

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592083
 研究課題名（和文）慢性虚血肢潰瘍に対する末梢血および骨髄由来多血小板血漿の治療効果
 研究課題名（英文）Efficacy of bone marrow aspirate derived platelet rich plasma for treating ulcers on chronic ischemic limb.
 研究代表者 西本 聡 (NISHIMOTO SOH)
 兵庫医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：30281124

研究成果の概要：

ウサギの慢性虚血肢モデルを用いて皮膚欠損創を作成し、末梢血および骨髄液を濃縮した多血小板血漿（PRP）を注射し、生理食塩水との効果の違いを実験的に観察した。末梢血 PRP では生理食塩水との差がなかったが、骨髄 PRP では有意に創傷治癒の促進が観察された。骨髄 PRP では骨髄細胞が移植され、あるものは生着し、持続的に成長因子を放出することにより、創傷治癒を促進するのではないかと推察できる。骨髄 PRP は安価で簡単に作成でき、虚血肢における潰瘍治療に役立つと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 2008 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：(1) 骨髄液 (2) 骨髄細 (3) 血小板
 (4) 再生医療 (5) 慢性虚血肢 (6) 皮膚潰瘍
 (7) 多血小板血漿

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では人口の高齢化が進みはじめ、また生活の欧米化、飽食化に伴い生活習慣病患者が増加の一途をたどっている。これに伴い動脈閉塞による血流障害を原因とする疾患、そのうち末梢血流障害を原因とする慢性創傷が増加している。また糖尿病患者の増加とともに糖尿病性潰瘍も増加してきている。これらの創傷は比較的小さなものからはじまることが多く、患者も、医療者も軽視しがちであるが、創傷治

癒能力が低いとためきわめて難治であり、慢性に経過する。そのため結局は医療費が高くなってしまふ。患者自身にとっては歩行が困難となり日常生活に大きな障害となる。これらの難治性潰瘍を治癒させるにはもちろん原因である動脈閉塞や、糖尿病の治療が第一であるが、血行再建のための麻酔や外科手術は侵襲が大きく全身状態や末梢血行があまりにも悪条件で行なえないことも多い。最近行われ始めた骨髄単核球移植による虚血肢に対する血管新生療法では骨髄液を 500ml 程度採取するため全身麻酔で行

なうことが前提となりこのことで除外される患者が少なくない。末梢血中の単核球を分離する方法もあるが、CD34 陽性細胞にして骨髓液の 500 分の1以下しか含まれず、効率が悪い。これを補うために granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)を投与し採血前に白血球量を上昇させる方法もあるが、血液の粘性が上昇するなどのため末梢血管の血栓が生じる危険度が上昇する。もともと末梢血管障害のある症例が対象であるため適応が難しい。虚血肢に生じた潰瘍に日常遭遇する機会が多いが、なかなか良い治療法がないのが実情である。

2. 研究の目的

慢性虚血状態における創傷治癒を再現した実験研究は多くない。我々はウサギの大腿動脈を摘出することにより後肢を慢性虚血状態にし、人工的に皮膚欠損層を作成するとその収縮治癒までにかかる時間が延長することを確認している。患者本人から末梢血を採取し、これを遠心分離することにより血小板を濃縮したものが PRP である。またこの PRP を分離するのと同じ手法で骨髓液を濃縮すると骨髓液中の血小板のみならず骨髓細胞も同時に濃縮できることがわかった。本研究においては動物実験により虚血のため創傷治癒能力の低下した皮膚欠損層に与える PRP および骨髓 PRP の効果を明らかにする。

3. 研究の方法

ウサギ慢性虚血肢の作成

日本白色家兎にペントバルビタール(30mg/kg)を耳介の静脈より投与し、十分に麻酔の効いたことを確認する。Pu らの報告した方法に準じて慢性虚血肢の作成を行なった。大腿長軸に沿って鼠径靭帯から膝蓋骨付近までの皮膚切開を加え大腿動脈を露出した。下腹壁動脈、浅腹壁動脈、外側回旋動脈、深大腿動脈、外側大腿動脈を全て結紮切離した。外腸骨動脈から膝窩、伏在動脈分岐までの大腿動脈を結紮、摘出した。これにより後肢は内腸骨動脈からの側副血行のみで栄養されることとなり虚血状態となる。皮膚を 3-0 ナイロン糸で縫合した。



摘出した大腿動脈

PRP, 骨髓 PRP の作成

3 週間後、再びペントバルビタール麻酔下をかけ耳介の動脈から末梢血 2ml を CPD(citrate-dextrose)液 1ml の入った注射

器に採取した。また健側大腿骨を穿刺し骨髓液 2ml を採取する。末梢血、骨髓液とも自動血球計算機にて血小板数および白血球、骨髓細胞数を測定した後、40g 20 分間および 200 g 10 分間の 2 回遠心分離にて PRP(pb-PRP)および骨髓 PRP(bm-PRP)それぞれ 0.2ml を得た。

皮膚欠損創の作成

虚血肢下腿に 2x2cm の全層皮膚欠損創を作成した。

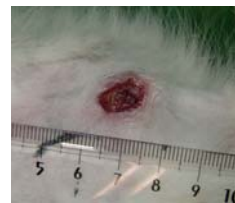


PRP の投与

無作為に 3 グループに分け皮膚欠損創の創床に各々、生理食塩水、PRP、骨髓 PRP を 0.2ml ずつ注射した。

観察、評価

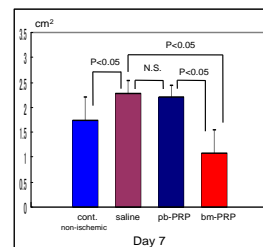
経時的に創部にデジタルカメラにて写真撮影を行い、コンピューター上にて画像処理し、創の収縮、上皮化の度合いを解析した。



