

筑波大学

博士（医学）学位论文

末梢神経欠損に対する  
自己血由来多血小板血漿による  
末梢神経再生促進効果の検証

2 0 1 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

井 汲 彰

# 目次

第1章 序論 .....	1
1-1 末梢神経損傷について .....	1
1-2 多血小板血漿（PRP）治療について .....	2
1-3 末梢神経損傷に対する PRP 治療 .....	3
第2章 本研究の目的 .....	6
第3章 実験 I . 自己血由来 PRP の神経再生促進効果に関する研究 .....	8
3-1 目的 .....	8
3-2 対象 .....	8
3-3 方法 .....	9
3-4 評価項目 .....	11
3-5 統計 .....	13
3-6 結果 .....	14

3-7	考察	17
3-8	小括	21
第4章	実験Ⅱ. PRP のシュワン細胞増殖効果に関する免疫組織学的検討	22
4-1	目的	22
4-2	対象	22
4-3	方法	23
4-4	評価項目	23
4-5	統計	24
4-6	結果	25
4-7	考察	26
4-8	小括	27
第5章	臨床研究. 末梢神経損傷に対する神経修復術における自己血由来 PRP 使用の安全性に関する研究	28
5-1	目的	28

5-2	研究デザイン	28
5-3	対象	29
5-4	方法	31
5-5	評価項目	33
5-6	結果	34
5-7	考察	36
5-8	小括	37
第6章	総括	38
6-1	総括	38
6-2	今後の展開と課題	39
6-3	結論	39
図表		41
謝辞		59
学会発表		60

引用文献	.....	61
参考論文	.....	68

【略語一覧】

BNB	: Blood-nerve barrier	(血液神経関門)
CMAP	: Compound muscle action potential	(複合神経活動電位)
CPF	: Cell Processing Factory	
EGF	: Epidermal growth factor	(上皮成長因子)
FGF	: Fibroblast growth factor	(線維芽細胞増殖因子)
HGF	: Hepatocyte growth factor	(肝細胞増殖因子)
IGF-1	: Insulin-like growth factor-1	(インスリン様成長因子-1)
iPS 細胞	: induced pluripotent stem cell	(人工多能性幹細胞)
MCV	: Motor nerve conduction velocity	(運動神経伝導速度)
MMT	: Manual muscle testing	(徒手筋力検査)
PBS	: Phosphate Buffered Salts	(リン酸緩衝生理食塩水)
PDGF	: Platelet-derived growth factor	(血小板由来増殖因子)

PPP	: Platelet-poor plasma	(乏血小板血漿)
PRGF	: Plasma Rich in Growth Factors	
PRP	: Platelet-rich plasma	(多血小板血漿)
TBS	: Tris Buffered Salts	(トリス緩衝生理食塩水)
TGF- $\beta$	: Transforming growth factor- $\beta$	(トランスフォーミング増殖因子)
VEGF	: Vascular endothelial growth factor	(血管内皮増殖因子)

# 第 1 章 序論

## 1-1 末梢神経損傷について

末梢神経損傷は、全外傷患者の 2.8%に発生し、運動障害や感覚障害などの長期的な機能低下を引き起こす[1]。本疾患に伴う経済的損失は非常に大きく、医療費は年間 1500 億ドル以上と試算されている[2-4]。現在における神経欠損を伴う末梢神経損傷治療のゴールドスタンダードは自家神経移植術であるが、顕微鏡下手術の技術が進歩した近年においても十分な機能回復が得られる症例は少ない[5-6]。さらに、自家神経移植術では正常な感覚神経を採取し自家移植神経片（グラフト）として利用するため、利用可能な神経に制約があることや神経採取部以遠の神経支配領域の感覚脱失を生じることなどの問題がある[6-10]。また、自家神経移植術には移植したグラフトが時に無血流となること、縫合部に口径差がある場合にグラフトを複数本束ねて移植する必要があること、損傷部の近位より発芽した再生軸索が遠位方向に伸長していく際に 2 箇所縫合部を通過しなければならないこと、という問題がある。



自家神経移植術におけるこれらの問題点を解決するため、人工神経（神経誘導管）の開発や、他家神経移植術などの試みが行われている。本邦においても神経再生誘導チューブ（ナーブリッジ<sup>®</sup>、東洋紡株式会社、日本）が2013年より保険適応となり臨床使用されている。さらに、シュワン細胞や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell; iPS 細胞）をはじめとする幹細胞を人工神経の内部に充填し神経再生を促進させる試みも行われているが[11]、未だ自家神経移植術を上回る治療成績は得られていないのが現状である[12]。また、他家神経移植術は本邦では実施されていない。

## 1-2 多血小板血漿療法について

多血小板血漿（Platelet-rich Plasma：以下 PRP）は、全血を遠心分離することで得られる血小板を豊富に含有する血漿層分画である[13]。血漿および血小板 $\alpha$ 顆粒内には Platelet-derived growth factor（PDGF）、Transforming growth factor- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）、Insulin-like growth factor-1（IGF-1）、Vascular endothelial growth factor（VEGF）、Hepatocyte growth factor（HGF）、Epidermal growth factor（EGF）、Fibroblast growth factor（FGF）等の多数の成長因子が含まれており [14]、PRP 治療は

血小板に含まれる $\alpha$ 顆粒内の様々な成長因子と血漿内の成長因子や接着因子・糖蛋白が生体内でバランスを保った状態で複合的に作用することで組織の修復過程を促進させる再生医療として位置づけられている[15]。1998年にMarxら[16]が顎顔面形成手術領域での骨再生促進効果を報告したのを皮切りに、歯科口腔外科領域での抜歯窩の骨再生[17]、皮膚科・形成外科領域での難治性潰瘍の治療[16]などでの有用性が報告されている。さらに、近年では整形外科領域においても主にスポーツ医学分野を中心に上腕骨外側上顆炎、肩腱板損傷、膝蓋腱炎、アキレス腱付着部炎などに対するPRPの有用性が報告されている[18-20]。

### 1-3 末梢神経損傷後の神経再生について

末梢神経は神経の活動電位を伝える神経軸索を中心に、神経細胞体やシュワン細胞などで構成されている。これらの構成要素は、神経軸索、軸索を支持するシュワン細胞、血管、組織の強度を維持する線維芽細胞などの細胞成分と基底膜などの細胞外成分に分類される。シュワン細胞は神経軸索の周囲に髓鞘（ミエリン）を形成することで跳躍伝導を可能にする一方で、髓鞘を持たない無髓線維も取り囲み、これを保護する機能を有している。

末梢神経損傷の重症度の判別には Seddon の分類[21]が一般的に用いられている。一過性神経伝導障害（Neurapraxia）は軽度の挫傷または圧迫により局所的に末梢神経の脱髄が生じた状態である。軸索は保持されており、脱髄の回復により数日～数週間で自然回復する。軸索断裂（Axonotmesis）は軸索が崩壊し、損傷部以遠にワーラー変性（Wallerian degeneration：末梢神経線維が切断や挫滅などにより神経細胞との連絡が断たれたときに生じる変化で、神経線維の断端遠位部より始まり、軸索は腫大した後に萎縮を経て断片化していく）を伴う状態である。シュワン細胞および神経内膜管は保持され、自然再生により機能が回復する。神経断裂（Neurotmesis）は神経が解剖学的に完全に断裂した状態である。軸索、シュワン細胞、神経内膜管の連続性が絶たれるため、自然回復は期待できない。

神経軸索損傷によって損傷部以遠がワーラー変性に陥ると、シュワン細胞は脱分化・増殖し、残存している基底膜とともに再生軸索の足場となる **Bunger's band** を形成する。さらに、シュワン細胞はマクロファージと協調して変性軸索（**Myelin debris**）を分解し、神経軸索伸長に必要な神経栄養因子を分泌し、軸索側の膜上蛋白と結合する接着因子を細胞膜上に発現することで軸索の伸長を誘導する。最終的

に、軸索の再生に伴い髄鞘を再形成することで軸索の成熟に寄与する。このようにシュワン細胞は神経再生において重要な役割を担っている。

また、血管系の働きも他の組織と同様に末梢神経組織の維持と再生に大きく影響する。末梢神経では血管は神経周膜の内外に位置し、神経との間に拡散関門（blood-nerve barrier：BNB）が存在し物質や細胞の行き来が制限されている。通常BNBは神経の定常状態維持に関与しているが、神経に損傷が生じると透過性が変化し血流からの炎症性細胞の流入を増加させることが確認されている [22]。

基底膜は主としてシュワン細胞によって作られ、ラミニン、タイプIVコラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンから構成されている。神経損傷が生じても残存し、軸索伸長およびシュワン細胞が髄鞘を形成する際の足場として必要である。

このように末梢神経損傷後は、神経・シュワン細胞・血管・細胞外基質が神経再生に相互的に作用していることが明らかとなっている[23]。

## 第2章 本研究の目的

末梢神経損傷後の神経再生を促進させるためには、神経再生に関与する様々なメカニズムへの複合的な介入が必要と考えられる。本研究では、多数の成長因子を含有し、接着因子・糖蛋白とともに生体内で複合的に組織修復に作用すると考えられている PRP に注目した。PRP は血液を遠心分離し、血小板の豊富な血漿成分を抽出することで作製が可能であり、自己血由来 PRP はその安全性や簡便性から臨床応用にも適している。

本研究では、臨床応用に向けた自己血由来 PRP の神経再生促進効果の非臨床 Proof of Concept を取得することを目的に、臨床に即した動物モデル、PRP 投与法を確立し、自己血由来 PRP の神経再生促進効果を検証する。

さらに、PRP には末梢神経再生において重要な役割を担っているシュワン細胞を増殖させる成長因子（FGF、TGF- $\beta$ 、HGF、PDGF、IGF-1 など）を多数含有していることから、PRP を神経移植部へ局所投与することでシュワン細胞の増殖が促され軸索再生が高まるという仮説をたて、日本白色家兎坐骨神経遊離神経移植モデルを用いて PRP の生体内におけるシュワン細胞への作用機序を検証する。

最後に、基礎研究によって得られた知見をもとに、末梢神経損傷患者を対象とした神経修復術後の神経修復部への自己血由来 PRP 局所投与の臨床試験（安全性試験）を計画し、自己血由来 PRP の臨床応用に関する安全性と神経再生への有用性を検証する。

## 第 3 章

### 実験 I . 自家血由来 PRP の神経再生促進効果に関する研究

本研究は国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に基づいて行い、実験は筑波大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

#### 3-1 目的

「自家血由来 PRP の局所投与が末梢神経損傷の修復過程を促進する」という仮説を、家兎坐骨神経移植モデルを用いて電気生理学的・組織学的に証明すること。

#### 3-2 対象

日本白色家兎 8~12 週齢 28 匹（北山ラベス、長野）を使用した。家兎は 1 匹ずつケージに収容し、12 時間毎の明暗サイクル下に置いた。食餌と水は自由に摂取させた。

侵襲を伴う処置は塩酸ケタミン（1.0 mL/kg）および塩酸キシラジン（0.7 mL/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 の作製

18 ゲージ針を用いた心臓採血により、3.8 % trisodium citrate 含有採血管 3 本 (5 mL/本) に、計 15 mL の自家血を採取した。PRGF (Plasma Rich in Growth Factors) System IV (BTI 社、Spain) を用いた 1 回遠心法 (580 g : 2100 rpm、8 分間) で採取した自己血を遠心した。遠心後の血漿層を Fraction1 (以下 F1 : 血漿の上層 1/2)、Fraction2 (以下 F2 : 血漿の下層 1/2) の 2 層に分け、マイクロピペットを用いて分離回収した。血小板を多く含有し、かつ白血球を含まない血漿層である F2 を PRP とした。作製した PRP 0.5 mL をガラス皿に移し、血小板凝集惹起物質である 10% 塩化カルシウム 25  $\mu$ L を加え、血小板凝集反応によって PRP を活性化 (血小板の粘着・凝集が促進された状態) ・ゲル化して使用した。 (図 1)

