

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

自家多血小板血漿及び自家骨髓血による
膝内側側副靱帯損傷の治癒促進に関する研究

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

青戸 克哉

目次

第1章	序論	3
1-1.	膝関節内側側副靱帯損傷について	
1-2.	骨軟部組織損傷に対する自家多血小板血漿について	
1-3.	骨軟部組織損傷に対する自家骨髓血について	
第2章	本研究の目的	9
第3章	自家多血小板血漿を用いた膝関節内側側副靱帯損傷治療の早期修復効果に関する研究	10
3-1.	目的	
3-2.	対象・群設定	
3-3.	方法	
3-4.	評価項目	
3-5.	結果	
3-6.	考察	
3-7.	小括	
第4章	自家多血小板血漿及び自家骨髓血を用いた膝関節内側側副靱帯損傷治療の早期修復効果に関する研究	16
4-1.	目的	
4-2.	対象・群設定	

4-3. 方法	
4-4. 評価項目	
4-5. 結果	
4-6. 考察	
4-7. 小括	
第5章 総括	26
5-1. 考察	
5-2. 結論	
図	29
表	48
謝辞	56
学会発表	57
引用文献	59
参考論文	

第 1 章 序論

1-1. 膝関節内側側副靱帯損傷について

スポーツに関連する外傷において、膝の靱帯損傷の発生率は非常に高く、膝関節の支持機構である内側側副靱帯 (Medial Collateral Ligament : 以下 MCL)、外側側副靱帯 (Lateral Collateral Ligament : 以下 LCL)、前十字靱帯 (Anterior Cruciate Ligament : 以下 ACL)、後十字靱帯 (Posterior Cruciate Ligament : 以下 PCL) のいずれか、または複数の損傷に伴う関節不安定性はスポーツ活動の継続に大きな影響を及ぼす。中でも膝関節外反・外旋不安定性の主制動因子である MCL は膝関節靱帯の中で最も損傷の頻度が高い[1]。

靱帯の損傷程度は 1～3 度に分類される (表 1)。MCL 単独損傷の治療は近年では保存療法が中心である。動物実験では Frank, Woo らは家兎 MCL を切断し放置して癒痕で治癒すると報告し[2]、臨床報告では Ginsburg と Ellsasser が 1978 年に中等度の MCL 損傷の患者に対し固定を行わず早期から筋肉訓練と可動域訓練を行い早期に回復したと報告した[3]。その後にも多くの臨床報告で MCL 単独損傷は手術的治療でなく保存療法、特に早期からの運動療法でよい成績が得られるとしている[4-6] が、損傷後 3 ヶ月においても力学的強度は正常よりも劣り[7]、損傷後 2 年を経過しても修復組織の 90% 以上のコラーゲン線維束径は正常より細いと報告されている[8]。3 度の損傷では脛骨付着部での剥離や関節内に靱帯が内翻しているような損傷では手

術が選択されることもある。膝関節の固定については動物実験では全く固定せず放置した群が固定群よりも早期に安定性を得られると報告があるが[9, 10]、臨床では疼痛や再受傷の予防等の理由で 1～2 週の外固定が行われることが多く[11]、そのためリハビリ期間の遅れが生じることとなる。

スポーツによる軟部組織損傷は機能や活動性の制限をもたらし、アスリート個人やチームにとって時間的損失を伴う。社会的にも2002年にはこれらの損傷により米国総保健支出のうち 158 億ドルが使用されたと推定されている[12]。Lundblad らはヨーロッパのプロフットボールチームにおいての試合中の MCL 損傷発生率はスポーツ活動 1000時間当たり 1.31 回、損傷後復帰までは平均 23 日を要したと報告している[13]。アスリートでは特に競技レベルが高くなるほど受傷から復帰までの期間を短縮することが望まれるが、従来の保存療法では治癒は主に自己の組織修復能力に依存するのみであり、侵襲が少なく、生体力学的修復を促進する治療が望まれている。

1-2. 骨軟部組織損傷に対する自家多血小板血漿治療について

多血小板血漿(Platelet Rich Plasma:以下 PRP)とは、自己血を遠心分離して形成される血小板を豊富に含んだ血漿層分画である。血小板内に含まれる α 顆粒は PDGF(platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor), IGF-1(insulin-like growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), EGF(Epidermal growth factor), FGF (Fibroblast growth factor)等の成長因子を含有しており[14]、これらの成長因子が骨

軟部組織損傷の創傷治癒の過程で重要な役割を示すことが明らかになっている。血小板 α 顆粒内に含まれる成長因子である PDGF、TGF- β 、VEGF、EGF の主な作用を表 2 に示す[15, 16]。1990 年代には靱帯損傷に対して様々な組み換え型成長因子単独もしくは併用での修復効果が研究され、いくつかの良好な結果も認められている[17-19]が、成長因子の適切な投与量は未だ不明で単独投与の場合は効果発現のために多量必要になることもあり、臨床的には生物学的安全性やコスト面の問題で使用されていない。

骨軟部組織に対する PRP 治療については 1990 年台に Marx らが顎顔面形成手術領域での有用性を報告[20, 21]して以来、歯科口腔外科領域での抜歯窩骨再生[22]、皮膚科・形成外科領域においての難治性潰瘍治療[23]などでの有用性が報告されている。その採取の容易さ、自家血から採取できるという安全性、コスト面での優位性から整形外科領域でも近年スポーツ医学分野を中心に急速に広まってきている[15, 22, 24]。靱帯、腱損傷に対する PRP の臨床的報告では上腕骨外上顆炎[25]、肩腱板損傷[26]、膝蓋腱炎[27]、アキレス腱付着部炎[28]等に対する有用性が報告されているが、効果に否定的な報告も散見される[29, 30]。

末梢血(peripheral blood : PB)由来 PRP(以下 PB-PRP)調整の手技に関しては、主に整形外科領域で使用されている市販の調整キットでは 2 回遠心後に白血球を含む層(buffy-coat)と血小板を抽出する buffy-coat based PB-PRP と 1 回遠心後に白血球を含めず血漿のみを抽出する plasma based PB-PRP の 2 つに大きく分けられる[31]。Buffy-coat based PB-PRP のほうがより高濃度の血小板を採取することが可

能であるが、buffy-coat を含むことにより白血球から放出されるプロテアーゼや活性酸素による炎症惹起により組織修復に抑制的に働くため plasma based PB-PRP が有用との報告もあり[32]、他方では buffy-coat は重要なサイトカインや酵素の供給源であり、またブドウ球菌や大腸菌の成長を有意に阻害する抗菌効果をもつとの報告もあり[33, 34]、その選択については未だ一定の見解は得られていない。

靱帯や腱への PRP の効果としては、最近の基礎的研究や動物実験では腱と腱細胞で遺伝子発現と基質合成に影響を及ぼすことが示されている。de Mos らは PRP 添加培地で培養された腱細胞では matrix metalloproteinase (以下 MMP)-1 と MMP-3 の増加を僅かに伴いながら、細胞増殖とコラーゲン産生が増加すると報告し[35]、Schnabel らはウマ浅指屈筋腱片を PRP 添加培地で培養し MMP-3 と MMP-13 の増加なく I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、軟骨オリゴマーマトリクス蛋白質 (cartilage oligomeric matrix protein: COMP) の遺伝子発現が増強したと述べている[36]。Wang らはヒト腱前駆細胞が PRP の添加により細胞増殖及びコラーゲン産生が活性化した[37]と報告した。In vivo の報告では Dallaudiere らはラットの膝蓋腱、アキレス腱損傷モデルに PRP を注入し、組織評価にて局所への毒性をもたず腱癒合を促進したと述べた[38]。Xie らはイヌ ACL 再建モデルにおいて PRP が血管新生と神経再支配を修飾する可能性を示唆[39]するなど、腱損傷の修復に PRP が有効である可能性が示されている。

1-3. 骨軟部組織損傷に対する自家骨髄血について

骨髄には造血系細胞 (hematopoietic cell) と骨髄基質細胞 (bone marrow stromal cell) がある。骨髄には多分化能を有する幹細胞があり、造血系細胞に分化する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) と、骨髄基質細胞に分化する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) が存在する。骨髄間葉系幹細胞は抗炎症作用や抗アポトーシス作用などの多様な能力を持ち、適切な条件下において骨芽細胞 (osteoblasts)、軟骨細胞 (chondrocytes)、腱細胞 (tenocytes)、脂肪細胞 (adipocytes) などの間葉系細胞に分化、増殖する可能性をもち[40, 41]、また臨床応用を考慮した場合は骨髄穿刺により採取した骨髄血 (Bone marrow aspirate: 以下 BMA) から容易に採取することができるという利点を持つ。BMA、骨髄間葉系細胞は骨軟部組織損傷の再生を促進する cell therapy のソースとしての応用が報告されており、Watanabe らは骨髄由来の有核細胞に靱帯治癒を強化し、再生の媒体となる能力がある可能性を報告[42]し、Kim らは家兎 PCL 損傷に対する BMA 投与により、組織学的に改善を認めたと述べている[43]。Murphy らはヤギ変形性膝関節症モデルにおいて BMA から分離、培養した間葉系幹細胞を関節内に投与し、半月板の再生と関節症変化の遅延が見られたと報告した[44]。

PRP と BMA との併用については、In vivo において骨髄間葉系細胞に PRP を添加することにより、間葉系細胞の分化・増殖を促進することが報告されている[45, 46]。臨床報告では Campbell らは軟部組織損傷に BMA と PRP を同時に使用することにより軟部組織損傷治癒を促進したとの報告[47]し、BMA に含まれる間葉系幹細胞

胞の腱細胞や軟骨細胞への分化・増殖がPRPにより修飾されたと考察している。しかし Martinello らは羊の深指屈筋腱損傷モデルの治療における末梢血由来間葉系間質細胞とPRPの投与において組織学的評価では併用による促進効果は認めなかったと報告[48]しており、PRPと前駆細胞を同時移植する方法については効果、手技について議論の余地は多い。

第 2 章 本研究の目的

前述のように PRP 及び BMA は骨軟部組織損傷に対する修復効果を有することが示唆されているが、その効果、手技については議論の余地は多い。特に、スポーツ外傷における膝靱帯損傷治癒に対する PRP 及び BMA の効果を生体力学的に評価した研究の報告はない。本研究の仮説は「家兎 MCL 損傷に対しての PRP 及び BMA の局所投与は損傷組織の早期修復を促す」とした。

本研究の目的は、以下の2つである。

- ①家兎 MCL 損傷に対する PRP 投与による組織修復効果を生体力学的に検討する。
- ②家兎 MCL 損傷に対する PRP 及び BMA 混合投与による組織修復効果を生体力学的、組織学的に検討する。

第 3 章

実験 1 自家多血小板血漿を用いた膝関節内側側副靱帯損傷 治療の早期修復効果に関する研究

本研究は筑波大学動物実験取り扱い規定に従い、動物実験委員会の承認を得て行った。

3-1. 目的

「PRP の局所投与が膝 MCL 損傷の修復過程を促進する」という仮説を家兎 MCL を用いて生体力学的に証明すること。

3-2. 対象・群設定

日本白色家兎雌 31 羽（北山ラベス、長野）、平均体重 3.1kg を使用した。左後肢膝関節 MCL に鈍的断裂を作製し、断裂部に PRP を投与する PRP 群 17 羽、コントロール群 14 羽の 2 群を作成した（表 3）。各群とも術後 3 週及び 6 週に安楽死させ生体力学的評価(n=21),組織学的評価(n=10)を行なった。

侵襲を伴う処置は塩酸ケタミン(1.0ml/kg)および塩酸キシラジン(0.4ml/kg)の筋肉内注射による全身麻酔下に行い、安楽死はペントバルビタールナトリウムの血管内注射により施行した。

