

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2010～2012  
課題番号：22591638  
研究課題名（和文）  
自家多血小板血漿を用いた椎間板再生法-臨床応用に向けた安全性の検証-  
研究課題名（英文）  
Intervertebral Disc Regeneration Using Platelet-Rich Plasma for Clinical Application  
研究代表者  
三上 靖夫（MIKAMI YASUO）  
京都府立医科大学 医学研究科 講師  
研究者番号：80360030

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では大型動物での自己多血小板血漿（PRP）とゼラチンハイドロゲル粒子を組み合わせた椎間板再生法の有効性を評価した。椎間板の組織構造および細胞組成がヒトと極めて類似した大型動物を用いたことでわれわれはこの再生法を臨床応用への前段階とすることができた。

## 研究成果の概要（英文）：

This study evaluated the possibility that the intervertebral regeneration process was effective on the large animal with platelet-rich plasma (PRP) and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres. This process shifted to the pre-stage to clinical application because we use the large animal whose organizational structure and cell composition of the intervertebral disc is extremely similar with humans.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：多血小板血漿、ゼラチンハイドロゲル、椎間板再生、脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

脊柱構成要素の一つである椎間板は、脊柱の支持性と運動性を担う重要な要素である。加齢や力学的負荷による椎間板変性は、椎体

間の不安定性を惹起し、椎間板、周囲の筋組織または靭帯に起因した腰痛の原因となる。そのため変性椎間板の生物学的機能を回復させる再生法の開発が切望されているが未

だ確立されていない。われわれは、自己血液から精製した多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) と drug delivery system (DDS) 技術を組み合わせ、家兎変性椎間板モデルの髄核内に注入し、内因性成長因子の徐放による椎間板再生効果を明らかにした。

さらに椎間板再生効果の機序について解析を行った結果、PRP を DDS であるゼラチンハイドロゲル粒子 (以下、ゼラチン粒子) と組み合わせる椎間板内注入する proteoglycan と Type II collagen の遺伝子発現量が増加し、髄核細胞のアポトーシスも抑制されることが判明した。また、臨床で椎間板評価に用いられる MR 画像においても椎間板再生効果を確認した。PRP は自己組織であり免疫拒絶反応の危険性がなく、既に口腔外科領域では臨床応用されている。一方、ゼラチン粒子は成長因子と電気的に結合し、生体内での分解とともに成長因子を局所で徐放させることが可能な生体吸収材料であり、臨床での安全性は証明されている。以上から、PRP とゼラチン粒子を用いた椎間板再生法は、臨床応用が非常に期待できる成長因子治療である。

## 2. 研究の目的

われわれが動物モデルとして用いた家兎の髄核細胞は脊索細胞が大半を占めており、軟骨様細胞が大半を占めるヒトとは細胞組成が異なる。従って、臨床応用へのステップとして、椎間板の組織構造および細胞組成がヒトと極めて類似した大動物を用いて、本法の再生効果を確認する必要がある。

ビーグル犬は、生後 1 年で椎間板内の脊索細胞の大半がヒトと同じ軟骨様細胞に置換され、椎間板の組織構造もヒトと極めて類似している。従って、臨床応用を実現するためにはビーグル犬で本法の再生効果を証明することが必要不可欠である。また、PRP を実

際にヒト椎間板へ投与する際には、再生効果が最も期待できる PRP の濃度について明らかにされている必要がある。ゼラチン粒子は、その作製過程で含水率を変化させることにより、生体内での成長因子の徐放期間を調節することが可能であるため、椎間板再生効果の最も高い徐放期間についても大動物を用いて検討する。一方、これまでの組織学的な評価法に加えて椎間板の強度および椎体間の不安定性などの生体力学的な機能回復についても検証する必要がある。髄核の主成分であるプロテオグリカンは陰性電荷により高い親水性を有し、それを取り囲む線維輪は同心円状に層構造を形成する。この構造が椎間板の粘弾性を維持し、脊椎の動的安定性に寄与している。変性椎間板では粘弾性が低下し、脊椎機能単位が破綻する。椎間板の粘弾性を数値化し、その変化を算出することにより本再生法による生体力学的な機能の回復を評価検討する。さらに、PRP は自己組織ではあるものの、細胞増殖作用を持つとされる成長因子を含有していることから、臨床応用に向けて生体への安全性についても詳細に検討する必要がある。本研究は、小動物で確立された PRP と DDS を用いた椎間板再生効果を、ヒトと類似した椎間板細胞を有する大動物で生体力学的評価を含めて検証する。さらに本再生法の安全性を詳細に検討することで、臨床応用を念頭に置いた最終的な前臨床的評価を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 変性モデルの作成

ビーグル犬 (生後 10-11 カ月、体重 10-12kg、雄) に対して全身麻酔下に腹膜外進入法 (右側進入) により腰椎前方に到達し、L3/4、L4/5、L5/6 椎間板を露出させる。18G 針付き 20ml シリンジを用いて、L3/4、L4/5、

