

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462275

研究課題名(和文) 自己単核球を含む多血小板血漿ゲルを用いた半月板再生方法の開発

研究課題名(英文) Character of platelet rich fibrin and effect for meniscal healing

研究代表者

橋本 祐介 (Hashimoto, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10382178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：半月板修復促進のためのマテリアルとして、完全自己血由来フィブリンゲルの生成方法、成分分析、半月板欠損モデルを用いて、半月板再生修復促進を検討した。ラットにおいて迅速な心臓採血とメディフュージ遠心分離器を用いICGFモードで遠心したところ安定したPRFを生成可能であった。ヒト末梢血由来のPRFの成分分析では、様々なGrowth Factorを豊富に含んでいることが明らかになった。ラット半月欠損モデルではPRFの明らかな半月板修復促進効果は認められなかった一方、骨髓血移植では半月板修復促進がみられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to assess how to produce the Platelet Rich Fibrin (PRF) and characteristics and effectiveness for meniscal healing. PRF from rat and human was stably produced using medifuge and rapid aspiration. As measured by ELISA, levels of VEGF, IGF-1, TGF- β , bFGF, and SDF-1 were abundantly included in PRF derived from human peripheral blood. For healing model of rat meniscus, repaired tissue in PRF group was similar to control group and there seemed to be no effect to accelerate the meniscal healing. While, repaired tissue in bone marrow blood (BM) group had metachromasia in Immunostaining. This indicated that BM might be more suitable material for meniscal healing than PRF.

研究分野：半月板再生、スポーツ整形外科

キーワード：半月板再生 フィブリン 単核球

1. 研究開始当初の背景

膝半月は、荷重に対する力学分散としての役割を担う一方で、生物学的治癒能力の低さから、一旦受傷すると修復されないため、半月板はいったん損傷されるとADLの低下をもたらす。半月板修復には血流の関与が重要であると言われ、特に血行野での損傷は治癒する可能性が高いとされている。動物実験レベルでは成長因子や幹細胞の投与によって、比較的良好的な成績が報告されているが、ヒトへ臨床応用するには一期的で簡便な方法で、他分野ですでに臨床応用されているものとして、多血小板血漿ゲルに注目した。自己単核球を含む多血小板血漿ゲル(PRF: Plate Rich Fibrin) は、多血小板血漿 (PRP: Plate Rich Plasma) とは異なる条件で末梢血を遠心分離することにより、単核球と成長因子を豊富に含む血小板分画をゲル状にして抽出できる。同時に単核球も採取できる。単核球は組織に遊走されるとマクロファージと変化し、損傷初期に主に貪食作用によって、組織修復に重要な役割を担う。我々は以前の研究で半月板欠損モデルにおいて、マクロファージが早期に損傷部位に集積すること、それらはほぼ血流由来であることを証明した。以上から、組織修復に重要な単核球、サイトカインを豊富に含有する完全自己由来フィブリンゲルを半月板損傷部位に添加することで半月板損傷治癒促進が得られると考えた。

2. 研究の目的

多血小板血漿をフィブリン析出させることでゲル化するセカンドジェネレーションPRPと称されるPRFを使用し、フィブリン化工程の最適化、PRFの組織学的評価、組成、半月板欠損への移植による半月板再生促進効果の評価を行う。

3. 研究の方法

(1) PRF生成方法の検討[Rat]

使用動物は、GFP transgenic ラットを用いた。麻酔としてケタラール(50 mg/mL; 三共社製)とキシラジン (0.2 mg/mL; Bayer HealthCare

社製)を10:3の比で1 mL/kg 体重量で皮下注射を行い、末梢血管から血液を0.5 ccから1 cc採取、ガラス管に移し、遠心分離機を用いて遠心を行い、PRFの作成が可能か検討した。

(2) PRF成分検討[Human]

安定的にPRFを作成するため、ヒトから末梢血を採取後、それぞれをガラス試験管に接触させて遠心機にかけた。遠心分離機(商品名Medifuge® Silfradent社, Italy)を用いて、CGFモード(2700rpm 2min, 2400rpm 4min, 2700rpm 4min, 3000rpm 3min)で遠心した。得られたフィブリンゲルをPRFとした。それぞれの成分分析として、血液分画(WBC, RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC, PLT)、成長因子であるIGF-1, TGF- β 1, FGF-2, VEGF, SDF-1を測定した。これらは大阪市立大学医学部倫理審査委員会承認を得た(承認番号2064、3306)のちに患者の同意の下、行った。

