

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861691

研究課題名(和文)PRP-F療法における創傷治癒促進効果の検討

研究課題名(英文)effect of platelet rich plasma and fibroblast growth factor for wound healing

研究代表者

佐藤 精一 (Sato, Seiichi)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50457628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では多血小板血漿 (PRP) と繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 混合製剤が創傷治癒促進効果をもたらすかどうかを検討した。マウス背部に皮膚潰瘍を作成し、混合製剤を潰瘍面に塗布および真皮内注射を行った。その結果、行った群と行わなかった群との間で、わずかな差を持って、行った群の治癒促進の傾向を認めた。また、注射と塗布とで治癒に差は生じなかった。また分離法としてsingle spine法とdouble spine法とでの比較でも差をみることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of paltelet rich plasma (PRP) and fibroblast growth factor (FGF) for wound healing was assessed. Animal model using mouse was used for this study. For this study, the ulcer was made on the back of the mouse model. The combined liquid using PRP and FGF (PRP + FGF) was put on the ucler or inject in the dermal layer of the ulcer. As the result of our study, the wound was healded earlier in tha group that PRP + FGF was adminisiterred than tha group that was not adminisiterred. We could not find significant difference between the single spine method and the double spine method.

研究分野：再建外科

キーワード：多血小板血漿 繊維芽細胞増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

### PRP と FGF-2

PRP にトロンピン・Ca を加えて活性化させる (= activated PRP : aPRP) と脱顆粒と呼ばれる現象が起こり、血小板中の顆粒から platelet derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor (TGF- $\beta$ )、vascular endothelial growth factor (VEGF)、epithelial growth factor (EGF) といった**様々な増殖因子が放出され、これらが協奏的に働き創傷治癒が促進される。**

FGF-2 は創傷治癒において重要な役割を担う増殖因子であり、創傷治癒過程の炎症期においては好中球やマクロファージの遊走、増殖を誘導し、増殖期においては血管内皮細胞増殖、遊走、管腔形成を促進することにより血管新生を促進する。また線維芽細胞を刺激し増殖させることにより肉芽を形成させ、再構築期においてはケラチノサイトの増殖作用により上皮化を進行させるといった多方面にわたる働きを示す。しかし天然には微量しか存在せず、遺伝子組み換え技術を用いた製造法が開発された。本邦では 2001 年に世界初の FGF-2 製剤が医薬品として認可され、皮膚潰瘍治療剤として使用されている。

### PRP-F 療法について

**PRP 療法は活性化操作により血小板から強制的に多量の増殖因子を放出させ、創傷治癒を促す「局所サイトカイン療法」である。**特に PDGF と TGF- $\beta$  については PRP 中に多く含有され、さらに活性化することで数百倍～数千倍もの量が放出されるが、**FGF-2 の含有量はごく微量**である (Kushida, S 38 anual J society wound healing)。

**これを補ったのが PRP-F 療法**であり、ヒト線維芽細胞の増殖度とコラーゲン産生量が有意に促進する (図 1、2)。

### PRP の調整法について

PRP の調整法は各施設で異なるが、**末梢血を 1 回の遠心分離で血漿層と血球層の境界部に存在**

**する血小板を回収する single spin 法と、末梢血を遠心分離して血小板浮遊血漿を回収し、2 回目の遠心分離で沈殿した血小板より PRP を調整する double spin 法**がある。single spin 法では手間が少なく、血小板濃縮を自動化や機械化に持ち込みやすいといった利点があり、double spin 法は 2 回の遠心分離操作を行う手間

と時間がかかるという欠点があるものの、single spin 法と比較して PRP と乏血小板血漿 (platelet - poor plasma : PPP) とを明瞭に識別でき、濃縮血小板の採取が容易であるという利点がある。また各々の血小板濃縮率は、single spin 法で 3.58 倍 (Eby, B.W. J oral implantol. 2002)、double spin 法で 4~7 倍程度 (Marx, R.E. Quintessence Pub Co. 2005) と報告されており、**一般的に double spin 法の方が有効とされているが、その遠心分離時間、回転数については明確なコンセンサスが得られていない。**