3-3. 方法

3-3-1. PRP 抽出

3.8% trisodium citrate 含有採血管 3 本(5ml/本)に 18 ゲージ針による心臓採血により計 20ml の自家血を回収し, PRGF (Plasma Rich in Growth Factors) システムⅢ (BTI 社, Spain: 図 1)を用いて 1 回遠心法(460g : 1800 rpm, 8 分間)にて遠心した。血漿層を fraction1(以下 F1:血漿の上層 1000μl)、fraction2(以下 F2:血漿の中間層 500μl+α)、fraction3(以下 F3:血漿の下層 500μl)の 3 層(図 2)に分けてマイクロピペットを用いて分離回収した。血小板が最も多く、かつ白血球を含まない血漿層(plasma based PB-PRP)である F3 を PRP とした。作成した PRP1ml をガラス皿に移し 10% 塩化カルシウムを 50μl 加え活性化・ゲル化し(図 3)、MCL 断裂部に投与した。

3-3-2. 内側側副靱帯断裂モデル作成

Weiss の方法[7]に準じ左後肢膝関節 MCL に鈍的断裂を作製した。MCL 長軸方向に沿って皮膚と筋膜を切開して膝関節の高位を確認し、MCL を関節高位で露出させ同部に径 2.5mm の金属製ロッドを挿入(図 4-A)し引っ張り、MCL を断裂させた(図 4-B)。PRP 群には断裂部に活性化・ゲル化した PRP1.0ml を局所投与し(図 4-C)、コントロール群は断裂部を放置し、筋膜と皮膚を縫合した。

3-4. 評価項目

3-4-1. 血算・成長因子濃度

全血及び F1・F2・F3 各層の血小板・白血球・赤血球濃度を測定し、血小板数の全血に対する濃縮率を算出した(MEK-6358 Celltac α 日本光電、東京)。

残った F3 検体はマイクロチューブにて-80 度で保管した。解凍後 10,000rpm10

分間遠心し、上清を採取し enzyme-linked immunosorbent assay kits (Quantikine colorimetric ELISA kits, R&D systems、Minneapolis, MN, USA)を用いて PDGF-BB, TGF- β 1 濃度を測定した。

3-4-2. 生体力学的評価

術後 3 週・6 週での安楽死時に左下肢を股関節で離断し、生理食塩水に浸したガーゼで覆いフリーザーバックにて-80 度で保存した。力学的試験の 24 時間前より室温で解凍した。MCL を除いた軟部組織を切除し、大腿骨・脛骨共に膝関節高位より 5cm の位置で骨切し、大腿骨-MCL-脛骨複合体を作成した(図 5)。大腿骨-MCL-脛骨複合体をインストロン型引張試験機 (Autograph AG-X、島津製作所、京都：図 6-A)に設置し(図 6-B), 33mm/min, 室温で破断させ最大荷重と剛性値を計測した。統計は多変量分散分析(multivariate analysis of variance; MANOVA)、多重比較 (LSD 法)を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

3-4-3. 組織学的評価

組織学的評価群は膝関節内側に長軸方向に皮膚と筋膜切開し MCL を露出し肉眼所見を確認し、断裂部を架橋する瘢痕組織と共に採取した。採取した組織は 10%ホルマリン液にて固定しパラフィン包埋ブロックを作成した。靱帯の長軸方向に 4 μ m 厚の薄切標本を作成し、細胞密度を評価するために Hematoxylin-eosin(以下 HE)染色を行った。また血管密度の評価のため血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 抗体(Dako, 京都)を用いて手順書に従い免疫染色を行った。全ての切片の観察は光学顕微鏡 (BX51、オリンパス社、東京)を用いて行った。

細胞密度の計測は Murray らの方法[49]を参考にし、400 倍で靱帯再生部を撮影し、1 名の検者が抽出した任意の 5 視野(200×200μm)の細胞数を別の 2 名の検者がカウントした。

血管密度の計測は Ju らの方法[50]を参考にし、100 倍で鏡検し 2 名の検者がそれぞれ任意の血管密度が高いと思われる 3 視野を選び 5x5mm 四方グリッド(Olympus U-OCMSQ5/5)内の血管数をカウントした。

3-5. 結果

3-5-1. 血算・成長因子濃度

血小板濃度は全血, PRP: 22.3×10^4 , $39.5 \times 10^4/\mu\text{l}$ で F3 層の血小板濃縮率は 1.77 倍であった。F3 層に白血球は含まれておらず、赤血球数は $0.2 \pm 0.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ だった。

PDGF-BB, TGF- β 1 は 0.43 ± 0.14 , $2.76 \pm 1.83 \text{ ng/ml}$ であった。(表 4)

3-5-2. 生体力学的評価

破断試験により、各群とも断裂は再生靱帯の近位端で生じた。最大荷重(図 7)は PRP 群 6 週で PRP 群 3 週およびコントロール群 3・6 週と比較し有意に高値($p < 0.05$)であった。剛性値(図 8)は PRP 群 6 週で PRP・コントロール各群 3 週と比較し有意に高値($p < 0.05$)であったが、コントロール群 6 週とは有意な差を認めなかった($p = 0.09$)。

3-5-3. 組織学的評価

肉眼的には各群とも靱帯断裂部が再生しており連続性を認め、3 週の肉眼所見

で PRP 群とコントロール群の間に差を認めなかった。手術創部の感染所見は認めなかった。

組織学的所見では HE 染色(図 9A-D)において靱帯再生部は線維芽細胞と血管炎症細胞で満たされており、細胞密度は両群とも 3 週で高く、PRP 群は 6 週で密度の低下が観察された(表 5)。

CD31免疫染色(図9E-H)では血管密度はPRP群3週で最も高く、6週では低下していた。コントロール群3週で最も血管密度が低く、6週では増加していた(表5)。

3-6. 考察

靱帯損傷の治癒過程は出血期、炎症期、増殖期、再構築期の 4 つに分けられる [2, 8]。出血期は組織の損傷と共に血管が破壊され出血が生じ、受傷後数分から数時間の間に血小板が凝集され血栓が形成される。炎症期は受傷後数時間から数日の期間に好中球や単球が創へ遊走し、線維芽細胞が出現する。増殖期は受傷後数日から数週の間で線維芽細胞から I 型コラーゲンをはじめ、プロテオグリカン、エラスチンなどが形成され、また線維芽細胞、血管内皮細胞などが活発な細胞増殖を行い肉芽組織が形成される。また組織中には盛んに血管が新生され、好中球、マクロファージ、線維芽細胞や成長因子が損傷部位に集積するための重要なルートとなる[51]。再構築期には数週から数年の間に起こり形成された肉芽組織が吸収され膠原線維に置換され、その量の増加や配列の改善が見られる。

本実験での組織学的評価においては PRP 群では 3 週で細胞密度、血管密度が高く 6 週では減少の傾向が見られた。一方でコントロール群では血管密度が 3 週から

6 週にかけて増加の傾向が見られており、PRP 群での血管新生が早期に生じていた。PRP は、MCL 断裂の直後に一度だけ局所に投与されており、靱帯治癒過程における出血期と炎症期、増殖期の初期に作用し線維芽細胞の出現や血管新生が促進されたと考えられた。

Schrive らは癒痕組織の欠損・傷 (flaws) の量がウサギ MCL 損傷モデルでの生体力学特性と反比例すると報告した[52]。本実験においても組織の修復が進行するにつれて生体力学的特性が改善し、6 週での最大荷重は PRP 群で有意に高く、PRP 投与による修復効果が認められた。

本実験で使用した PRP は plasma based PB-PRP であり、Anitua らが提唱した PRGF システムの手順[53]に沿って作成した。PRGF システムでは PRP の血小板濃度は 300,000/ μ l 以上であることを定義している[54]が、本実験での平均は 395,000/ μ l であり PRP として認められる値であった。

本実験での課題としては、組織学的評価に用いたサンプル数が小さいことがあげられる。そのため、統計学的評価を行うことができず、傾向のみしか評価できなかった。

3-7. 小括

PRP の家兎 MCL 損傷への投与は、6 週での修復 MCL の最大荷重を有意に改善し生体力学特性に影響を与え、早期修復に寄与する有用な治療法になると示唆された。

第 4 章

実験2 自家多血小板血漿及び自家骨髓血を用いた膝関節 内側側副靱帯損傷治療の早期修復効果に関する研究

本研究は筑波大学動物実験取り扱い規定に従い、動物実験委員会の承認を得て行った。

4-1. 目的

実験 1 にて PRP の家兎 MCL 損傷への投与が、6 週での修復 MCL の生体力学特性に影響を与え、早期修復に寄与する可能性が示唆された。

本実験では家兎 MCL 損傷に対して PRP 及び自家 BMA を同時に投与することで、BMAに含まれる間葉系幹細胞の線維が細胞への分化・増殖がPRPにより修飾されることを期待し、その組織修復効果を生体力学的、組織学的に検討することを目的とした。

4-2. 対象・群設定

日本白色家兎（東京実験動物、東京）雌 40 羽、平均体重 3.1kg を使用した。実験1と同様に後肢膝関節 MCL に鈍的断裂を作製した。左後肢断裂部に PRP を投与する PRP 群 20 羽、左後肢断裂部に PRP 及び BMA を混合投与した混合投与群 20 羽、右後肢に断裂作成し放置したコントロール群 20 羽、右後肢 MCL の展開のみ行い靱帯損傷は作成しなかったシャム手術群の 4 群を作成した（表 6）。術後 3 週及び 6

週に安楽死させ生体力学的評価,組織学的評価を行なった。術後に右後肢シャム手術群、左後肢 PRP 群の 1 羽が死亡した。

侵襲を伴う処置は塩酸ケタミン(1.0ml/kg)および塩酸キシラジン(0.4ml/kg)の筋肉内注射による全身麻酔下に行い、安楽死はペントバルビタールナトリウムの血管内注射により施行した。術後疼痛対策としてフルニキシンメグルミンを 1.1mg/kg で 12 時間毎、術後 72 時間まで皮下注射にて投与した。

4-3. 方法

4-3-1. PRP 抽出

3.8% trisodium citrate 含有採血管 2 本(5ml/本)に 21 ゲージ針による心臓採血により計 10ml の自家血を回収し、実験1と同様に PRGF システムⅢを用いて 1 回遠心法(460g : 1800 rpm, 8 分間)にて遠心した。血漿層を fraction1(以下 F1:血漿の上層 1000 μ l+ α)・fraction2(以下 F2:血漿の下層 1000 μ l)の 2 層に分けてマイクロピペットを用いて分離回収し、F2 を PRP とした。作成した PRP1ml をガラス皿に移し 10% 塩化カルシウムを 50 μ l 加え活性化・ゲル化した。

4-3-2. 骨髓血採取

上後腸骨棘に 18G 針で開孔し、陰圧を強くかけて BMA を 2.5ml 採取した。1.0ml を混合投与群の MCL 損傷部位投与に、1.0ml は colony forming assay に、0.5ml を血算測定に使用した。

4-3-3. 内側側副靱帯断裂モデル作成

実験 1 と同様に Weiss の方法[7]に準じ後肢膝関節 MCL に鈍的断裂を作製し

た。PRP 群には断裂部に活性化・ゲル化した PRP1.0ml を局所投与し(図 10-A)、混合投与群は活性化した PRP1.0ml と BMA1.0ml を混合し投与(図 10-B)、コントロール群は断裂部を放置し(図 10-C)、シャム手術群は MCL の展開のみ行った(図 10-D)。

4-4. 評価項目

4-4-1. 血算

全血及び F1・F2 各層の血小板・白血球・赤血球濃度を測定し、血小板数の全血に対する濃縮率を算出した(MEK-6358 Celltac α)。

4-4-2. 骨髓血評価

BMA の血小板・白血球・赤血球濃度を測定した(MEK-6358 Celltac α)。

BMA を使用して colony forming assay を行い、注入した BMA に含まれる未分化間葉系細胞(幹細胞)数を算定した[55]。500μL の BMA を phosphate-buffered saline(以下 PBS)で 2 回洗浄し、Dulbecco's modified eagle's medium (以下 DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)、10%牛胎児血清(fetal bovine serum, 以下 FBS; Sigma)、1%抗生物質(antibiotic-antimycotic; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で構成した培地と混合した。6 well cell culture cluster (Costar, Corning, NY, USA)の各穴に播種し、37 度、5%二酸化炭素の環境下で 14 日間培養した。培地は 1 週間に 2 回交換した。14 日後にメタノールで溶解した 0.5% crystal violet(Sigma)で 5 分間染色し、洗浄の後直径 2mm 以上のコロニー数 (Colony-forming unit fibroblastic; 以下 CFU-Fs)を計測し、BMA1ml 当たりの