(3) PRFの組織学的検討[Rat]

GFPラットから得られたPRFを蛍光顕微鏡(Nikon, SMZ1500)を用いて、GFP陽性細胞の有無を検討した。その後ホルマリン固定を行い、パラフィン切片にてH-E染色、トルイジンブルー染色を行った。また電子顕微鏡(SEM: Hitachi, S-4700)を用いてフィブリンと細胞を観察した。

(4) PRFを用いた半月板再生促進効果[Rat]

野生型(WT) Lewisラットを用いた。前述と同様の麻酔方法を施行後、両膝を関節切開、内側半月を展開し、内側側副靭帯レベルから前方部分を切除した。左膝にはPRFを埋植後閉創し、右膝はそのまま閉創した。4、8週で犠牲死させ、修復した半月組織を採取し、パラフィン切片にて、H-E染色、トルイジンブルー染色、抗ラットGFP抗体で免疫染色を行った。

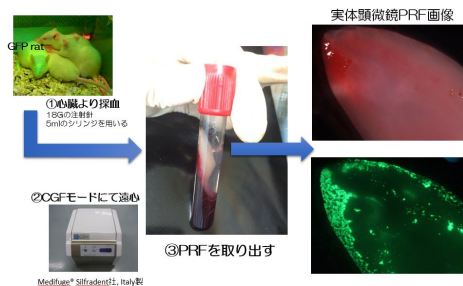
4. 研究成果

(1) PRF生成方法の確立[Rat]

下大静脈から21G針で採血を行い、3000rpm15分遠心を行ってもPRFは生成でき

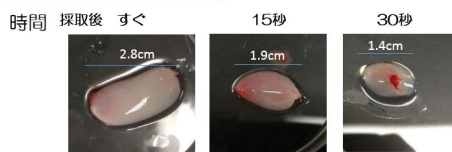
なかった。また採取量は平均 0.5 cc 程度であり少量であった。以上から採血時間が長くなっていることで凝固系がすでに働きフィブリン化が遠心前に起きている可能性、血液採取量が少ない、遠心方法の問題が挙げられた。Ohらの文献(Journal of Biomedical Nanotechnology; volume 9, Number 3 March 2013 pp.535-537(3))に基づき遠心分離機を変更し、Medifuge® Silfradent 社, Italy 製の遠心分離機を使用した。その設定は CGF モード (2700rpm 2min, 2400rpm 4min, 2700rpm 4min, 3000rpm 3min) であった。血液採取量増加、迅速な採血を行うために、胸郭縦切開を施行し、心臓から採取することで迅速に最大 2 cc の採血が可能となった。素早くガラス管に移し、遠心することで PRF を安定的に作成することができた【Fig.1】【Fig.2】。

Rat PRF 作製手順



【Fig.1】

PRFの形成と時間



【Fig.2】

(2) PRF 成分検討[Human]

末梢血採取の同意を得られた手術患者から末梢血を採取し、ガラス管に移し、上記の Medifuge® Silfradent 社, Italy 製の遠心機を用いて遠心した。得られた PRF にプラスミン溶液を添加させ溶解処理を行い、株式会社 SRLにて血液分画(WBC, RBC, Hb, Ht MCV, MCH,

MCHC, PLT) と ELISA 法によりサイトカインの IGF-1, TGF-β1, FGF-β, VEGF, SDF-1α を測定した。また、SDF-1 は ELISA kit(R&D systems)を用いて測定した【Table 1】【Table 2】。

Results of each concentration.		
peripheral blood (n=3)		
variable	Whole blood	PRF
IGF-1	93.7 (±38.4)	140.0 (±51.1)
TGF-β	22.3 (±7.5)	130.1 (±76.9)
bFGF	44.0 (±9.6)	150.7 (±50.6)
VEGF	417.7 (±295.6)	910.7 (±16.5)
SDF-1	416.3 (±22.0)	420 (±108.7)

Data are presented as mean (±s.d.).