#### 3-3-2 坐骨神経移植モデルの作製

家兎の左後肢大腿部で坐骨神経を展開し、大腿部中央で 15 mm 長の坐骨神経を鋭的に採取し神経欠損部を作成した。採取した坐骨神経は反転グラフトとして神経欠損部に神経縫合を行った。神経縫合は顕微鏡下を実施し、神経欠損部の近位



及び遠位神経断端と神経移植片内の神経束をあわせるように配置し、針付き 9-0 ナ

イロン糸を用いて神経外膜を 3 か所縫合した。(図 2A)

### 3-3-3 PRP の局所投与

神経縫合後、活性化・ゲル化した PRP でグラフトと近位及び遠位神経縫合部

を被覆することで局所投与を行った。(図 2B)

### 3-3-4 群設定

神経縫合のみを行う自家神経移植 (Nerve Autograft : NG) 群 (n = 10) と神

経縫合後に PRP の局所投与を追加する PRP 局所投与 (PRP) 群 (n = 18) に分け、

右後肢の坐骨神経をコントロール (Control) 群 (n = 28) として使用し、3 群間で

の比較検証を行った。評価は神経縫合後 4 週 (n = NG 群 5、PRP 群 9、Control 群

14) と 12 週 (n=NG 群 5、PRP 群 9、Control 群 14) に分けて実施した。

### 3-4 評価項目

#### 3-4-1 PRP

PRP 群で全血および 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  $\alpha$ 、日本光電、東京）。

#### 3-4-2 肉眼的観察

評価時に、感染徴候の有無、PRP の残存の有無、坐骨神経と周囲組織との癒着の程度を肉眼的に観察した。

#### 3-4-3 神経再生の評価

全身麻酔下に坐骨神経を展開し電気生理学的評価を行った後、腓腹筋と坐骨神経を採取し、筋湿重量計測と組織学的評価を行った。

##### 3-4-3-1 電気生理学的評価

室温 25°Cの遮蔽室内で、坐骨神経運動神経伝導速度（Motor nerve conduction velocity：MCV（m/s））と複合神経活動電位（Compound muscle action potential：CMAP）振幅（mV）を測定した。（図 3）

家兎は側臥位とし、バイポーラフック電極を用いて神経縫合部の近位、遠位の 2 箇所を最大上刺激による神経刺激を行った。活動記録針電極を腓腹筋の筋腹中央に、基準記録針電極をアキレス腱に刺入し、腓腹筋からの CMAP を記録した。刺激は 1Hz 周期の矩形波を用いた。刺激部位間の距離を活動電位の潜時差で除することにより MCV を測定した。CMAP 振幅はバイポーラフック電極によって記録した。健側を対照とし、健側比を算出した。

#### 3-4-3-2 筋湿重量

屠殺後に腓腹筋を全摘出し、即時に精密秤で湿重量（g）を測定した。健側を対照とし、健側比を算出した。

#### 3-4-3-3 組織学的評価

坐骨神経移植片中央部および腓腹筋の神経筋接合部 5 mm 近位での軸索数・軸索径の計測を行った。採取した神経を 10% 中性緩衝ホルマリンで 1 晩固定した後、1% osmium tetroxide で固定し、エタノールで脱水後に Epon 812 (TAAB、UK) で包埋した。その後 0.5~1  $\mu\text{m}$  の横断薄切切片を作製し、トルイジンブルー染色を行った。400 倍視野でランダムな 5 視野での有髄神経の軸索数 (NG 群・PRP 群では再生軸索数) ( $/\text{mm}^2$ ) を計測した。Photoshop (Adobe<sup>®</sup>、USA) と Image J (NIH、USA) プログラムを用いて軸索の横断面積を計測し、円相当径 ( $\mu\text{m}$ ) を計算した。軸索径の平均値を計算し、ヒストグラムを作成した。

### 3-5 統計

全てのデータは平均  $\pm$  標準偏差として示した。

MCV、CMAP、筋湿重量は 2 群間 (NG 群・PRP 群) の差を評価するため、Student t-test を行った。軸索数、軸索径は 3 群間 (NG 群・PRP 群・Control 群) の差を評価するため、Bonferroni 検定を行った。さらに、軸索径の分布の差を評価するため Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 3-6 結果

### 3-6-1 PRP

血小板濃度 ( $\times 10^4 / \mu\text{L}$ ) は全血  $38.2 \pm 9.7$ 、PRP  $58.6 \pm 22.0$  で血小板濃縮率は  $1.54 \pm 0.45$  倍であった。PRP 中の白血球濃度 ( $\times 10^2 / \mu\text{L}$ ) は  $0.82 \pm 0.69$ 、赤血球濃度 ( $\times 10^4 / \mu\text{L}$ ) は  $0.65 \pm 0.57$  であった。作製した全ての PRP で白血球と赤血球はほとんど含まれておらず、Pure PRP の基準を満たしていた [24]。

### 3-6-2 肉眼的観察

神経縫合部および PRP 局所投与部の感染をきたした個体はなかった。移植した神経片の連続性は全例で保たれていた。投与した PRP は神経縫合後 4 週では一部残存を認めたものの、神経縫合後 12 週では完全に消失していた。全例で坐骨神経と周囲軟部組織との癒着形成を認めたが NG 群・PRP 群間で癒着の程度に明らかな差は認めなかった。(図 4)

### 3-6-3 神経再生の評価

#### 3-6-3-1 電気生理学的評価

神経縫合後 4 週では両群とも腓腹筋 CMAP は導出できなかった。神経縫合後 12 週では全例で腓腹筋 CMAP が導出された。MCV の健側比 (%) は NG 群 :  $34.85 \pm 6.85$ 、PRP 群 :  $37.26 \pm 15.36$  と両群間に有意差を認めなかった。CMAP 振幅の健側比 (%) は NG 群 :  $27.36 \pm 3.09$ 、PRP 群 :  $27.90 \pm 14.30$  と両群間に有意差を認めなかった。(図 5)

#### 3-6-3-2 筋湿重量

神経縫合後 4 週における腓腹筋の筋湿重量の健側比 (%) は NG 群  $52.77 \pm 12.14$ 、PRP 群  $46.16 \pm 3.60$ 、神経縫合後 12 週における腓腹筋の筋湿重量の健側比 (%) は NG 群  $51.95 \pm 5.25$ 、PRP 群  $50.70 \pm 7.69$  であった。神経縫合後 4 週・12 週とも両群間に有意差を認めなかった(図 6)。

#### 3-6-3-3 組織学的評価(図 7)

神経縫合後 4 週において、移植片中央部における有髄神経の軸索数 (/mm<sup>2</sup>) は NG 群  $4860 \pm 1965$ 、PRP 群  $5473 \pm 2296$ 、Control 群  $11716 \pm 1785$  であった。NG 群・PRP 群ともに Control 群より有意に軸索数が少なかった ( $P < 0.01$ )。

NG 群・PRP 群間に差を認めなかった。腓腹筋の神経筋接合部 5 mm 近位では、NG 群・PRP 群ともに再生軸索は確認できなかった。

神経縫合後 12 週において、移植片中央部における有髄神経の軸索数 (/mm<sup>2</sup>) は NG 群 10231 ± 2869、PRP 群 11725 ± 1801、Control 群 11041 ± 1028 であり、3 群間に差を認めなかった。腓腹筋の神経筋接合部 5 mm 近位では、NG 群 4956 ± 2765、PRP 群 9017 ± 1650、Control 群 10409 ± 1502 であり、PRP 群は NG 群より軸索数が有意に多かった (P < 0.01)。Control 群と PRP 群間に有意差はなく、NG 群は Control 群より軸索数が有意に少なかった。(図 8)

神経縫合後 4 週において、移植片中央部における平均軸索径 (μm) は NG 群 1.89 ± 0.10、PRP 群 2.22 ± 0.17、Control 群 4.35 ± 0.47 であった。PRP 群は NG 群よりも平均軸索径が有意に大きかった。NG 群・PRP 群ともに Control 群より有意に平均軸索径は小さかった。

神経縫合後 12 週において、移植片中央部における平均軸索径 (μm) は NG 群 2.42 ± 0.11、PRP 群 2.48 ± 0.15、Control 群 4.84 ± 0.42 であった。腓腹筋の神経接合部 5 mm 近位における平均軸索径 (μm) は NG 群 2.64 ± 0.10、PRP 群 2.53 ±

0.15、Control 群  $5.08 \pm 0.69$  であった。両部位ともに NG 群・PRP 群は Control 群より有意に平均軸索径が小さかった。NG 群・PRP 群間に差を認めなかった。(図 9)

再生軸索径の分布は、移植片中央部において神経縫合後 4 週、12 週ともに PRP 群が NG 群よりも有意に右方(径が大きい方)に分布していた(神経縫合後 4 週:  $P < 0.001$ 、神経縫合後 12 週:  $P = 0.001$ )。腓腹筋の神経筋接合部 5 mm 近位では両群間の分布に差を認めなかった。(図 10)

### 3-7 考察

本研究では、臨床応用に向けた非臨床 Proof of Concept を取得することを考慮し実験モデルを作製した。PRP については基礎実験では他家血由来 PRP を用いた検証が多く行われているものの[25-30]、臨床応用に際して他家血由来 PRP はウイルス感染、免疫拒絶反応などの副作用のリスクや倫理的な問題から使用は困難である。そこで、本研究では PRP を作製するのに十分な自己血の採取が可能な家兎を用い、自己血由来 PRP における神経再生促進効果を検証した。

動物モデルについては、人工神経や静脈移植術の際の内腔の充填剤として PRP を使用した報告が散見されるものの[12]、自家神経移植術を超える成績は得られていない。そ



ここで我々は既存の治療のゴールドスタンダードである自家神経移植術に併用し、PRPを自家神経移植片および神経縫合部の周囲に局所投与することで治療成績を向上させる効果があるかを検証するため、自家神経移植モデルにおけるPRP局所投与の神経再生促進効果を検証した。神経欠損長は自然再生が起こらないといわれている15 mmとし[12]、神経縫合は臨床と同様に顕微鏡下での神経周膜縫合を実施した。

組織学的評価では、PRPの局所投与によって神経縫合後4週では移植片内の再生軸索径が神経移植のみと比較して有意に増大し、神経縫合後12週では遠位に到達した再生軸索数が神経移植のみと比較して有意に増加していた。再生軸索径の増大は神経再生において軸索成熟の指標であり、PRPの局所投与が早期に軸索を成熟させた可能性が示された。しかし、神経縫合後12週の段階では再生軸索径は正常と比較して有意に小さく、神経の修復は完了していないと判断された。また、神経縫合後12週において遠位に到達した再生軸索数が増加した結果については、早期の軸索成熟に伴い遠位方向への再生軸索の伸長が促進された結果生じたと可能性が考えられた。PRPの局所投与が神経損傷部近位からの軸索発芽を促進させるという報告は過去にあるものの[31]、本実験では移植片内の再生軸索数は神経縫合後4週・12週ともにPRP局所投与の有無によって差はなく、軸索発芽を促進させる効果は確認できなかった。

一方で、本研究では機能回復の指標である電気生理学的評価や筋湿重量において PRP 群・NG 群間に差を認めなかった。電気生理学的評価では、神経縫合後 12 週において全例で腓腹筋 CMAP が計測されたことから神経筋接合部を通過し筋線維へ刺激は伝わっていた。遠位に到達した再生軸索数が PRP で有意に増加していたにも関わらず神経伝導速度に差が生じなかった原因として、本研究では神経縫合部の近位および遠位（距離約 3 cm）で刺激を行ったが、短距離間の測定に伴う測定誤差により 2 群間の測定誤差によるバイアスが加わった可能性が考えられた。

PRP を用いた神経再生促進効果の研究は、他家血由来 PRP を用いた小動物（ラット、マウス）での検証と自己血由来 PRP を用いた中・大動物（家兎、羊、豚）での検証の報告が散見される。

