

筑波大学

博士（医学）学位論文

変形性膝関節症に対する多血小板血漿治療
とその基礎研究

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

谷口 悠

目次

第 1 章 本研究の背景	1
1.1. 多血小板血漿とは.....	1
1.2. PRP の調整法と種類	2
1.3. LR-PRP と LP-PRP	2
1.4. PRP 内成長因子濃度に影響を与える患者側因子	3
1.5. 共同研究者による先行研究	4
第 2 章 本研究の目的	5
第 3 章 日本人における Leukocyte poor PRP 内成長因子と 年齢・性別・血小板数との関係	6
3.1. 目的	6
3.2. 対象・群設定	6
3.3. PRP の調製	6
3.4. 評価項目	7
3.4.1. 血算	7
3.4.2. 成長因子濃度	7
3.5. 統計解析法	8
3.6. 結果	8
3.7. 考察	9
3.8. 小括	13

第 4 章 日本人変形性膝関節症に対する多血小板血漿治療

第 I / II a 相臨床試験 14

4.1. 背景	14
4.1.1. 変形性膝関節症(膝 OA)の疫学	14
4.1.2. 膝 OA の病態	14
4.1.3. 膝 OA の治療	15
4.1.4. 関節内注射と本邦での問題点	16
4.1.5. 膝 OA に対する PRP 関節内注射治療	17
4.2. 目的	18
4.3. 対象と方法	18
4.3.1. 患者選択	18
4.3.2. PRP 調製	19
4.3.3. PRP 関節内注射	19
4.3.4. 血算測定	19
4.3.5. 成長因子濃度測定	20
4.3.6. 評価項目	20
4.3.7. 統計解析	21
4.4. 結果	21
4.4.1. 患者背景	21
4.4.2. 血算・成長因子濃度	22
4.4.3. 安全性	22
4.4.4. 実現可能性	22
4.5. 考察	23
4.6. 小括	26

第5章	総括	27
5.1.	考察	27
5.2.	結論	29
図		30
表		40
引用文献		50
謝辞		58
学会発表		59
参考論文		61

第 1 章 本研究の背景

1.1. 多血小板血漿とは

多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: 以下 PRP)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[1, 2]。血小板は骨髄中の巨核球(巨大核細胞)の細胞質から産生され、核を持たない大きさ約 $2\mu\text{m}$ 、厚さ $0.5\mu\text{m}$ の円盤状の血液細胞である[3, 4]。血小板の役割は止血の中心となる以外に、凝固する際に種々の成長因子が放出されることで損傷組織の修復に寄与することが知られており、細胞間伝達の調整に役立つ 300 種類以上のサイトカインや成長因子などの生理活性物質を含んでいる[5]。この血小板や血漿に含まれる成長因子は腱・靭帯・軟骨などの運動器組織の再生に重要な役割を示すことがわかっている(表 1)[6]。PRP 治療は、血小板 α 顆粒内の様々な成長因子と血漿内に含まれる成長因子や接着因子・糖蛋白が生体内でのバランスを保った状態で複合的に組織損傷に作用すると考えられており、「採血によって得られる自己由来産物」として、その応用にあって簡便性と安全性を併せ持つ治療である[7, 8]。骨軟部組織に対する PRP 治療は 1994 年に Tayapongsak らにより「Autologous Fibrin Adhesive(AFA)療法」として下顎骨再建の際に初めて用いられ[9]、1998 年に同様の下顎骨再建治療を Marx らが PRP 治療として報告した[10]。その後、歯科口腔外科領域において抜歯窩骨再生[11]、皮膚科・形成外科領域において難治性潰瘍治療などで有用性が報告されている[12]。2000 年代に入り整形外科領域においても主として欧米を中心にスポーツ傷害に対し臨床応用が進んできた。すでにスポーツ傷害に対する PRP の臨床的報告も多くなされ[13]、膝蓋腱炎[14, 15]やアキレス腱炎[16]、上腕骨外上顆炎[17]、肩腱板損傷[18]等に対しては有効性を示す報告もあるが、効果に否定的な報告も散見される[19, 20]。

1.2. PRP の調製方法と種類

PRP の調製は自己末梢血採血・遠心・抽出・活性化の 4 つの工程に分けられる。現在、PRP の調製システムは各社から販売されているが[13]、調製される PRP は遠心条件(遠心回数や回転数)や白血球の有無、活性化の有無などにより成分が異なる。遠心回数を増やし、遠心時間を長くすれば PRP 内の血小板濃度も高くなる訳であるが、必ずしも濃縮率が高ければ組織治癒に有用というわけではなく、濃縮率が末梢血の 6 倍を超えるとアポトーシスや成長因子の down regulation により、投与された PRP が組織治癒を妨げる危険性もある[21]。一般的には血小板の濃縮率が末梢血の 2~6 倍であれば PRP としての効果があると報告されている[2]。

遠心された血液は上層の血漿層と下層の赤血球層、その間の白血球に大きく分けられる(図 1)。白血球を主として、その直上の血小板を多く含む層は合わせて buffy-coat と呼ばれる。血小板は血漿層から buffy-coat に主に存在するが、この層を含む PRP は buffy coat based PRP または Leukocyte-rich PRP(以下 LR-PRP)と呼ばれ、血漿のみを用いて白血球の含有が少ない plasma based PRP または Leukocyte-poor PRP(LP-PRP)と呼ばれる PRP とは区別される。

1.3. LR-PRP と LP-PRP

遠心された血液の buffy coat 内には好中球やリンパ球、マクロファージなどの白血球があり、この白血球を含むか否か、すなわち LR-PRP と LP-PRP で性質は大きく異なる。LR-PRP は白血球を多く含むことにより、血管新生に必要な成長因子である VEGF を産生し変性した組織の治癒に有効と考えられるが[22]、投与部局所の炎症を惹起する可能性がある[23]。特に関節内投与に際しては、白血球を含有することにより炎症を引き起こし関節に有害であるとする報告がある[24, 25]一方で、白血球より放出される分

子や細胞の複合的な影響で軟骨細胞や滑膜細胞に良い効果があるとする報告もあり[26, 27]、意見が分かれている。Sundman ら[28]は 11 名の健常者ボランティアから LR-PRP と LP-PRP を作製して、PRP に含まれる血小板数、白血球数、成長因子濃度、炎症性サイトカイン濃度を測定した。その結果、PRP の血小板数と成長因子濃度に相関があり、白血球数と炎症性サイトカイン濃度に相関を認めた。臨床に応用する際には投与する環境による使い分けが必要であると報告している。

このように一概に PRP といっても血小板濃度や白血球の含有、活性化の有無などにより PRP の性質は大きく異なり、生物学的活性の異なる PRP が治療に用いられているのが現状であるため、その治療成績に一定の見解が得られていないというのが PRP 治療の現状である[29]。

1.4. PRP 内成長因子濃度に影響を与える患者側因子

PRP 治療はスポーツ傷害に対する治療として欧米を中心に盛んに用いられ、数多く臨床で使用した報告もなされ、本邦でも拡がりを見せている。一方で、スポーツ傷害を負った際に積極的に治療を行うと考えられる比較的レベルの高いスポーツ選手の年齢層は幅広く、性別・体型も異なる。また近年、整形外科領域への PRP 治療はスポーツ傷害に対する治療だけではなく、いわゆる加齢・変性疾患(変形性関節症など)にも使用され、良好な臨床成績を残している。このように PRP は幅広い年齢層の治療に用いられ、患者の年齢や性別などの因子は PRP を品質管理する上で重要な因子となる。

PRP 調製の元となる末梢血の血小板数に関しては、年齢や性別により異なることが多く報告されている。加齢により血小板数が減少すること、男性より女性の血小板数が多いこと、人種により血小板数が異なることがわかっており[30-32]、また血小板数だけではなく、血小板の機能についても年齢や性別、人種により異なることも報告されている[33, 34]。再生医療の分野でも、軟骨再生などに用いられている間葉系幹細胞(human

marrow-derived stromal cells: hMSCs)と年齢の関係について分化経路ごとに多くの報告がなされている[35, 36]。しかしながら、PRP に関しては含有する成長因子と患者の年齢や性別についての数少ない報告があるのみで、年齢や性別による PRP の違いは明らかではない[37-39]。また、人種により血小板の機能は異なるが、PRP に含まれる成長因子と患者の年齢や性別について日本人を対象とした研究はない。

1.5. 共同研究者による先行研究

われわれのグループでは整形外科疾患やスポーツ傷害の治療に PRP を臨床応用すべく、PRGF-Endoret® IV System (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)を導入して基礎実験を進めてきた。PRGF は 1 回遠心法(580g, 8 分間, 室温)で、白血球を含まず、CaCl₂ を活性化に使うのが特徴の PRP キットである。スペインのグループより多くの基礎実験や[25, 40-43]、臨床応用が報告されている[11, 44-46]。Yoshioka ら[47] は日本白色家兎を用いて MCL 損傷の損傷部に PRP を導入して、対照群と組織学的・生体力学的に検討した。その結果、6 週で PRP 群は対照群よりも組織学的に有意に改善し、PRP は靭帯の治癒を促進したと報告した。Aoto ら[48]は、健康人ボランティアから 1 日 4 回採血をし PRP 抽出を行い、PRP 内の血小板数と成長因子濃度を測定した。その結果、どの時間帯の成長因子濃度も有意差を認めず、PRP 内の血小板数・成長因子濃度に日内変動がないことを報告した。

第2章 本研究の目的

前述のように整形外科領域での PRP 治療は本邦でも拡がりをみせている。すでに臨床的報告も多くなされているが、一概に PRP といっても血小板濃度や白血球の含有、活性化の有無などにより PRP の性質は大きく異なるため、その治療成績に一定の見解が得られていないというのが PRP 治療の現状である。さらに PRP 治療は「採血によって得られる自己由来産物」として簡便性と安全性を併せ持つが故に、臨床現場やスポーツ現場で先行的に用いられ、基礎研究が不足している上に、日本人に対する研究は非常に少ない。PRP 治療を今後当院で行うために、先行研究を踏まえて日本人を対象とした基礎研究と臨床試験 I/II a 相を行った。本研究の目的は以下の 2 つである。

- ①日本人を対象に PRP に含まれる血小板および血漿由来成長因子濃度を網羅的に解析し、PRP 治療を行う際の基礎データとなる知見を得ること

- ②日本人変形性膝関節症(以下膝 OA)患者に対する PRP 関節内注射治療の安全性と実施可能性を明らかにすること

第3章 日本人における Leukocyte poor PRP 内成長因子と年齢・性別・血小板数との関係

本研究は筑波大学附属病院倫理委員会の承認を得て行った(H26-120)。採血を行う前に被験者ごとにインフォームドコンセントを行った。

3.1. 目的

日本人を対象に PRP に含まれる血小板および血漿由来成長因子濃度を網羅的に解析し、年齢・性別・PRP 内血小板数との関係を明らかにすること。

3.2. 対象・群設定

18歳-49歳までの日本人の男女、現在治療を要する疾患や既往歴のない健常者で本研究に関する同意が得られた者を対象とし、筑波大学附属病院内にポスターを貼付して、被験者を募った。血小板の機能に影響を与えうる抗凝固剤を内服している者や、血液疾患を有する者、Hb 11.0 g/dl 未満の貧血を有する者は除外した。被験者は末梢血を採血する前に、本研究の目的などの説明を受け、被験者本人の意思で同意書に署名を行った。20歳から49歳までの39名より末梢血採血を行い、20-29歳、30-39歳、40-49歳の3群に分けた。

3.3. PRP の調製 (図 2)

被験者の肘静脈より 21 ゲージの針で 36ml の末梢血を溶血しないように採取した。末

梢血を 3.8%クエン酸ナトリウム入り 9ml スピッツ 4 本に採取し、1 回遠心法(580g、8 分間、室温)で遠心すると(PRGF-Endoret® IV System; BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)、スピッツごとに赤血球層、buffy coat 層、血漿層に分離された。buffy-coat を吸引しないように直上に安全域を設けた上で、この血漿層を 2 等分して下層を Platelet rich plasma(PRP)、上層を Platelet poor plasma(PPP)と定義した。PRGF-Endoret® IV System に付属している吸引器を使用して、各スピッツより 2ml ずつ計 8ml の PRP を採取した。PRP は 5%塩化カルシウムを加えて 37°Cで 1 時間静置し、1000g、20 分間、4°Cで遠心して、その上清を-80°C冷凍庫で保管した。

3.4. 評価項目

3.4.1. 血算

調製された PRP は塩化カルシウムを加える前に 0.5ml を採取して血算を測定した。採取した末梢血(Peripheral Blood: PB)、PPP、PRP の赤血球数・白血球数・血小板数を多項目自動血球計数装置 (Sysmex KX-21N, Sysmex Corp., Kobe, Japan)で測定した。PRP の血小板数を PB で除したものを PRP 血小板濃縮率と定義して算出した。