【Table 1】

Hematological results		
variable	Whole blood	PRF
WBC (/ul)	7120 (±1542)	333 (±153)
RBC (10 ⁴ /ul)	460 (±35.3)	1.3 (±0.6)
Hb (g/dL)	14.38 (±1.0)	0.0 (±0.1)
Ht (%)	41.16 (±3.1)	0.0 (±0.0)
MCV (fl)	89.58 (±4.1)	27.5 (±0.9)
MCH (pg)	31.28 (±1.4)	76.6 (±72.8)
MCHC (%)	34.92 (±0.4)	68.5 (±29.1)
PLT (10 ⁴ /ul)	7.66 (±1.8)	1.7 (±1.0)
ST (%)	0.4 (±0.2)	0.0 (±0.0)
SEG (%)	65.6 (±6.6)	38.4 (±16.4)
EO (%)	2.8 (±1.3)	0.8 (±1.2)
BA (%)	0.3 (±0.4)	0.4 (±0.8)
MO (%)	4.2 (±1.0)	8.6 (±2.7)
LY (%)	32.7 (±15.9)	51.6 (±16.0)

Data are presented as mean (±s.d.).

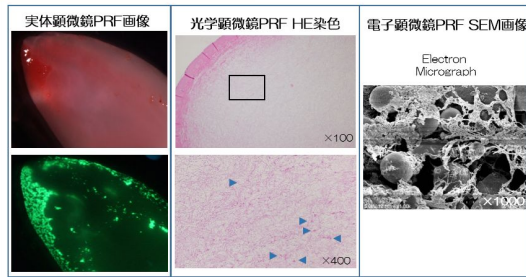
【Table 2】

(3) PRF の組織学的検討[Rat][Human]

得られた GFP ラット由来 PRF を蛍光顕微鏡で観察すると GFP 陽性細胞が散在しており、単球などの白血球由来細胞と考えられる細胞が存在することが分かった。

H-E 染色では赤色のフィブリンの間に単核の細胞が多数認められた。電子顕微鏡ではフィブリンの間に細胞がトラップされている様子が観察された【Fig.3】。

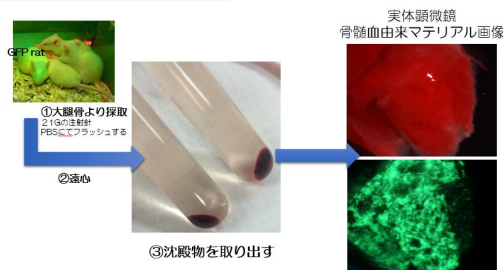
PRFの組織学的検討



【Fig.3】

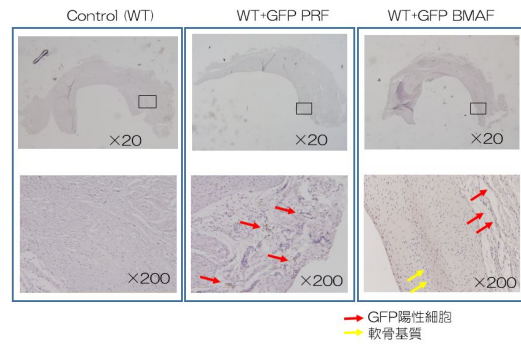
(4) PRF を用いた半月板再生促進効果[Rat]
PRF 埋植群の 4、8 週の H-E 染色、トルイジンブルー染色では軟骨基質を示す異染性はなく、コントロールと変わらなかった。また GFP 染色では GFP 陽性細胞はほとんどなく、PRF 内の細胞が再生部分に生着することは確認できなかった。以上から、PRF そのものの埋植では半月板部分の再生を促進するとは言えなかった。そこで、骨髓血からもフィブリン製剤が得られることから骨髓血移植を追加した。ラットの骨髓は非常に小さいため、大腿骨、脛骨の骨幹部を採取し、21G 針を用いて生理食塩水でフラッシュし、骨髓血を採取、遠心分離機を用いて遠心し、骨髓部分を移植した【Fig.4】。骨髓移植群の 6 週での GFP 免疫染色組織では軟骨基質を示す異染性が一部見られた【Fig.5】。

Rat 骨髓血採取手順



【Fig.4】

組織 (Rat半月 6w GFP免疫染色)