他家血由来 PRP を用いた報告では、Farrag ら[28]は顔面神経縫合モデルにおける PRP の局所投与が再生軸索数を有意に増加させ、神経伝導速度検査での潜時を有意に短縮させたと報告している。Sariguney ら[30]はラットの坐骨神経縫合モデルにおける PRP の局所投与が髄鞘厚を有意に増大させ、神経伝導速度検査での潜時を有意に短縮させたと報告している。Wu ら[32]は、ラットの海綿体神経圧挫モデルを用いて、PRP の局所投与が勃起機能の改善と再生軸索数の増加、Apoptosis index の減少をさせたと報告している。一方

で、Lichtenfels ら[29]は人工神経（シリコンチューブ）移植における PRP の人工神経内腔への充填は自家神経移植術の成績に劣ると報告し、Emel ら[27]は坐骨神経圧挫モデルへの PRP 局所投与は神経再生促進効果を有さなかったと報告している。

自己血由来 PRP を用いた報告では、Ye ら[33]は家兎の坐骨神経への人工神経移植術の際に PRP と培養シュワン細胞を人工神経内腔への充填剤として併用することで、再生軸索数の増加と髄鞘厚の増大をきたし、神経伝導速度検査における運動神経伝導速度と複合筋活動電位が優位に改善したと報告している。一方で、Casanas ら[34]は羊の人工神経移植モデルにおいて充填剤としての PRP の使用は神経再生促進効果を有しないと報告している。

これらの報告は PRP の作製法もそれぞれ異なっており、投与方法や使用手段も様々であるため一概に結論を述べるのは困難である。PRP の有用性を検証するためには PRP の作製法の統一や同一実験モデルでの各種 PRP の有用性を比較・検証することが必要であると考えられる。

本実験と同様のプロトコールで検証している報告は過去にないため、過去の報告との比較はできないものの、本実験では、PRGF system IV を用いて作製した自己血由来 PRP

を自家神経移植術の際に局所投与することで、神経再生を有意に促進させたという結果が得られたことで非臨床 Proof of Concept は取得できたと考える。

### 3-8 小括

PRGF system IV を用いて作製した自己血由来 PRP を自家神経移植術後の神経縫合部へ局所投与することで、術後早期の再生軸索の成熟が促され、遠位に到達する再生軸索数を増加させることができた。

## 第 4 章

### 実験 II . PRP のシュワン細胞増殖効果に関する免疫組織学的検討

本研究は国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に基づいて行い、実験は筑波大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

#### 4-1 目的

先述の実験 I で確認された PRP の神経再生促進効果に関して、シュワン細胞の増殖促進効果を免疫組織学的に証明すること。

#### 4-2 対象

日本白色家兎 8-12 週齢 20 匹（北山ラベス、長野）を使用した。家兎は 1 匹ずつケージに収容し、12 時間毎の明暗サイクル下に置いた。食餌と水は自由に摂取させた。

侵襲を伴う処置は塩酸ケタミン（1.0 mL/kg）および塩酸キシラジン（0.7 mL/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。

### 4-3 方法

先述の実験と同様の手順で坐骨神経移植モデルを作成した（3-3-2 参照）。神経縫合のみを行う NG 群（n = 10）と神経縫合後に PRP 局所投与を行う PRP 群（n = 10）に分け、右後肢の正常坐骨神経を Control 群（n = 20）として使用し、3 群間での比較検証を行った。評価は神経縫合後 4 週で実施した。

### 4-4 評価項目

坐骨神経を採取し、移植片中央部において抗 S-100 抗体、抗 PCNA（Proliferating cell nuclear antigen）抗体、核染色の三重染色を行い、シュワン細胞の増殖を検討した。

採取した神経を 10%中性緩衝ホルマリンで一晩固定した後、10%、20% sucrose 液で脱水し、Tissue-Tek OCT compound（Sakura Finetek, USA）に包埋して-80 °Cで急速冷凍した。組織はクライオスタットで 8 μm の横断薄切切片とした。切片を 4 °Cのアセトンで 10 分間固定し、Phosphate Buffered Salts（PBS）で洗浄後、0.3%過酸化水素水を含むメタノールに室温で 30 分浸し Tris Buffered Salts（TBS）で洗浄した。非特異性反応を抑えるため、1.5%ヤギ血清に 20 分間浸した。次に、一次抗体（mouse monoclonal anti-rabbit S-100 1:750; Abcam, United Kingdom と rabbit polyclonal anti-PCNA, 1:200; Abcam, United Kingdom）の混

合) に室温で一晩浸した。TBS で洗浄後、暗所で二次抗体 (Alexa Fluor 546 goat anti-mouse immunoglobulin G, 1:150; Invitrogen, USA と Alexa Fluor 488 anti-rabbit immunoglobulin G, 1:150; Invitrogen, USA の混合) に室温で 30 分浸した。TBS で洗浄後封入 (Vectastain® mounting medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) し核染色を行った。

400 倍視野でランダムな 5 視野を抽出し、細胞数 (DAPI 染色陽性細胞: 青)、細胞分裂の亢進している細胞数 (抗 PCNA 抗体陽性細胞: 赤)、細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数 (抗 S-100 抗体陽性細胞核に PCNA 染色域が重なっている細胞: 黄) を評価した。(図 11)

細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数を抗 PCNA 陽性細胞数で割って、細胞分裂の亢進した細胞におけるシュワン細胞の割合を算出した。

#### 4-5 統計

全てのデータは平均±標準偏差として示した。

3 群間 (NG 群・PRP 群・Control 群) の差を評価するため、Bonferroni 検定を行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

#### 4-6 結果

細胞数 (/mm<sup>2</sup>) は NG 群 4083.15 ± 484.76、PRP 群 3697.99 ± 425.60、Control 群 1401.20 ± 129.25 であった。NG 群・PRP 群ともに Control 群と比較し細胞数は有意に増加していた (P < 0.01)。NG 群・PRP 群間に差を認めなかった。

細胞分裂の亢進している細胞数 (/mm<sup>2</sup>) は NG 群 279.04 ± 107.18、PRP 群 371.43 ± 141.79、Control 群 67.24 ± 20.42 であった。NG 群・PRP 群ともに Control 群と比較し細胞分裂の亢進している細胞数は有意に増加していた (P < 0.01)。NG 群・PRP 群間に差を認めなかった。

細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数 (/mm<sup>2</sup>) は NG 群 117.11 ± 51.11、PRP 群 188.09 ± 89.50、Control 群 13.24 ± 10.28 であった。細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数は PRP 群で NG 群よりも有意に多かった (P < 0.05)。また、NG 群・PRP 群ともに Control 群と比較し細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数は有意に増加していた (P < 0.01)。(図 12)

細胞分裂の亢進している細胞数のうち、シュワン細胞の占める割合は NG 群 47.6%、PRP 群 51.0%であった。



#### 4-7 考察

本研究では、神経縫合後 4 週において、移植神経片内の細胞数は NG 群、PRP 群ともに Control 群と比較し有意に増加していた。神経損傷後早期にはマクロファージなどの炎症細胞が動員されることで損傷組織の貪食が起り、シュワン細胞が immature phenotype に脱分化・増殖し、シュワン細胞の遊走と脱分化を誘導するため線維芽細胞が増殖する。このように神経損傷後には様々な細胞の増殖・動員が促されるため、両群とも細胞数の有意な増加を認めたと考えられた。

一方で、細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数が PRP 群で有意に増加していたことは、PRP の局所投与によってシュワン細胞の活性化が促された結果と考えられる。シュワン細胞は損傷後 1~5 日で分裂がはじまり、活性化のピークは損傷後 3 日前後といわれている[35]。PRGF system IV で作製された PRP は、塩化カルシウムを添加し活性化することで Fibrin matrix による scaffold が形成され、形成された scaffold からは 1 週間で含有する成長因子の 70% が徐放性に放出されることが明らかとなっている[36]。このことから神経縫合部を被覆した PRP よりシュワン細胞の増殖・活性化に関与する成長因子（FGF、TGF- $\beta$ 、HGF、PDGF、IGF-1、GGF）[37]が供給されたことで細胞分裂の亢進したシュワン細胞数の増加に繋がった可能性が示唆された。

#### 4-8 小括

PRGF system IV を用いて作製した自己血由来 PRP の自家神経移植術後の神経縫合部へ局所投与の作用機序として、移植片内における損傷後早期のシュワン細胞の増殖・活性化が促進されることが明らかとなった。

## 第 5 章

### 臨床研究. 末梢神経損傷に対する神経修復術への

#### PRP 使用の安全性に関する研究

本研究は再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）に基づいて行い、研究は筑波大学認定再生医療等委員会の承認を得て行った。（再 28-1、UMIN ID：UMIN000026553）

##### 5-1 目的

末梢神経損傷患者に神経縫合、神経移行、遊離神経移植術などの神経修復術を行う際に、自己採血より得られる PRP を投与、有害事象発生の有無を確認し、神経再生の程度について評価すること。

##### 5-2 研究デザイン

探索的臨床試験

### 5-3 対象

末梢神経損傷により末梢神経修復術（神経縫合術、神経移植術、神経移行術）を受ける患者を対象とした。

以下の選択基準のすべてを満たし、除外基準のいずれにも該当しない患者を試験登録適格例とした。

#### 5-3-1 選択基準

以下の基準を全て満たす患者を対象とした。

- ① 同意取得時に 20 歳以上の男女
- ② 受傷機転・損傷部位が明らかな末梢神経損傷患者
- ③ 全研究期間にわたって観察可能であったこと

#### 5-3-2 除外基準

以下のいずれかに抵触する患者は本試験に組み入れないこととした。

- ① 感染の既往

開放損傷等で神経損傷部位に明らかな感染の既往

② 易感染性宿主

糖尿病：診断基準に準ずる[41]

免疫不全：（原発性・続発性）免疫不全症の診断での治療歴の有無で評価

慢性腎不全：下記の片方又は両方が3か月以上持続することにより診断

- ・ 腎障害を示唆する所見（検尿異常、画像異常、血液異常、病理所見など）の存在
- ・ GFR 60 mL/分/1.73 m<sup>2</sup>未満

肝硬変：Child-Pugh score Grade A-C の患者

免疫抑制剤の使用：免疫抑制剤の使用歴を聴取

③ 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の既往

④ 貧血

ヘモグロビン値 10 g/dL 未満

⑤ 血液疾患

血友病など凝固・線溶系異常を有するもの

⑥ 抗凝固剤使用

アスピリン・ワーファリンなどの抗凝固剤の使用歴

⑦ 3 か月以内にステロイド治療を受けた患者

⑧ 同意日前 5 年以内に悪性腫瘍の既往のある患者、あるいはその疑いのある患者

⑨ 自発的同意能力を有さない患者

⑩ 文書による同意の取得が不可能な患者

⑪ その他、研究担当医師が対象として適切でないと判断した患者

## 5-4 方法

### 5-4-1 試験のアウトライン

試験のフローチャート参照 (図 13)

### 5-4-2 多血小板血漿 (PRP)

神経修復術の際に神経周囲への PRP 局所投与を 1 回行った。採血も術中に行い、自己血由来 PRP を作製した。手術当日の飲食に関しては絶飲食とした。

手術室にて清潔操作下に末梢血 36 mL を採血し、抗凝固剤含有採血管 (3.8 % sodium citrate) 4 本に各 9.0 mL 回収した。1 回遠心分離 (PRGF system IV : 580 g · 8 分間 · 室温) 後に各採血管の白血球層直上 2.0 mL (白血球は含めない)、計 8.0 mL の PRP を分離抽出し、5.0 mL を神経修復部周囲へ局所投与した。PRP の分離抽出は筑波大学次世代医療研究開発・教育統合センター (CREIL) 内の細胞や生体材料を使用した臨床研究を実行するために必要な GMP 基準を満たす処理室 (Cell Processing Factory : CPF) でクラス 1000 レベルの手技で行った。採血時に、血液検査で末梢血中に含まれる血小板濃度を測定し、治療に用いる PRP (0.3 mL) と用いない乏血小板血漿 (Platelet-poor plasma: 以下 PPP) に含まれる血小板濃度を測定し、濃縮率を算出した。また投与する PRP 内に白血球が含まれないことも確認した。PRP は一部 (2 mL) を細菌培養検査に提出した。