3.4.2. 成長因子濃度

冷凍された PRP を室温で解凍後、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits を用いて成長因子濃度を測定した (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB、transforming growth factors (TGF)- β 1、vascular endothelial growth factor (VEGF)、epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor (FGF)、insulin-like growth factor (IGF)-1、hepatocyte growth factor (HGF)の 7 種類の成長因子濃度をそれぞれの ELISA キットに付属している手順

書に従って測定した。測定の精度を高めるため、各スタンダードや PRP 試料は 2 回ずつ測定(duplicate)し、その平均値を測定値として採用した。

3.5. 統計解析法

20-29 歳、30-39 歳、40-49 歳の 3 群の 3 群間の比較は Kruskal-Wallis one-way analysis を用いて、post-hoc は Fisher's least significant difference (LSD) analysis で解析し、男性と女性の 2 群間の比較は Wilcoxon's rank sum test で解析した。成長因子濃度と年齢や性別、PRP 内血小板数の相関は、Spearman の順位相関分析を用いて解析した。いずれの統計解析も p 値 0.05 未満を有意とした。全データの統計解析には JMP 10.0.2 (SAS Institute, Tokyo, Japan)を用いた。

3.6. 結果

39 名の末梢血より PRP を調製し、解析を行った。女性 19 名(48.7%)、男性 20 名(51.3%)で、20-29 歳(20 歳代)が 13 名、30-39 歳(30 歳代)が 13 名、40-49 歳(40 歳代)13 名だった。平均年齢(±標準偏差; データ範囲)は 33.9 (±8.7; 21-48) 歳、平均 BMI は 21.4 (±4.0; 17.0-32.8) kg/m² だった。血算解析の結果は表 2 に示した。PRP の平均血小板数は 41.4 (± 12.1; 22.6-81.8) × 10⁴/μL で、末梢血の血小板数 23.4 (± 4.4; 15.8-33.6) × 10⁴/μL よりも有意に高値で、PRP の血小板濃縮率の平均は 1.8 倍だった。血小板数や白血球数や好中球の存在により調製された PRP を分類する Platelets, Activation, and White cells classification system(PAW 分類)(図 3)[49]では P2-x-Bβ に分類された。7 つの成長因子濃度と PRP・PB の血小板数の測定結果を表 3 に示した。年代別にみると、PDGF-BB、EGF、IGF-1、PB と PRP の血小板数で有意差を認めた。また、年齢と PDGF-BB 濃度、IGF-1 濃度は負の相関を認めた(Spearman の順位相関分析：それ

ぞれ $p = 0.049$ and 0.014)。PDGF-BB・IGF-1 と年齢の散布図を図 4 に示した。性別に関しては測定した 7 種の PRP 内成長因子濃度は被験者の性別と有意差を認めなかった(表 4)。PRP の血小板数と PRP 内成長因子濃度の関係は、PDGF-BB、TGF- β 1、EGF、HGF の 4 種で正の相関を認めた(表 5)。これらの成長因子濃度と PRP 内血小板数の散布図は図 5 に示した。

3.7. 考察

PRP 治療の本質は、血小板 α 顆粒内の様々な成長因子と血漿内に含まれる成長因子や接着因子、糖蛋白が生体内でのバランスを保った状態で複合的に損傷組織に作用することによるものと考えられている[7, 8]。なかでも成長因子は軟骨や靭帯、腱の損傷から回復する過程において重症な役割を果たすことが知られている[50-52]。本研究では我々が臨床の現場で使用している PRGF-Endoret®IV system により調製した PRP 内の 7 種類の成長因子濃度を測定して、年齢・性別・PRP 内の血小板数との相関を解析し、主に 3 つの結果を得た。1 つ目は測定した 7 種類の成長因子のうち PDGF-BB と IGF-1 濃度は統計学的に年齢と相関を認め、年齢が若いほど高濃度であった。2 つ目は、PRP に含まれる 7 種類の成長因子濃度は性別で統計学的に有意差を認めなかった。3 つ目は、解析した 7 種類のうち 4 種の成長因子(PDGF-BB、TGF- β 1、EGF、HGF)が PRP 内血小板数と統計学的に正の相関を認め、血小板数が多いほど成長因子濃度が高濃度であった。

年齢や性別と PRP に含まれる成長因子濃度の関係についての分析はいくつか行われている。Evanson らは LP-PRP を解析して、PDGF-BB、TGF- β 1、IGF-1、EGF の成長因子濃度は 25 歳以下が 26 歳以上と比較して高値だったと報告した。また女性は男性に比べて PDGF-BB、EGF、HGF、IGF-1 が高濃度だった[39]。Weiblich らは血小板濃縮率 5-6 倍、白血球の含有の評価はされていない PRP を検討し、IGF-1 のみ被験

者の年齢と負の相関を認めた。また PRP 内成長因子濃度と性別は相関を認めなかった [37]。2 回遠心法で調整した血小板濃縮率 5-6 倍の PRP では、年齢と弱い負の相関を認めたのは PDGF-BB と IGF-1 であったと Choi らが報告している [53]。また Dragoo らも同様に PDGF-BB と IGF が年齢と弱い負の相関を認めたと報告した [38]。本研究の結果も先行研究と同様に PDGF-BB と IGF-1 は年齢との間に相関を認めた。PRP を変形性膝関節症の治療で用いる場合、これらの成長因子の軟骨細胞への影響や成長因子の影響を与える有効濃度は重要である。PDGF-BB は血小板 α 顆粒より分泌される間葉系細胞の主要な分裂促進因子で、コラーゲン合成を促進し、軟骨細胞の細胞増殖および分化を促すだけでなく、再分化させる能力も有する [54-56]。PDGF の有効濃度は過去の報告では *in vitro* で 4.7- 300ng/mL の範囲で変化し、40ng / mL 未満の濃度で有効であることが多くの研究により報告されている [57, 58]。本研究の PDGF-BB 濃度は 20 歳代 3.3 ng/ml、30 歳代 3.5 ng/ml、40 歳代 2.1 ng/ml といずれの群の PRP も PDGF-BB の有効濃度には達していなかった。IGF-1 は幹細胞の軟骨形成および軟骨修復への分化を誘導し、成長線軟骨細胞分化に関与する [59, 60]。IGF-1 単独では、ヒト骨髄由来幹細胞の軟骨形成を誘導しないが、軟骨形成誘導に対する TGF-1 の効果を増強する [61]。過去の研究では軟骨形成を誘導する IGF-1 濃度は 50- 100 ng/ml と報告されているが [62]、本研究の PRP 内 IGF-1 濃度は 47-139 ng/ml で軟骨形成を誘導する至適濃度に達していた。以上より PDGF-BB と IGF-1 は年齢と負の相関関係を示したが、IGF-1 が軟骨細胞を誘導・分化を促進するために必要な至適濃度に達しており、変形性膝関節症の治療に PRP を使用する際に年齢の若い患者より採取した PRP の治療効果が高い可能性がある。

PRP 内の成長因子と性別との関係は、過去の報告が少なくコンセンサスはえられていない。 [34, 37]。異なる環境で調製された PRP は成長因子濃度が異なると考えられ、システムごとに成長因子濃度については評価するべきである。今回我々が用いた

PRGF-Endoret IV system で精製した PRP については性別により 7 種の成長因子濃度に違いはなかった。

PRP 内血小板数と成長因子濃度についての解析は、いくつかの報告がある。Magalon らは 5 つの異なるシステムにより精製された PRP の成長因子濃度を測定して、PRP の血小板数と VEGF、PDGF-AB、EGF、TGF- β 1 の間に正の相関を認めた[63]。また、PRP の白血球数と VEGF、EGF の間に正の相関を認めた。同様に Eppley らも血小板数が全血の 8 倍、白血球数が 5.4 倍の LR-PRP の成長因子濃度を測定して、PRP 内血小板数と VEGF、PDGF-AB、EGF、TGF- β 1 の間に正の相関を認めた[64]。しかし、PRP 内の血小板数が 8 倍になっているにも関わらず、PRP 内成長因子濃度は全血の 3-6 倍だった。PRP の血小板濃縮率を高くするほど PRP の成長因子が高濃度になる訳ではないことが示唆された。一方で、Zimmerman らは PRP に含まれる成長因子濃度は個体差が大きく、PRP 内の血小板数と成長因子濃度に相関を認めないと報告した[65]。本研究では PRP 血小板数と PDGF-BB、TGF- β 1、EGF、HGF 濃度との間に正の相関を認め、VEGF、FGF-2、IGF-1 濃度とは相関を認めなかった。PRP 血小板数と強い相関を認めたのは、今回調査した成長因子では TGF- β 1($r=0.75$)と EGF($r=0.71$)であった。TGF- β 1 は軟骨細胞の成長、分化および軟骨修復に中心的な役割を果たすと報告されている[66, 67]。過去の報告では間葉系細胞を刺激し、in vitro において軟骨形成を促進させる TGF- β 1 濃度は 0.3~20.0ng/ml であった[68, 69]。本研究では PRP 内 TGF- β 1 濃度は最低でも 11.0 ng/ml と軟骨細胞への作用を考慮すると、十分治療範囲の濃度であった。また、EGF は主に創傷治癒の現場などで発展してきた[70]が、その効果は多岐にわたり細胞間接着やタンパク質間相互作用および多タンパク質複合体の形成に関与し、他の成長因子の効果を増強する作用がある[71]。つまり PRP 内血小板数が高濃度であれば、軟骨形成を促進する TGF- β 1 および他の成長因子の効果を増強する EGF を高濃度に含有しており、軟骨治療および軟骨変性が病因の変形性膝関節症治療

において、治療効果の高い PRP であることが示唆された。また、先行研究では PRP 内血小板数と VEGF 濃度との間に相関を認めていた[53, 54]が、それらの研究ではいずれも LR-PRP を用いていたのに対して、本研究では LP-PRP を用いており、PRP 内の白血球数は平均 300/ μ l と少量しか含まれていなかった。VEGF 濃度と白血球数は正の相関を認めることが報告されているため[23, 63]、PRP 内に白血球がほとんど含まれないことが、VEGF と相関を認めなかった要因であろう。変形性膝関節症と VEGF の関連を調べた最近の研究では、ヒトにおける外傷後 OA のモデルである、外科的に誘導されたマウス膝 OA において、VEGF の発現の増加は、軟骨細胞および滑膜細胞における異化過程に関連し、VEGF 発現の減少は OA の進行を減弱させることを示した[72]。つまり膝 OA の治療において PRP 内 VEGF はできるだけ少ない方がよいと考えられる。本研究の結果で興味深いのは血小板由来ではなく、血漿由来の HGF が PRP 内血小板数と正の相関を認めたことである。HGF は炎症のプロセスを調整する主な転写因子である NF- κ B の阻害因子と報告されている[73]。HGF の抗炎症作用を期待して PRGF-Endoret®を用いる際には、血小板数が多い PRP の治療効果が高い可能性が示唆された。PRP は調製するシステムごとに PRP に含まれる血小板数や白血球数、成長因子濃度は大きく異なり[74]、調製システムごとに血小板濃度や成長因子濃度を測定し使用することが必要である。

本研究にはいくつかの限界がある。1 つは被験者の年齢層が限られている点である。スポーツ愛好家を想定して年齢層を 20 歳代、30 歳代、40 歳代としたため、50 歳以上の中高齢者に対しては本研究のデータは参考にならない。PRP を変形性膝関節症に対する関節内注射治療などの比較的高齢の患者が多い疾患に使用するためには、今後 50 歳以上のデータも必要となる。2 点目は、年齢や PRP 内血小板数に対する相関をみるにはサンプルサイズが小さい点である。様々な年齢・性別の検体を採取してさらなる解析が必要である。

3.8. 小括

本研究では PRGF-Endoret IV を用いて調製した PRP (PAW 分類 : P2-x-B6) に含まれる成長因子濃度について分析した。PDGF-BB と IGF-1 は被験者の年齢と負の相関を認め、PDGF-BB、TGF- β 1、EGF、HGF は PRP 内血小板数と正の相関を示した。性別では成長因子濃度に有意差はなかった。成長因子の軟骨細胞への作用と濃度の有効域を考慮すると、LP-PRP を用いて膝 OA の治療を行う際には年齢の若い患者より採取したものと PRP 内の血小板数が多いものが治療効果高いことが示唆された。