CFU-Fs、有核細胞 10^6 個中の CFU-Fs 出現率を算出した。

4-4-3. 生体力学的評価

実験 1 と同様に術後 3 週・6 週の大腿骨-MCL-脛骨複合体をインストロン型引張試験機 (Autograph AG-X) に設置し、33mm/min、室温で破断させ最大荷重と剛性値を計測した。統計は二元配置分散分析、多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

4-4-4. 組織学的評価

組織学的評価群は膝関節内側に長軸方向に皮膚と筋膜切開し MCL を露出し肉眼所見を確認し、断裂部を架橋する癒痕組織と共に採取した。採取した組織は 10%ホルマリン液にて固定しパラフィン包埋ブロックを作成した。靱帯の長軸方向に 4 μ m 厚の薄切標本を作成し、HE 染色、CD31 免疫染色を行った。また増殖細胞の評価のために抗 proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA)モノクローナル抗体 (Dako)を用いて免疫染色を行った。

細胞密度及び血管密度の計測は実験 1 と同様に行った。

細胞増殖能の評価は Nakajima らの方法[56]を参考にし、400 倍で靱帯再生部を撮影し、抽出した任意の 5 視野 (100 \times 100 μ m) の全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の比率を PCNA score として百分率で表した。

切片の観察は光学顕微鏡 (DP80、オリンパス) を用いた。統計は二元配置分散分析、多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

4-5. 結果

4-5-1. 血算

採取した 40 羽のうち、血算測定前に PRP 検体が凝固した 5 羽を除いた 35 羽の検体を対象とした。

血小板数は全血, PRP: $33.5 \pm 11.5 \times 10^4$, $35.9 \pm 35.9 \times 10^4/\mu\text{l}$ で F2 層の血小板濃縮率は 1.07 倍であった。F3 層の白血球は $0.2 \pm 0.4 \times 10^2/\mu\text{l}$ 、赤血球数は $0.0 \pm 0.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ だった (表 7)。

4-5-2. 骨髓血評価

BMA 中の白血球数は $222.4 \pm 98.2 \times 10^2/\mu\text{l}$ 、血小板数は $4.7 \pm 3.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ だった。CFU-Fs 濃度は $88.5 \pm 135.8/\text{ml}$ 、CFU-Fs 出現率は $3.6 \pm 4.9/10^6$ nucleated cells だった(表 8)。

4-5-3. 生体力学的評価

破断試験により、PRP 群、混合投与群、コントロール群は再生靱帯の近位端で断裂が生じた。シャム群では 3 週の 2 例で脛骨付着部から靱帯剥離し、3 週の 1 例と 6 週の 1 例において大腿骨遠位成長軟骨部で離開した。

最大荷重(N)は 3 週で PRP 群、6 週で混合投与群が高い傾向があるも、PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった(図 11)。剛性値(N/mm)においても 3 週で PRP 群、6 週で混合投与群が高い傾向があるも PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった(図 12)。

4-5-4. 組織学的評価

肉眼的には各群とも靱帯断裂部が再生しており連続性を認め、3 週の肉眼所見

で PRP 群、混合投与群とコントロール群の間に差を認めなかった(図 13)。手術創部の感染所見は認めなかった。

組織学的所見では HE 染色(図 14)において細胞密度は全ての群で 3 週が 6 週に比べ有意に細胞密度が高かった。3 週では混合投与がコントロール群より有意に高かったが 6 週では PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった。シャム手術群は 3 週、6 週とも他群に比べ有意に密度が低かった(図 15)。

CD31免疫染色(図16)での血管密度は、3週ではPRP群が混合投与、コントロール、シャム手術の各群よりも有意に血管密度が高かった。6週ではPRP群では密度が減少し混合投与群がコントロール群、シャム手術群に比べて有意に高くなった。PRP群、シャム手術群では3週から6週にかけて血管密度が有意に減少した(図17)。

PCNA免疫染色(図18)ではPRP群3週・6週及び混合投与群3週・6週がそれぞれシャム手術群3週・6週に比べ有意にPCNAスコアが高かったが、PRP群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった。また各群とも同群の3週・6週間では3週のPCNAスコアが高値であったが有意差は認めなかった(図19)。

4-6. 考察

本実験においては多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞を含有するBMAをPRPと同時に投与することで、治癒過程における炎症期の線維芽細胞や血管内皮細胞の出現を促進し、線維芽細胞からコラーゲンなどの細胞外基質が早期に産生され、生体力学特性が改善されることを期待した[45-47]。結果は生体力学的評価では最大荷重、剛性値のいずれにおいても PRP 投与群と PRP 及び混合投与群との間に有意差

は認められず、BMA 混合による相乗効果は認めなかった。また、実験 1 では有意差が認められた PRP 群とコントロール群との間にも有意差が生じなかった。しかしこれは実験 1 と実験 2 では手術が片側と両側であり、また術後疼痛対策としてフルニキシンメグルミンを術後 72 時間まで皮下注射にて投与しており、術後に手術を施行した下肢にかかる力学的ストレスが異なることが予想され、実験モデルが異なるため単純な比較はできない。また最も大きな違いとして PRGF システムの臨床的使用プロトコールの変更に伴い PRP 抽出のプロトコールも変更しており、実験 2 の方が実験 1 に比べて 1 スピッツあたりの回収量が増加しており、結果としてより血小板濃度が比較的低い部分まで PRP として回収している。本実験での PRP の血小板濃度は平均 359,000/ μ l で Anitua らの PRP 基準[54]は達成していたが、末梢血に対する血小板濃縮率は平均 1.07 倍であり実験 1 よりも低値であった。Weibrich らは buffy-coat based PB-PRP を用いて、骨再生に至適な血小板濃度が 503,000 から 1,729,000/ μ l であり、 3.8×10^5 / μ l 以下では効果が減弱し、 1.8×10^6 / μ l 以上であると逆に抑制的に働くと報告[57]している。Plasma based PB-PRP では buffy-coat based PB-PRP に比べて遠心分離手技の違いから濃縮率は低下することが多く、本研究で使用した PRGF システムでの濃縮率は平均 2-3 倍とされており[58]、自験例でのヒト標本を使用した実験での濃縮率は 1.72 ± 0.54 倍であり(9th Biennial ISAKOS Congress, Toronto, 2013 にて発表、現在投稿中)、本研究ではそれらの結果よりも低い濃縮率である。本実験でのいくつかの検体においては PRP 生成において血小板数が少なく、結果として成長因子量が減少し、効果が減弱した可能性があり、実験 1 で示したように PRP の

血小板濃縮率を高めることで PRP 単独投与での力学的改善を期待できると考えられた。本研究で使用した PRGF システムのプロトコールは遠心器の回転数を含めてヒトに使用するために設定しており、ウサギの血小板数や大きさがヒトとは異なるため濃縮率が低下した可能性があり、今後実験を行う際にウサギに適合したプロトコールを再設定する必要がある。

組織学的評価では Kim らは家兎 PCL 断裂モデルに対して BMA 投与を行い、8 週の時点でコントロール群に比べ BMA 投与群が正常化しており、8 週以前にすでに治癒機転に差が生じていることを示唆している[43]。本研究での細胞密度は全ての群において 3 週で高く、時間の経過と共に減少した。特に混合投与群はコントロール群と比較して 3 週の細胞密度は有意に高く、また PCNA 染色で細胞増殖能を評価したが、PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認められず、いずれの群も細胞の増殖能では差がなかった。6 週に比べて 3 週が細胞密度、PCNA スコアが高値であることは本実験の 3 週から 6 週にかけての経過が治癒過程における増殖期から再構築期への変化をみていることを表していると考えられる。また細胞増殖能に差を認めないにもかかわらず混合投与群 3 週での細胞密度が増加したことから、BMA の局所投与により細胞密度が増加した可能性はあると考える。BMA における有核細胞 10^6 個中の CFU-Fs 出現率は Sakai らのヒト BMA での報告[55]では $2.65/10^6$ nucleated cells であり、本研究での出現率 $3.6 \pm 4.9/10^6$ nucleated cells は遜色ない値である。しかし本研究では、濃縮や培養を加えていない BMA を直接 1ml 移植しており、そこに含まれる間葉系幹細胞数は CFU-Fs 数から算出すると平均 $88.5 \pm 135.8/\text{ml}$ と少数である。

期待した相乗効果が得られなかった要因として、細胞数の絶対量の不足が考えられる。間葉系幹細胞移植が再生医療の細胞源として多く使用されてきた骨形成において移植する間葉系幹細胞数と効果に関しての相関には相反する意見があり、Connolly らは、偽関節に対し、ドリリングに加え自家 BMA を注入した研究において、採取した BMA を遠心分離にて単核細胞層のみを分離したものとし、その骨癒合に与える効果に有意な差はなかったと述べている[59]。一方、Ohgushi らは、HA ブロックをラットの背中に皮下挿入し、その周囲に培養した骨髄血幹細胞を移植した。移植細胞数が多いほど良好な骨形成を生じ、少なれば骨形成は生じなかったと報告しており[60]、今後 BMA の濃縮の有無による効果の比較検討も必要と考える。

また本実験で使用した plasma based PB-PRP は buffy-coat を除くことにより白血球による炎症惹起等の可能性を除去したシステム[32]であり、血小板濃度は buffy-coat based PB-PRP に比べ低濃度である。そこに白血球が $222.4 \times 10^2 / \mu\text{l}$ と高濃度に含まれ、血小板濃度が $4.7 \times 10^4 / \mu\text{l}$ と低濃度の BMA を混合投与することにより血小板濃度が低下し、plasma based PB-PRP の利点である純粋な成長因子の供給源としての役割[22, 54]を果たすことができなかったことも、相乗効果が得られなかった要因の一つと考えられた。

本実験において血管密度は早期には PRP 群が他群よりも有意に高かった。PRP に含まれる種々の成長因子のうち、特に VEGF は主に血管内皮細胞の増殖を始めとして血管新生に働くことが知られており[61]、PRP 投与により血管新生が促されることで組織修復促進に寄与することが示唆された。

本実験での課題としては各群の検体数が少ないこと、先述のように PRP の血小板濃縮率が低値であったことがあげられるが、PRP に BMA を加えることによる相乗効果については評価に値したと考える。

4-7. 小括

PRP と骨髓間葉系幹細胞を含む BMA を家兎 MCL 損傷に同時に投与することで、生体力学的特性が改善されることを期待したが、相乗効果は得られなかった。PRP 単独の投与により血管新生が促進され、組織修復に寄与する主な要因となることが示唆された。

第 5 章 総括

5-1. 考察

MCL 損傷は膝関節靱帯損傷の中で最も損傷の頻度が高い[1]。現在の治療法では X 線検査において13%の患者に初期の変形性関節症の徴候を認めたと報告されている[62]。靱帯の治癒を促進し、リハビリの期間を短縮し、スポーツへの早期復帰のみならず、関節安定性を増加することで損傷後の変形性関節症変化を防ぐことが望まれる。

PRP は広義には全血を遠心分離して得られる血小板を多量に含有する血漿分画と定義される[31]。これまで成長因子単独もしくは複合の局所投与による MCL 修復促進の試みがなされてきた。主に用いられたのは TGF- β 、PDGF、FGF2、EGF など、Hildebrand、Letson らはウサギ MCL 損傷モデルへの PDGF 単独での投与により力学的改善を認めたと報告した[19, 63]。Batten らも損傷直後に PDGF を投与することでの修復効果を報告した[64]。一方で Spindler らは PDGF と TGF- β 2 の組合せでの投与が生体力学的特性に改善をもたらさないこと、TGF- β の慢性投与で力学的に低下することを報告した[65, 66]。外因性の投与により効果が見られたのは PDGF、FGF2 の単独投与のみであり、混合投与による効果は認めなかった。効果はいずれも投与後 6 週までの短期においてのみ見られており、長期にわたって修復の促進を維持した報告はない。ただ、これらの研究は生体内で起こっている生理的修復機転のごく一部の断面をみているに過ぎず、修復過程においては多くの生理活性物質が

