

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861234

研究課題名(和文)徐放化多血小板血漿による血管新生療法の開発

研究課題名(英文)Enhanced Sternal Healing via Effect of Controlled Release and Spatial Retention of Platelet-Rich Plasma Impregnated in Biodegradable Gelatin Hydrogel

研究代表者

栗田 二郎(Jiro, Kurita)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20421183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸骨正中切開の創傷治癒過程において、ゼラチンハイドロゲルを用いた多血小板血漿の創傷治癒効果の検討を行った。胸骨虚血モデルを Control Gel30mg+PBS300 $\mu$ l (Gel) PRP300 $\mu$ l (PRP) Gel30mg+PRP300 $\mu$ l (PRP+Gel)投与群に分け、比較検討を行った。PRP+gel群は他の群と比較して海綿骨における線維組織の面積の割合や、オステオカルシンのmean intensityが有意に高値であった。また、micro CTでも海綿骨においてPRP+Gel群で有意に高い骨密度を認めた。DDS徐放化PRPは胸骨正中切開術後早期における胸骨の癒合を促進した。

研究成果の概要(英文)：Purpose: The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the controlled release of PRP. Methods: After median sternotomy and bilateral internal thoracic artery removal, 16 rabbits were randomized into 4 groups: control (ctrl), 30mg of gelatin-hydrogel incorporating 300 $\mu$ l of PBS (gel), 300 $\mu$ l of the solution form of PRP (PRP), 30mg of gelatin-hydrogel incorporating 300 $\mu$ l of PRP (PRP+gel). Results: This study demonstrated that a controlled release of PRP increases the bone mineral density of sponge bone ( $382.7 \pm 40.1$ mg/cm<sup>3</sup>) compared with Ctrl, gel, and PRP ( $265.4 \pm 18.9$ ,  $325.6 \pm 41.4$ ,  $285.4 \pm 31.5$ mg/cm<sup>3</sup>, respectively  $p < 0.01$ ). Histologic analysis of PRP+gel group revealed accumulation of fibrous tissue into the separated sternal space. Apparent sternal dehiscence was observed in the Ctrl, gel, PRP as assessed radiographically. Conclusion: Controlled release PRP system is markedly effective in encouraging sternal healing on early phase.

研究分野：心臓血管外科学分野

キーワード：再生医療 血管新生 多血小板血漿 心臓手術 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

心臓手術において胸骨正中切開は最も基本的な手術アプローチ法である。一般的に胸骨は正中で縦に切開され、手術後に金属ワイヤーで左右を寄せ合い、閉胸される。術後経過の中で再骨化し癒合していくが、疼痛に悩む症例も多い。また近年、本邦においても生活習慣の変化から開心術を受ける症例の糖尿病合併比率が年々上昇している。糖尿病合併症例は創傷治癒遅延を契機に、術後に重度の縦隔洞炎を併発することもある。特に冠動脈バイパス術にて両側内胸動脈を使用した症例は、胸骨周囲の虚血も影響し、致命的な術後縦隔洞炎になる可能性が高い。それらを危惧してこのようなハイリスク症例には両側内胸動脈を使用すべきではないという報告もある。しかし、今日の冠動脈バイパス術における内胸動脈はその長期開存性から使用血管の golden standard とされ、術後の胸骨癒合不全の問題が回避されれば、更なる積極的な内胸動脈の使用が可能となり、冠動脈バイパス術の手術成績はさらに改善するであろう。

一方、血管新生を促進する増殖因子の存在が明らかとなって以来、血管内皮増殖因子 (VEGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) などによる虚血組織への治療的血管新生の可能性が示唆された。その中でも、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) には血管新生 angiogenesis および動脈形成 arteriogenesis (小動脈レベルの血管拡張, リモデリング) を促進する特色を持つことが知られている。それを応用し臨床治験が既に開始され、下肢の重症虚血肢に対する良好な結果が報告されている。しかしながら、血管再生過程は無数の因子 (蛋白・酵素・血管作動性物質・細胞・細胞外マトリックスなど) が関与しているため、単一成長因子のみによる血管新生療法には限界

があると推測される。

一方、多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma: PRP) は platelet derived growth factor (PDGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor (TGF)- など様々な成長因子を含むことから新たな再生療法として注目されている。すでに 1998 年に Marx らにより歯科領域において初めて下顎骨再建術に臨床応用され、有効な骨再生効果を示した。前述のように多種類の成長因子を含み、血液凝固の際に形成されるフィブリン網の介在により組織の再生がより起りやすい環境にあり、単体投与に比べてそれらの相乗効果が期待できる。