第4章 日本人変形性膝関節症に対する多血小板血漿治療-第 I / II a 相臨床試験

4.1. 背景

4.1.1. 変形性膝関節症(膝 OA)の疫学

2007年に65歳以上の老年人口が総人口に占める割合（高齢化率）が21%を越え、日本は超高齢化社会となった。国立社会保障・人口問題研究所の推計では、約50年後の2065年には高齢化率は約40%とされ[75]、1人の高齢者を1.3人の現役世代が支える社会が訪れると予測されている。高齢化に伴って加齢を基盤とした疾患も増加している。疫学調査では65歳以上の日本人の約20%、英国人の約50%がKellgren-Lawrence分類のGrade 2以上の変形性膝関節症であることが報告されている[76]。日本における大規模な疫学研究（戦略的 OA 統合研究計画：Research on Osteoarthritis Against Disability, ROAD プロジェクト）でも膝 OA の潜在患者数は2400万人、50歳以上で、痛みを伴う膝 OA 患者は820万人という推計が出された[77]。超高齢化社会となり運動器疾患が増加していくことは支援や介護が必要な人が増えていくことを意味している。2012年に介護保険の要支援者は127万人を数えたが、2016年の国民生活基礎調査[78]によると要支援者の17.2%と最も多くの原因となっているのが変形性膝関節症を中心とした関節疾患であることから、要介護状態にしないまでも広く高齢者の生活の質を低下させるのが変形性膝関節症であるといえる。

4.1.2. 膝 OA の病態

正常な膝関節では骨の表面を軟骨が覆っており、関節運動に際しては軟骨の表面同士がなめらかに擦れ合う。膝 OA では関節軟骨が摩耗し、進行により軟骨が消失して軟骨

下骨が露出する。軟骨の変化は、関節運動の円滑性が失われるだけでなく、衝撃吸収機能も低下することにより、痛みや日常生活活動障害を生じやすくなる。膝 OA の代表的な症状は、関節痛、関節可動域の制限、関節腫脹である。膝関節痛は、露出した軟骨下骨への荷重によるストレス増加や半月板の変性・断裂、関節炎により肥大増殖した滑膜などにより生じる。関節可動域制限は膝周囲の筋肉や靭帯などの軟部組織の拘縮、関節軟骨の摩耗・欠損や大腿骨および脛骨自体の変形による関節形状の変化、さらには関節炎による疼痛などが主な原因である。また軟骨の変性摩耗や荷重による機械的ストレスの結果、反動的に増殖した滑膜が関節液を大量に産生し、膝関節は腫張する。[79]。このように膝 OA の症状発生には様々な因子が関与しているが、膝関節への荷重負荷や関節安定性などによる機械的因子と、骨・軟骨代謝や炎症反応、栄養にかかわる生化学的因子が主なものと考えられている。

4.1.3. 膝 OA の治療

現在、本邦で行われている膝 OA の保存的治療としては、非薬物療法として大腿四頭筋の強化訓練やハムストリングのストレッチ体操などの運動療法やリハビリテーション、関節への負荷軽減を目的として減量、杖の使用、歩行補装具や足底板などの装具療法がある。薬物療法として行われているのは、非ステロイド性抗炎症薬(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAID)の内服や外用薬の貼付、副腎皮質ステロイドやヒアルロン酸の関節内注射である。このような膝 OA に対する非薬物療法や薬物療法、その併用によって十分な疼痛緩和と機能改善が得られない場合は、高位脛骨骨切り術や人工膝関節置換術などの手術治療が考慮される。本邦でのこの治療体系の基本となっているのは 2012 年 1 月に日本整形外科学会(日整会)より、Osteoarthritis Research Society International (OARSI) ガイドライン part II [80]が翻訳され、日本の診療実態に即して新たな情報も加味し適合化を図った「変形性膝関節症の管理に関する OARSI 勧告-

OARSI によるエビデンスに基づくエキスパートコンセンサスガイドライン(以下、日整会膝 OA ガイドライン)[81]」である。

4.1.4. 関節内注射と本邦での問題点

日整会 OA ガイドラインは OARSI ガイドライン part II に基づいているが、この OARSI ガイドラインは 2014 年 3 月に part IV が公表された[82]。日整会 OA ガイドラインと OARSI ガイドライン part IV を比較すると、最も特徴的な点は OA に対する関節内注射治療の位置づけの違いである。どちらのガイドラインでも治療に対する推奨強度(Strength Of Recommendation : SOR、単位は%)を示しているが、副腎皮質ステロイドの関節内注射は OARSI では SOR 78%であるのに対して、日整会膝 OA ガイドラインでは 67%と本邦での推奨度は低い。副腎皮質ステロイド関節内注射は効果が即時的である上、抗炎症作用が強いが、関節破壊や感染といった副作用が危惧される。ヒアルロン酸(Hyaluronic acid: 以下、HA)の関節腔内注射は OARSI が SOR 64%、日整会では 87%と本邦でより強く推奨されている。欧米では、HA 製剤は NSAIDs 無効例、人工関節置換術の直前といった中等度から重度の膝 OA に対してのみ使用されているのに対して[83]、わが国においては膝 OA の初期から使われているといった膝 OA 治療に対する HA 関節内注射の位置づけの違いが SOR の乖離の要因となっている。HA の疼痛抑制効果に関しては Bannuru ら[84]のメタアナリシスの結果からは、4 週から 24 週にかけて effect size は小さいものの、プラセボに比べて HA 関節内注射は有意に疼痛を抑制することが示されている。また副腎皮質ステロイド関節内注射と比べても、Bannuru ら[85]のメタアナリシスでは、HA 関節内注射は 12 週以降からステロイドに比べて有意な疼痛抑制効果が認められると報告されている。つまり本邦において HA 関節内注射は、膝 OA のステージ初期から反復投与され、長期投与により効果を認めるため、膝 OA の保存療法として一般化している。

そこで、HA 関節内注射について当院での使用実態と効果を当院のレセプトデータより調査した。対象は 2013 年 1 月～2015 年 12 月まで約 3 年間のレセプトデータで、「変形性膝関節症」「50 歳-75 歳」「スベニール®ディスポ」「アルツ®ディスポ」のキーワードに該当した 114 名 132 膝を対象とした。診療録より使用実態により「効果あり：HA 注射 5 回もしくは 5 回以下で軽快し、その後注射をしていない」「維持：5 回を超えて注射継続している、もしくは HA 注射を再開している」「手術移行：手術に移行した」の 3 群に分け、効果を判定した。結果は、効果ありが 37 膝(28%)、維持が 59 膝(45%)、手術移行が 36 膝(27%)で、数回の HA 関節内注射では効果が不十分で HA 関節内注射を続けているもしくは手術に移行した患者は 7 割以上を占めた。この結果より HA 関節内注射は本邦で一般的な保存療法で、膝 OA のステージ初期より多くの患者に使用されているが、数回の注射では効果が不十分で慢性的に HA 関節内注射を継続するか、手術に移行する患者が多いことが示された。

4.1.5. 膝 OA に対する PRP 関節内注射治療

PRP 治療は、血小板 α 顆粒内の様々な成長因子と血漿内に含まれる成長因子や接着因子・糖蛋白が生体内でのバランスを保った状態で複合的に組織損傷に作用し、簡便性と安全性を併せ持つ治療である[7, 8]。PRP の関節構成体への作用については Akeda ら[86]は、ウシの軟骨細胞の培地に PRP、PPP、生理食塩水を添加して培養し、PRP 群が DNA 含有量・プロテオグリカン・コラーゲン産生で PPP 群・生理食塩水群よりも良好だったと示し、Spreafico ら[87]は PRP が間葉系幹細胞の増殖能や軟骨分化マーカーの促進効果があること、Anitua ら[40]は PRP により滑膜細胞が HA 産生を促進して関節液の性質を改善させることを示した。臨床での使用例も報告されており、近年報告された 5 編の膝 OA に対する前向きランダム化比較臨床試験では、一般に行われている HA 関節内注射と比較し、PRP 関節内注射治療の有効性が示唆されている[46, 88-

91]。しかしながら、これらの報告は海外での臨床試験結果であり、治療方針や手術に至るタイミングが異なる日本人膝 OA 患者に対しても同様の有効性が現れるかに関しては不明である。また PRP の調製法や投与方法が異なり、安全性に関しても再検討が必要である。そこで、本研究では、日本人膝 OA 患者を対象とした治療プロトコルを作製し、その安全性と実施可能性の検証を行う。

4.2. 目的

日本人膝 OA 患者に対する PRP 関節内注射治療の安全性と実現可能性を明らかにすること。

4.3. 対象と方法

本研究は筑波大学附属病院倫理委員会の承認を得て研究を行った(H25-040)。

4.3.1 患者選択

当院整形外科外来に膝関節痛を主訴として受診した日本人膝 OA 患者のうち、同意取得時に満 50 歳以上の 75 歳未満の男女、3 カ月以上続く膝関節痛で Visual analogue scale(以下、VAS)が 35mm 以上、画像診断(単純 X 線)上、Kellgren-Lawrence 分類 [92]が 1-3(図 6)、Body Mass Index(以下 BMI)が 20-32 kg/m²、片側のみの治療を要する患者で全研究期間にわたって観察可能である患者を対象とした。除外基準は以下の通りである。多関節痛を認める患者、1 年以内に膝関節鏡手術歴を有する患者、3 か月以内にヒアルロン酸もしくはステロイド関節内注射歴を有する患者、2 週間以内の NSAIDs 内服の既往を有する患者、感染(化膿性膝関節炎・大腿骨/脛骨骨髓炎)の既

往、易感染性宿主（糖尿病・免疫不全・慢性腎不全・肝硬変（Child-Pugh score の grade A-C）・免疫抑制剤使用など）、自己免疫疾患（関節リウマチ・全身性エリテマトーデスなど各種膠原病）、貧血（ヘモグロビン値 10 g/dl 未満）、血液疾患（血友病など凝固・線溶系異常）、抗凝固剤（アスピリン・ワーファリンなど）を使用している患者は除外した。

4.3.2. PRP 調製(図 7)

PRP の調製は適正製造基準(Good Manufacturing Practice: GMP)準拠施設である筑波大学附属病院内の Cell Processing Factory で行った。調製された PRP が食事摂取の影響を受けないように、注射を受ける当日は採血予定 4 時間前以降を禁食とし、飲水（クリアウォーター）のみ許可した。末梢血を 36 ml 採血し、抗凝固剤含有採血管（3.8% sodium citrate）4 本に各 9.0 ml 回収し、1 回遠心分離（PRGF system IV : 580g・8 分間・室温）によって、スピッツごとに赤血球層、buffy coat 層、血漿層に分離した。buffy-coat を吸引しないように buffy-coat の直上に安全域を設けた上で、この血漿層を 2 等分して下層を Platelet rich plasma(PRP)、上層を Platelet poor plasma(PPP)と定義した。PRGF-Endoret® IV System に付属している吸引器を使用して、各スピッツより 2ml ずつ計 8 ml の PRP を採取し、そのうち 6 ml を関節内注射に使用した。残りの約 2ml の PRP は 0.3 ml を細菌培養検査に提出、0.7 ml を血算データの測定に使用した。残り 1ml は-80℃冷凍庫で保存し、成長因子濃度の測定に使用した。

4.3.3. PRP 関節内注射

関節内注射は当院整形外科外来で行った。患者を仰臥位、膝関節約 20 度屈曲位とし

て、清潔操作に留意して上外側進入法で膝蓋上嚢に約 6 ml の PRP を 21 ゲージ針で注入した。注射時に局所麻酔薬は併用しなかった。注射前と注射後 30 分の血圧、心拍数、体温を測定した。注射後、24 時間は激しい運動は行わないように指導したが、日常生活活動は特に制限をしなかった。注射間隔と注射回数に関しては先行研究を参考にして決定し、1 週おきに 3 回注射とした[93]。注射は同一医師が行った。

4.3.4. 血算測定

調製された PRP は塩化カルシウムを加える前に 0.5ml を採取して血算を測定した。採取した末梢血(Peripheral Blood: PB)、PPP、PRP の赤血球数・白血球数・血小板数を多項目自動血球計数装置 (Sysmex KX-21N, Sysmex Corp., Kobe, Japan)で測定した。PRP の血小板数を PB で除したものを PRP 血小板濃縮率と定義して算出した。

4.3.5. 成長因子濃度測定

Single freeze-thawing cycle により血小板内の成長因子の放出を促すため、-80 度で冷凍された PRP を室温で解凍して、10000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を測定した。Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)、tissue growth factor (TGF)- β 1、vascular endothelial growth factor (VEGF)の 3 項目について enzyme-linked immunosorbent assay (以下、ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)で成長因子濃度をそれぞれの ELISA キットに付属している手順書に従って測定した。測定の精度を高めるため、各スタンダードや PRP 試料は 2 回ずつ測定(duplicate)し、その平均値を測定値として採用した。

4.3.6. 評価項目

投与された PRP の安全性を確認するために、投与する前に PRP 0.7ml を採取して細菌培養検査に提出して、PRP 調製の過程で細菌感染していないことを検査で明確にした。PRP 関節内注射の安全性に関しては、治療中および経過観察中に生じた有害事象すべてを患者に記載するよう依頼した。特に膝痛、関節のこわばり、関節腫脹、注射部の灼熱感などの症状について発症、持続期間、重症度などを詳細に記録した。痛みに対してはアセトアミノフェン内服のみ救済処置として認めた。