絶妙のタイミングでお互いに影響しながら効果発現されていると考えられ、それぞれの生理活性物質の単独投与または混合投与の選択、時期、投与量、投与方法等不明の点が多い[67]。本研究にて検討した PRP 治療の本態は濃縮血小板 α 顆粒内の様々な成長因子と血漿に含まれる成長因子や接着因子・糖たんぱくが、それぞれを単独での投与でなく生体内でのバランスを保った状態で複合的に組織に作用することによるものと考えられている[15]。成長因子単独での投与は安全性やコストの問題で臨床的には用いられていないが、PRP は自家血から容易に採取できるという安全性、コスト面での優位性から急速に広まってきている。本研究実験 1 では膝 MCL 損傷に対する PRP 局所単独投与の有用性が示唆され、スポーツへの早期復帰を目指すアスリートに対しての PRP 治療を支持する結果であった。

Lim ら[68]や Ouyang ら[69]は ACL 再建術の動物実験において、BMA から分離培養された骨髄間葉系幹細胞を投与して移植腱と骨の固着が改善すると報告したが、Silva ら[70]は臨床試験において培養ではなく BMA を遠心分離して採取した、BMA 由来の buffy-coat based PRP を投与し MRI での評価において移植腱と骨の固着に改善を認めなかったと報告している。本実験においても BMA から骨髄間葉系幹細胞を分離培養し投与することで、移植細胞数の確保、過剰な白血球や赤血球の除去が可能となり効果の改善が期待できる可能性はあるが、組織採取から培養にかかる期間が必要となるため、本来の目的であるスポーツ外傷での治癒促進・早期復帰には帰着せず、臨床的意義は少ないと考える。

5-2. 結論

家兎 MCL 損傷に対する PRP 投与は生体力学特性に影響を与え、早期修復に寄与する有用な治療法になると示唆された。

一方で家兎 MCL 損傷に対する PRP 及び BMA 混合投与では生体力学特性は改善せず、混合投与による相乗効果は得られなかった。



図 1. PRGF (Plasma Rich in Growth Factors) システムⅢ(BTI 社, Spain)遠心器

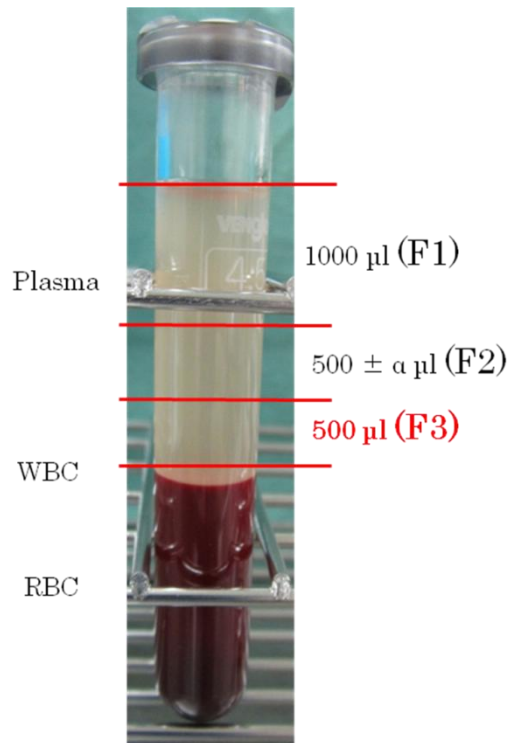


図 2. PRP 抽出

fraction1(F1:血漿の上層 1000 μ l)

fraction2(F2:血漿の中間層 500 + α μ l)

fraction3(F3:血漿の下層 500 μ l)の 3 層に分離し抽出

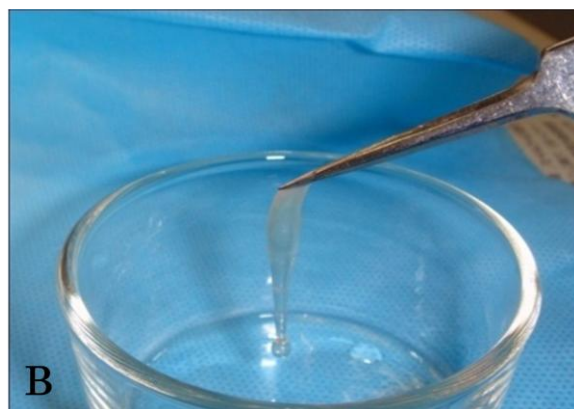


図 3. 塩化カルシウムによる活性化

A; 塩化カルシウム B; PRP 活性化後

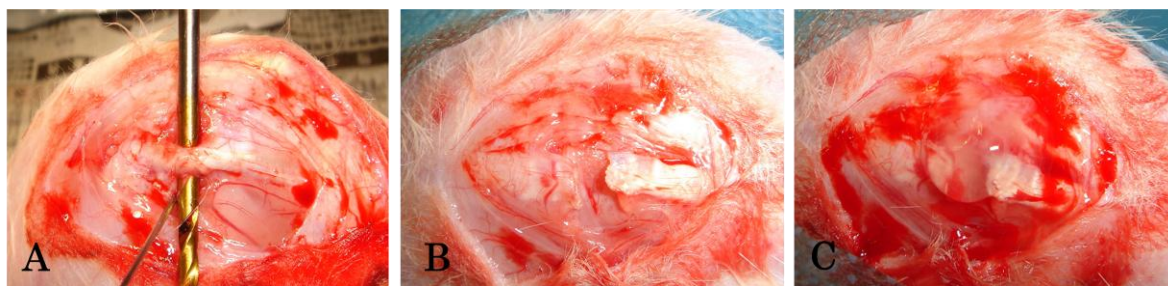


図 4. MCL 断裂モデル作成

A; MCL を露出し関節高位で径 2.5mm のロッドを挿入

B; ロッドを引っ張り MCL 鈍的断裂作成

C; 断裂部に活性化・ゲル化した PRP1.0ml を局所投与



图 5. 大腿骨-MCL-脛骨複合体

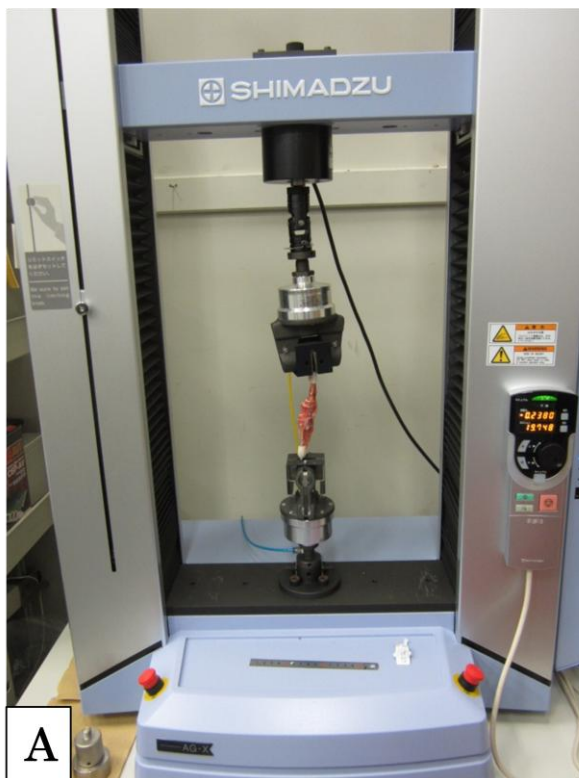


図 6. 生体力学的試験

A; インストロン型引張試験機(Autograph AG-X, 島津製作所、京都)

B; 大腿骨-MCL-脛骨複合体をインストロン型引張試験機に設置

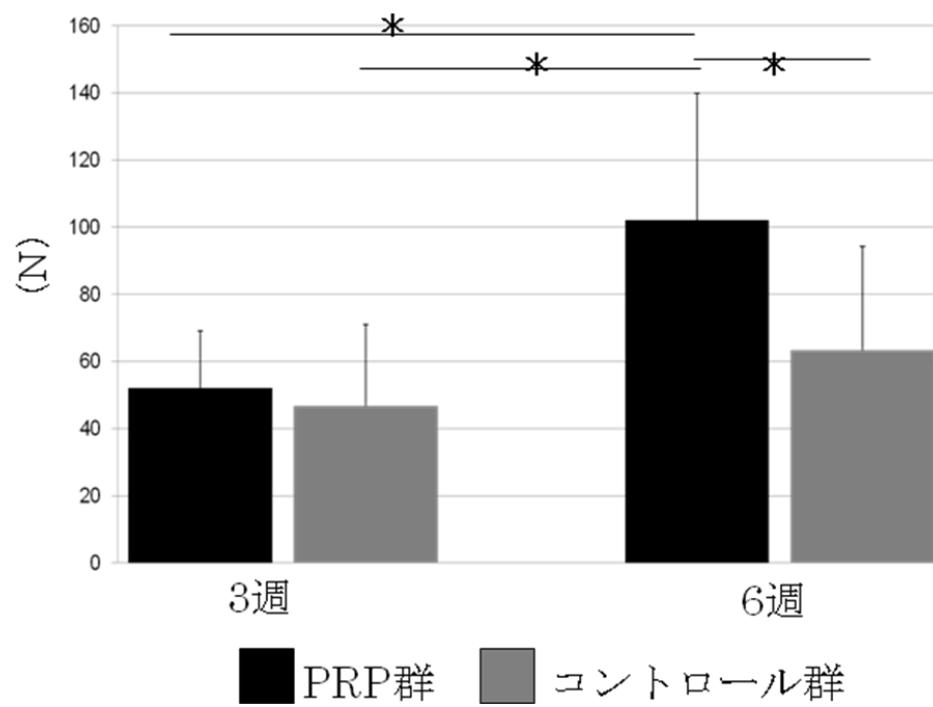


図 7. 最大荷重(N)

PRP 群 6 週で PRP 群 3 週およびコントロール群 3・6 週と比較し有意に高値 ($p<0.05$)

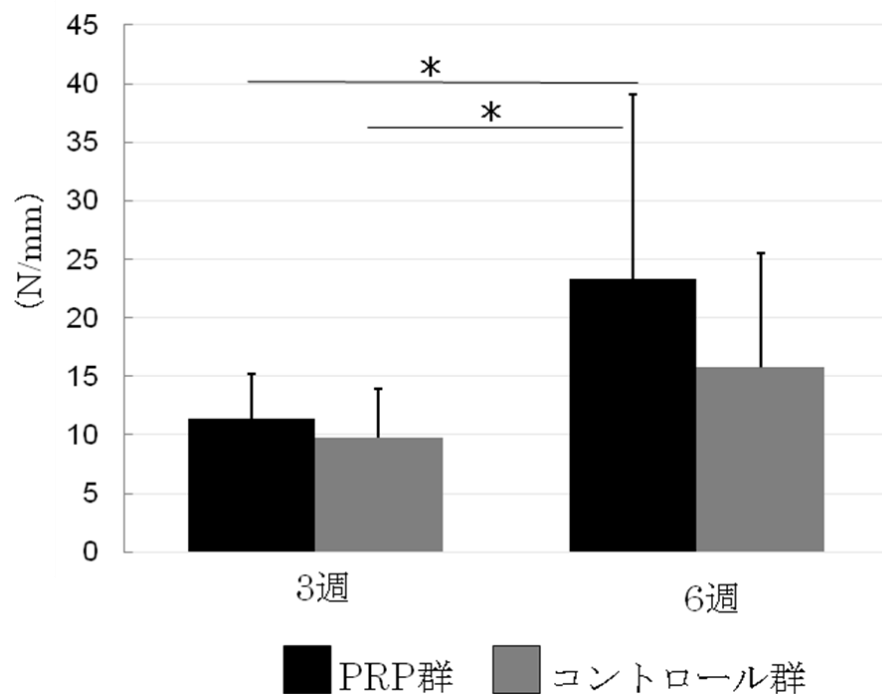


図 8. 剛性値(N/mm)

PRP 群 6 週で PRP 群 3 週・コントロール群 3 週と比較し有意に高値 ($p<0.05$) であったが、コントロール群 6 週とは有意な差を認めなかった ($p=0.09$)