#### 5-4-3 神経修復術の際の PRP 投与法

- ・ 神経縫合術：神経両断端を PRP に 15 分浸した後に神経縫合を行い、縫合部周囲にゲル化した PRP を局所投与した。
- ・ 神経移行術：神経両断端を PRP に 15 分浸した後に神経縫合を行い、縫合部周囲にゲル化した PRP を局所投与した。

- ・ 神経移植術：採取した移植神経片を束ねた状態で PRP に 15 分浸し、ゲル化した PRP をまとった状態で近位および遠位の神経断端と神経縫合を行い、さらに縫合部周囲にゲル化した PRP を局所投与した。

## 5-5 評価項目

### 5-5-1 主要評価項目

#### 5-5-1-1 PRP 使用時および観察期間における有害事象発生の有無とその詳細

本研究における有害事象とは、術後 2 週間までの期間に被験者に生じた創部の感染と定義した。

有害事象の重篤度は「Common Terminology Criteria for Adverse Events」に基づき分類した。（表 1）

有害事象が発現した場合は、有害事象名、発現日、重症度、重篤度、研究による介入の状況、転帰、本治療法との因果関係を症例報告書に記録した。

#### 5-5-1-2 PRP の安全性評価

PRP の一部（2 mL）を一般細菌検査に提出した。



## 5-5-2 副次評価項目

### 5-5-2-1 神経再生への有効性

術後の神経再生を徒手筋力検査（Manual muscle testing：MMT）および臨床所見（Tinel 徴候）の推移で経時的に評価した。

### 5-5-2-2 PRP の評価

血算（白血球数（ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ）、赤血球（ $\times 10^4/\mu\text{L}$ ）、血小板数（ $\times 10^4/\mu\text{L}$ ））を測定した。

## 5-6 結果

末梢神経損傷患者 5 例（指神経損傷 1 例、前腕部尺骨神経損傷 2 例、腕神経叢損傷 2 例）に対し、神経修復術中の神経修復部に PRP 局所投与を行った。（表 2）

### 5-6-1 主要評価項目

経過観察期間中（術後 1 年まで）に創部の感染を疑う所見を認めた症例はなく、一般細菌検査に提出した PRP から細菌は検出されなかった。（細菌感染率：0%、PRP へのコンタミネーション：0%）

#### 5-6-2 副次評価項目

感覚神経のみで構成される指神経損傷患者 1 例を除いた 4 例全例で、術後 1 年の段階で MMT は 2 以上に回復した。さらに、尺骨神経損傷患者 2 例では、最終観察時に日常生活で支障をきたさないレベル（MMT4 以上）の筋力改善を認めた。（表 3）

Tinel 徴候を評価可能であった 4 例では、全例 Tinel 徴候は神経修復部から遠位方向に向かって移動していき、指神経損傷の一例は最終観察時に Tinel 徴候は陰性化した。

#### （表 4）

作製した PRP には白血球と赤血球は含まれておらず、Pure PRP の基準を満たしていた [24]。濃縮率は 1.54（1.15～2.23）倍であった。（表 5）

## 5-7 考察

本研究では、基礎研究（実験 I～III）によって得られた知見（PRGF System IV によって作製された自己血由来 PRP の神経修復術後の神経縫合部への局所投与が術後の神経再生を促進する）をもとに、末梢神経損傷患者に対する神経修復術後の神経縫合部への PRP 局所投与の臨床応用を行い、PRP 局所投与の安全性・有用性について検証した。

本研究では、PRP 局所投与に伴う有害事象の発生はなく、臨床応用において安全であることが確認された。さらに、副次評価項目である神経再生への有用性についての検証では、術前に認めた神経損傷に伴う運動障害・感覚障害の術後の機能回復は良好であった。

一方で、本研究は安全性試験であるため PRP 局所投与の有無による神経再生、術後治療成績の比較は行っておらず、PRP 局所投与の神経再生への有用性についての検証は十分とはいえない。PRP の神経再生促進効果の作用機序として、軸索成長促進作用、神経保護作用、血管新生促進作用、抗炎症作用、筋萎縮抑制作用が過去に報告されている[42]。また、PRP 局所投与による神経障害性疼痛の改善効果についても複数の報告があり[43-47]、本研究でも指神経損傷に対して PRP 局所投与を行った症例で術後早期より神経障害

性疼痛の軽減が得られたことから、PRPには術後の神経障害性疼痛の軽減効果があることが示唆された。この効果は術後のリハビリを実施する際に有意に働くことも考えられる。

#### 5-8 小括

末梢神経損傷患者に対する自己血由来PRPの神経修復術後の神経修復部への局所投与の安全性が確認された。

## 第 6 章 総括

### 6-1 総括

自己血由来 PRP 治療の最大の利点は、自己血を遠心分離し、血小板の豊富な血漿層分画を抽出することで作製が可能な「簡便性」と、作製の際に細胞の培養や化学物質の添加が不要なことによる「安全性」であると考えられる。一方でその「簡便性」と「安全性」から、臨床研究が先行し十分な基礎研究による科学的根拠（エビデンス）の蓄積が行われてこなかった。

本邦では、平成 25 年に再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）が制定され、PRP 療法も同法律の枠組みの中で使用することが義務付けられた。それをうけ、我々は基礎研究による自己血由来 PRP の神経再生促進効果の非臨床 Proof of concept を取得し、PRP をエビデンスに基づき臨床応用するために本研究を実施した。

基礎研究（実験 I ～ II）の結果、PRGF System IV を用いて作製された自己血由来 PRP の神経修復術後の神経縫合部への局所投与が術後の神経再生を促進させることが明らかとなり、さらにその作用機序としてシュワン細胞の増殖・活性化に PRP が作用することが示唆された。この結果をうけて実施した臨床試験では、ヒトへの臨床応用に伴う自己血

由来 PRP の安全性が確認され、自己血由来 PRP の神経再生への有用性を示唆する結果が得られた。

## 6-2 今後の展開・展望

過去の報告では、神経再生への PRP の作用機序として今回我々が解明したシュワン細胞の増殖・活性化の他に、軸索成長促進作用、神経保護作用、血管新生促進作用、炎症作用、筋萎縮抑制作用、神経障害性疼痛の軽減作用など様々な作用機序が報告されている。PRP は神経再生の複数の機序に複合的に作用していると考えられ、より効果的に神経再生を促進させる使用法（投与部位、投与時期、投与回数など）を検証していくことが今後の課題である。さらに、臨床試験において PRP 局所投与の有無による神経修復術後の治療成績の比較を行い、PRP 局所投与の有用性を検証していくことも必要である。

## 6-3 結論

本研究では、家兎自家神経移植モデルを用いて、PRGF System IV を用いて作製した自己血由来 PRP の神経再生促進効果を組織学的に証明し、PRP がシュワン細胞に作用し、シュワン細胞の増殖・活性化を促進させることを示した。基礎研究による非臨床 Proof of

concept を取得した上で、末梢神経損傷患者に対する PRP 局所投与の安全性試験を行い、PRP 局所投与の安全性を確認した。臨床応用における神経再生への自己血由来 PRP の有用性は検証できなかったものの、今後の研究を通してエビデンスを蓄積し、さらなる作用機序の解明を行っていくことで、神経修復部への自己血由来 PRP の局所投与は末梢神経損傷患者に対する有用な治療法になると考える。

# 図表

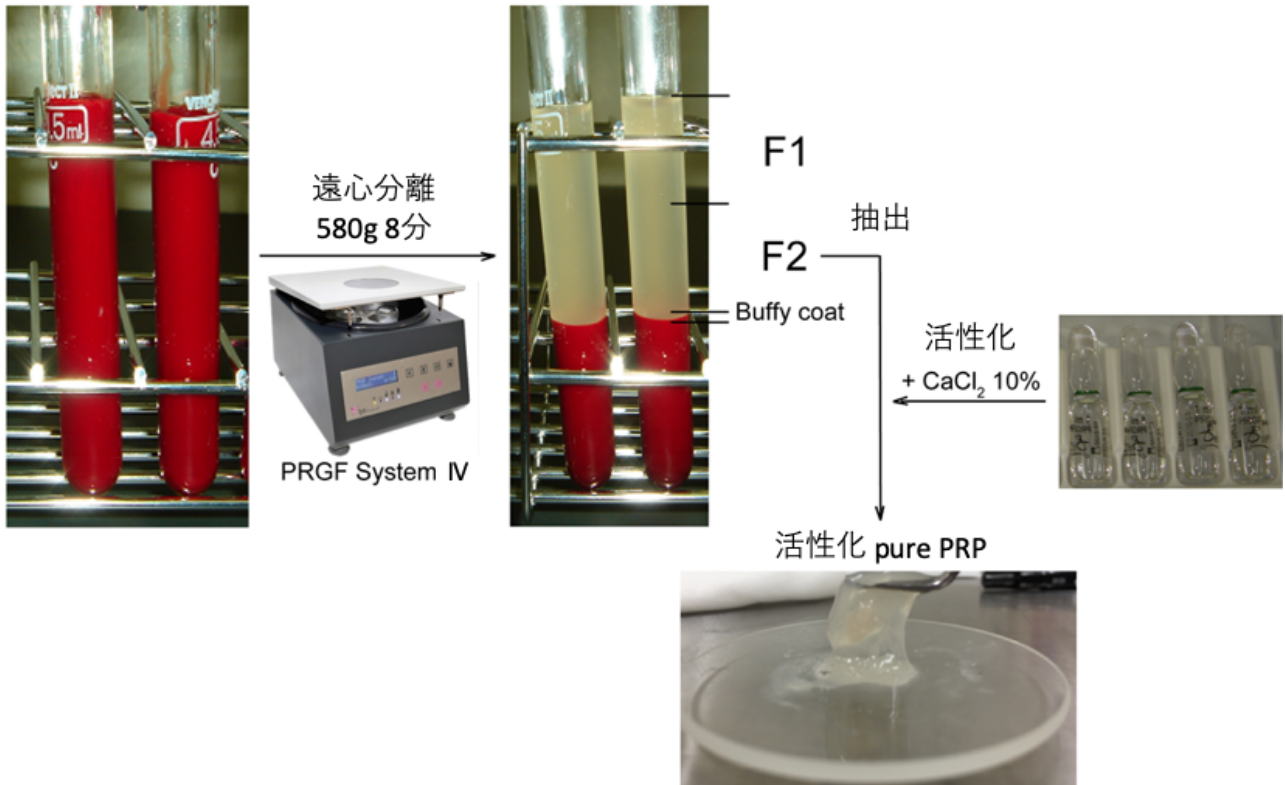


図1 PRP 作製

Fraction1 (F1: 血漿の上層 1/2 (乏血小板血漿; PPP))、Fraction2 (F2: 血漿の下層 1/2 (多血小板血漿; PRP)) の 2 層に分離し抽出。Activation: 10%塩化カルシウムを用いて活性化・ゲル化。



