

学位論文の要旨

所属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻病態解明医学講座 腫瘍集学治療学分野	氏名	小畑 秀 司
----	---	----	--------

主論文の題名

Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study

主論文の要旨

【目的】

椎間板変性は腰痛や腰椎変性疾患に関与する臨床上的重要な問題だが、椎間板は自己再生能力に乏しく、治療を困難なものにしている。その要因の一つに椎間板が無血管組織であり、創傷治癒反応が生じないことが考えられる。活性化した血小板はTransforming growth factor- β (TGF- β)、Insulin-like growth factor-1(IGF-1)、などさまざまな成長因子を分泌し、創傷治癒に寄与することが知られており、血小板を高濃度を含む多血小板血漿(PRP; platelet-rich plasma)は骨や軟部組織の再生を促すために臨床的に使用されている。

この PRP を凝固活性化させ放出させて得られた PRP-releasate (PRP 上清)は in vitro において椎間板細胞の代謝を活性化させプロテオグリカン合成を促進させることが報告されているが、in vivo での効果は調べられていない。本研究の目的は自己血のみを用いて作製した PRP 上清の変性椎間板に対する効果を検討することである。

【方法】

12羽の New Zealand white rabbit を用いて全身麻酔下に後側方アプローチで椎間板を露出させ、椎間板(L2/3、4/5)を 18G 針で穿刺し、椎間板変性モデルを作製した。術中に PRP 作製用に 10ml の血液を anti-coagulant citrate dextrose-A (ACD-A)液を含む容器に採取し、さらに 5ml を自己血清作製用に採取した。採血した全血を 300g で 15 分遠心分離し、血球成分と血小板を含む血漿に分離したのち、血漿を 1000g で 10 分遠心分離し血小板を沈降させ、乏血小板血漿 (PPP; platelet-poor-plasma) と血小板ペレットに分離した。血小板ペレットに PPP を 200 μ l 加えたものを PRP とした。

PRP、PPP に自己血清と 2%CaCl₂ 溶液の混和物を加え凝固・活性化させ、遠心分離することにより、PRP 上清、PPP 上清を得た。穿刺後 4 週経過した家兎を 2 群に分けた。コントロール群は 4 羽の家兎に phosphate-buffered-saline(PBS)20 μ l を L2/3、4/5 椎間板に 30G 針で注入した。残りの 8 羽の L2/3、4/5 には PRP 上清あるいは PPP 上清を注入した。側面レントゲン像にて 2 週ごとに椎間板高の測定を行い、注入後 8 週で屠殺し腰椎を採取、MRI 撮影を行った。椎間板高は Disc height index(DHI:椎体に対する椎間板高の比率)を計測し、%DHI(=術後 DHI/術前 DHI \times 100)にて評価した。MRI は 3.0-Tesla imager で作成した椎間板水平断の T2 マッピングにより T2 値を定量化し平均値で評価した。MRI 撮影後に腰椎を椎体 - 椎間板単位に分けパラホルムアルデヒドで固定し、H-E 染色、サフラニン - O 染色を行い、髄核、線維輪内層前方、後方で軟骨細胞様細胞の数を評価した。

【結果】

PRPの血小板数は全血の約 29 倍であった（全血： $195.2 \pm 6.4 \times 10^3/\mu\text{l}$ 、PRP： $5752.5 \pm 393.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ ）。穿刺により椎間板高は4週間で非穿刺椎間板と比べ有意に低下した。PRP上清、PPP上清群は注入後2週間で、PBS群に比べ椎間板高の回復が見られた(%DHI:PBS群: $70.8 \pm 1.5\%$ 、PPP上清群: $83.7 \pm 3.0\%$ $p < 0.05$ vs. PBS群、PRP上清群: $86.8 \pm 9.3\%$ $p < 0.01$ vs. PBS群)。注入後4週間でPRP上清群は穿刺前の90%まで椎間板高が回復した。以降の実験期間でも同様の結果が持続した(8W、10W、12W; $p < 0.05$ vs. PPP上清群、PBS群)。PPP上清群では非穿刺椎間板と比較し約80%の回復を示し、PBS群では椎間板高の回復は認めなかった。MRIでは穿刺椎間板は非穿刺椎間板と比べT2値は優位に低値であった。PRP上清群、PPP上清群はPBS群に比べT2値が高値な傾向を示したが、3群間に有意差は認めなかった。組織学的には前方の線維輪内層ではPRP上清群は他の2群に比較して優位に軟骨細胞様細胞の数が多く、髄核部分でもPRP上清群はPBS群に比べ優位に軟骨細胞様細胞の数が多かった。

【考察】

血小板には多くの成長因子が含まれているが、放出されるには凝固活性化される必要がある。過去にも多くのPRPを用いた報告があるが、凝固活性化にウシやヒト由来トロンビンが使われてきた。しかし異種もしくは同種の血液由来産物を使用することは免疫反応や感染症の観点から臨床応用への妨げとなりえる。また、トロンビン自体が軟骨組織を変性させることが報告されているため、本研究では自己血清と塩化カルシウムのみを用いてPRPを活性化させた。

過去の家兎線維輪穿刺モデルへosteogenic protein-1 (OP-1)、growth differentiation factor-5 (GDF-5)を投与した研究では椎間板高が非穿刺椎間板高の約90%まで回復したと報告されている。本研究の結果はPRP上清はこれらの物質と同様の椎間板高の回復が得られる可能性を示唆している。また、本研究の方法では特別な機材を必要としないため、容易に利用できることも利点である。

近年、椎間板におけるMRI評価は構造的評価のみでなく、構造組織や基質含有量も評価されている。T2マッピングを用いることで椎間板の分子構成と構造組織の変化を定量的に評価できることが報告されており、本研究でもT2マッピングを用いた定量評価を行った。PRP上清の投与でT2値が増加する傾向を認めたが、他の2群と比べ有意差は認めなかった。

組織学的にはPRP上清の投与により軟骨細胞様細胞の増加が確認されたが、炎症反応などの副反応は認めなかった。以上よりPRP上清は安全であり、容易に作製できるため、早期に臨床応用への移行が可能であると考えた。