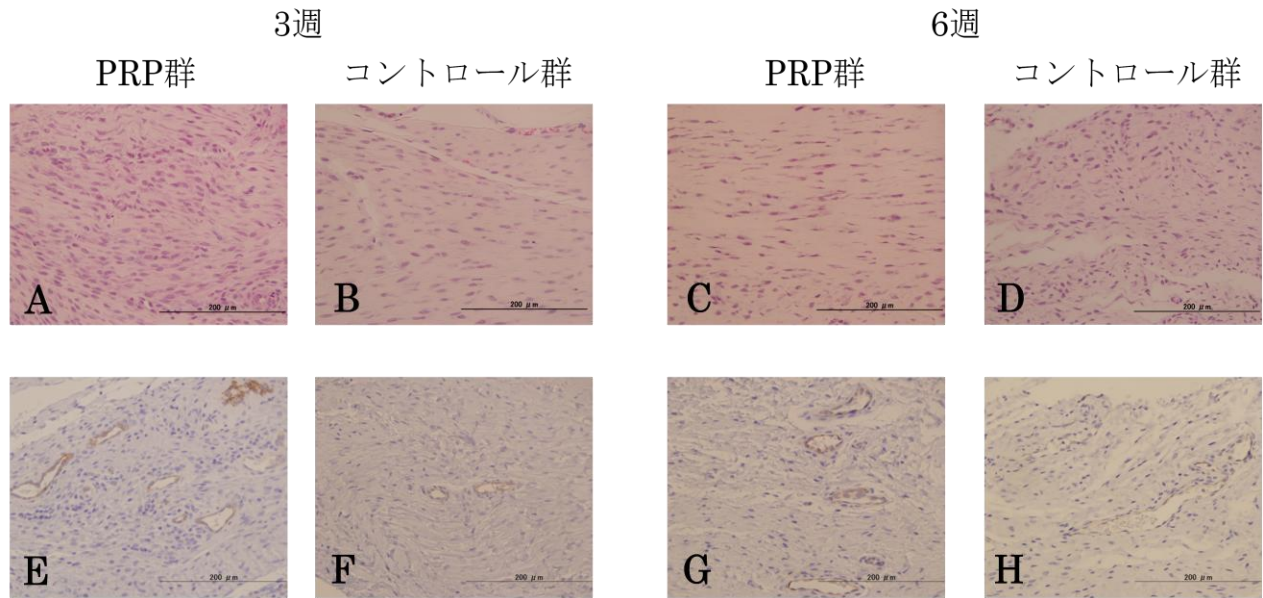


図 9. 組織学的所見

A,B,C,D: HE 染色 E,F,G,H: CD31 免疫染色

A,E: PRP 群 3 週 B,F: コントロール群 3 週

C,G: PRP 群 6 週 D,H: コントロール群 6 週

Scale bar 200μm

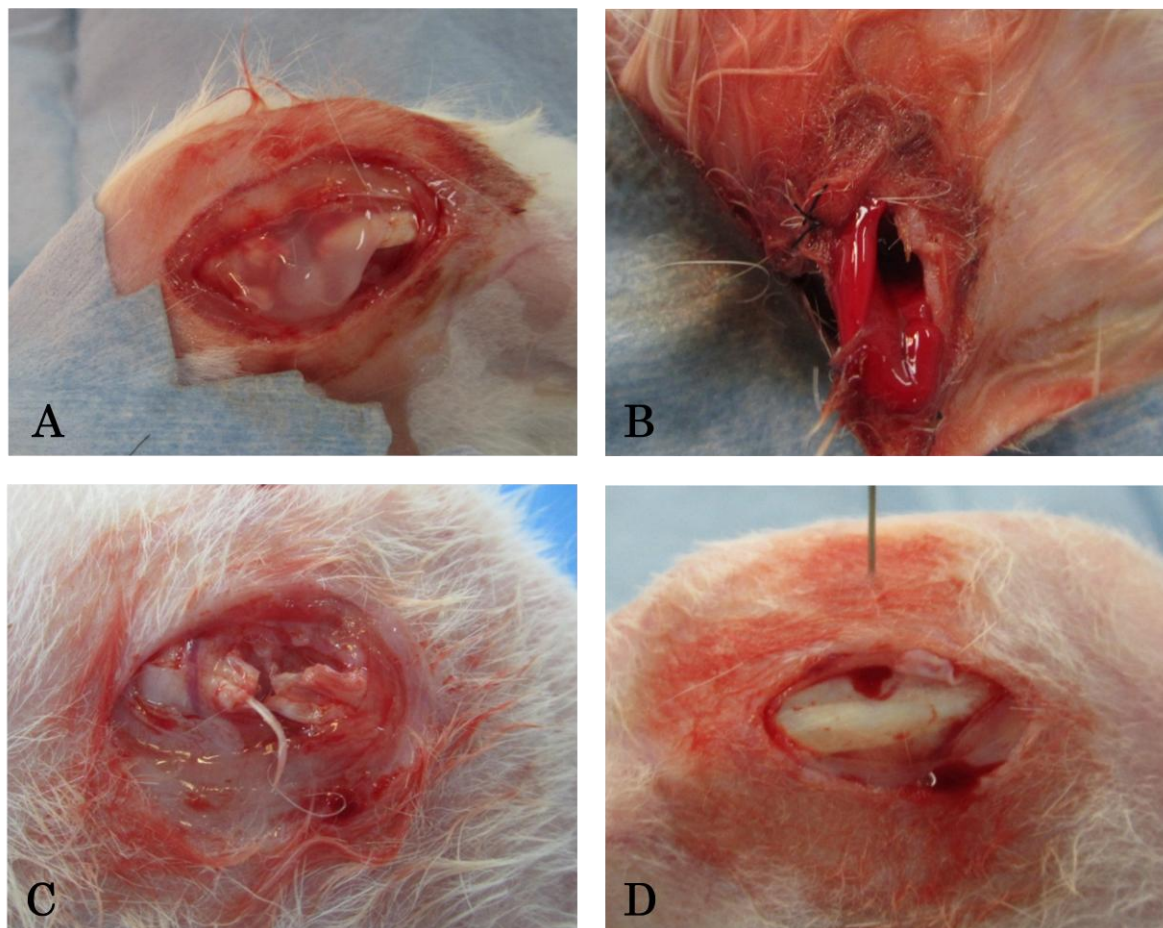


図 10. 実験2 群設定

A: PRP 群 B:混合投与群 C:コントロール群 D:シャム手術群

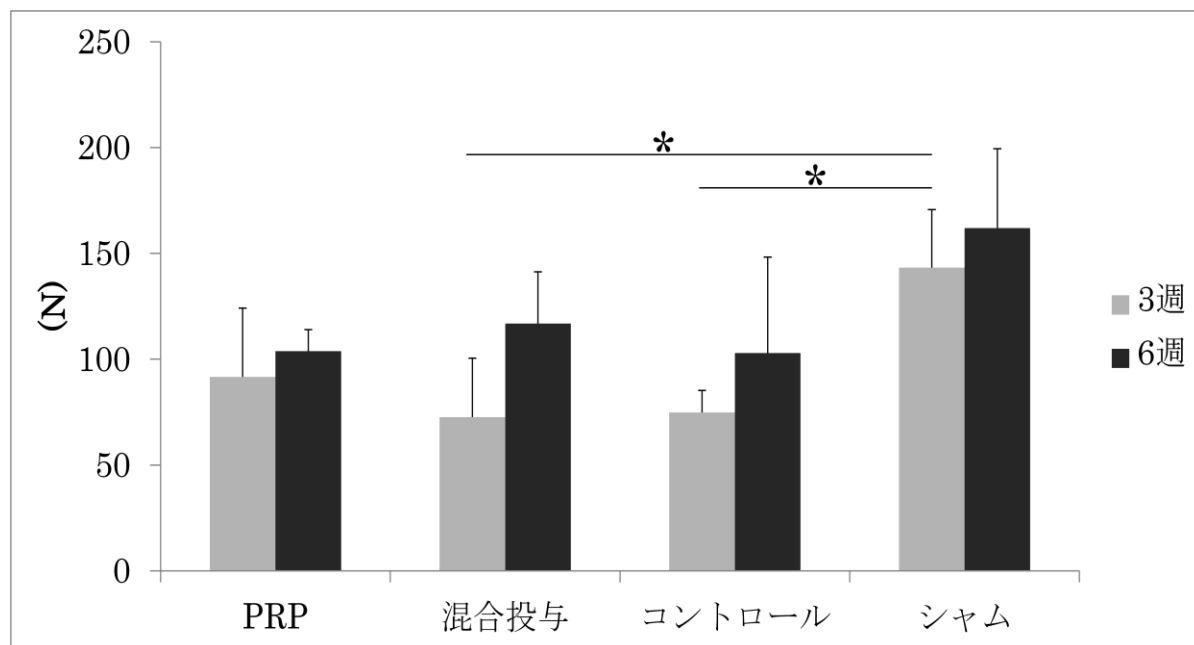


図 11. 最大荷重(N)

3 週で PRP 群、6 週で混合投与群が高い傾向があるも、PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めず。(* $P < 0.05$)

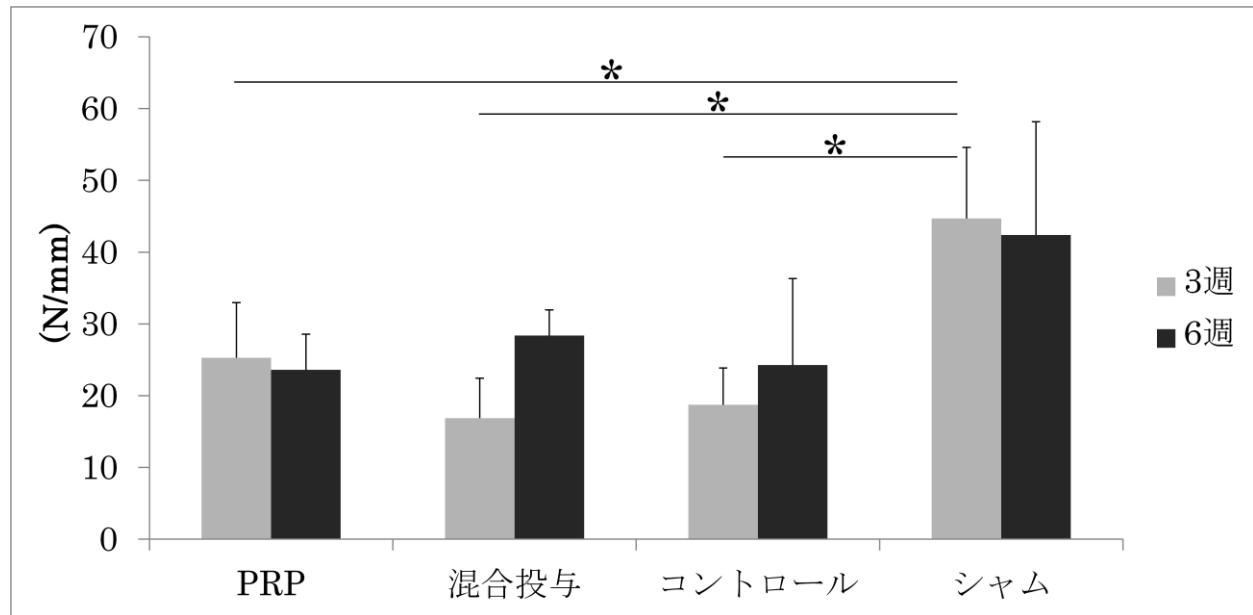


図 12. 剛性値(N/mm)

3 週で PRP 群、6 週で混合投与群が高い傾向があるも、PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めず。(* $P < 0.05$)