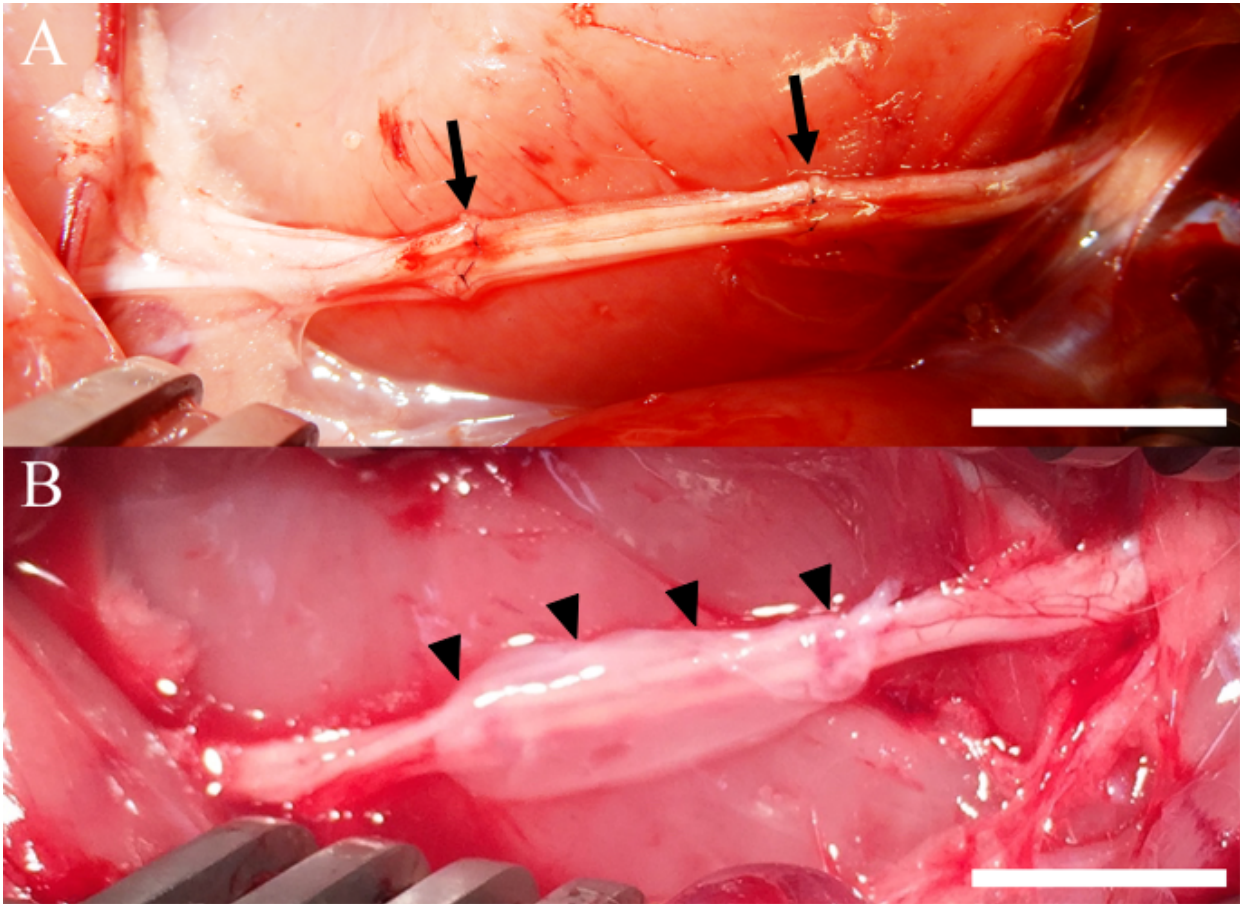


図2 坐骨神経移植モデル (Scale bar = 10mm)

A：顕微鏡下神経縫合、針付き 9-0 ナイロン糸を用い顕微鏡下に神経周膜を 3 か所縫合

(矢印)。B：PRP 局所投与、活性化・ゲル化した PRP でグラフトおよび神経縫合部を被

覆 (矢頭)。

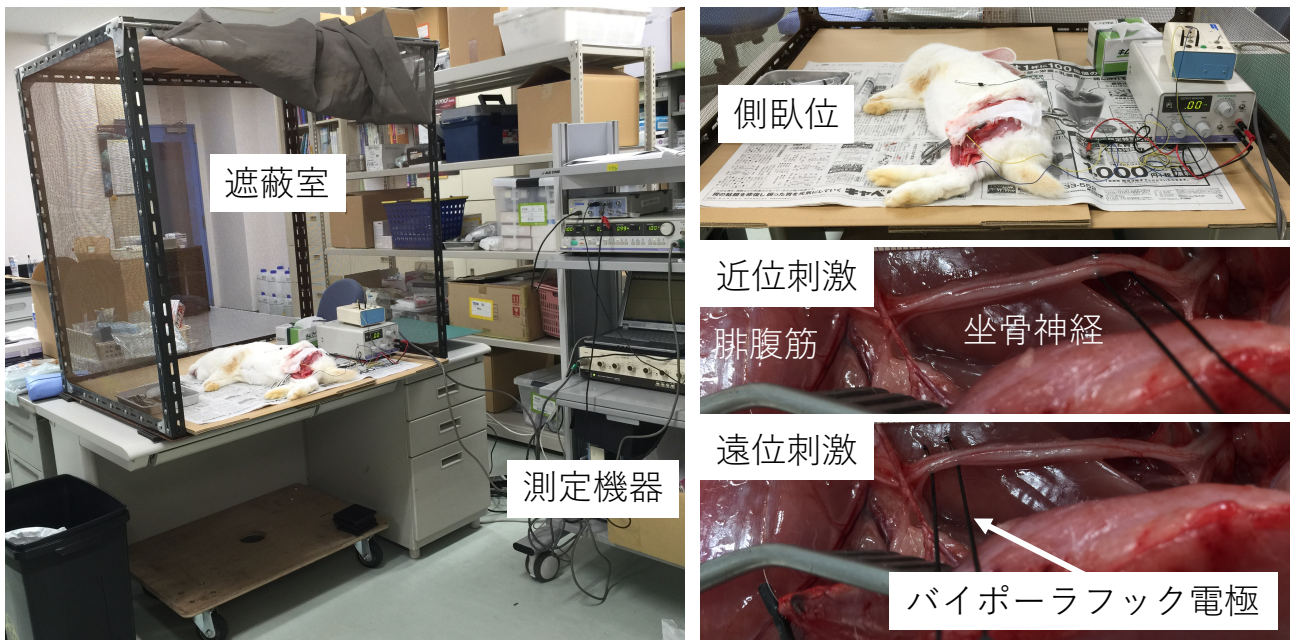


図3 神経伝導検査

遮蔽室内で全身麻酔下に実施。バイポーラフック電極を用い神経縫合部の近位および遠位で坐骨神経を刺激し、MCV と腓腹筋 CMAP 振幅を計測。

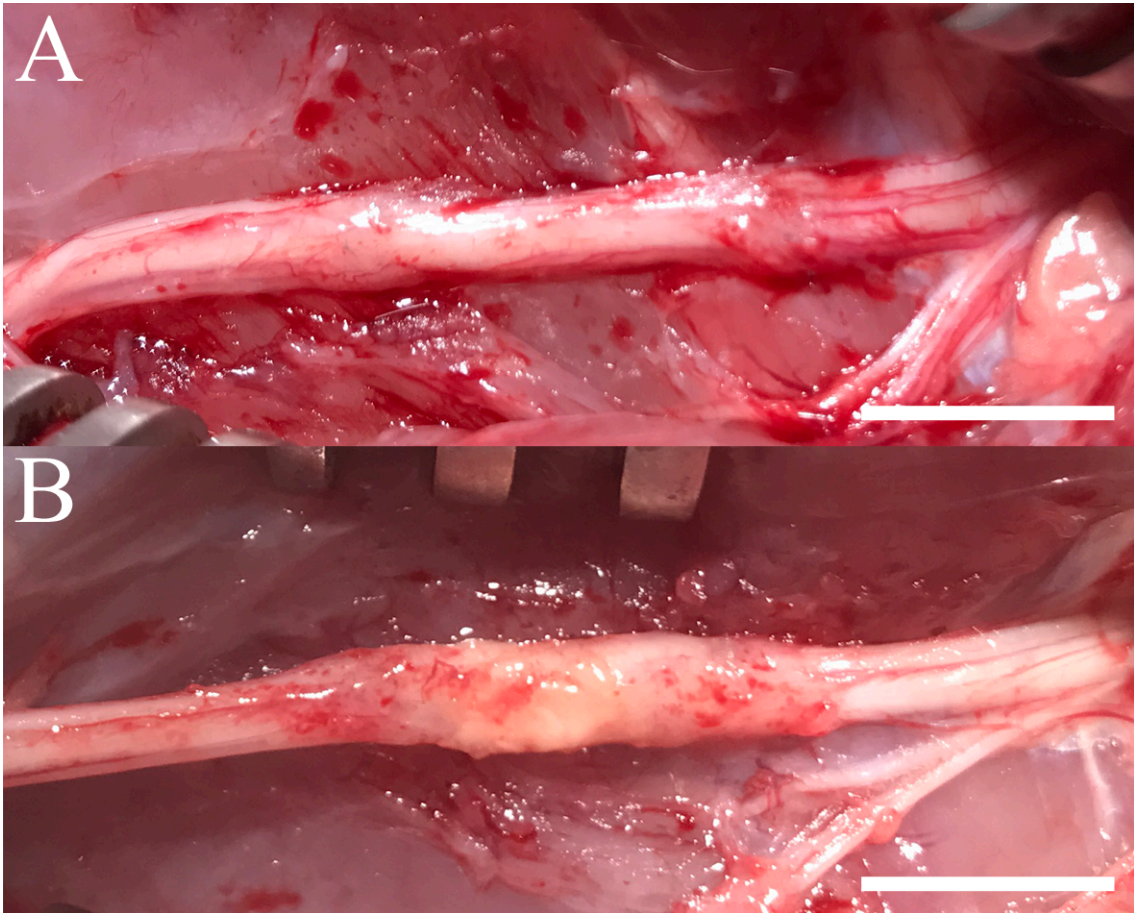


図4 神経移植後12週における神経縫合部の肉眼的所見 (Scale bar = 10 mm)

A : NG 群、B : PRP 群、両群とも神経縫合部と周囲組織との癒着を認めたが肉眼的所見では2群間に明らかな差は認めない。

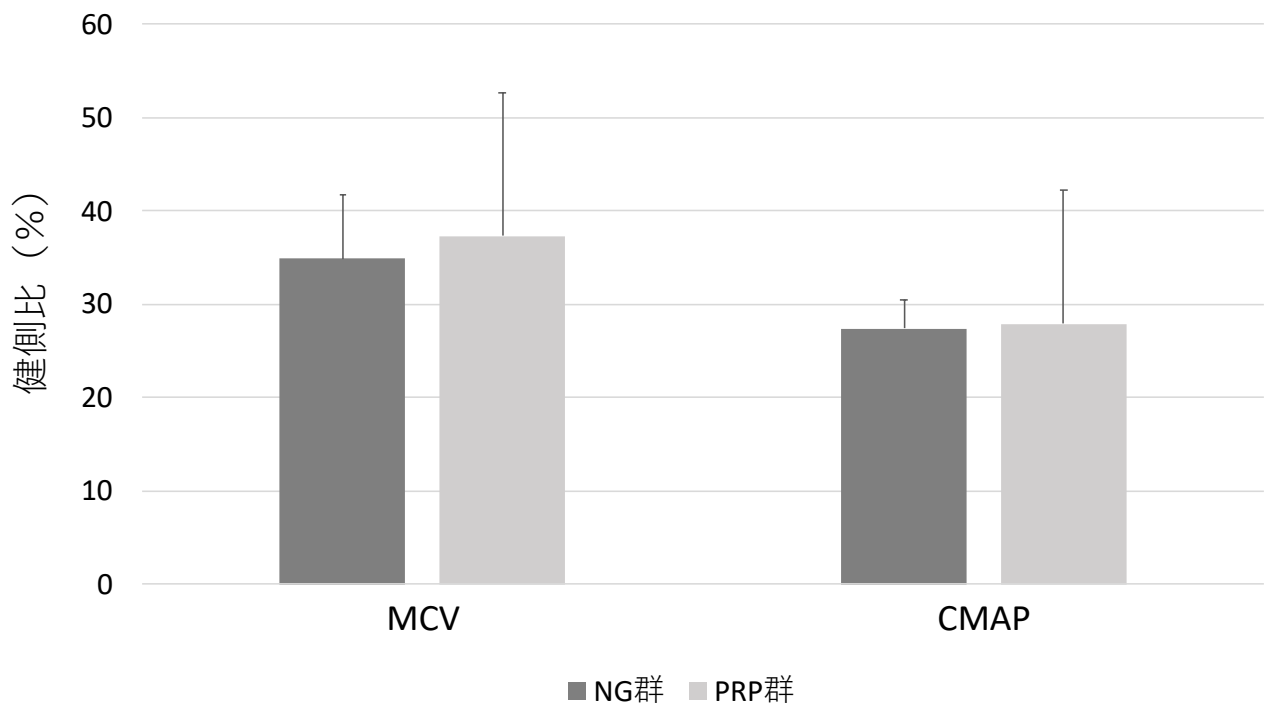


図5 神経縫合後12週における MCV・CMAP の健側比 (平均値 ± 標準偏差)