PRP の関節内注射の実現可能性を検証するために、治療前、最終注射時から 1、3、6 ヶ月後に評価した。評価項目は本邦において膝 OA 患者の膝関節機能評価に一般的な評価法である VAS、日本人膝 OA 患者機能評価尺度 (Japanese Knee Osteoarthritis Measure: JKOM) score、日本整形外科学会 OA 膝治療成績判定基準 (Japanese Orthopaedics Association: JOA) score を用いた。JKOM score と JOA score は過去に海外で標準的に使用されている WOMAC score や SF-36 score と比較して、その信頼性や妥当性が示されている [94-97]。VAS に関しては、治療前と治療後 6 ヶ月の値を比べて 50%以上減少している症例数と割合を算出した。

治療前、治療後 1、3、6 ヶ月での単純 X 線による画像評価もおこなった。単純 X 線は、臥位正面像、側面像、スカイライン像を撮影して、2 人の評価者により K-L grade を評価した。また膝 OA のバイオマーカーとして知られている血清ヒアルロン酸濃度も治療前・治療後 1、3、6 ヶ月で測定した [98, 99]。

4.3.7. 統計解析

同一群内の経時的な変化に関しては Bonferroni 法による多重比較検定、2 群間の比較に関しては、Student-t 検定を用いた。すべての統計学的解析は SPSS Statistics 21.0 (International Business Machines Co., New York, NY, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

4.4. 結果

4.4.1. 患者背景

本研究には 11 名が参加登録をしたが、1 名は治療期間中に上気道炎に伴う発熱が出現した上、高脂肪食を摂取したため調製した PRP が白濁し、除外となった。したがって 10 名の患者を調査した。患者背景は表 6 に示す。全例女性、平均年齢：60.6 歳、治療側：右 6 例/左 4 例、平均 body mass index(BMI)：23.4 kg/m²、Kellgren-Lawrence(以下 KL)分類 grade1：2 例、2：4 例、3：4 例であった。罹患コンパートメントは内側が 8 膝、外側が 4 膝、膝蓋大腿関節が 4 膝だった。関節水腫を認める症例はなかったため、注射時に関節液の排液を要する症例はなかった。

4.4.2. 血算・成長因子濃度

血算と成長因子濃度を表 7 に示す。PRP の平均血小板数($39.4 \pm 13.1 \times 10^4/\mu\text{L}$)は末梢血($24.0 \pm 3.7 \times 10^4/\mu\text{L}$)や PPP ($27.1 \pm 5.8 \times 10^4/\mu\text{L}$)より高く、血小板濃縮率は 1.7 倍だった。血小板数や白血球や好中球の存在により調製された PRP を分類する Platelets, Activation, and White cells classification system(PAW 分類)[49]では P2-x-B8 に分類された。PDGF-BB、VEGF、TGF- β 1 の成長因子濃度は、それぞれ 6.8 ± 3.4 ng/mL、 213 ± 207 pg/mL、 33.3 ± 10.8 ng/mL であった。

4.4.3. 安全性

調製した PRP の細菌培養検査は全検体陰性であった。各回注射の有害事象の結果は表 8 に示した。10 名の患者に 30 回 PRP 関節内注射を行ったが、有害事象は 22 回の注射で発生した。発生した事象はいずれも軽症で、研究を中止しなければいけないほど

の重症な事象は発生しなかった。すべての有害事象は経過観察のみで 48 時間以内に症状が消失した。

4.4.4. 有効性

VAS の平均値は治療前から治療終了後 1・3・6 カ月の経過で、それぞれ 71.6、12.5、15.1、18.4 と推移し、治療前と比較し治療後 1、3、6 カ月では統計学的に有意に膝関節痛は軽減していた(図 8、 $p<0.001$)。また VAS の平均値は注射後から注射後 6 カ月まで維持されていた。治療後 6 カ月時点で、治療前の VAS よりも 50%以上軽減した患者は 10 例中 8 例(80%)だった。JKOM は治療前から治療後 1・3・6 カ月の経過で、それぞれ 36.2、14.4、13.3、15.5 と推移し、治療前と比べて治療終了後 1 カ月において統計学的に有意に改善していた(図 9、 $p=0.044$)。治療前・治療終了後 6 カ月を比較した JOA score は、治療前 70 が治療終了後 6 カ月で 89.5 と改善し(図 10、 $p=0.002$)、項目別にみると疼痛・歩行能力と疼痛・階段昇降能が統計学的に有意に改善していた(それぞれ $p=0.034$ 、 $p<0.001$)。画像評価では治療前と治療後 6 カ月で K-L 分類の重症度の進行はいずれの症例でも認めなかった。また血清 HA 濃度は術前 48.2 ± 23 ng/mL、治療後 1 カ月 69.0 ± 58 ng/mL、3 か月 98.2 ± 64 ng/mL、6 カ月 97.5 ± 58 ng/mL ($p>0.05$)であった。

4.5. 考察

本研究で最も重要な所見は、日本人膝 OA 患者に対する PRP 関節内注射は、注射終了後 6 カ月間重篤な有害事象を引き起こさなかったことである。注射直後の膝痛や、膝関節の刺すような痛み、歩行時痛などの軽微な有害事象は 30 回の注射中 22 回(73%)で認めたが、いずれの症状も 48 時間以内に消失した。Sanchez ら[46]は我々と同じ調製

システム、同じ治療プロトコール(1週おきに3回、6mlのLP PRPを注射)でHA関節内注射との比較試験を行った(PRP群 89例 vs HA群 87例)。有害事象は感染など重篤なものは発生せず、26例に何らかの症状(腰痛、股関節痛、反対側の膝関節痛、頭痛、坐骨神経痛、肩関節痛、感冒など)が発生したが治療とは関係ないものが96%であり、1例のみ3回目の注射後に局所疼痛が発生したが48時間以内に自然消失したとしている。また Vaquerizo ら[91]も同様の調製システムでHAとの Randomised Control Trial(以下、RCT)を行い、有害事象に関しては重篤なものは発生せず、注射時の痛みなどの軽微なものが認められたのみだった。Patel ら[89]はPRPを1回注射した群、2回注射した群、生理食塩水を注射した群の3群でRCTを行った。めまい、発汗、頭痛、吐き気、胃部不快、失神、頻脈といった有害事象を認めたが、いずれも注射時に発生し2-3時間で自然軽快したとのことであった。また、注射部周囲の疼痛や膝のこわばりがPRPを1回注射した群で14.8%、2回注射した群で12%発生し、これも注射後2日間で自然軽快したとしている。これらの有害事象は注射した血小板数と有意な関連が認められ、血小板活性化のために注射直前に添加した塩化カルシウムが影響を及ぼした可能性があると考えられている。Filardo ら[88]も同様にHA群とのRCTを行い、有害事象は感染など重篤なものは発生しなかったが、PRP群ではHA群と比較し有意に注射後の局所疼痛が発生し、数日で自然軽快したとしている。その理由としてPRPに含有される白血球による炎症作用ではないかと考察している。本研究の結果および過去の研究結果でも重篤な有害事象は発生せず、PRP関節内注射は臨床上、膝OAの安全な治療法と考えられた。

PRP関節内注射の膝OAへの有効性に関しては、6つのRCTをまとめたMeheuxらのシステマティックレビューによると[100]、PRP関節内注射は12か月以上の間、膝OAの臨床症状の改善を認め、臨床症状とWOMAC scoreはHA関節内注射よりもLeukocyte poor PRP関節内注射の方が注射後3-12か月の期間で明らかな改善を認め

た。PRP 治療は膝 OA の治療として有利な報告を認めるが、これらの RCT はいずれも欧米人を対象とした研究で、これらの所見が日本人に当てはまるとは限らない。また、最近の研究では人種間で血小板機能に差異を認めるという報告もあり [101, 102]、日本人膝 OA に対する PRP 関節内注射の有効性について検証を行う必要がある。本研究は日本人 OA に対する PRP 関節内注射の結果を示した最初の報告であり、10 名中 8 名の膝 OA 患者の VAS を治療前と比べて 50%以上軽減させ、その効果が 6 ヶ月持続した。また、本研究は日本特有の評価項目である JOA score と JKOM score により評価を行った。特に JKOM score は欧米と日本の生活様式の違いを考慮して、日本人の生活様式に合わせた Quality of life (以下 QOL) 評価法で、SF-36 score や WOMAC score と比較しても信頼性や妥当性が示されている。JOA score は治療前と治療後 6 ヶ月を比較して、総合点と「疼痛・歩行能力」及び「疼痛・階段昇降能力」の項目が明らかに改善した。JKOM score は治療前と比較して治療後 1 ヶ月で明らかな改善を認めた。このことより膝 OA に対する PRP 関節内注射は患者の QOL を改善する可能性があることが示唆された。

膝 OA は多因子疾患であり疼痛の発生原因も複雑であるが、主には膝関節への荷重負荷や関節安定性などが関係する機械的因子と、骨・軟骨代謝や炎症反応、栄養に関わる生化学的因子が主なものと考えられている。PRP の鎮痛機序については *in vitro* の実験で関節内構成体に対して PRP は軟骨細胞 [86] や間葉系幹細胞 [87]、滑膜細胞 [40] に作用することが示されているが、最も明確な膝 OA に対する PRP の作用機序は NF- κ B シグナルを介した抗炎症作用であると考えられる。NF- κ B シグナルは様々な生命現象を制御する細胞内シグナルで、細胞の生存・増殖・分化・組織形成・炎症・免疫応答などに関与する。その主要転写因子は p65 であり、通常は細胞質に不活性化状態で存在するが、IL-1 β や TNF- α といった炎症性サイトカインの刺激などにより活性化され核内へ移行し、炎症性蛋白の発現調節 (COX-2、PGE₂ など) を介して関節軟骨変性が進行

する[103]。in vitro での実験で、PRP 投与は膝関節構造体である軟骨細胞、半月板細胞、滑膜細胞、組織前駆細胞において NF- κ B シグナル活性経路を阻害し抗炎症作用を示すことが明らかとなっており、in vivo の実験では、この抗炎症作用による軟骨変性抑制（異化促進を抑制）効果が示唆されているため、これらの実験結果から現時点で最も明確な膝 OA に対する PRP の作用機序は NF- κ B シグナルを介した抗炎症作用であると考えられている[73, 104]。つまり、この効果は前述の生化学的因子に対して主に作用すると理論的には考えられる。本研究では、関節内のバイオマーカーとして血清 HA 濃度を測定し、治療前に比べて治療後 3 か月まで上昇した。血清 HA 濃度は OA のマーカーとして報告されているが[99]、K-L grade 4 のような重症 OA では有用であるが、軽症から中等症の OA では有用ではないと報告されている[98]。本研究は K-L grade 1-3 の軽症から中等症の膝 OA が対象の研究であるため、バイオマーカーとして適切でなかった可能性がある。今後の研究では異なるバイオマーカーを考慮する必要がある。

一方で機械的因子の面から見ると、変形性膝関節症の病態は慢性の機械的負荷によって荷重面を中心に軟骨表面の変性が生じ、剪力による軟骨亀裂の発生、さらに軟骨組織の摩耗、剥離、そして骨組織の露出へと進行する。さらに露出した骨組織は象牙化へと進む。この過程で骨と骨が直接接するようになると関節の運動時の痛みにつながる。変形性膝関節症の機械的因子を評価するために、われわれの研究では単純 X 線を用いた。本邦で単純 X 線は一般に広く普及しており、比較的簡便に骨やアライメントの評価を行える。結果としては 6 ヶ月の経過観察期間で膝 OA の病期進行はなかった。しかし、病期進行を見るには経過観察期間が短く、膝 OA の病期進行抑制効果があるかは不明である。単純 X 線で評価をするのであれば、より長い経過観察期間が必要と考えられる。また MRI では膝 OA 発症早期より詳細に関節内構造体（関節軟骨・軟骨下骨・半月板・滑膜・関節包組織など）が観察できるため、経時的に撮影することで画像的に関節内構造体に対する PRP の作用が評価できる。

本研究にはいくつかの限界がある。本研究は日本人膝 OA 患者に対する PRP 関節内注射の安全性と実施可能性を検証するための第 I + II a 相の臨床試験として行ったため、比較対照群がなく、経過観察期間も 6 ヶ月で、症例数も安全性を確認するための最小限の数である 10 例であった。本研究では PRP 関節内注射の有効性を検証することはできず、有効性を検証するにはさらなる研究が必要である。

4.6. 小括

本研究は日本人膝 OA に対する PRP 関節内注射の安全性と実現可能性を確かめるため、第 I / II a 相の臨床試験として行った。PRP 関節内注射は日本人膝 OA 患者にとって安全な治療法で、治療により軽微な有害事象が起こる可能性はあるが 48 時間以内に消失した。本治療は 6 ヶ月以上の期間、膝 OA の痛みを軽減する可能性があるが、有効性を示すにはさらなる研究が必要である。