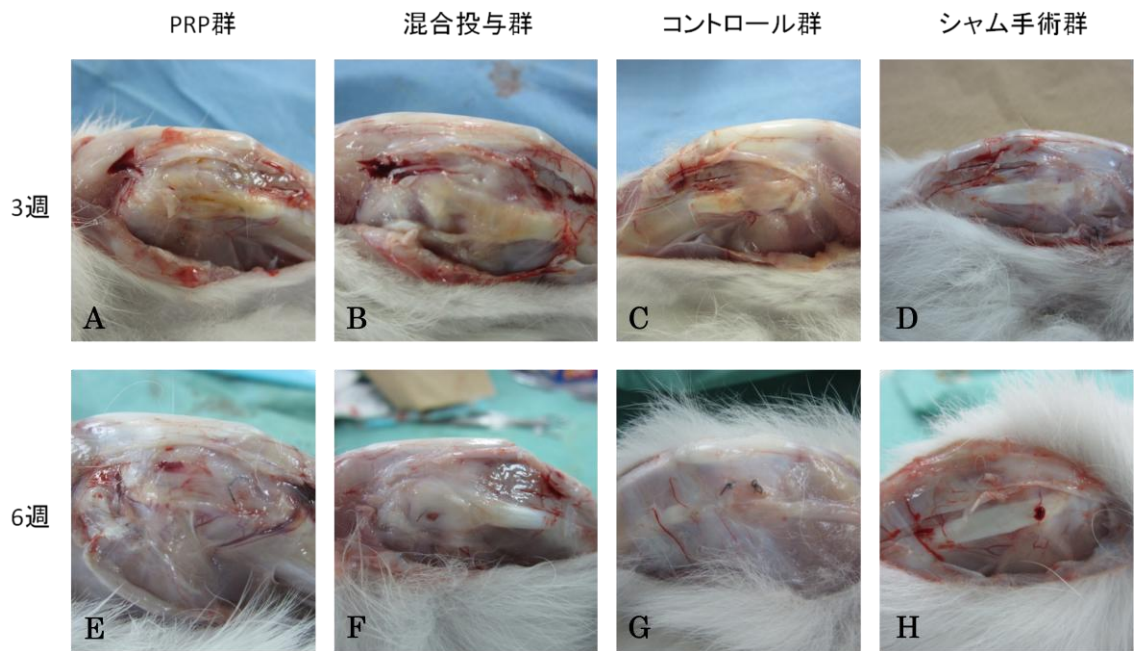


図 13. 肉眼所見

A,E:PRP 群 B,F:混合投与群 C,G:コントロール群 D,H:シャム手術群

A,B,C,D:3 週 E,F,G,H:6 週

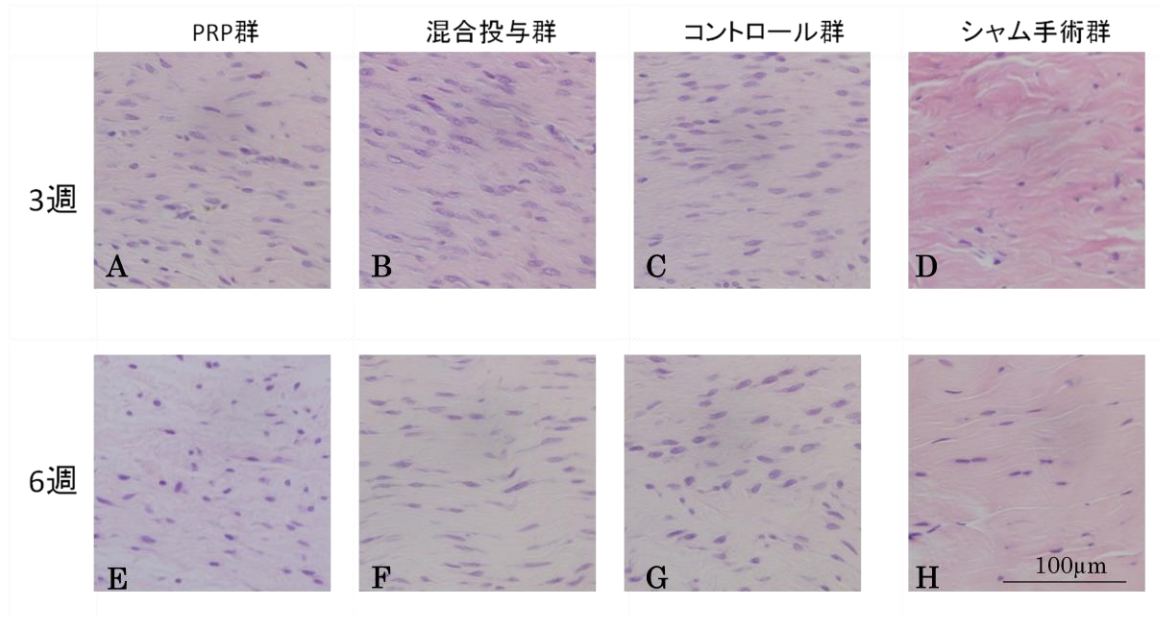


図 14. 組織学的所見 HE 染色

A,E:PRP 群 B,F:混合投与群 C,G:コントロール群 D,H:シャム手術群

A,B,C,D:3 週 E,F,G,H:6 週

Scale bar 100µm

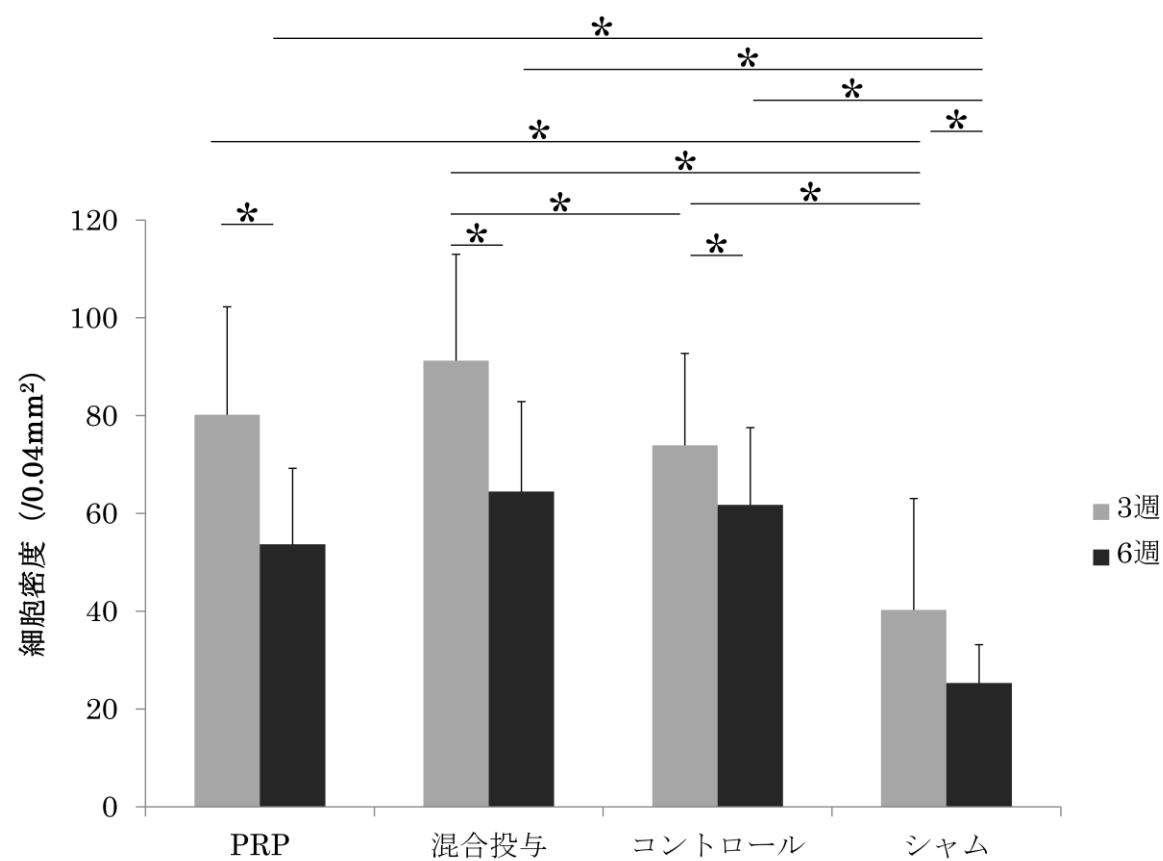


図 15. 細胞密度

全ての群で 3 週が 6 週に比べ有意に細胞密度が高かった。3 週では混合投与がコントロール群より有意に高かったが 6 週では PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった。シャム手術群は 3 週、6 週とも他群に比べ有意に密度が低かった (* $P < 0.05$)