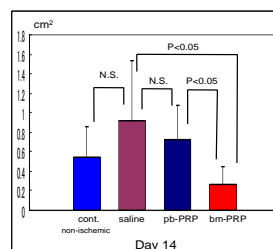
移植細胞のトレーシング

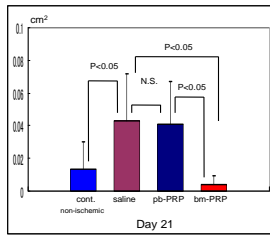
pb-PRP および bm-PRP を分離した後、その細胞成分を蛍光色素 DiI にて標識した後、創床に注射し、経時的に組織を採取し、蛍光顕微鏡下に観察した。

4. 研究成果

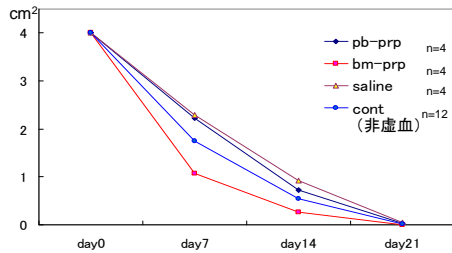


皮膚欠損面積の比較
Mann-Whitneyのu-検定

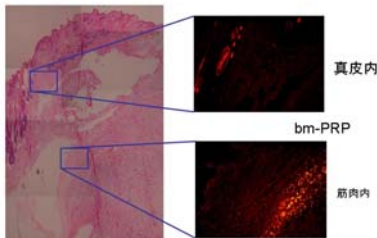




虚血のないコントロール群と虚血肢に生食投与群では7日目、21日目では有意差があった。生食投与群と pb-PRP 投与群では有意差を認めなかった。これに対し bm-PRP 投与群では、全てのタイムポイントにおいて生食投与、pb-PRP に対して有意差をもって皮膚欠損面積が小さくなっていった。



皮膚欠損面積の変化(平均値)



bm-PRP 移植後 4 週

PRP の細胞成分を蛍光色素 DiI で染色して注射後、4 週では pb-PRP では創底部に蛍光を認めたがあまり強くなかった。一方、bm-PRP では真皮内、創底部の筋層内に蛍光を認め、細胞の生存が確認された。

考察

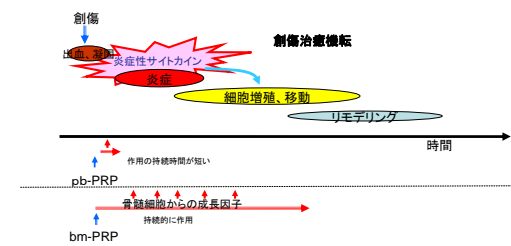
本実験においては慢性虚血肢における創傷治癒遅延に対して、残念ながら末梢血 PRP 投与は効果がなく、骨髄由来の PRP 投与では創傷治癒促進効果があった。

ただし本実験は虚血肢における新鮮皮膚欠損状態の創傷治癒を観察したものであり、ま

た、患肢が虚血におかれた時間が数週間程度と短いことが臨床とは異っている。

キズができるとさまざまな炎症性サイトカインが創部に分泌され、創傷治癒機転がはじまる。本実験のように創傷治癒のごく初期に 1 回投与での末梢血 PRP による成長因子の供給による影響はもともと創傷から分泌されるサイトカインの効果にマスクされ、また持続時間が短いのではないかと推察した。

これに対して骨髄 PRP では骨髄細胞が移植され、あるものは生着し、持続的に成長因子を放出することにより、創傷治癒を促進するのではないかと推察できる。



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には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西本 聡 ほか 多血小板血漿 (PRP) の純度による効果の差 第 38 回日本創傷治癒学会 平成 20 年 12 月 5 日 東京
- ② 西本 聡 ほか 慢性虚血肢における創傷治癒に対する末梢血および骨髄由来多血小板血漿 (PRP) の効果 第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会 平成 20 年 10 月 3 日 東京
- ③ Nishimoto, S. ほか Alveolar bone generation with an in situ tissue engineering technique. 53rd Annual Meeting The Plastic Surgery Research Council 平成 20 年 5 月 30 日 Springfield, U.S.A.
- ④ 西本 聡 ほか 慢性虚血肢における創傷治癒遅延に対する末梢血および骨髄液由来多血小板血漿 (PRP) の効果 第 14 回ケロイド肥厚性癬痕研究会 平成 20 年 3 月 8 日 東京
- ⑤ 西本 聡 ほか 慢性虚血肢の創傷治癒遅延に対する末梢血および骨髄液由来多血小板血漿の効果 第 37 回日本創傷治癒学会 平成 19 年 12 月 6 日 横浜

[図書] (計 1 件)

西本聡ほか メディカルレビュー社 第14回ケロイド肥厚性癬痕研究会記録集 pp42-47 2009年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 聡

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 30281124

(2) 研究分担者

垣淵, 正男

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号： 50252664

河合建一郎

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号： 80423177

福田健児

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号： 70351814

妻野知子

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号： 90449877

(3) 連携研究者