第5章 総括

5.1. 考察

PRP 治療は簡便性と安全性をあわせ持つ非常に魅力的な治療法であり、形成外科や口腔外科、整形外科特にスポーツ傷害を中心に海外から PRP 治療の RCT の報告が多くみられている。しかし、生物学的活性の異なる PRP が治療に用いられているのが現状であるため、その治療成績に一定の見解が得られていない[29]。PRP を調製するキットは現在非常に多く発売されており、キットごとに特徴があり、調製された PRP は遠心条件(遠心回数や回転数)や白血球の有無、活性化の有無などにより成分が異なる。このため、使用するキットの特徴や、調製される PRP の特性を理解する必要がある。これまでも各種キットによって調製された PRP 内の成長因子を検討した研究[23, 74]や、PRP が白血球を含むか否かにより成長因子濃度が異なるかを検討した研究[105]、より臨床に即したものでは採血と PRP 調製の1日うちのいつ行われるのが適当かを調べた研究[48]などが行われ、調製された PRP の特性が調査されてきた。我々は、第4章の研究で用いた PRGF-Endoret® IV System (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)により臨床研究を進めているが、この調製システムは1回遠心法、白血球は含まないもしくは含むとしても少量(いわゆる Leukocyte poor(LP)-PRP)、CaCl₂による活性化を選択できる。この LP-PRP に対して PRP を評価する際に広く用いられている PRP 内の成長因子濃度を測定した。本研究より PDGF-BB と IGF-1 は被験者の年齢と負の相関を認め、PDGF-BB、TGF-β1、EGF、HGF は PRP 内血小板数と正の相関を示した。性別では成長因子濃度に有意差はなかった。それぞれの成長因子の軟骨細胞への影響を考慮すると、今回調査した7種類の成長因子のうち IGF-1・TGF-β1 が重要な成長因子と考えられ、変形性膝関節症の治療に使う際に LP-PRP においては若い患者より調製したものと PRP 内の血小板数が多いものが、膝 OA の治療効果が高いこと

が示唆された。このことは我々が LP-PRP により研究を進めていく上での重要な基礎データとなる。

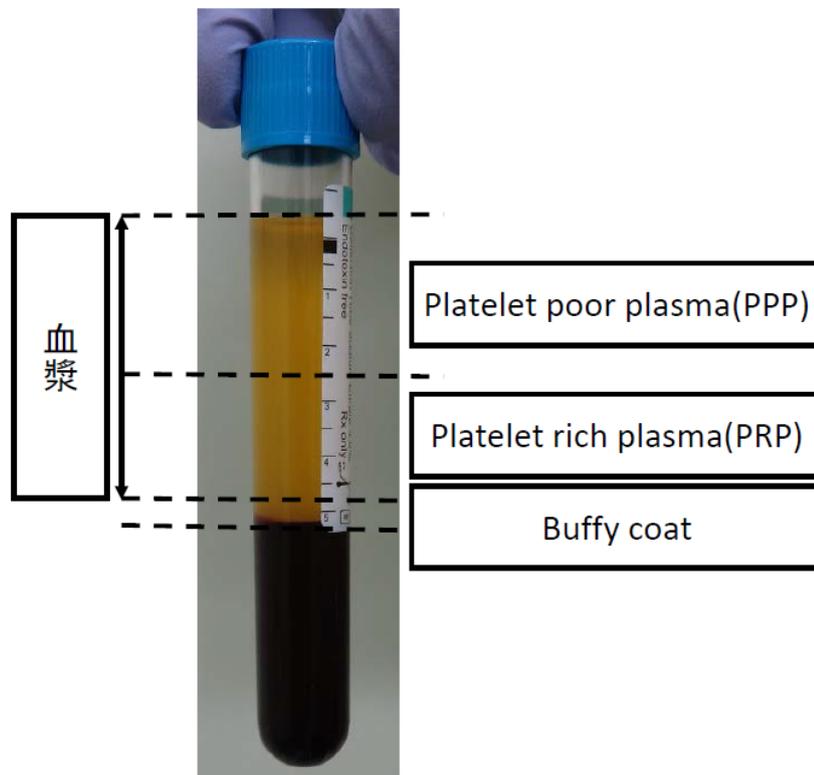
膝 OA は中高年の多くが罹患する退行変性を基盤とした疾患であり、我々整形外科医が目にする頻度の高い common disease である。膝 OA は多因子疾患であり、その発症と疾患の進行、増悪には多種の因子が関わっているが、膝関節への荷重負荷や関節安定性などによる機械的因子と、骨・軟骨代謝や炎症反応、栄養にかかわる生化学的因子が主なものと考えられている。この生化学的因子に対する新しい治療として PRP 関節内注射治療が期待されている。PRP の関節構成体への作用については Akeda ら[86]は、ウシの軟骨細胞の培地に PRP、PPP、生理食塩水を添加して培養し、PRP 群が DNA 含量・プロテオグリカン・コラーゲン産生で PPP 群・生理食塩水群よりも良好だったと示し、Spreafico ら[87]は PRP が間葉系幹細胞の増殖能や軟骨分化マーカーの促進効果があること、Anitua ら[40]は PRP により滑膜細胞が HA 産生を促進して関節液の性質を改善させることを示した。臨床的にも近年報告された 5 編の膝 OA に対する前向きランダム化比較臨床試験では、一般に行われている HA 関節内注射と比較し、PRP 関節内注射治療の有効性が示唆されている[46, 88-91] この新たな保存療法となる可能性を持った PRP 関節内注射を当院でも導入すべく、第 I/II a 相の臨床試験を行った。その結果、PRP 関節内注射は日本人膝 OA 患者にとって安全な治療法で、治療により軽微な有害事象が起こる可能性はあるが 48 時間以内に消失したことが示された。また、本治療は 6 ヶ月以上の期間、膝 OA の痛みを軽減する可能性も示せた。この安全性のデータを元に、今後さらなる臨床研究を立案、実行し、本治療を発展させていきたい。

5.2. 結論

日本人被験者の末梢血より LP-PRP を作製して成長因子濃度を分析した。PDGF-BB と IGF-1 は被験者の年齢と負の相関を認め、PDGF-BB、TGF- β 1、EGF、HGF は PRP 内血小板数と正の相関を示した。性別では成長因子濃度に有意差はなかった。

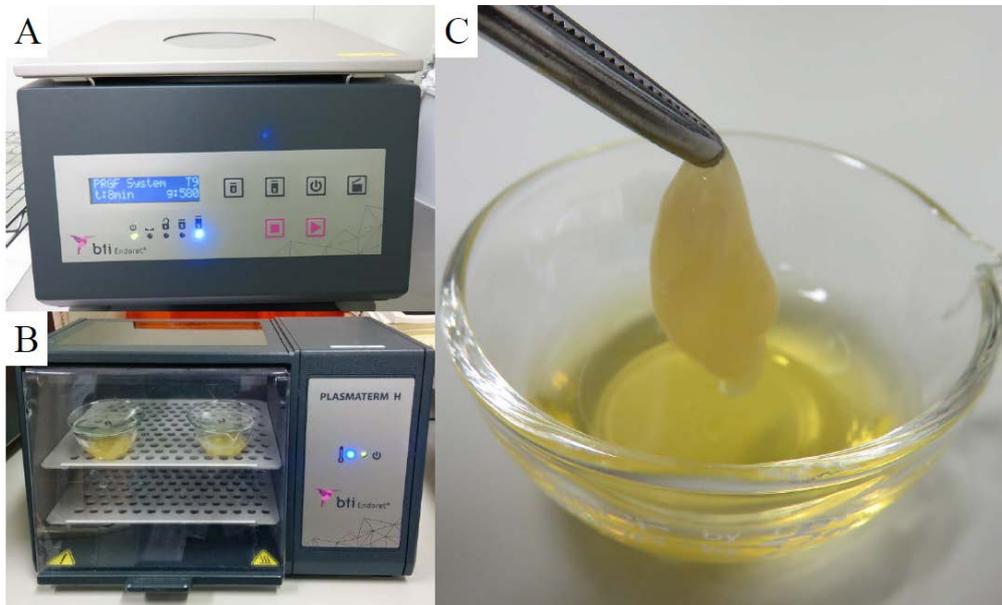
日本人膝 OA 患者に対する PRP 関節内注射治療は重篤な有害事象を認めず、治療の安全性を示すことができた。本治療は 6 ヶ月以上の期間、膝 OA の痛みを軽減する可能性があるが、有効性を示すにはさらなる研究が必要である。

図 1: 遠心後の末梢血



血漿層を 2 等分し、その下層の血小板が多く含まれる層を PRP と定義し、上層は PPP と定義する。

図 2: PRP の調製



A: PRGF-IV遠心機(PRGF-Endoret® IV System; BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)

B: 抽出された PRP は 5%CaCl₂ を添加し活性化して 37°C で 1 時間静置する

C: 1 時間静置後の PRP はクロットを形成する。その上清を保存する。

図 3: PAW 分類(文献 28 より改変)

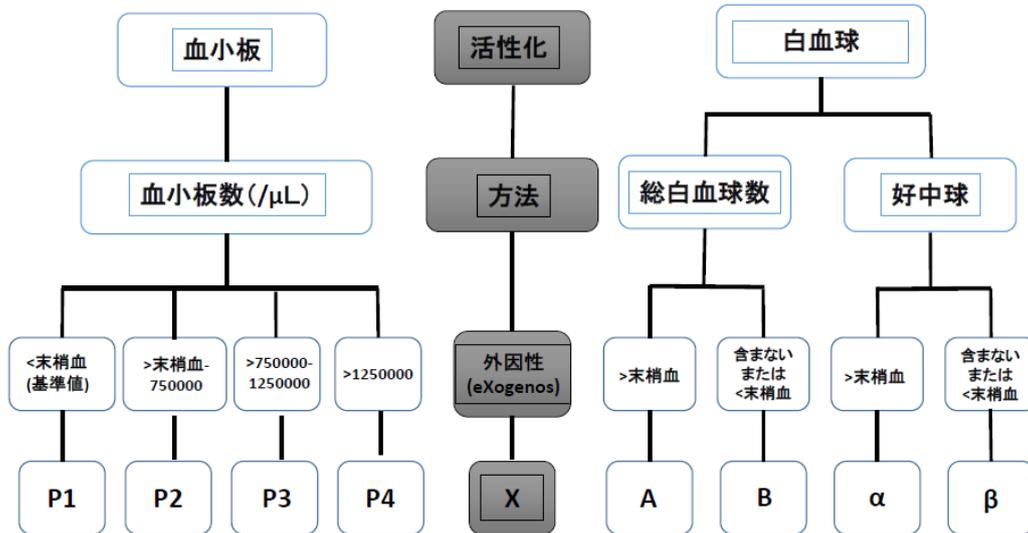
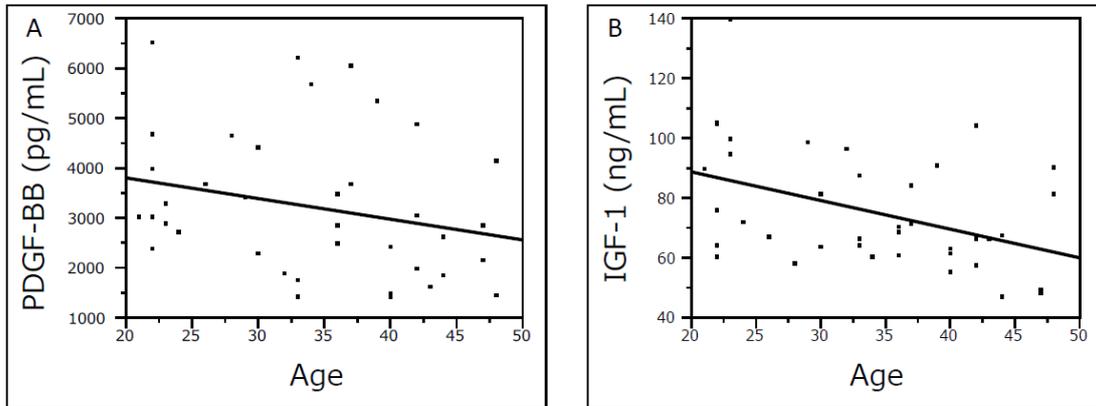