L5/6 の髄核を同穿刺部位から 2 回吸引し、aspiration model を作製する。吸引後 4 週間待機することにより変性モデルを作製する。

#### (2)ゼラチンハイドロゲルの作成

等電点 5.0 の 10w%ゼラチン溶液を 25w% glutaraldehyde (GA) 溶液で化学架橋し径 10~20 $\mu$ m のゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。

#### (3)PRP 含浸ゼラチンハイドロゲルの作成

ビーグル犬 (生後 10-11 カ月、体重 10-12kg、雄)にペントバルビタールを腹腔内注射し全身麻酔を行った。1 匹あたり 30cc の採血を行い、ACD-A 液を 7cc 入れておいた 50 cc 遠心チューブ 2 本に 15cc ずつ血液を移した。遠心チューブを遠心分離機を用いて 1500rpm で 10 分間遠心分離した。上層にある透明な血清部分を 14G サーフロー針を用いて吸引し別の遠心チューブに移した。3000rpm で 10 分間遠心分離した。上層の血清部分を 14G サーフロー針を用いて吸引し、platelet poor plasma (PPP) を得た。底に沈殿した血小板および血清 450 $\mu$ L をピペッティングし PRP を得た。PRP、血液中、PPP の血小板数を計測した。450 $\mu$ L の PRP のうち 90 $\mu$ L を 4.5mg、のゼラチンハイドロゲル粒子に 37°C で 1 時間含浸させた。PBS 270 $\mu$  を加え Total 360 $\mu$ L の PRP を作成した。

#### (4)PRP の注入

髄核吸引 4 週間後に髄核吸引側と反対側から腹膜外進入法により腰椎前方に到達し、L3/4、L4/5、L5/6 椎間板を露出させた。

PRP 含浸粒子 (60 $\mu$ L) を投与する PRP 群、PBS 含浸粒子 (60 $\mu$ L) を投与する PBS 群、未注入群の 3 群に分別した。

#### (5)腰椎椎間板複合体の摘出

注入後 8 週にペントバルビタールの大量投与により安楽死させ、腰椎椎間板複合体を摘出した。

#### (6)MRI での評価

L3/4、L4/5、L5/6 の MR 画像を撮像した。T1 強調画像で椎間板高の前後方を測定し平均値を概算し、T2 強調画像で Pfirrmann classification によるスコア (1-5) を、T2 mapping で髄核中央に range of interest (ROI) を設定し T2 値を測定した。

## 4. 研究成果

### (結果)

椎間板高の平均値は PRP 群 (n=5、15 椎間板) で 3.41mm、PBS 群 (n=3、9 椎間板) で 3.54mm、control 群 (n=3、9 椎間板) で 3.30mm であった。Pfirrmann classification では、PRP 群 (n=5、15 椎間板) で  $2.00 \pm 0.53$ 、PBS 群 (n=3、9 椎間板) で  $2.11 \pm 0.60$ 、control 群 (n=4、12 椎間板) で  $2.25 \pm 0.75$  であった。T2 値は PRP 群 (n=2、2 椎間板) で 57.2ms、PBS 群 (n=3、3 椎間板) で 66.3ms、control 群 (n=2、2 椎間板) で 59.8ms であった。

### (考察)

PRP 群では他群と比較して投与後 8 週間において椎間板高の差や T2 値の上昇を認めなかった。Pfirrmann classification による椎間板変性の評価では PRP 群において変性が抑制された傾向を認めた。

PRP は自己血液から精製可能であるため感染 (transmissible diseases) や自己免疫反応のリスクが極めて低く安全性が高いことから組織再生医療の分野において臨床での使用が始まっている。一般的に成長因子を *in vivo* で使用する際には、その半減期の短さ (short biological half-life) が問題点となる。そのため成長因子を組織再生 (tissue regeneration) に用いる際には成長因子を局所で徐放するために様々なスキャホフォードが必要である。PRP を用いた椎間板再生法でも、PRP 単独では椎間板再生を促進しない

が、成長因子を徐放するキャリアと併用することにより椎間板再生促進効果を認めたという報告がある。このため、PRP を用いた椎間板再生法を開発するには併用するスキヤフォードの選択が重要であると考えた。

ゼラチンを化学架橋したゼラチンハイドロゲルは生体適合性および生体分解性に優れたバイオマテリアルである。ゼラチンハイドロゲルはさまざまな成長因子と静電気力により吸着し、分解に伴い成長因子の生物活性を保持したまま徐放することが可能である。ゼラチンハイドロゲルは、臨床でさまざまな成長因子を徐放するためのDDSとして使用されている。

本法は臨床で使用されている安全性が高いマテリアルを材料としていることや椎間板の組織構造および細胞組成がヒトと極めて類似した大型動物であるビーグル犬を用いたことでわれわれはこの再生法を臨床応用への前段階とすることができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

特になし

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三上 靖夫 (MIKAMI YASUO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80360030

### (2) 研究分担者

池田 巧 (IKEDA TAKUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40453120

### (3) 研究協力者

石橋 秀信 (ISHIBASHI HIDENOBU)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生