MCV、CMAP ともに両群間に有意差を認めない。

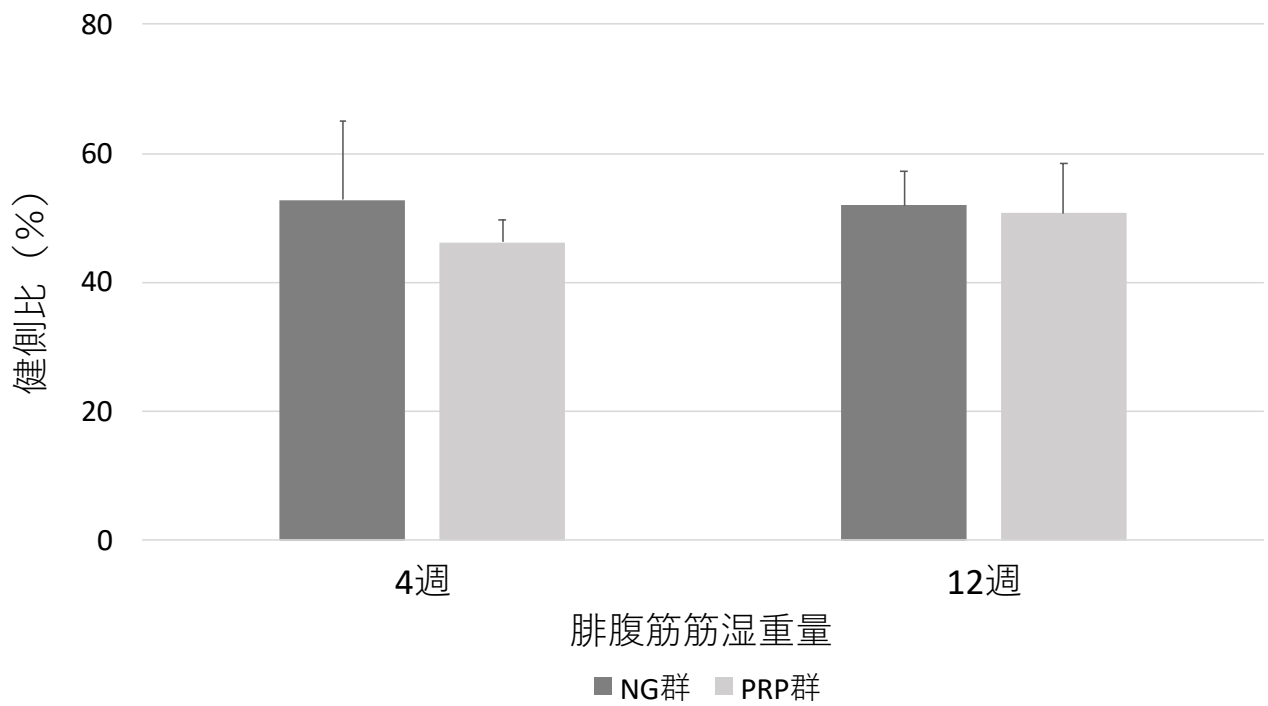


図6 神経縫合後4・12週における腓腹筋の筋湿重量の健側比（平均値±標準偏差）

4週、12週ともに両群間に有意差を認めない。

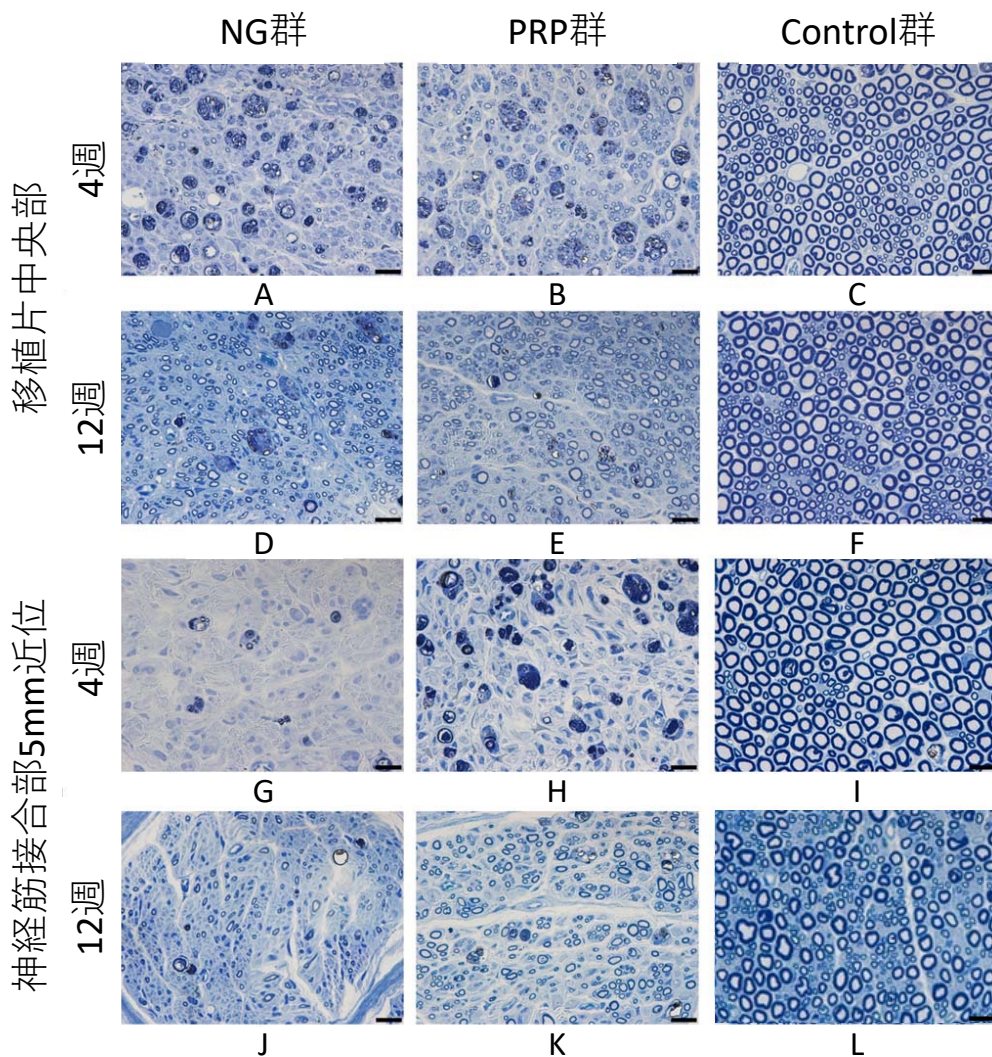


図7 組織学的評価（トルイジンブルー染色、scale bar = 20  $\mu$  m）

再生軸索数は NG 群、PRP 群ともに神経縫合後 12 週で 4 週より増加し、再生軸索径も増大する。（A、B、D、E）神経筋接合部 5 mm 近位では神経縫合後 4 週では再生軸索を認めない（G、H）が、12 週では NG 群、PRP 群ともに確認される。（J、K）Control 群における軸索数、軸索径は神経縫合後 4 週、12 週間で差は認めない。（C、F、I、L）

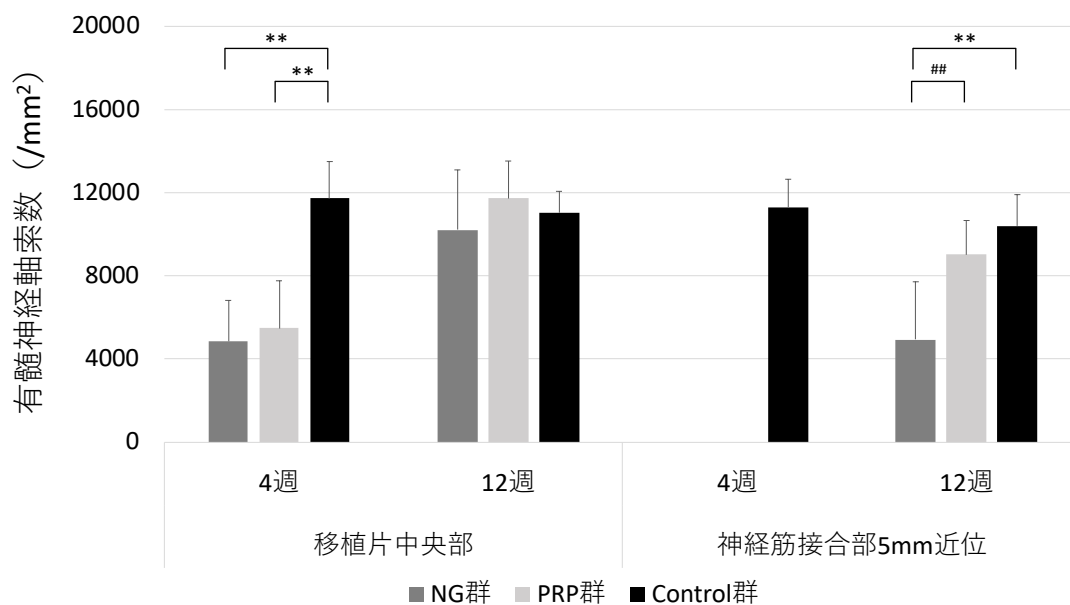


図8 有髄神経軸索数 (/mm<sup>2</sup>)

移植片中央部では、神経縫合後4週ではNG群、PRP群ともにControl群より軸索数が有意に少なく、12週では3群間に差は認めない。神経筋接合部5mm近位では、神経縫合後4週ではNG群、PRP群ともに有髄神経軸索は確認されず、12週ではPRP群がNG群より有意に多く、PRP群とControl群で差は認めない。\*\*P<0.01 (対Control群)、##P<0.01 (対PRP群)

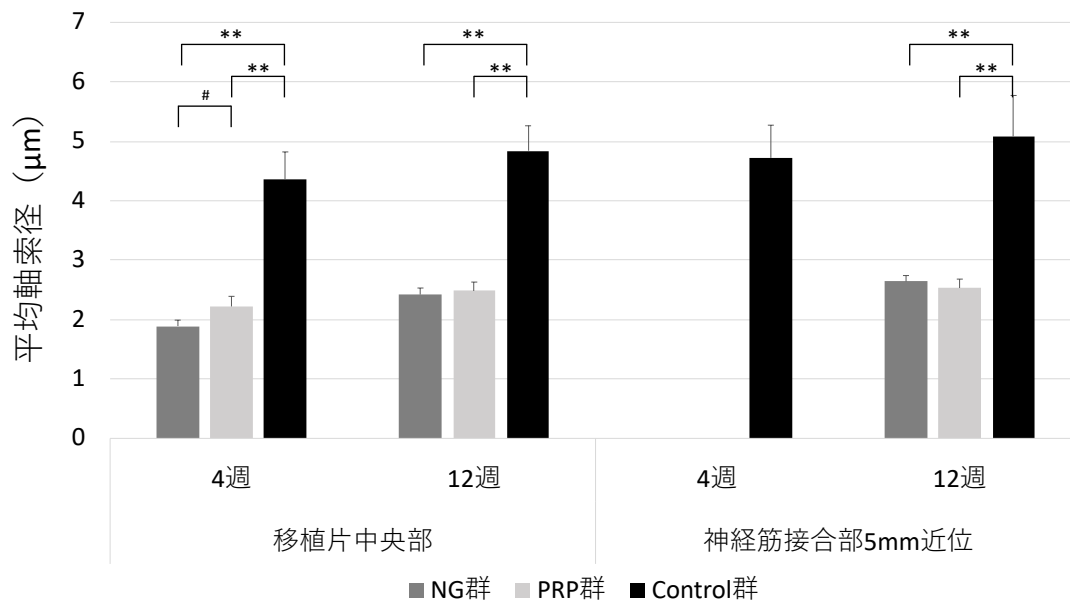


図9 平均軸索径 (μm)