しかし、いずれの増殖因子も生物学的活性が極めて短く、局所で一定期間有効な濃度を保つためには困難な側面があった。そこで京都大学の田畑教授が Drug Delivery System (DDS) の概念から開発された gelatin-hydrogel は、投与された成長因子の徐放化を可能にした。これによって、細胞増殖因子は生物活性を維持したまま生体内の任意の部位に留まらせることが可能となり、より安定した血管新生効果を得ることが可能となった。(図 1)

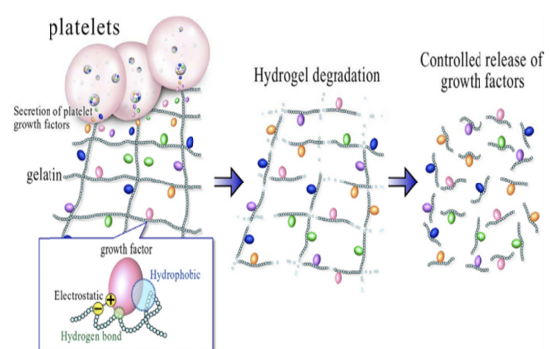


図 1. 多血小板血漿の徐放化のメカニズム (文献より)

## 2. 研究の目的

以上の知見を踏まえ、筆者らは 2011 年にゼラチンハイドロゲルによる徐放化多血小板血漿を用いてラット重症虚血肢モデルの

血管新生効果を報告したが、今回、同方法が胸骨の癒合効果も促進させると仮定した。

本研究は、胸骨正中切開の創傷治癒過程において、gelatin-hydrogel を用いた多血小板血漿の創傷治癒効果の検討を行う目的で施行した。

### 3. 研究の方法

#### 【実験モデル作成】

日本白ウサギを全身吸入麻酔下に、臨床上の手技に準じて剪刀で胸骨を正中切開した。両側内胸動脈を電気メスにて起始部から横隔膜直上まで採取切離した。胸骨虚血モデルを無作為に以下の4群に分け、閉胸時に投与を行った。観察期間は7日間とした。

Control (Ctrl)

30mg of gelatin-hydrogel  
incorporating 300  $\mu$ l of PBS (gel)  
300  $\mu$ l of the solution form of PRP (PRP)  
30mg of gelatin-hydrogel  
incorporating 300  $\mu$ l of PRP (PRP+gel)

#### 【多血小板血漿の作成】

投与する PRP は同種ウサギより得られた血液から 2 回遠心法 (ダブルスピン法) を用いて作成した。まず、1000g x10 分 4 の遠心分離後、血小板が多く含まれる軟層 (buffy coat) を採取した後に、再度 2100g x15 分 4 で遠心し、下層の 500  $\mu$ L を PRP とした。得られた PRP を gelatin-hydrogel に含浸し、60 分 37 下に静置した後、胸骨切開部に注入した。

#### 【評価】

治療 1 週間後、胸骨横断切片を作成し、各群における病理組織学的評価を行った。

micro CT を用いて、Bone mineral density (BMD) を計測し、構造分析を行った。

Masson 染色およびオステオカルシン抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、骨再生評価を行った。

### 4. 研究成果

micro CT で評価した海綿骨における BMD において PRP+gel 群 ( $382.7 \pm 40.1$  mg/cm<sup>3</sup>) は、Ctrl 群、gel 群および PRP 群 ( $265.4 \pm 18.9$ ,  $325.6 \pm 41.4$ ,  $285.4 \pm 31.5$  mg/cm<sup>3</sup>) と比較し有意に高値であった (\*: p<0.05)。(図 2)

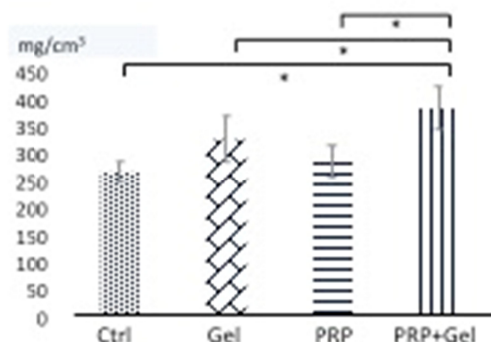
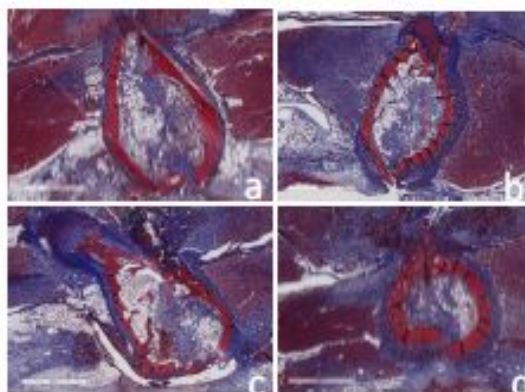