図 4: 被験者の年齢と PRP 内成長因子濃度との相関



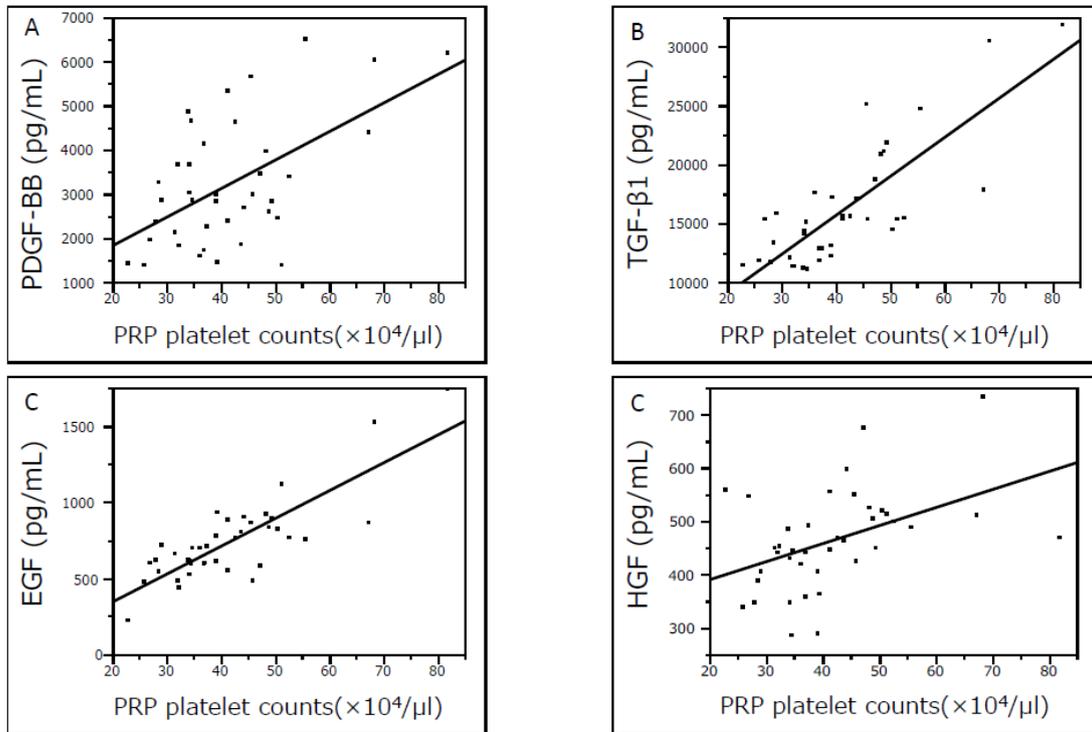
PDGF-BB と IGF-1 濃度は年齢との相関を認めた

Spearman 順位相関分析

PDGF-BB $r = -0.32$, $p < 0.05$

IGF-1 $r = 0.39$, $p < 0.05$

図 5: PRP 内血小板数と成長因子との相関



Spearman 順位相関分析

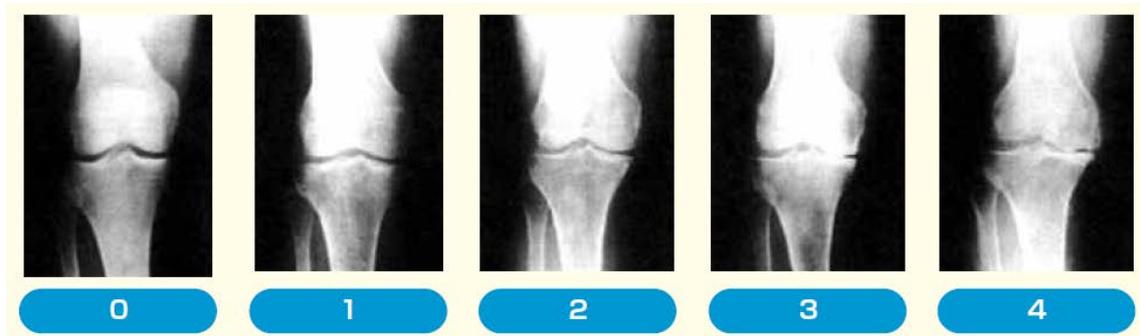
PDGF-BB $r = 0.39$, $p < 0.05$

TGF-β1 $r = 0.75$, $p < 0.001$

EGF $r = 0.71$, $p < 0.001$

HGF $r = 0.48$, $p < 0.05$

図 6: Kellgren-Lawrence 分類



Grade 0 : 正常

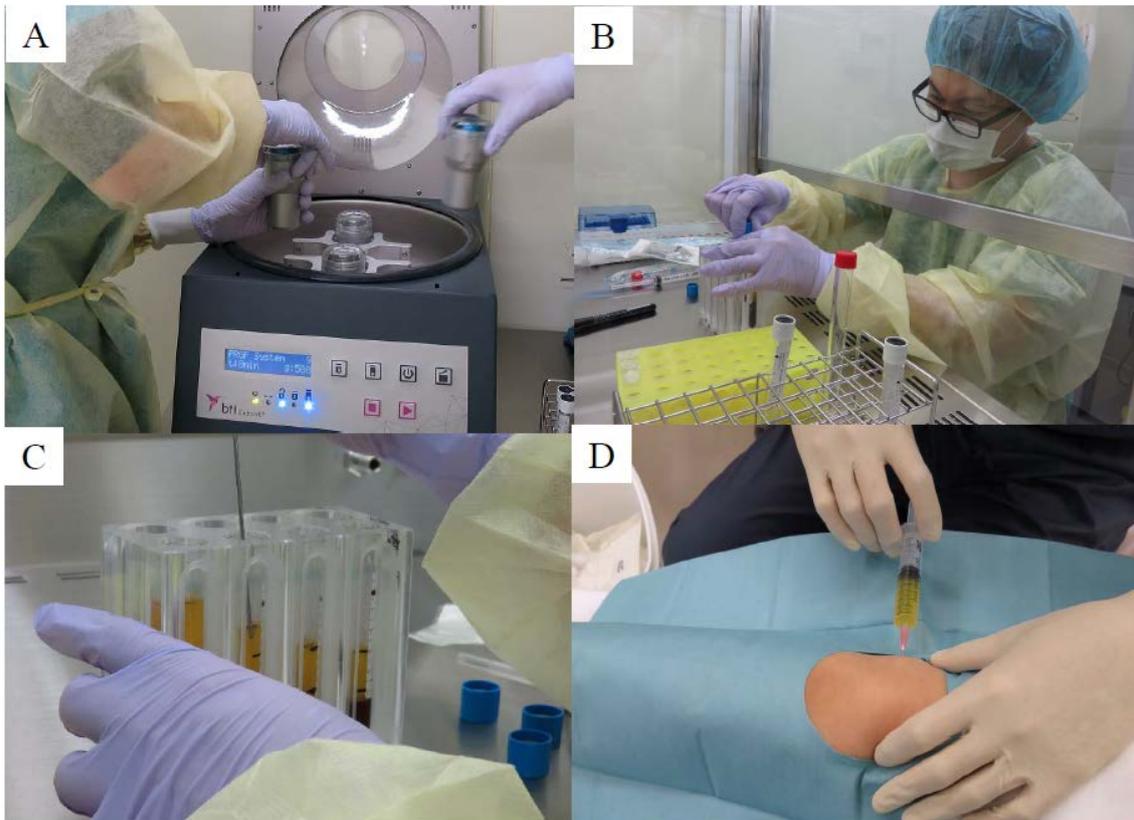
Grade 1 : 骨棘の可能性、関節裂隙狭小化の疑い

Grade 2 : 明確な骨棘、関節裂隙狭小化の可能性

Grade 3 : 中等度で複数の骨棘、明確な関節裂隙狭小化、骨硬化、骨端部変形の可能性

Grade 4 : 大きな骨棘、著明な関節裂隙狭小化、高度の骨硬化、明確な骨端部変形

図 7: PRP 調製



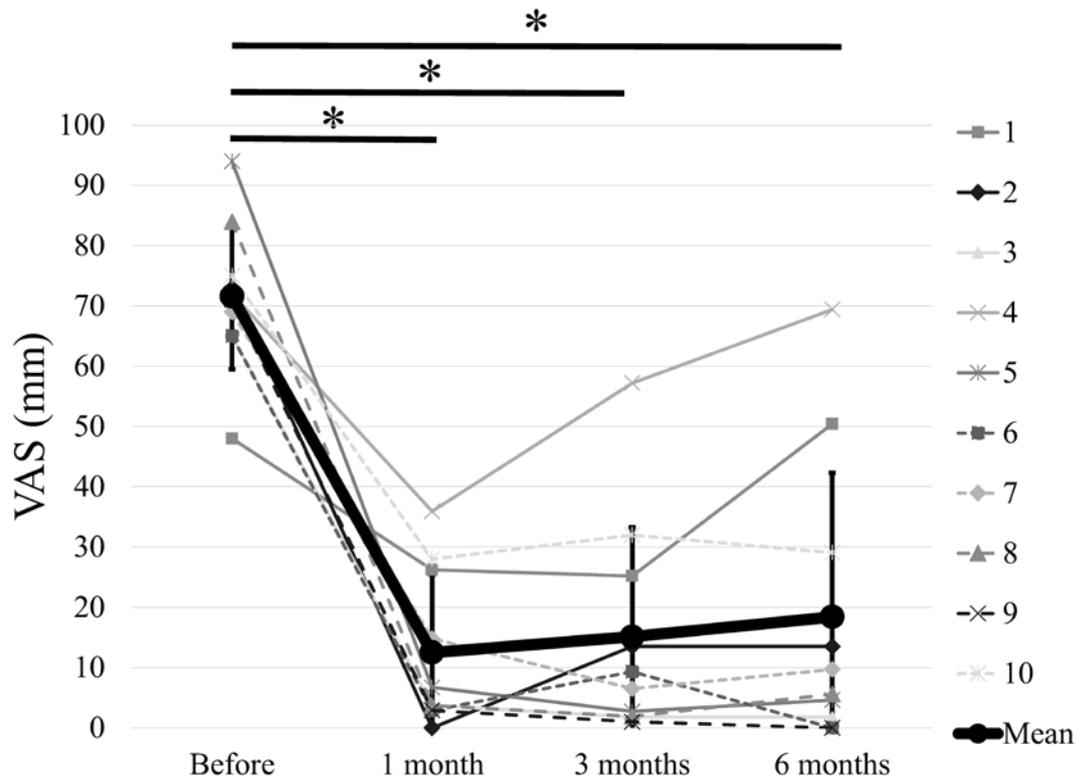
A: PRGF-IV遠心機(PRGF-Endoret® IV System; BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)

B: PRP の調製は GMP 準拠した CPF 内で行う

C: PRGF-IVキットに付属しているピペットで PRP を抽出する

D: 清潔操作で膝蓋上囊に PRP 6ml を関節内注射

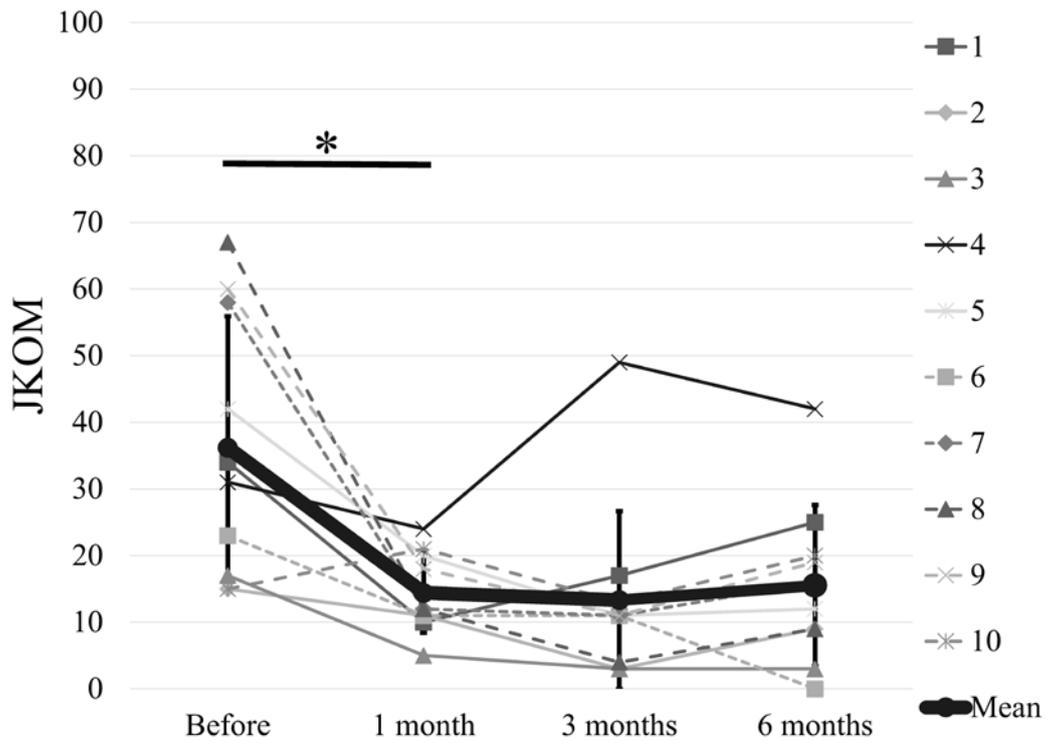
図 8: 治療前から治療後 6 ヶ月までの Visual Analogue Scale(VAS)の推移