【Fig.5】

本研究によって

- 1) PRF 生成方法は Medifuge® Silfradent 社, Italy 製の遠心分離器を用いることで安定した PRF を生成することができた。
- 2) ヒトから得られた PRF の成分は IGF-1, TGF-β1, FGF-β, VEGF, SDF-1α であり、特に TGF-β1, FGF-β, VEGF では高値を示した。
- 3) PRF の組織像はフィブリンネットワーク内に多数の単核細胞が存在することが確認できた。
- 4) PRF による半月板再生促進効果ははっきり証明ができなかった。その理由にサイトカイン量が半月板再生促進の濃度と合っていないこと、PRF のフィブリンの硬さが固すぎることなどが挙げられた。一方で、GFP 免疫染色から骨髓移植群で半月板再生促進効果が一部見られたことから、末梢由来より、骨髓血由来マテリアルのほうが半月再生修復にたいして有利である可能性が示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Junsei Takigami, Yusuke Hashimoto, Tomohiro Tomihara, Shinya Yamasaki, Predictive factors for osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle. KSSTA:Knee Surgery, Sports. 2017 10.1007/s00167-017-4451-8 (査読あり)
Shinya Yamasaki, Yusuke Hashimoto, Junsei Takigami, Hiroaki Nakamura. Risk Factors Associated With Knee Joint Degeneration After Arthroscopic Reshaping

for Juvenile Discoid Lateral Meniscus. The American Journal of Sports Medicine 2016 Mar;45(3):570-577. (査読あり)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Terai S, Takigami J, Nakamura H. Proposed Referential Index to Resect Femoroacetabular Cam-Type Impingement during Arthroscopy using a Cadaveric Hip Model. Arthroscopy. 2015;31:1069-76. (査読あり)

Takigami J, Hashimoto Y, Shinya Y, Terai S, Nakamura H. Direct bone-to-bone integration between recombinant human bone morphogenetic protein 2-injected tendon graft and tunnel wall and regeneration of enthesis in a one-stage anterior cruciate ligament reconstruction model. Int Orthop. 2015;39:1441-7 (査読あり)

Tomihara T, Hashimoto Y, Taniuchi M, Shimada N. Relationship between femoral tunnel location and graft bending angle in outside-in and transportal technique for ACL double bundle reconstruction in 3D-CT study. Arch Orthop Trauma Surg. 2015 135(6):839-46 (査読あり)

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamamura K, Nakamura S, Nakamura H. Posterior reference guides do not always maintain the size of posterior femoral condyles in TKA. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2015 in press (査読あり)

Minoda Y, Nakagawa S, Sugama R, Ikawa T, Hirakawa M, Nakamura H. Decreased extension gap and valgus alignment after implantation of total knee prosthesis in primary varus knees. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2015 In press (査読あり)

Minoda Y, Nakagawa S, Sugama R, Ikawa T, Noguchi T, Hirakawa M. Midflexion laxity after implantation was influenced by the joint gap balance before implantation in TKA. Journal of Arthroplasty. 2015;30:762-5. (査読あり)

Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Mizokawa S, Itokazu M, Nakamura H. Mobile-bearing prosthesis and intraoperative gap balancing are not predictors of superior knee flexion: a prospective randomized study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2015;23:1986-92. (査読あり)

Takigami J, Hashimoto Y, Yamasaki S, Terai S, Nakamura H. A case of asymptomatic bilateral massive pulmonary embolism after arthroscopic multiple knee ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc In press 2014. (査読あり)

Yamasaki S, Hashimoto Y, Takigami J,

Terai S, Wakitani S and Nakamura H. Circulating nucleated peripheral blood cells contribute to early-phase meniscal healing. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2014 In press. (査読あり)

Shinya Yamasaki, Hisashi Mera, Maki Itokazu, Hashimoto Y and Shigeyuki Wakitani. Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies. Cartilage 2014 1-7 (査読あり)

H. Mera, J. Takigami, Y. Hashimoto, N. Endo, and S. Wakitani. Potential for Tumorigenesis and Repair of Osteochondral Defects by iPS Cell Transplantation in Rat. 2014 American Journal of Tissue Engineering and Stem Cell 1 (1). 39- 50 (査読あり)