移植片中央部では、神経縫合後4週ではPRP群がNG群より平均軸索系が有意に大きい (P = 0.03)。4週、12週ともにNG群、PRP群の平均軸索系はControl群より有意に小さい (P < 0.01)。\*\*P < 0.01 (対Control群)、#P < 0.05 (対PRP群)



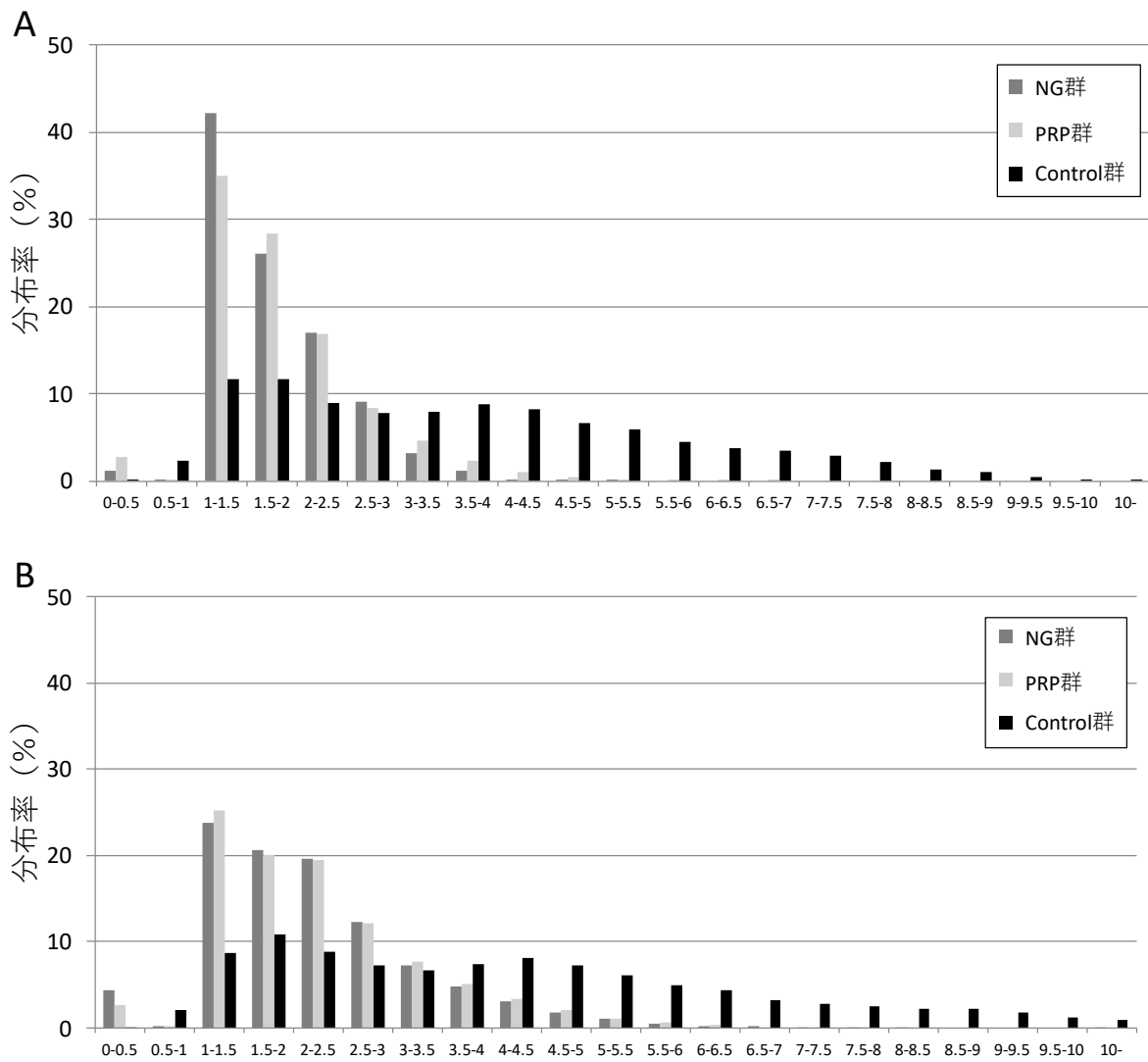


図 10 移植片中央における軸索径分布

A：神経縫合後 4 週、PRP 群のほうが NG 群より軸索径分布が有意に右方（径が大きい方）に存在。（ $P < 0.001$ ）

B：神経縫合後 12 週、PRP 群のほうが NG 群より軸索径分布が有意に右方（径が大きい方）に存在。（ $P = 0.001$ ）

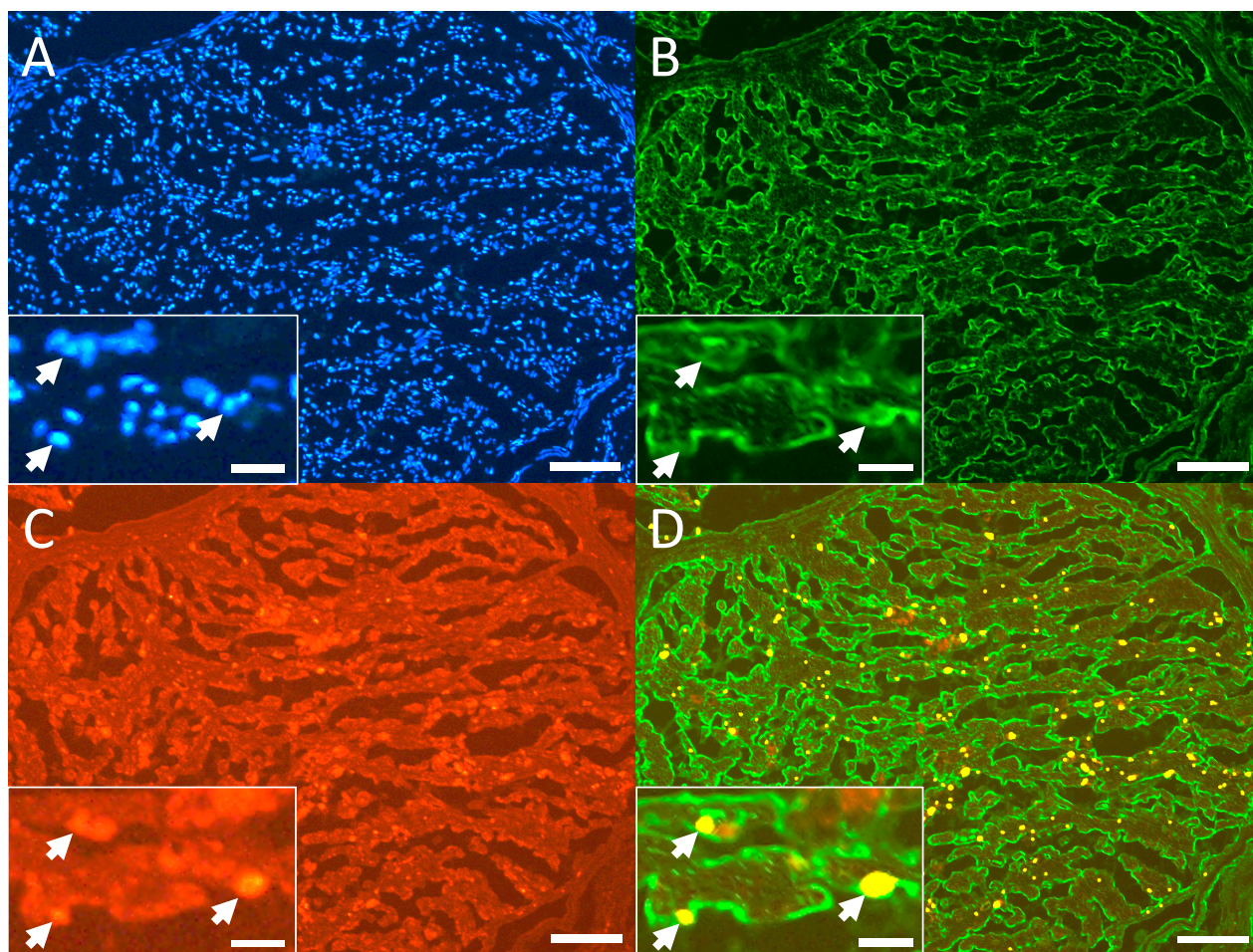


図 11 抗 S-100 抗体、抗 PCNA 抗体、核染色の三重免疫蛍光染色 (Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (弱拡大)、20  $\mu\text{m}$  (強拡大))

A : 核染色 (DAPI) 。 B : 抗 S-100 抗体染色。 C : 抗 PCNA 抗体染色。 D : 抗 S-100 抗体染色と抗 PCNA 染色の合成画像。細胞分裂の亢進しているシュワン細胞が黄色の領域として描出される (白矢印) 。

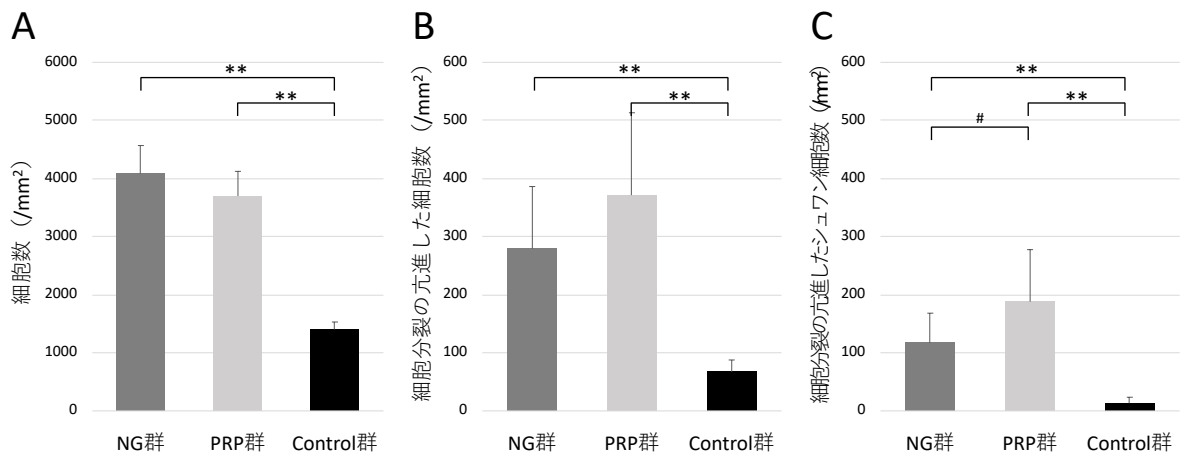


図 12 移植片中央部における各種細胞数 (/mm<sup>2</sup>)