10 名の変形性膝関節症患者に対して、膝関節内に多血小板血漿を週に 1 回 3 週間投与した。VAS スコアは、注射前および注射後 1,3,6 か月で評価した。 * P < 0.05

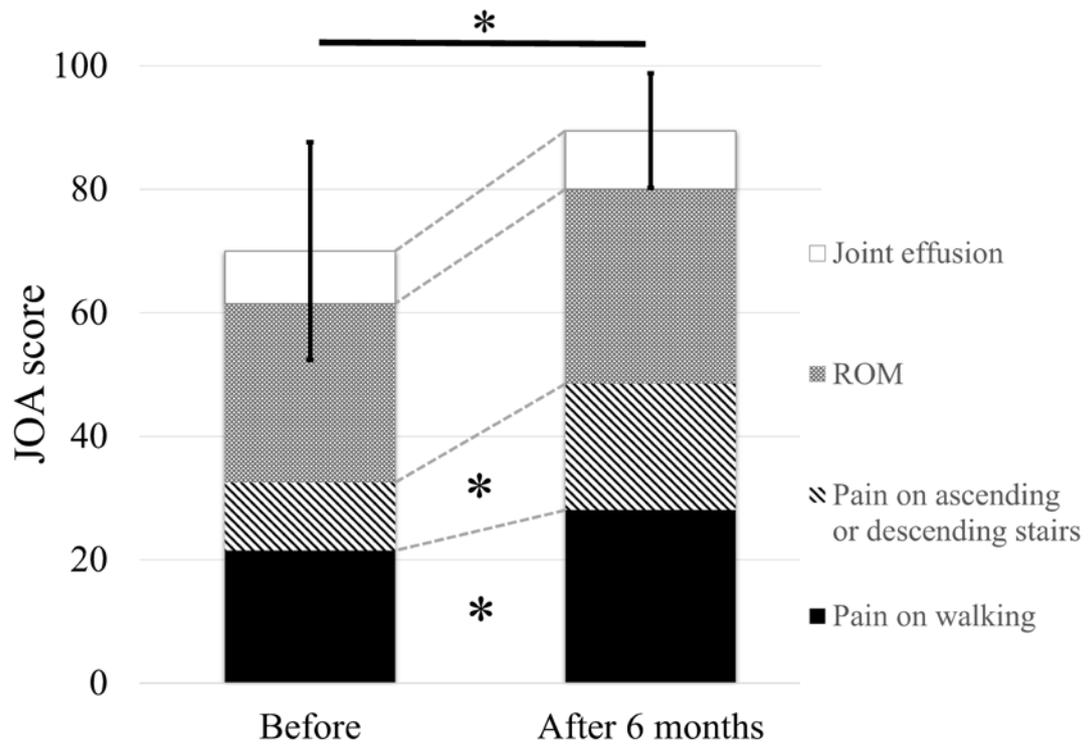
図 9: 治療前から治療後 6 ヶ月までの Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM)

の推移



10 名の変形性膝関節症患者に対して、膝関節内に多血小板血漿を週に 1 回 3 週間投与した。JKOM スコアは、注射前および注射後 1,3,6 か月で評価した。 * P < 0.05

図 10: Japanese Orthopedic Association (JOA) スコアの平均値



JOA スコアは治療前と治療後 6 ヶ月の数値を比較した。* P < 0.05

表 1 PRP に含まれる主な成長因子

成長因子	由来	機能
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	血小板	血管新生・マクロファージの活性化 細胞増殖 コラーゲン合成
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	血小板	血管新生 血管内皮細胞増殖 血管透過性亢進
Transforming Growth Factor (TGF-β)	血小板	線維芽細胞の増生 I型コラーゲン・フィブロネクチンの形成促進
Fibroblast Growth Factor (FGF)	血小板	線維芽細胞・筋細胞の増殖促進
Epidermal Growth Factor (EGF)	血小板	幹細胞増殖・分化 他の成長因子の増強効果
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	血漿	血管新生・線維化抑制
Insulin-like Growth Factor (IGF-1)	血漿	筋芽細胞・線維芽細胞の遊走 タンパク合成

表 2

	WBC ($\times 10^2 / \mu\text{L}$)	57.8 ± 17.6
Whole blood	RBC ($\times 10^5 / \mu\text{L}$)	47.5 ± 4.8
	PLT ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	23.4 ± 4.4
	WBC ($\times 10^2 / \mu\text{L}$)	0.3 ± 0.8
PRP	RBC ($\times 10^5 / \mu\text{L}$)	0.2 ± 0.1
	PLT ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	41.4 ± 12.2
	ratio	1.8

平均值 \pm 標準偏差

表 3

成長因子	20's N = 13	30 's N = 13	40 's N = 13	P by Kruskal- Wallis test	P value for pairwise comparison*			年齢との相関 Spearman	P
					20's vs 30 's	20's vs 40 's	30's vs 40 's		
PDGF-BB (ng/mL)	3.3 [2.4, 6.5]	3.5 [1.4, 6.2]	2.1 [1.4, 4.9]	0.030	0.72	0.013	0.094	-0.32	0.049
TGF-β1 (ng/mL)	15.4 [11.0, 24.7]	17.1 [11.4, 31.9]	13.1 [11.2, 21.1]	0.12	-	-	-	-0.17	0.295
VEGF (pg/mL)	104 [21, 534]	290 [65, 591]	196 [41, 725]	0.20	-	-	-	0.19	0.325
EGF (pg/mL)	722 [489, 923]	861 [489, 1736]	612 [226, 938]	0.029	0.10	0.18	0.026	-0.19	0.255
FGF (pg/mL)	11 [5, 15]	12 [4, 40]	10 [4, 19]	0.33	-	-	-	-0.20	0.211
HGF (pg/mL)	431 [285, 596]	492 [357, 733]	451 [338, 560]	0.11	-	-	-	0.16	0.341
IGF-1 (ng/mL)	90 [58, 139]	70 [60, 96]	63 [47, 104]	0.027	0.18	0.024	0.10	-0.39	0.014
PLT (×10 ⁴ /μL)	23 [16, 26]	26 [20, 34]	21 [18, 32]	0.004	0.003	0.94	0.024	0.03	0.87
PLT (PRP) (×10 ⁴ /μL)	39 [28, 56]	47 [32, 82]	34 [23, 49]	0.004	0.077	0.16	0.001	-0.23	0.151

中央値 [最大値, 最小値]

表 4

成長因子	男性 N = 20	女性 N = 19	P by Wilcoxon's rank sum test
PDGF-BB (ng/ml)	3.5 [1.4, 6.5]	2.9 [1.5, 5.3]	0.31
TGF-β1(ng/ml)	15.6 [11.3, 31.9]	15.2 [11.1, 18.7]	0.20
VEGF (pg/ml)	240 [41, 591]	140 [21, 725]	0.47
IGF-1 (ng/ml)	68 [47, 105]	70 [48, 139]	0.40
EGF (pg/ml)	765 [226, 1736]	697 [489, 938]	0.69
FGF (pg/ml)	11 [4, 40]	10 [4, 20]	0.35
HGF (pg/ml)	479 [338, 733]	443 [285, 675]	0.074
PLT($\times 10^4/\mu\text{L}$)	23 [16, 34]	24 [18, 31]	0.87
PLT (PRP) ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	43 [23, 82]	37 [27, 53]	0.37

中央値 [最小値, 最大値]

表 5

Growth factors	Correlation of platelet counts	
	in PRP	p
PDGF-BB	0.39	0.015
TGF- β 1	0.75	<0.001
VEGF	0.08	0.69
EGF	0.71	<0.001
FGF	0.17	0.296
HGF	0.48	0.002
IGF-1	-0.08	0.63

表 6

症例	年齢 (歳)	性別	罹患側	BMI (kg/m ²)	K-L grade	罹患コンパートメント
1	59	女性	右	27.6	3	内側・PF
2	61	女性	右	21.2	2	外側
3	55	女性	左	20.7	3	内側・PF
4	70	女性	左	21.1	1	内側
5	52	女性	右	22.9	1	内側
6	64	女性	右	22.2	3	内側・外側・PF
7	70	女性	左	23.9	2	内側
8	57	女性	右	25.5	2	外側
9	67	女性	右	23.4	3	内側・外側・PF
10	51	女性	左	25.0	2	内側

PF : patello-femoral joint 膝蓋大腿関節

表 7

	末梢血	PPP	PRP
WBC (/μL)	5803 ± 1564	0	79 ± 162
RBC (×10⁴/μL)	437 ± 38	1.1 ± 3.3	1.8 ± 0.6
PLT (×10⁴/μL)	24.0 ± 3.7	27.1 ± 5.8	39.4 ± 13.1
PDGF-BB (ng/mL)	-	-	6.8 ± 3.4
VEGF (pg/mL)	-	-	213 ± 207
TGF-β1 (ng/mL)	-	-	33.3 ± 10.8

表 8

症例	注射回数	有害事象	症状持続期間
1	1回目	注射部の痛みと膝関節のこわばり	注射直後
	2回目	なし	
	3回目	なし	
2	1回目	膝の違和感	注射直後
	2回目	注射部皮下出血	48時間以内
	3回目	なし	
3	1回目	寒気、歩行時痛、関節内の痒み	48時間以内
	2回目	注射部位が広がるような痛み	48時間以内
	3回目	歩行時痛、膝関節の痒み	48時間以内
4	1回目	膝に刺すような痛み	注射直後
	2回目	なし	
	3回目	歩行時痛、膝関節の痒み	24時間以内
5	1回目	なし	
	2回目	なし	
	3回目	なし	
6	1回目	歩行時痛	24時間以内
	2回目	歩行時痛	24時間以内
	3回目	膝関節痛とこわばり	24時間以内
7	1回目	膝に刺すような痛み	24時間以内
	2回目	膝関節こわばり	注射直後
	3回目	膝窩痛	1時間以内
8	1回目	膝関節の痒み	注射直後

	2回目	歩行時痛、膝関節の痒み	24時間以内
	3回目	なし	
9	1回目	歩行時痛、膝関節のかゆみ	1時間以内
	2回目	膝関節内に鋭い痛み	1時間以内
	3回目	膝関節が中から押されるような感覚	直後
10	1回目	膝関節痛	48時間以内
	2回目	膝関節痛	48時間以内
	3回目	膝関節のこわばり	48時間以内

引用文献

1. Marx, R.E., *Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?* Implant Dent, 2001. **10**(4): p. 225-8.
2. Marx, R.E., *Platelet-rich plasma: evidence to support its use.* Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2004. **62**(4): p. 489-496.
3. 池田康夫, 丸., et al., *血小板生物学*. 2004: メディカルレビュー社.
4. 浅野茂隆, 池.内., et al., *三輪血液病学*. 第3版 ed. 2006: 文光堂.
5. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions.* Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
6. 青戸, 克., et al., *[整形外科領域における platelet-rich plasma 療法] Platelet-rich plasma 療法の基礎.* 整形・災害外科, 2014. **57**(8): p. 965-970.
7. Foster, T.E., et al., *Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications.* Am J Sports Med, 2009. **37**(11): p. 2259-72.
8. Alsousou, J., et al., *The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature.* J Bone Joint Surg Br, 2009. **91**(8): p. 987-96.
9. Tayapongsak, P., et al., *Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow.* J Oral Maxillofac Surg, 1994. **52**(2): p. 161-5; discussion 166.
10. 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.
11. 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.
12. Kim, S.A., et al., *Application of platelet-rich plasma accelerates the wound healing process in acute and chronic ulcers through rapid migration and upregulation of cyclin A and CDK4 in HaCaT cells.* Mol Med Rep, 2013. **7**(2): p. 476-80.
13. Chahla, J., et al., *A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting: A Systematic Review of the Clinical Orthopaedic Literature.* J Bone Joint Surg Am, 2017. **99**(20): p. 1769-1779.
14. Zayni, R., et al., *Platelet-rich plasma as a treatment for chronic patellar tendinopathy: comparison of a single versus two consecutive injections.* Muscles Ligaments Tendons J, 2015. **5**(2): p. 92-8.
15. Kaux, J.F., et al., *Using platelet-rich plasma to treat jumper's knees: Exploring the effect of a second closely-timed infiltration.* J Sci Med Sport, 2016. **19**(3): p. 200-204.