Minoda Y, Yoshida T, Ikebuchi M, Nakamura H. Detection of Small Periprosthetic Bone Defects after Total Knee Arthroplasty. J Arthroplasty. in press 2014 (査読あり)

Minoda Y, Nakagawa S, Sugama R, Ikawa T, Noguchi T, Hirakawa M, Nakamura H. Intraoperative assessment of midflexion laxity in total knee prosthesis. Knee. 2014;21:810-4. (査読あり)

Minoda Y, Mizokawa S, Tokuhara Y, Kadoya Y. Joint gap measurement in total knee arthroplasty using a tensor device with the same articulating surface as the prosthesis. Matsui Y, Nakagawa S, Arch Orthop Trauma Surg. 2014;134:699-705. (査読あり)

[学会発表](計8件)

Shozaburo Terai, Yusuke Hashimoto, Shinya Yamasaki, Takanori Teraoka, Yohei Nishida, Hiroaki Distribution of Macrophages and α -Smooth Muscle Actin+ Cells during Meniscal Healing in Rat Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2016 .2016.3.5 Orlando, Florida

Yusuke Hashimoto, Shinya Yamasaki , Junsei Takigami, Deeper and Higher Position of PL Bundle was Greater Length Change than Shallower and Lower Position in Double Bundle ACL Reconstruction. The 17th ESSKA Congress 2015.6 Barcelona, Spain

Minoda Y, Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamamura K, Nakamura S, Nakamura H. Assymmetric Tibial Component Reduced The Risk Of Malrotation In TKA Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03. Las

Vegas, NV, USA.

Minoda Y., Kondo Y, Kadoya Y, Kobayashi A, Nakagawa S, Hirakawa M, Noguchi T, Higuma Y. Joint Gap At 120° In Flexion Is A Predictor Of Postoperative Flexion Angle After TKA. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2015.03. Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y., Mizokawa S, Ohta Y, Ikebuchi M, Itokazu M, Yamaura K, Nakamura S, Nakamura H. Assymetric Tibial Component Reduced The Risk Of Malrotation In TKA

61st Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) 2015.03. Las Vegas, NV, USA.

Minoda Y., Hata K, Mizokawa S, Ohta Y, Itokazu M, Yamamura K, Nakamura H. Sequentially Annealed Highly Cross-linked Polyethylene Reduced In Vivo Wear Particle Generation In TKA. 60th Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) 2014.03. New Orleans, LA

Yamasaki S., Hashimoto Y., Nakamura H. Contribution of Circulation Cells to Meniscus Healing in Early Phase. 60th Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) 2014.03. New Orleans, LA

Yusuke Hashimoto., Shinya Yamasaki, Junsei Takigami, Shouzaburo Terai, Kunikazu Kaneda, Tomohiro Tomihara, Hiroaki Nakamura. Occurrence of Osteochondritis dissecans after surgery is different for resection pattern with complete discoid lateral meniscus in juvenile knees. The 16th ESSKA Congress. 2014.5 Amsterdam

〔図書〕（計6件）

橋本祐介 外側円板状半月に対する鏡視下手術 関節外科 36 巻 157-167 2017

橋本祐介 スポーツ復帰のための手術 円板状半月板損傷に対する形成・縫合術 OS NEXUS No5 88-97 2016

橋本祐介 外側円板状半月板損傷に対する形成術と縫合術 Monthly Orthopaedics 29(5) 53-62 2016

橋本祐介 スポーツ選手にみられる膝痛の対処法 - 半月板損傷 - Monthly Orthopaedics 29(3) 13-21 2016

橋本祐介 円板状半月板損傷に対する形成・縫合術の適応と術後スポーツ復帰 臨床スポーツ医学 31 巻 12 号 2014

橋本祐介 股関節鏡視下手術を行う上で必要な解剖学的知識 関節外科 33 巻 2 号 20-25 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本祐介 (HASHIMOTO, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 10382178

(2)研究分担者

箕田 行秀 (MINODA, Yukihide)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 90453133

(3)脇谷滋之 (WAKITANI, Shigeyuki)

武庫川女子大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号 : 70243243

(4)研究協力者

折田(荻) 久美 (ORITA, Kumi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員

員

研究者番号 : 40748597