A：細胞数（核染色）。B：細胞分裂の亢進している細胞数（抗 PCNA 抗体染色陽性細胞

数）。C：細胞分裂の亢進しているシュワン細胞数（抗 S-100 抗体・抗 PCNA 抗体染色陽性

細胞数）。\*\*P < 0.01（対 Control 群）、#P < 0.05（対 PRP 群）。

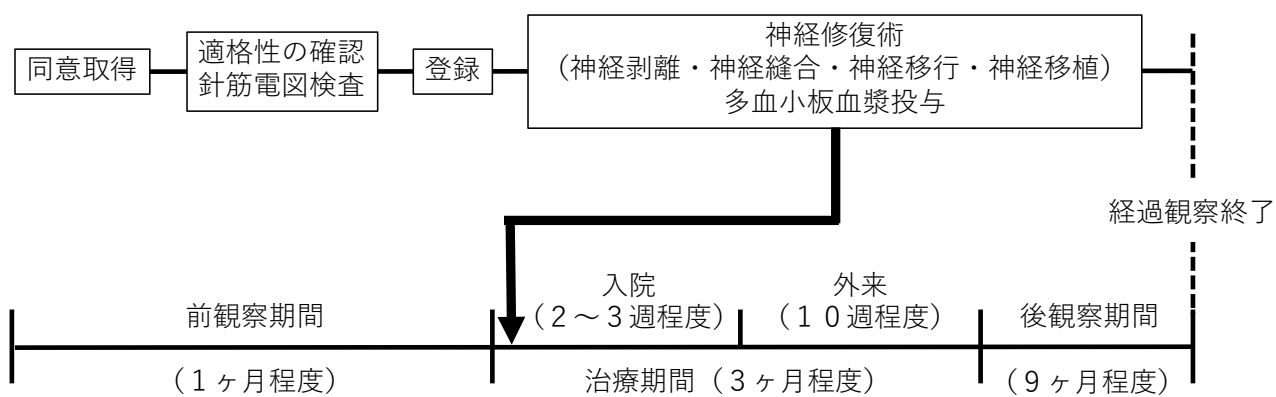


図 13 試験のフローチャート

表 1 Common Terminology Criteria for Adverse Events

Grade 1:	軽症（無症状または軽度の症状）、臨床的または診断学的所見のみ、治療を要さない
Grade 2:	中等症（最小限、局所的または非侵襲的な治療を要する）、年齢相応の日常生活動作に支障あり
Grade 3:	重症または医学的に重大であるが、直ちに生命を脅かすことはない、入院または入院期間延長を要する、活動/動作制限（基本的日常生活動作に支障あり）
Grade 4:	生命を脅かす転帰（緊急処置を要する）
Grade 5:	有害事象による死亡

表 2 末梢神経損傷患者の詳細

症例	年齢	性別	傷病名	受傷機転	損傷内容	術式
1	45	女性	前腕部尺骨神経損傷	犬に咬まれた	圧挫損傷	神経縫合術
2	28	女性	指神経損傷	製本機に挟まれた	圧挫損傷	神経剥離術
3	59	女性	前腕部尺骨神経損傷	ガラスで切った	神経断裂	神経縫合術
4	22	女性	腕神経叢損傷	交通事故	引抜損傷	神経移行術
5	22	女性	腕神経叢損傷	交通事故	引抜損傷	神経移行術

表 3 徒手筋力検査（MMT）の術後推移

症例	傷病名	測定筋	MMT(徒手筋力検査)			最終観察時
			術直後	術後1年		
1	前腕部尺骨神経損傷	第1背側骨間筋	0	2	4	術後2年
2	指神経損傷	なし	-	-	-	-
3	前腕部尺骨神経損傷	尺側手根屈筋	0	3	4	術後1.5年
4	腕神経叢損傷	棘下筋	0	2	2	術後1年
5	腕神経叢損傷	上腕二頭筋	0	2	3	術後1.3年

表 4 Tinel 徴候の術後推移

症例	傷病名	Tinel徴候(神経修復部を0とした遠位方向への移動距離(cm))				最終観察時
		支配神経	術直後	術後1年		
1	前腕部尺骨神経損傷	尺骨神経	0	19	24	術後2年
2	指神経損傷	指神経	0	陰性	陰性	術後1.5年
3	前腕部尺骨神経損傷	尺骨神経	0	15	20	術後1.5年
4	腕神経叢損傷	肩甲上神経	0	深部のため確認難		術後1年
5	腕神経叢損傷	筋皮神経	0	手関節まで到達(約50cm)		術後1.3年



表 5 血算結果、PRP 濃縮率

症例	全血			PPP			PRP			濃縮率
	WBC	RBC	PLT	WBC	RBC	PLT	WBC	RBC	PLT	
1	5.2	4.1	26.0	0	0	21.8	0	0	34.1	1.31
2	7.0	4.7	27.1	0	0	32.5	0	0	60.4	2.23
3	3.5	8.6	19.4	0	0	11	0	0	25.9	1.34
4	7.2	3.6	16.6	0	0	16.9	0	0	19.1	1.15
5	6.8	3.8	17.1	0	0	13.1	0	0	28.4	1.66

PLT : Platelet ; 血小板 ( $\times 10^4 / \mu\text{L}$ )、PPP : Platelet-poor plasma (乏血小板血漿)、PRP :

Platelet-rich plasma (多血小板血漿)、RBC : Red blood cell ; 赤血球 ( $\times 10^4 / \mu\text{L}$ )、WBC :

White blood cell ; 白血球 ( $\times 10^2 / \mu\text{L}$ )、濃縮率 (倍) = 血小板数 (PRP / 全血)

# 謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、ご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原友紀講師、金森章浩講師、運動器再生医療学寄附講座の吉岡友和准教授、菅谷久准教授のご指導、ご助言、ご協力に対してここに改めて感謝いたします。

実験をするにあたり、多大なるご協力をいただいた筑波大学生命科学動物資源センターのスタッフの皆様、筑波大学医学医療系技術室（医学系電子顕微鏡室）の泰泉寺裕子様、筑波大学医学医療系技術室（組織標本作成室）の菊川浩子様に厚く御礼申し上げます。

臨床試験の申請にあたり、多大なるご協力をいただいた筑波大学つくば臨床医学研究開発機構の藤澤千寿子様、高橋唯様に厚く御礼申し上げます。

なお本研究は、日本学術振興会から平成29年度科研費基盤（C）の助成金を得て行いました。

## 学会発表

井汲 彰, 原 友紀, 吉岡 友和, 谷口 悠, 金森 章浩, 山崎 正志

家兎坐骨神経遊離神経移植に対する多血小板血漿(PRP)による神経再生促進効果

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 熊本 2016 年 10 月

井汲 彰, 原 友紀, 谷口 悠, 久保田 茂希, 菅谷 久, 吉岡 友和, 金森 章浩, 山崎 正志

自家血由来多血小板血漿 (PRP) による末梢神経再生促進メカニズムの検証

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 沖縄 2017 年 10 月

Ikumi A, Hara Y, Taniguchi Y, Sugaya H, Yoshioka T, Kanamori A, Yamazaki M

Effect of Local Administration of Platelet-rich Plasma (PRP) on Peripheral Nerve Regeneration: An

Experimental Study in The Rabbit Model

Orthopaedic Research Society Annual Meeting. New Orleans, USA. March 2018.

## 引用文献

- [1] Huang, W., et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials*, 2012. 33: p. 59-71.
  
- [2] Kelsey, J. L., et al. Upper extremity disorders: Frequency, Impact, and cost. London: Churchill-Livingstone Press, 1997. p. 26-42.
  
- [3] Noble, J., et al. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *Journal of Trauma*, 1998. 45: p. 116-122.
  
- [4] Rodriguez, F. J., et al. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2004. 1: p. 177-185.
  
- [5] Evans, G. R. Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineering constricts. *The Anatomical Record*, 2001. 263: p. 396-404.
  
- [6] Meek, M. F., Coert, J. H. Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: Review of the literature. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 2002. 18: p. 97-109.
  
- [7] Hudson, T. W., et al. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clinics of Plastic Surgery*, 1999. 26: p. 617-628.

- [8] Rappaport, W. D., et al. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. American Journal of Surgery, 1993. 166: p. 252-256.
- [9] Shen, C. C., et al. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. 100: p. 48-63.
- [10] Staniforth, P., Fisher, T. R. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. Hand, 1978. 10: p. 187-190.
- [11] 植村卓也 ほか. iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生治療開発. Pharm Med, 2013. 31: p. 37-42.
- [12] Zheng, C., et al. Improved peripheral nerve regeneration using acellular nerve allografts loaded with platelet-rich plasma. Tissue Engineering Part A, 2014. 20: p. 3228-3240.
- [13] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? Implant Dent, 2001. 10: p. 225-228.
- [14] 金森章浩, 吉岡友和. スポーツ外傷・障害に対する多血小板血漿(PRP)治療の適応と実際. J MIOS, 2013. 69: p. 11-18.

- [15] 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: p. 987-996.
- [16] Marx RE. Platelet-rich plasma; growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1998. 85: p. 638-646.
- [17] Anitua E, et al. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, 2007. 28: p. 4551-4560.
- [18] Sánchez M, et al. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*, 2009. 39: p. 345-354.
- [19] Foster TE, et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 2009. 37: p. 2259-2272.
- [20] Kon E, et al. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011. 19: p. 516-527.
- [21] Seddon H. Nerve injuries. *Med Bull (Ann Arbor)*, 1965. 31: p. 4-10.
- [22] AK Reinhold, HL Rittner. Barrier function in the peripheral and central nervous system - a review. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 2017. 469: p. 123-134.

- [23] 緒方徹 ほか. 神経再生の分子細胞生物学. 整・災外, 2008. 51: p. 659-665.
- [24] Dohan Ehrenfest, et al. Classification of Platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (PPRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends in Biotechnology, 2009. 27: p. 158-167.
- [25] Dallaudiere, B, et al. Efficacy of intra-tendinous injection of platelet-rich plasma in treating tendinosis: comprehensive assessment of a rat model. European Radiology, 2013. 23: p. 2830-2837.
- [26] Ding, X. G., et al. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. Asian Journal of Andrology, 2009. 11: p. 215-221.
- [27] Emel, E., et al. Effect of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. Journal of Neurosurgery, 2011. 114: p. 522-528.
- [28] Farrag, T. Y., et al. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. Laryngoscope, 2007. 117: p. 157-165.
- [29] Lichtenfels, M., et al. Effect of platelet rich plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. Microsurgery, 2013. 33: p. 383-390.

- [30] Sariguney, Y., et al. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 2008. 24: p. 159-167.
- [31] Sanchez, M., et al. Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017. 17: p. 197-212.
- [32] Wu, Y. N., et al. Optimization of platelet-rich plasma and its effects on the recovery of erectile function after bilateral cavernous nerve injury in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2016. 10: p. 294-304.
- [33] Ye, F., et al. Platelet- rich plasma gel in combination with Schwann cells for repair of sciatic nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 2012. 7: p. 2286-2292.
- [34] Casansas, J., et al. Peripheral nerve regeneration after experimental section in ovine radial and tibial nerves using synthetic nerve grafts, including expanded bone marrow mesenchymal cells: morphological and neurophysiological results. *Injury*, 2014. 45: p. 2-6.
- [35] Bradley, W.G., Asbury, A.K. Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve regeneration. *Experimental Neurology* , 1970. 26: p. 275-282.



- [36] 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 Part A*, 2015. 103A: p. 1011-1020.
- [37] 伊藤 聰一郎. 末梢神経障害 – 基礎と臨床の全て人工神経. 整形・災害外科, 2008. 51: p. 725-732.
- [38] Witzel, C., et al. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *Journal of Comparative Neurology*, 2005. 485: p. 183-190.
- [39] 立野勝彦. 神経移植における末梢側縫合部の二次的切除の実験的研究. 十全医学雑誌, 1976. 85: p. 17-32.
- [40] Fu, S.Y, Gordon, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 1997. 14: p. 67-116.
- [41] 日本糖尿病学会糖尿病診断基準に関する調査検討委員会：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告（国際標準化対応版）. *糖尿病*, 2012. 55: p. 494.
- [42] Sanchez, M, et al. Platelet-rich plasma, an adjuvant biological therapy to assist peripheral nerve repair. *Neural Regen Res*, 2017. 12: p. 47-52.

- [43] García de Cortázar U, et al. Intraneural Platelet-Rich Plasma Injections for the Treatment of Radial Nerve Section: A Case Report. *J Clin Med*, 2018. 29: p. E13.
- [44] Kuffler, D.P. Platelet-rich plasma promotes axon regeneration, wound healing, and pain reduction: Fact or fiction. *Mol. Neurobiol*, 2015. 52: p. 990-1014.
- [45] Hibner, M, et al. Repeat operation for treatment of persistent pudendal nerve entrapment after pudendal neurolysis. *J. Minim. Invasive Gynecol*, 2012. 19: p. 325-330.
- [46] Sánchez, M, et al. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of common peroneal nerve palsy associated with multiple ligament injuries of the knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc*, 2013. 22: p. 1084-1089.
- [47] Malahias, M.A, et al. Single injection of platelet-rich plasma as a novel treatment of carpal tunnel syndrome. *Neural Regen Res*, 2015. 10: p. 1856-1859.