16. Guelfi, M., et al., *Long-term beneficial effects of platelet-rich plasma for non-insertional Achilles tendinopathy*. Foot Ankle Surg, 2015. **21**(3): p. 178-81.
17. Mishra, A.K., et al., *Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients*. Am J Sports Med, 2014. **42**(2): p. 463-71.
18. Zhang, Z., Y. Wang, and J. Sun, *The effect of platelet-rich plasma on arthroscopic double-row rotator cuff repair: a clinical study with 12-month follow-up*. Acta Orthop Traumatol Turc, 2016. **50**(2): p. 191-7.
19. 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.
20. de Jonge, S., et al., *One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial*. Am J Sports Med, 2011. **39**(8): p. 1623-9.
21. Choi, B.H., et al., *Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2005. **34**(4): p. 420-4.
22. Werther, K., I.J. Christensen, and H.J. Nielsen, *Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets*. Scand J Clin Lab Invest, 2002. **62**(5): p. 343-50.
23. Castillo, T.N., et al., *Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems*. Am J Sports Med, 2011. **39**(2): p. 266-71.
24. Braun, H.J., et al., *The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy*. Am J Sports Med, 2014. **42**(5): p. 1204-10.
25. Anitua, E., et al., *Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(3): p. 1011-20.
26. Cavallo, C., et al., *Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(5): p. 423-9.
27. Assirelli, E., et al., *Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015. **23**(9): p. 2690-703.
28. Sundman, E.A., B.J. Cole, and L.A. Fortier, *Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma*. Am J Sports Med, 2011. **39**(10): p. 2135-40.
29. Moraes, V.Y., et al., *Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries*.

- Cochrane Database Syst Rev, 2013(12): p. Cd010071.
30. Biino, G., et al., *Influence of age, sex and ethnicity on platelet count in five Italian geographic isolates: mild thrombocytopenia may be physiological*. Br J Haematol, 2012. **157**(3): p. 384-7.
 31. Buckley, M.F., et al., *A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count*. Thromb Haemost, 2000. **83**(3): p. 480-4.
 32. Biino, G., et al., *Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54289.
 33. Cleator, J.H., et al., *Racial differences in resistance to P2Y12 receptor antagonists in type 2 diabetic subjects*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. **351**(1): p. 33-43.
 34. Cowman, J., et al., *Age-related changes in platelet function are more profound in women than in men*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12235.
 35. Muschler, G.F., et al., *Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors*. J Orthop Res, 2001. **19**(1): p. 117-25.
 36. Zhou, S., et al., *Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts*. Aging Cell, 2008. **7**(3): p. 335-43.
 37. Weibrich, G., et al., *Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count*. J Craniomaxillofac Surg, 2002. **30**(2): p. 97-102.
 38. Dragoo, J.L., et al., *Age-Related Changes of Chondrogenic Growth Factors in Platelet-Rich Plasma*. Operative Techniques in Orthopaedics, 2012. **22**(2): p. 49-55.
 39. Evanson, J.R., et al., *Gender and age differences in growth factor concentrations from platelet-rich plasma in adults*. Mil Med, 2014. **179**(7): p. 799-805.
 40. Anitua, E., et al., *Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(12): p. 1769-72.
 41. Anitua, E., et al., *Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors*. Ann Anat, 2013. **195**(5): p. 461-6.
 42. Anitua, E., et al., *Intranasal delivery of plasma and platelet growth factors using PRGF-Endoret system enhances neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73118.
 43. Anitua, E., et al., *Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 285-93.

44. Sanchez, M., et al., *Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report*. Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(10): p. 1648-52.
45. Sanchez, M., et al., *Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis*. Arthrosc Tech, 2014. **3**(6): p. e713-7.
46. Sanchez, M., et al., *A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis*. Arthroscopy, 2012. **28**(8): p. 1070-8.
47. Yoshioka, T., et al., *The effects of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) on healing of medial collateral ligament of the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2013. **21**(8): p. 1763-9.
48. Aoto, K., et al., *Circadian variation of growth factor levels in platelet-rich plasma*. Clin J Sport Med, 2014. **24**(6): p. 509-12.
49. DeLong, J.M., R.P. Russell, and A.D. Mazzocca, *Platelet-rich plasma: the PAW classification system*. Arthroscopy, 2012. **28**(7): p. 998-1009.
50. Oliva, F., et al., *Growth factors and tendon healing*. Med Sport Sci, 2012. **57**: p. 53-64.
51. Fortier, L.A., et al., *The role of growth factors in cartilage repair*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(10): p. 2706-15.
52. 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.
53. Cho, H.S., et al., *Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells*. Korean J Lab Med, 2011. **31**(3): p. 212-8.
54. Lohmann, C.H., et al., *Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo*. Biomaterials, 2000. **21**(1): p. 49-61.
55. Barbero, A., et al., *Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(6): p. 476-84.
56. Jakob, M., et al., *Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro*. J Cell Biochem, 2001. **81**(2): p. 368-77.
57. Kieswetter, K., et al., *Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation*. Endocrine, 1997. **6**(3): p. 257-64.
58. Schmidt, M.B., E.H. Chen, and S.E. Lynch, *A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 403-12.

59. Indrawattana, N., et al., *Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(3): p. 914-9.
60. Hunziker, E.B., J. Wagner, and J. Zapf, *Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(3): p. 1078-86.
61. Fukumoto, T., et al., *Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(1): p. 55-64.
62. Fortier, L.A., et al., *Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I*. *J Orthop Res*, 1999. **17**(4): p. 467-74.
63. Magalon, J., et al., *Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model*. *Arthroscopy*, 2014. **30**(5): p. 629-38.
64. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, *Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing*. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2004: p. 1502-1508.
65. Zimmermann, R., et al., *Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application*. *Transfusion*, 2001. **41**(10): p. 1217-24.
66. Iwasaki, M., et al., *Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells*. *Endocrinology*, 1993. **132**(4): p. 1603-8.
67. Blaney Davidson, E.N., P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg, *TGF-beta and osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(6): p. 597-604.
68. Reinholz, G.G., et al., *Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. **17**(6): p. 723-34.
69. Joyce, M.E., et al., *Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(6): p. 2195-207.
70. Bodnar, R.J., *Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013. **2**(1): p. 24-29.
71. Wang, Y.C., et al., *Multiple functions of the first EGF domain in matrilin-3: Secretion and endoplasmic reticulum stress*. *Int J Mol Med*, 2015. **36**(6): p. 1648-56.
72. Nagao, M., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and*

- Osteoarthritis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13027.
73. Bendinelli, P., et al., *Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF*. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 757-66.
74. Kushida, S., et al., *Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems*. J Artif Organs, 2014. **17**(2): p. 186-92.
75. 高齢社会白書. 2002.
76. Loeser, R.F., Jr., *Aging and the etiopathogenesis and treatment of osteoarthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2000. **26**(3): p. 547-67.
77. Yoshimura, N., et al., *Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study*. J Bone Miner Metab, 2009. **27**(5): p. 620-8.
78. 厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健社会統計課世帯統計室, 労務資料 平成27年国民生活基礎調査結果の概要. エルダー = Monthly elder : 高齢者雇用の総合誌, 2016. **38**(11): p. 54-57.
79. 吉川秀樹, et al., 最新整形外科学大系 第17巻 膝関節・大腿. 2006: 中山書店.
80. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(2): p. 137-62.
81. 津村, 弘., 診療ガイドライン at a glance 変形性膝関節症の管理に関する OARSI 勧告 OARSI によるエビデンスに基づくエキスパートコンセンサスガイドライン(日本整形外科学会変形性膝関節症診療ガイドライン策定委員会による適合化終了版). 日本内科学会雑誌, 2017. **106**(1): p. 75-83.
82. McAlindon, T.E., et al., *OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(3): p. 363-88.
83. Lapane, K.L., et al., *Factors Associated with the Use of Hyaluronic Acid and Corticosteroid Injections among Patients with Radiographically Confirmed Knee Osteoarthritis: A Retrospective Data Analysis*. Clin Ther, 2017. **39**(2): p. 347-358.
84. Bannuru, R.R., et al., *Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis--meta-analysis*. Osteoarthritis Cartilage, 2011. **19**(6): p. 611-9.
85. Bannuru, R.R., et al., *Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis*. Arthritis Rheum, 2009. **61**(12): p. 1704-11.
86. Akeda, K., et al., *Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte*

- proliferation and matrix biosynthesis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(12): p. 1272-80.
87. Spreafico, A., et al., *Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes*. J Cell Biochem, 2009. **108**(5): p. 1153-65.
88. Filardo, G., et al., *Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial*. BMC Musculoskelet Disord, 2012. **13**: p. 229.
89. Patel, S., et al., *Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial*. Am J Sports Med, 2013. **41**(2): p. 356-64.
90. Cerza, F., et al., *Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis*. Am J Sports Med, 2012. **40**(12): p. 2822-7.
91. Vaquerizo, V., et al., *Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial*. Arthroscopy, 2013. **29**(10): p. 1635-43.
92. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. **16**(4): p. 494-502.
93. Gormeli, G., et al., *Multiple PRP injections are more effective than single injections and hyaluronic acid in knees with early osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2017. **25**(3): p. 958-965.
94. Akai, M., et al., *An outcome measure for Japanese people with knee osteoarthritis*. J Rheumatol, 2005. **32**(8): p. 1524-32.
95. Yasuda, K., et al., *A ten- to 15-year follow-up observation of high tibial osteotomy in medial compartment osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, 1992(282): p. 186-95.
96. Yasuda, K., et al., *Clinical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction procedure using hamstring tendon grafts: comparisons among 3 different procedures*. Arthroscopy, 2006. **22**(3): p. 240-51.
97. Okuda, M., et al., *Validity and reliability of the Japanese Orthopaedic Association score for osteoarthritic knees*. J Orthop Sci, 2012. **17**(6): p. 750-6.
98. Kaneko, H., et al., *Reference intervals of serum hyaluronic acid corresponding to the radiographic severity of knee osteoarthritis in women*. BMC Musculoskelet Disord, 2013. **14**: p. 34.

99. Elliott, A.L., et al., *Serum hyaluronan levels and radiographic knee and hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians in the Johnston County Osteoarthritis Project*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(1): p. 105-11.
100. Meheux, C.J., et al., *Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review*. *Arthroscopy*, 2015.
101. Edelstein, L.C., et al., *Racial differences in human platelet PAR4 reactivity reflect expression of PCTP and miR-376c*. *Nat Med*, 2013. **19**(12): p. 1609-16.
102. Tourdot, B.E., et al., *Mechanism of race-dependent platelet activation through the protease-activated receptor-4 and Gq signaling axis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(12): p. 2644-50.
103. Rasheed, N., A. Alghasham, and Z. Rasheed, *Lactoferrin from Camelus dromedarius Inhibits Nuclear Transcription Factor-kappa B Activation, Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Stimulated Human Chondrocytes*. *Pharmacognosy Res*, 2016. **8**(2): p. 135-41.
104. van Buul, G.M., et al., *Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes*. *Am J Sports Med*, 2011. **39**(11): p. 2362-70.
105. Kobayashi, Y., et al., *Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations*. *J Orthop Sci*, 2016. **21**(5): p. 683-9.

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金森章浩講師、筑波大学再生医療学寄付講座の吉岡友和准教授、菅谷久講師のご指導、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国立霞ヶ浦医療センター病院整形外科青戸克哉医学博士に厚く御礼申し上げます。

学会発表

1. 第30回日本整形外科基礎学術集会

2015年10月22日-23日 富山国際会議場ほか(富山市)

多血小板血漿治療の標準化を目指した多血小板血漿内成長因子濃度の網羅的解析：年齢・性別による比較検討

谷口 悠、吉岡 友和、菅谷 久、青戸 克哉、金森 章浩、山崎 正志

日本人変形性膝関節症患者に対する多血小板血漿関節内注射治療の短期成績

谷口 悠、吉岡 友和、菅谷 久、青戸 克哉、金森 章浩、山崎 正志

2. 第7回日本関節協・膝・スポーツ整形外科学会

2015年10月24日-25日 札幌市産業振興センター(札幌市)

日本人変形性膝関節症患者に対する多血小板血漿関節内注射の安全性と有効性

谷口 悠、吉岡 友和、菅谷 久、青戸 克哉、金森 章浩、山崎 正志

3. 第31回日本整形外科基礎学術集会

2016年10月13日-14日 福岡国際会議場(福岡市)

多血小板血漿内成長因子濃度に影響を与える患者側因子の検討

谷口 悠、吉岡 友和、菅谷 久、金森 章浩、山崎 正志

4. 13th World Congress of the International Cartilage Repair Society 2016 (ICRS)

2016年9月24日-27日 Hilton Sorrento Palace Hotel

Safety and efficacy of intra-articular injections of platelet-rich plasma for the osteoarthritis of the knee in the Japanese population

Taniguchi Y, Yoshioka T, Kanamori A, Aoto K, Sugaya H, Yamazaki M

5. 第 32 回日本整形外科基礎学術集会

2017 年 10 月 26 日-27 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

日本人変形性膝関節症患者に対する多血小板血漿関節内注射治療の安全性と有効性

谷口 悠、吉岡 友和、青戸 克哉、菅谷 久、金森 章浩、山崎 正志

参 考 论 文

1. Intra-articular platelet-rich plasma (PRP) injections for treating knee pain associated with osteoarthritis of the knee in the Japanese population: A phase I and IIa clinical trial

Yu Taniguchi, Tomokazu Yoshioka, Akihiro Kanamoari, Katsuya Aoto, Hisashi Sugaya, Masashi Yamazaki

Nagoya Journal of Medical Science 80(1) 2018 に掲載予定