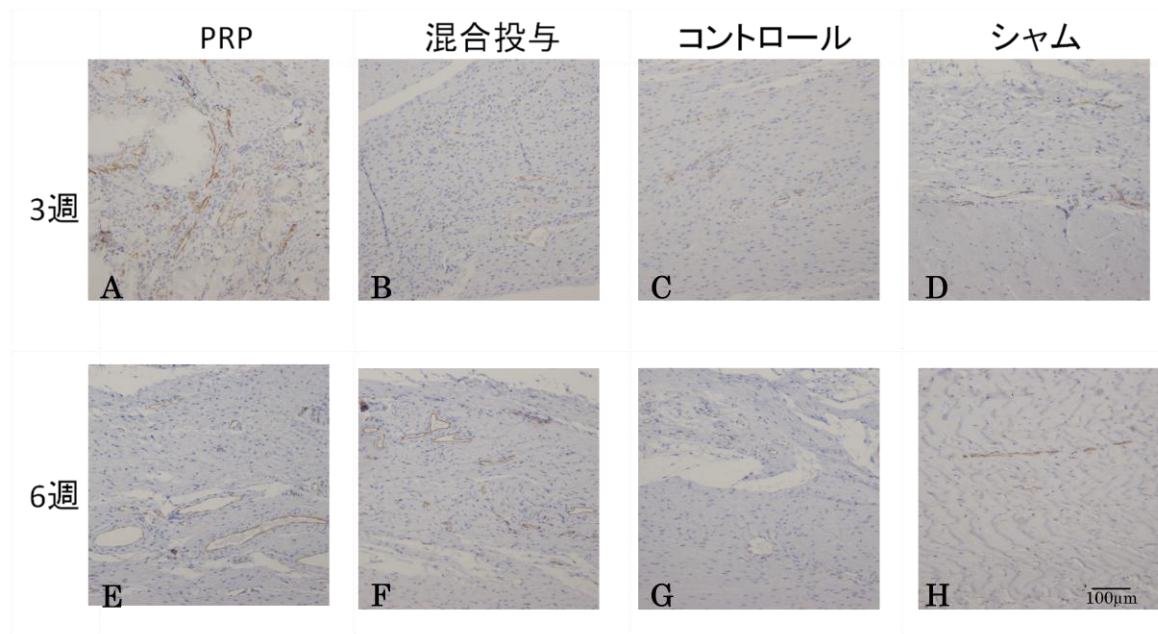


図 16. 組織学的所見 CD31 免疫染色

A,E:PRP 群 B,F:混合投与群 C,G:コントロール群 D,H:シャム手術群

A,B,C,D:3 週 E,F,G,H:6 週

Scale bar 100µm

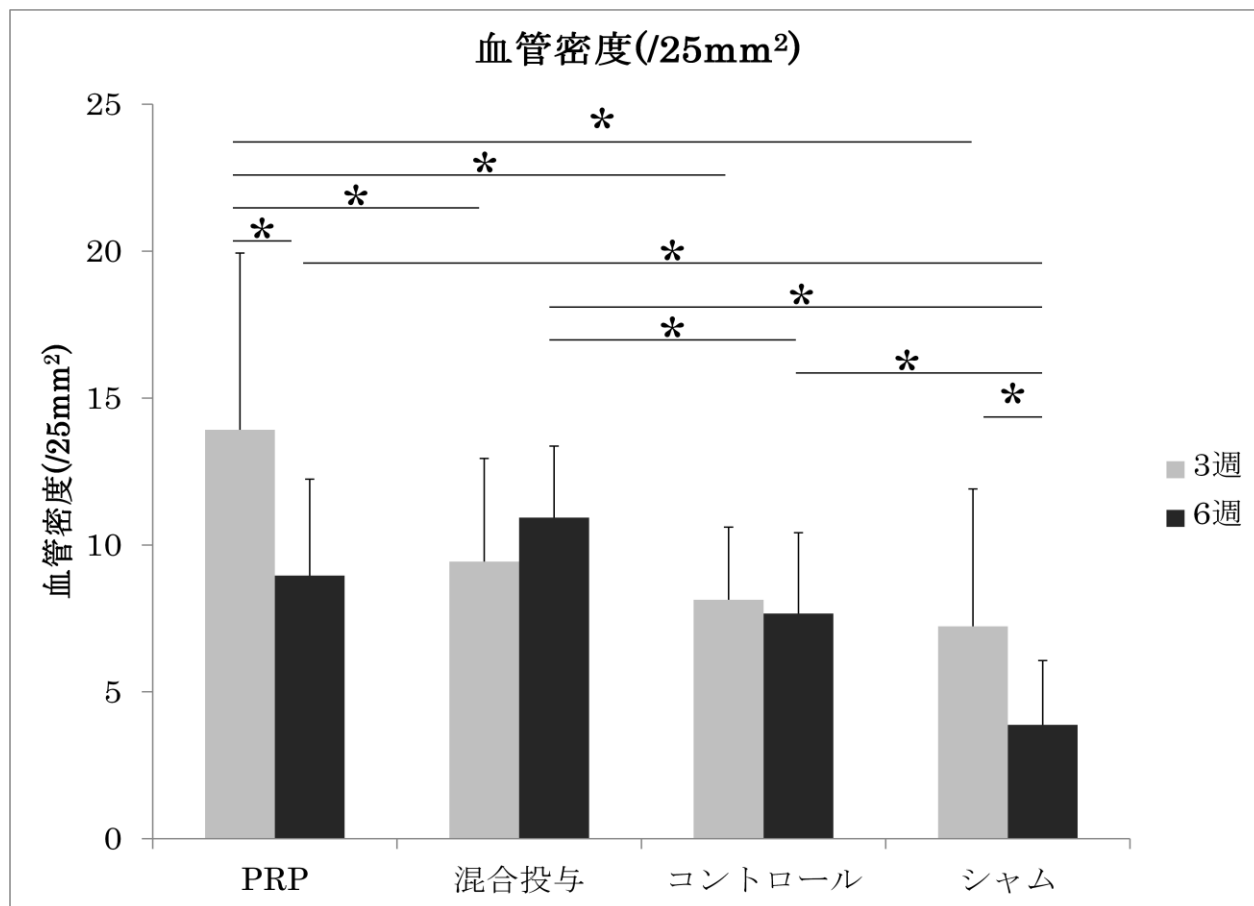


図 17. 血管密度

3 週では PRP 群が混合投与、コントロール、シャム手術の各群よりも有意に血管密度が高かった。6 週では混合投与群がコントロール群、シャム手術群に比べて有意に高かった。PRP 群、シャム手術群では 3 週から 6 週にかけて血管密度が有意に減少した。(* $P < 0.05$)

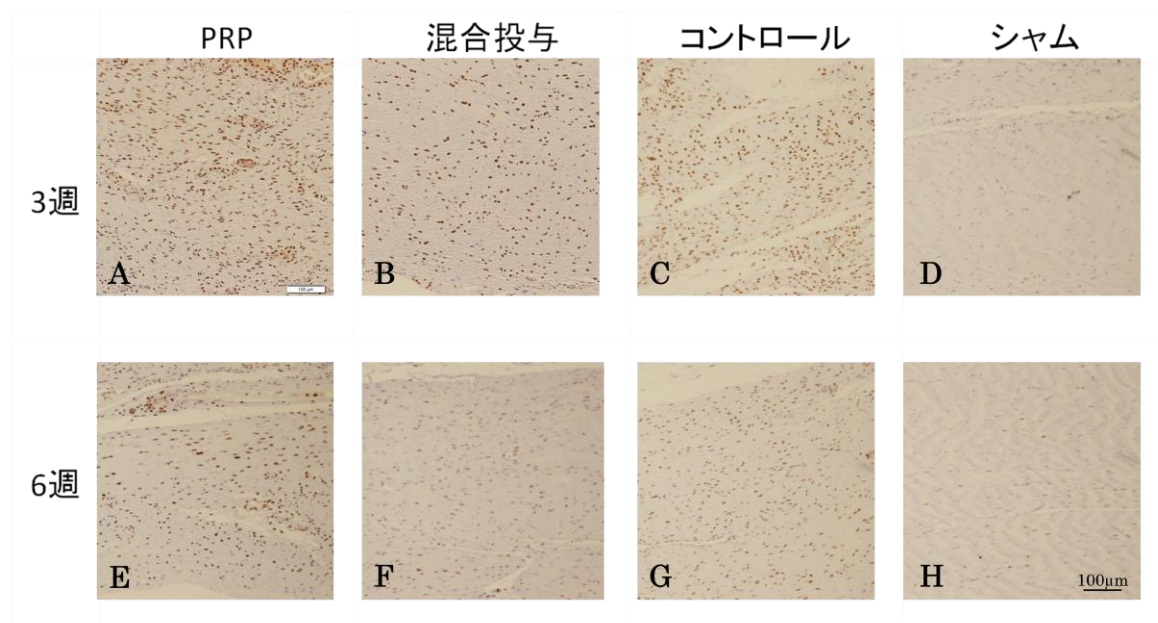


図 18. 組織学的所見 PCNA 免疫染色

A,E:PRP 群 B,F:混合投与群 C,G:コントロール群 D,H:シャム手術群

A,B,C,D:3 週 E,F,G,H:6 週

Scale bar 100µm

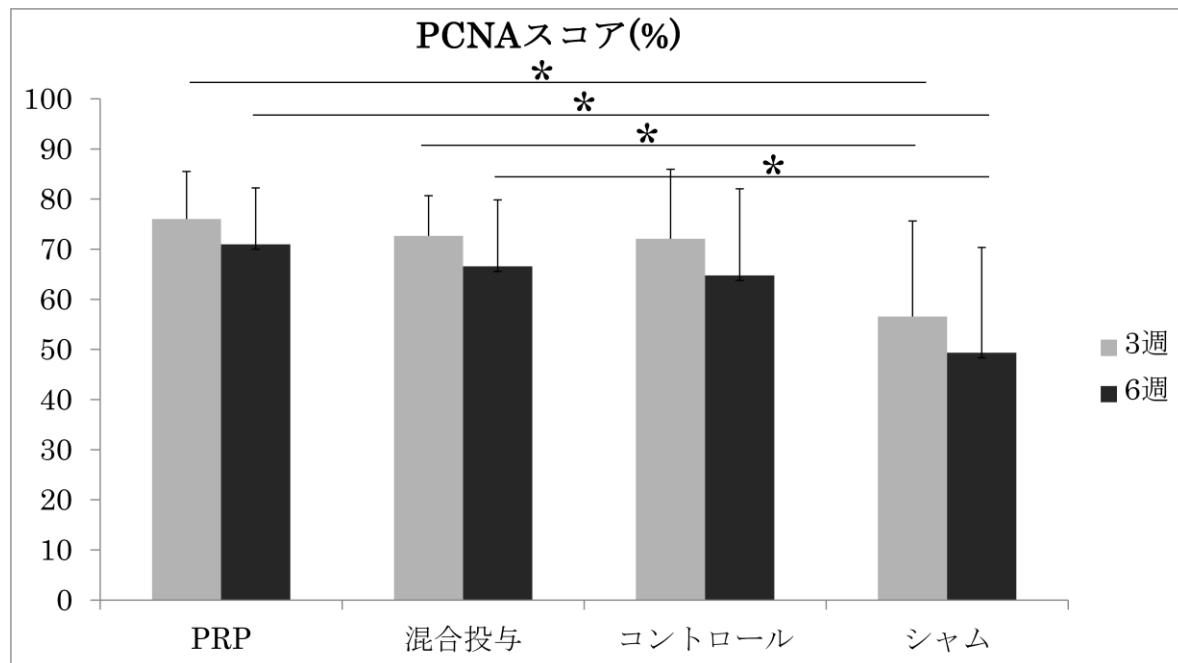


図 19. PCNA スコア(%)

PRP 群 3 週・6 週及び混合投与群 3 週・6 週がそれぞれシャム手術群 3 週・6 週に比べ有意に PCNA スコアが高かったが、PRP 群、混合投与群、コントロール群間で有意差は認めなかった。また各群とも同群の 3 週・6 週間では 3 週の PCNA スコアが高値であったが有意差は認めなかった。(* $P < 0.05$)

表 1. 靱帯損傷分類 (American Medical Association)

1 度: 小範囲の損傷で不安定性を認めないもの

2 度: 中等度の断裂で軽度から中等度の不安定性を認めるもの

3 度: 完全断裂や付着部の剥離骨折で不安定性が著明なもの

成長因子	主な作用
PDGF	線維芽細胞、平滑筋細胞、グリア細胞、軟骨細胞などの増殖 線維芽細胞、平滑筋細胞、好中球、単球の遊走 細胞外基質産生促進
TGF- β	細胞外基質産生促進
VEGF	血管内皮細胞増殖 血管透過性亢進
EGF	線維芽細胞、表皮細胞、血管平滑筋細胞などの増殖

表 2. 成長因子の主な作用

	力学的評価		組織学的評価	
評価週	3 週	6 週	3 週	6 週
PRP 群(n=17)	5	6	3	3
コントロール群(n=14)	5	5	2	2

表 3. 実験1 群設定

	血小板		白血球 ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	赤血球 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	PDGF-BB (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)
	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	濃縮率(倍)				
全血	22.3 \pm 1.3	-	37.5 \pm 7.4	532.8 \pm 65.8	-	-
F1	30.6 \pm 1.7	1.37	0	1.6 \pm 0.6	-	-
F2	32.4 \pm 1.6	1.46	0	0.3 \pm 0.5	-	-
F3	39.5 \pm 2.4	1.77	0	0.2 \pm 0.4	0.43 \pm 0.14	2.76 \pm 1.83

表 4. 血小板・白血球・赤血球・成長因子濃度

	PRP群		コントロール群	
	3週	6週	3週	6週
細胞密度(/0.04mm ²)	97.5±3.5	57.6±2.1	76.5±3.7	75.8±3.1
血管密度(/25mm ²)	9.2±1.9	7.9±0.8	4.8±0.8	8.7±5.9

表 5. 細胞密度及び血管密度

		力学的評価 (n=40)		組織学的評価 (n38)	
評価週		3 週	6 週	3 週	6 週
左後肢	PRP 群 (n=19)	5	5	5	4
	混合投与群 (n=20)	5	5	5	5
右後肢	コントロール群 (n=20)	5	5	5	5
	sham 群 (n=19)	5	5	5	4

表 6. 実験2 群設定

	血小板		白血球	赤血球
	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	濃縮率(倍)	($\times 10^2/\mu\text{l}$)	($\times 10^4/\mu\text{l}$)
全血	33.5 ± 11.5	-	47.4 ± 14.7	557.0 ± 112.4
F1	33.1 ± 7.2	0.99	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.7
F2(PRP)	35.9 ± 7.8	1.07	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0

表 7. 実験2 血小板・白血球・赤血球濃度

白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{ l}$)	222.4 ± 98.2
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{ l}$)	533.1 ± 79.7
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{ l}$)	4.7 ± 3.1
CFU-Fs 濃度 (/ml)	88.5 ± 135.8
CFU-Fs 出現率 ($/10^6$ nucleated cells)	3.6 ± 4.9

表 8. 実験2 骨髓血評価

謝 辞

本論文の作成にあたり、ご指導、御校閲を賜りました山崎正志教授に心より感謝いたします。また、疾患制御医学専攻運動器系制御医学分野の落合直之前教授、金森章浩講師、吉岡友和講師のご指導、ご助言、ご協力に対してここに改めて感謝いたします。さらに実験をするにあたり、多大なるご協力をいただいた産業技術総合研究所鷺尾利克氏、筑波大学大学院菅谷久先生、植村健太先生、李梅花氏に厚く御礼申し上げます。

なお本研究実験1の一部は、公益財団法人ヤマハ発動機スポーツ振興財団から平成21年度(第3期生)スポーツチャレンジ研究助成を得て行いました。

学 会 発 表

1. 7th World Congress on Science & Football

Programme for preventing groin pain in athletes

2011 年 5 月 26 日(木)- 30 日(月), Toyoda Auditorium Hall, Nagoya University

Aoto K, Hirano A, Uemura K, Misonoo G, Oda K, Miyakawa S.

2. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会

2011 年 10 月 20 日(木)・21 日(金) ベイシア文化ホール(群馬県民会館)、前橋商
工会議所

自家多血小板血漿を用いた膝関節内側側副靱帯損傷治療と早期修復効果:家兎モ
デルでの力学的・組織学的検討

青戸克哉、金森章浩、吉岡友和、鷲尾利克、植村健太、坂根正孝、落合直之

3. 9th Biennial International Society of Arthroscopy Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS) Congress

2013 年 5 月 12 日(日)-16 日(木) Metro Toronto Convention Centre

Circadian Variation of Growth Factors Level In Plasma-Based Platelet Rich
Plasma

Aoto K, Kanamori A, Uemura K, Yoshioka T, Sakane M, Yamazaki M.

4. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会

2013 年 10 月 18 日(木)・19 日(金) 幕張メッセ

自家多血小板血漿及び骨髓血による家兎膝内側側副靱帯損傷治療の早期修復効果についての力学的検討

青戸克哉、金森章浩、吉岡友和、鷺尾利克、植村健太、坂根正孝、山崎正志

5. 第 40 回日本臨床バイオメカニクス学会

2013 年 11 月 22 日(金)・23 日(土) 神戸国際会議場

自家多血小板血漿及び骨髓血による家兎膝内側側副靱帯損傷治療の早期修復効果についての力学的・組織学的検討

青戸克哉、金森章浩、吉岡友和、鷺尾利克、植村健太、坂根正孝、山崎正志

引 用 文 献

1. Wijdicks, C.A., et al., *Injuries to the medial collateral ligament and associated medial structures of the knee*. J Bone Joint Surg Am, 2010. **92**(5): p. 1266-80.
2. Frank, C., et al., *Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits*. Am J Sports Med, 1983. **11**(6): p. 379-89.
3. Ginsburg, J.H. and J.C. Ellsasser, *Problem areas in the diagnosis and treatment of ligament injuries of the knee*. Clin Orthop Relat Res, 1978(132): p. 201-5.
4. Derscheid, G.L. and J.G. Garrick, *Medial collateral ligament injuries in football. Nonoperative management of grade I and grade II sprains*. Am J Sports Med, 1981. **9**(6): p. 365-8.
5. Indelicato, P.A., *Non-operative treatment of complete tears of the medial collateral ligament of the knee*. J Bone Joint Surg Am, 1983. **65**(3): p. 323-9.
6. Reider, B., et al., *Treatment of isolated medial collateral ligament injuries in athletes with early functional rehabilitation. A five-year follow-up study*. Am J Sports Med, 1994. **22**(4): p. 470-7.
7. Weiss, J.A., et al., *Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: primary repair versus nonoperative treatment*. Journal of Orthopaedic Research, 1991. **9**(4): p. 516-28.
8. Frank, C., D. McDonald, and N. Shrive, *Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment*. Connect Tissue Res, 1997. **36**(3): p. 261-9.
9. Thornton, G.M., et al., *Strength of medial structures of the knee joint are decreased by isolated injury to the medial collateral*

- ligament and subsequent joint immobilization.* Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(5): p. 1191-8.
10. Woo, S.L., et al., *Treatment of the medial collateral ligament injury. II: Structure and function of canine knees in response to differing treatment regimens.* Am J Sports Med, 1987. **15**(1): p. 22-9.
 11. 村瀬研一, 【膝関節疾患保存療法マニュアル】 膝内側支持機構損傷に対する保存的療法. Orthopaedics, 2007. **20**(5): p. 54-60.
 12. Yu, W.W. and S.R. Machlin, *An examination of skewed health expenditure data from the Medical Expenditure Panel Survey (MEPS).* Journal of Economic and Social Measurement, 2005. **30**(2): p. 127-134.
 13. Lundblad, M., et al., *The UEFA injury study: 11-year data concerning 346 MCL injuries and time to return to play.* Br J Sports Med, 2013. **47**(12): p. 759-62.
 14. Kiuru, J., et al., *Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor.* Life Sci, 1991. **49**(26): p. 1997-2003.
 15. Foster, T.E., et al., *Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications.* Am J Sports Med, 2009. **37**(11): p. 2259-72.
 16. 楠本健司, *PRPの基礎理論*, in *多血小板血漿 (PRP) 療法入門*. 2010, 全日本病院出版会. p. 1-8.
 17. Deie, M., et al., *The effects of age on rabbit MCL fibroblast matrix synthesis in response to TGF-beta 1 or EGF.* Mech Ageing Dev, 1997. **97**(2): p. 121-30.
 18. DesRosiers, E. A., L. Yahia, and C.H. Rivard, *Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors.* Journal of Orthopaedic Research, 1996. **14**(2): p. 200-8.
 19. Hildebrand, K.A., et al., *The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study.* Am J Sports Med, 1998. **26**(4): p. 549-54.
 20. Marx, R.E., *Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not*

- PRP?* Implant Dent, 2001. **10**(4): p. 225-8.
21. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(6): p. 638-46.
 22. Anitua, E., et al., *The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields*. Biomaterials, 2007. **28**(31): p. 4551-60.
 23. Martinez-Zapata, M.J., et al., *Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review*. Transfusion, 2009. **49**(1): p. 44-56.
 24. Kon, E., et al., *Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**(4): p. 516-27.
 25. Mishra, A. and T. Pavelko, *Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma*. Am J Sports Med, 2006. **34**(11): p. 1774-8.
 26. Randelli, P.S., et al., *Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study*. Disabil Rehabil, 2008. **30**(20-22): p. 1584-9.
 27. Kon, E., et al., *Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee*. Injury, 2009. **40**(6): p. 598-603.
 28. Sanchez, M., et al., *Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices*. Am J Sports Med, 2007. **35**(2): p. 245-51.
 29. de Vos, R.J., et al., *Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial*. JAMA, 2010. **303**(2): p. 144-9.
 30. Silva, A. and R. Sampaio, *Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing?* Knee Surg Sports

- Traumatol Arthrosc, 2009. **17**(6): p. 676-82.
31. 吉岡友和;金森章浩, *多血小板血漿 (PRP) による関節軟骨損傷治療の今後の可能性*. 臨床スポーツ医学, 2013. **30**(4): p. 367-372.
 32. Schnabel, L.V., et al., *Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons*. Journal of Orthopaedic Research, 2007. **25**(2): p. 230-240.
 33. Frechette, J.P., I. Martineau, and G. Gagnon, *Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing*. J Dent Res, 2005. **84**(5): p. 434-9.
 34. Mishra, A., J. Woodall, Jr., and A. Vieira, *Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma*. Clin Sports Med, 2009. **28**(1): p. 113-25.
 35. de Mos, M., et al., *Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study*. Am J Sports Med, 2008. **36**(6): p. 1171-8.
 36. Schnabel, L.V., et al., *Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons*. Journal of Orthopaedic Research, 2007. **25**(2): p. 230-40.
 37. Wang, X., et al., *Proliferation and differentiation of human tenocytes in response to platelet rich plasma: an in vitro and in vivo study*. Journal of Orthopaedic Research, 2012. **30**(6): p. 982-90.
 38. Dallaudiere, B., et al., *Efficacy of intra-tendinous injection of platelet-rich plasma in treating tendinosis: comprehensive assessment of a rat model*. Eur Radiol, 2013.
 39. Xie, X., et al., *Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction*. J Surg Res, 2013. **183**(1): p. 214-22.
 40. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
 41. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for*

- nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71–4.
42. Watanabe, N., et al., *Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation*. Microsc Res Tech, 2002. **58**(1): p. 39–44.
 43. Kim, E., et al., *The effect of intra-articular autogenous bone marrow injection on healing of an acute posterior cruciate ligament injury in rabbits*. Arthroscopy, 2011. **27**(7): p. 965–77.
 44. Murphy, J.M., et al., *Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3464–74.
 45. Goedecke, A., et al., *Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro*. J Tissue Eng Regen Med, 2011. **5**(8): p. 648–54.
 46. Lucarelli, E., et al., *Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells*. Biomaterials, 2003. **24**(18): p. 3095–100.
 47. Campbell, K.J., et al., *Treatment of a hip capsular injury in a professional soccer player with platelet-rich plasma and bone marrow aspirate concentrate therapy*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2013. **21**(7): p. 1684–8.
 48. Martinello, T., et al., *Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep*. Journal of Orthopaedic Research, 2013. **31**(2): p. 306–14.
 49. Murray, M.M., et al., *Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82-A**(10): p. 1387–97.
 50. Ju, Y.J., et al., *Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament in rabbits*. Am J Sports Med, 2006. **34**(1):

p. 84–91.

51. Molloy, T., Y. Wang, and G. Murrell, *The roles of growth factors in tendon and ligament healing*. Sports Med, 2003. **33**(5): p. 381–94.
52. Shrive, N., et al., *Soft - tissue “flaws” are associated with the material properties of the healing rabbit medial collateral ligament*. Journal of Orthopaedic Research, 1995. **13**(6): p. 923–929.
53. Anitua, E., *Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **14**(4): p. 529–35.
54. Artitua, E., et al., *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. Thromb Haemost, 2004. **91**: p. 4–15.
55. Sakai, S., et al., *Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods*. Acta orthopaedica, 2008. **79**(3): p. 445–448.
56. Nakajima, F., et al., *Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor*. Journal of Orthopaedic Research, 2001. **19**(5): p. 935–44.
57. Weibrich, G., et al., *Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration*. Bone, 2004. **34**(4): p. 665–671.
58. Lopez-Vidriero, E., et al., *The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2010. **26**(2): p. 269–278.
59. Connolly, J.F., *Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S257–66.
60. Ohgushi, H., V.M. Goldberg, and A.I. Caplan, *Heterotopic*

- osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells*. Journal of Orthopaedic Research, 1989. 7(4): p. 568-78.
61. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nature medicine, 2003. 9(6): p. 669-676.
 62. Lundberg, M. and K. Messner, *Long-term prognosis of isolated partial medial collateral ligament ruptures. A ten-year clinical and radiographic evaluation of a prospectively observed group of patients*. Am J Sports Med, 1996. 24(2): p. 160-3.
 63. Letson, A.K. and L.E. Dahners, *The effect of combinations of growth factors on ligament healing*. Clin Orthop Relat Res, 1994(308): p. 207-12.
 64. Batten, M.L., J.C. Hansen, and L.E. Dahners, *Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament*. Journal of Orthopaedic Research, 1996. 14(5): p. 736-41.
 65. Spindler, K.P., et al., *Collagen expression and biomechanical response to human recombinant transforming growth factor beta (rhTGF-beta2) in the healing rabbit MCL*. Journal of Orthopaedic Research, 2002. 20(2): p. 318-24.
 66. Spindler, K.P., et al., *The biomechanical response to doses of TGF-beta 2 in the healing rabbit medial collateral ligament*. Journal of Orthopaedic Research, 2003. 21(2): p. 245-9.
 67. 平岡久忠, *運動器の基礎知識 靱帯*, in *整形外科クルズス(改定第4版)*, 中村耕三, Editor. 2003, 南江堂: 東京. p. 57-62.
 68. Lim, J.-K., et al., *Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2004. 20(9): p. 899-910.
 69. Ouyang, H.W., J.C. Goh, and E.H. Lee, *Use of Bone Marrow Stromal Cells for Tendon Graft-to-Bone Healing Histological and*

- Immunohistochemical Studies in a Rabbit Model*. Am J Sports Med, 2004. 32(2): p. 321-327.
70. Silva, A., et al., *Is there a role for adult non-cultivated bone marrow stem cells in ACL reconstruction?* Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2012: p. 1-6.

参 考 論 文

1. Aoto K, Kanamori A, Yoshioka T, Uemura K, Sakane M, Yamazaki M
Circadian Variation of Growth Factor Levels in Platelet-Rich Plasma
Clinical Journal of Sport Medicine: 2014 Nov. 24(6): 509–512
2. Yoshioka T, Kanamori A, Washio T, Aoto K, Uemura K, Sakane M, Ochiai N.
The effects of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) on healing of
medial collateral ligament of the knee.
Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2013 Aug;21(8):1763-9.

参考論文については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。なお、電子ジャーナルとして出版社から公開されていますので、契約している場合は全文を読むことができます。