### PRP、FGF-2 混合製剤の投与方法について

過去に **FGF-2 をゼラチンに混合して注射することにより血管新生などに有効な効果を示した**との報告があり (J control release. 1994)、有効な drug delivery system であると注目を集めた。さらに **PRP の局所注射は近年美容外科領域で除皺術として行われており** (日本美容外科学会. 2006)、PRP-F 療法においてもその混合製剤を潰瘍表面に塗布するより局所注射した方が有効である可能性がある。

### 着想に至った経緯

研究代表者が所属する診療科 (形成外科) では褥瘡や末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease : PAD) に伴う難治性潰瘍などの慢性創傷の治療にあたる機会が多く、治療に行き詰るケースも存在する。**保存的療法のオプションとして、または外科的療法のブースターとして PRP-F 療法に期待するところは大きく、**まず治療の outcome である臨床所見に着目し、そこから最適な治療条件を模索する方法が有効であると判断し、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

**多血小板血漿 (platelet-rich plasma : PRP) と増殖因子の 1 つである FGF-2 の併用 (以下、PRP-F 療法) はヒト真皮線維芽細胞の増殖度とコラーゲン産生量を有意に促進することが判明**しており、臨床への応用の可能性が期待されている。そこで

本研究は、PRP-F療法の臨床的効果を糖尿病マウスに皮膚潰瘍を作成して検証し、さらにPRPの調整をsingle spin法で行った場合とdouble spin法で行った場合、またPRPとFGF-2を潰瘍表面に塗布した場合と潰瘍周囲の真皮内に注入した場合とで臨床的な差異が生じるかどうかを検討して、同治療法のプロトコルの確立を目指すことを目的とする。

**PRPとFGF-2の混合製剤の真皮内投与が創傷治癒を促進するという実験的検討は、今回我々が調べ得た限り行われていない。**

もし真皮内投与が単純な塗布よりも有意に潰瘍の治癒までの期間を短縮することが分かれば、従来の投与方法が見直される可能性がある。

またPRP-F療法により潰瘍の治癒までの期間が有意に短縮し、さらにPRPの調整法についてはsingle spin法よりdouble spin法の方が血小板濃縮率が高く、潰瘍の治癒までの期間が短いと予想されるが、有意差が生じなかった場合は、より簡便なsingle spin法を用いたPRP-F療法の啓蒙に繋がり、生じた場合はdouble spin法の遠心分離条件に研究対象を絞ってさらに研究を深め、**最終的にはPRP-F療法の治療プロトコルの確立に繋がる**と思われる。

さらにPRP-F療法を施行し治癒した潰瘍はコラーゲンが豊富に存在し質感に優れていると予想され、それが病理組織学的に証明されれば、**創傷治癒の促進以外のPRP-F療法の新たな可能性**が示されると考える。

### 3. 研究の方法

モデルとして糖尿病マウス(ogマウス)を使用する。マウスの背部から直径1.5cmの皮膚、脂肪を筋膜上で切除し、2か所に皮膚潰瘍を作成する。1つはPRPとFGF-2の混合製剤を投与し、もう1つはコントロールとする。それぞれハイドロコロイド創傷被覆材で密閉閉鎖しその上からポリウレタン被覆材を貼付して固定する。PRPの調整法と混合製剤の投与方法の違いにより、合計4つのグループを作る。毎日創部の観察

を行い、**平成25年度は潰瘍面が消失した時期の差を、肉眼的、病理組織学的に検討する。平成26年度は免疫組織学的検討を行い、治癒過程における血管新生の差異を検討し、single spin法とdouble spin法とで活性化後のサイトカイン放出量に差があるかどうかELSA法にて検討する。**尚、グループ、混合製剤作成の詳細は次の通りとする。

	PRPの調整	混合製剤の投与方法
グループ	Single spin	潰瘍面塗布
グループ	Single spin	真皮内注射
グループ	double spin	潰瘍面塗布
グループ	double spin	真皮内注射