図 2. BMD of sponge bone

また、Masson 染色において海面骨における繊維芽組織面積の比率を評価すると、PRP+gel 群は、他の群と比較して有意に高値であった ( $15.0 \pm 4.1$ ,  $13.2 \pm 7.9$ ,  $13.2 \pm 8.8$ ,  $22.6 \pm 13$  % for Ctrl, gel, PRP, PRP+gel, \*: p<0.01)。(図 3, 4)



a: Ctrl, b: Gel, c: PRP, d: PRP+Gel

図 3. Masson trichrome 染色 (x40)

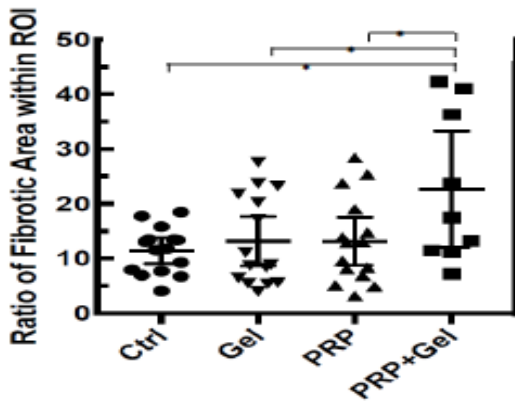
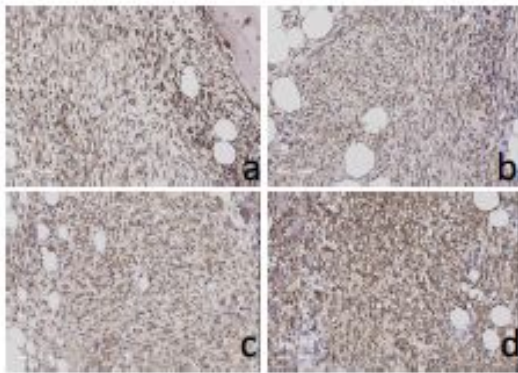


図4. 海面骨における繊維芽組織面積比率

オステオカルシンの海綿骨における mean intensity においても PRP+gel 群は、他の群と比較して有意に高値であった(9.3±3.2, 7.9±3.3, 9.5±2.8, 23.9±23.3 for Ctrl, gel, PRP, PRP+gel, \*: p<0.01)。(図5, 6)



a: Ctrl, b: Gel, c: PRP, d: PRP+Gel

図5. オステオカルシン免疫染 (x200)

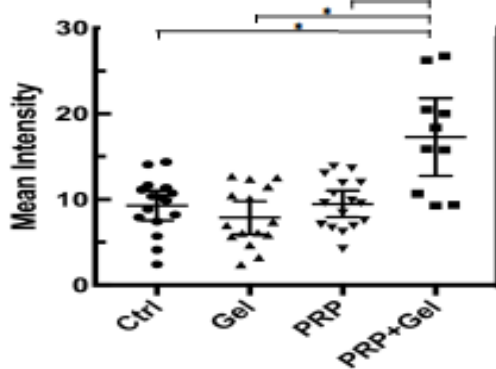


図6. オステオカルシンの海面骨における mean intensity

今回の組織学的評価において、gelatin-hydrogel によって徐放化された PRP は、胸骨切開創への繊維芽組織の増盛を促進させた。しかし、この観察期間内では全ての群において胸骨周囲の vascular density に差は認めなかった。

gelatin-hydrogel 徐放化 PRP は胸骨正中切開術後早期における胸骨の癒合を促進させた。今後、さらなる長期観察における骨癒合経過および血管新生変化を追加研究する必要がある。

#### <引用文献>

Kurita J, Miyamoto M, et al. Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel. *Ann Thorac Surg.* 2011 Sep;92(3): 837-44.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

Shibata M, Kurita J, et al. Enhanced Sternal Healing via Effect of Controlled Release and Spatial Retention of Platelet-Rich Plasma Impregnated in Biodegradable Gelatin Hydrogel. American Heart Association Scientific Sessions 2016, Nov 12-16, 2016, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, Louisiana, USA)

芝田匡史、栗田二郎、他. DDS 徐放化 PRP による胸骨正中切開後の胸骨癒合促進における新治療法の開発. 第117回日本外科学会定期学術集会. 2017年4月27-29日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗田 二郎 (KURITA, Jiro)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20421183

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

芝田 匡史 (SHIBATA, Masafumi)