### PRP、FGF-2混合製剤の作成方法

#### PRPの作成方法

モデルとなるマウス24匹から少量ずつ静脈血採血を行い、計25mlの血液を採取する。

25mlの内訳は、PRP分離用8.5ml採血管(クエン酸Na含有)2本と、自己トロンビン用8ml

採血管(凝固促進剤含有)1本とする。

1回目の遠心分離を行う。条件は1700rpmで7分間とする。これにより末梢血は赤血球層と

血漿層とに分離される。

18Gノンベベル針をつけた5mlシリンジで、2本のPRP分離用8.5ml採血管の赤血球層と血漿層

との境界にあるbuffy coat(白血球と血小板の混合物)層より下3mmの所まで吸引する。

single spin法ではここで吸引したものを滅菌シャーレに移す。

double spin法では別の採血管に移し、2回目の遠心分離を行う。条件は3200rpmで5分間

とする。遠心分離後、淡黄色の上澄み部分は乏血小板血漿(platelet-poor plasma: PPP)

であるので26G注射器を用いて吸引し、破棄する。**採血管に残っているのがPRP**であるの

で、これを滅菌シャーレに移す。

single spin法でもdouble spin法でも、滅菌シャーレに移す時にPRPの量を計測しておく。

自己トロンビン用採血管は遠心分離す

る前に 30 分間静置する。その後 3600rpm で 12 分間遠心

分離し、できた上澄みの部分を 18G ノンベベル針で吸引して自己トロンピンとして使用する。

自己トロンピンの 1/3 の量の 10% 塩化カルシウムを自己トロンピンに加え、PRP のアクティベ

ーターを調整する。

で計測しておいた PRP の量の 1/10 の量の **アクティベーターを滅菌シャーレ内の PRP に混和**

**し、PRP を活性化させる (=aPRP)。**

この際 PRP がゲル化している事が活性化の目安となる。

#### PRP と FGF-2 との混合

作成した PRP を各グループに投与するため 4 等分する。

1 グループ用の PRP につき FGF-2 製剤 30 µg を混和する。

#### 動物実験モデル

モデルとして糖尿病マウス (og マウス) を使用する。マウスの背部から直径 1.5cm の皮膚、脂肪を筋膜上で切除し、2 か所に皮膚潰瘍を作成する。1 つは PRP と FGF-2 の混合製剤を投与し、もう 1 つはコントロールとする (下図)。それぞれハイドロコロイド創傷被覆材で密閉閉鎖しその上からポリウレタン被覆材を貼付して固定する。術後は毎日創部の観察を行い、創傷治癒経過に差が生じるかどうか検討する。

#### 肉眼的観察

術後創傷治癒経過を毎日観察し、毎日スケールを用いてサイズを記録して Group - 間で潰瘍縮小の早さに差があるかどうかを検討する。

#### 病理組織学的検討

各グループにおいて術後 7 日目に潰瘍部を筋膜上で採取して、HE 染色を行い治癒経過の差異の有無を検討す

る。

さらに、術後 14 日目 (創治癒後) にも試験組織採取を行い、HE 染色を行い癒痕の成熟度の差異を検討する。

#### 免疫組織学的検討

術後 3 日目、6 日目、9 日目、12 日目に潰瘍部および治癒癒痕部を筋膜上で採取し、血管内皮細胞の免疫染色を行い、各グループ間での血管新生の程度の違いについて検討する。

#### サイトカイン放出量の検討

Single spin 法と double spin 法にて採取された PRP を活性化させた後、これを 1500rpm にて 5 分間遠心分離し、上清を採取し、この中に含まれる PDGF、TGF の量を ELISA 法にて測定して、二つの方法間で差があるかどうか検討する。

#### 4. 研究成果

##### 肉眼的観察

肉眼的観察において、上皮化完了期間では、グループ 1-4 すべて 8 日目に上皮化を得た。一方でコントロール群では、平均 9.2 日目であった。有意差は認めなかったが、ややグループ 1-4 において創傷治癒が早くなる傾向を認めた。1-4 グループ間では差は認めなかった。

##### 病理組織学的検討

病理組織学的検討においては、7 日目では上皮化完了有無についてグループ 1-4 とコントロールでわずかな差をみとめたが、14 日目では癒痕の状態に差を認めなかった。

##### 免疫組織学的検討

本検討では、各グループ間に差は認めなかった。さらに検討する予定である。

##### サイトカイン放出量の検討

Double spine 法と single spine 法では採取できる血小板数では差は認めなかった。今後サイトカイン量について検討予定である。

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は  
下線)

〔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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤精一 (SATO SEIICHI)  
大分大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：50457628

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：