

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18525

研究課題名(和文) 選択的自己多血小板血漿の関節内注射による変形性関節症疼痛緩和機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of the evidence of selective platelet-rich plasma for joint pain

研究代表者

宮武 和正 (Miyatake, Kazumasa)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：00777435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己多血小板血漿 (PRP) は血小板に含まれる様々な anabolic factor を血液から分離することで得られる。その効果としては細胞増殖、組織修復、抗炎症作用など様々な効果が報告され、膝関節症の分野においても、疼痛緩和目的で使用されている。しかし臨床的に一定の効果が認められている一方で、基礎的な分野における機序の解明は未だ多くが不明である。そこで我々はラット関節症モデルを作成し白血球の濃度によって分類した3種類のPRPの関節内注射を行い、疼痛緩和メカニズムを検討した。PRP投与後組織学的に関節炎の改善効果を認めており、PRPの抗炎症作用、CGRP抑制効果による鎮痛効果が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRP注射が、組織損傷の低減だけでなく疼痛改善効果を有していることは確認されているが、その作用機序は未だ不明であった。本研究はその作用機序の解析を目的としており、これまでの他の研究と全く関連を有しない。多くの膝関節の痛みに悩む患者に効果的な保存治療を行うことができず最終的に人工膝関節全置換術を選択せざるを得ない状況は、2003年に年間4万件であった手術件数が10年間で2倍になっている現状を生み出している。本研究の結果は、現在保険適応にない自己PRPの関節内投与による膝OAの疼痛抑制治療の認可につながる可能性があり、新たな膝OAの保存治療の確立に貢献できる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Several clinical trials in osteoarthritis (OA) have concluded that platelet rich plasma (PRP) injections have a beneficial effect on OA symptoms because of its availability and safety. Despite the increasing use of PRP, the mechanism of PRP to relieve joint pain remains still unknown. In this study, we investigated the effects on synovitis and joint pain in rat arthritis model. The proportion of weight of the PRP injected side significantly increased, which represent relief of joint pain. Histologically, inhibition of inflammatory cells into the synovial tissue and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in infrapatellar fat pad and was significantly observed on PRP injected sides, which was obvious by pure-PRP among three PRPs. In rat arthritis model, we proved that PRP injections reduced knee pain by regulating synovial inflammation and inhibition of CGRP.

研究分野：整形外科

キーワード：疼痛の非薬物治療 自己多血小板血漿 変形性関節症 動物モデル 滑膜炎 CGRP 軟骨変性

1. 研究開始当初の背景

軟骨の退行変性を主体とする変形性膝関節症の最大の愁訴は疼痛であり、従来の膝関節症の保存治療では、運動療法、消炎鎮痛剤の内服に加えて、ヒアルロン酸の関節内注射による消炎鎮痛が主として行われている。しかしながらこれらはすべて対症療法であるため、関節軟骨の退行変性や疼痛の発症の原因を根本的に取り除くものとはなっていない。さらに一部の患者においては、これらにより必ずしも十分な疼痛抑制効果を得られないことが、現状における保存治療の課題となっている。さらに2009年に発表された統計(ROAD study)では、わが国における40歳以上の2500万人以上がレントゲンで膝関節症を指摘されており、高齢化に伴いこの数は年々増加していくと考えられる。膝OAの悪化はADLを低下させ要介護者を増やす結果に繋がることから、膝関節症に伴う疼痛発症と増悪の機序の解明とそれに基づいた、より効果的な保存療法(疼痛のコントロール法)の確立が我々整形外科に関わるものにとって性急かつ重要な課題である。

自己多血小板血漿(PRP)は血小板に含まれる様々なanabolic factorを血液から分離することで得られる。一般のクリニックでも遠心機さえあれば施行できるほど簡便であることが最大の利点である。また自己血漿のみしか使用しないことから安全であり、倫理的な問題点もないことも知られている。その効果としてはPRP自身がgrowth factorのカクテルであるため細胞増殖、組織修復、抗炎症作用など様々な効果が報告されている。その利点と効用から既に整形外科では臨床で使用されてきており、米大リーグに在籍している大谷翔平選手がPRP療法を併用し、打者としてシーズン中に復帰を果たしたことは記憶に新しい。そして以前から膝関節症の分野においても、現在多く日本で施行されているヒアルロン酸の関節内注射よりも疼痛改善やADLの改善につながる事が報告されている。しかし臨床的に一定の効果が認められている一方で、基礎的な分野における詳細な機序の解明は未だ不明なままである。その原因としては先ほど利点であると述べた簡便さがゆえに、臨床応用がされてしまい基礎的なメカニズムの解明が遅れてしまっていることがあげられる。さらに、基礎的解明をさらに複雑にしている原因は現在国内で利用可能なPRP精製キットが様々であるがゆえに一言でPRPといっても実際には内容に違いがある点である。PRPは現在白血球の含まれる割合によって大きく3つに分類されており(pure-PRP, leukocyte poor(LP)-PRP, leukocyte rich(LR)-PRP)、白血球濃度が多いほど異化作用が強いとされている。ただ、どのPRPが関節症にとって最適なのかは臨床的にもいまだ不明であり、その検討が必要である。

2. 研究の目的

我々の教室で確立した、ラット膝関節内へのモノヨード酢酸(MIA)の注射により惹起される関節炎症モデルを用いた。このラット膝関節炎症モデルは、膝滑膜炎と疼痛回避行動とともに、膝領域を支配すると考えられる第4腰椎後根神経節(L4DRG)におけるCGRP(Calcitonin gene-related peptide)陽性の神経線維の増加が観察されることを確認しているモデルである。このモデルを使用して、PRPによる疼痛抑制のメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Wistar Rat(雄、12週齢)から心臓採血により約10ccの全血を採取し、Ycellbio PRP tube(Ycellbio社、韓国)を用いて遠心した。Buffy-coat上方を採取してpure-PRPを分離、buffy-coat下方を採取してLP-PRP及びLR-PRPを分離した。マイナス80で24時間凍結後、37で1時間静置し活性化させた。完成したPRPは使用時までマイナス80で凍結保存した。

続いて、Wistar rat(雄、12週齢)の両膝にモノヨード酢酸(MIA) 1mgを関節内注射し、関節炎モデルを作成した。MIA投与翌日に、右膝に各PRP 30 μ l、左膝にはコントロールとしてリン酸化緩衝液(PBS)を30 μ l投与した。

疼痛行動評価として、Incapacitance tester により後肢荷重量測定を 14 日目まで行った。このテストは、疼痛によると考えられる後肢の荷重量減少を計測することで、疼痛軽減効果を判定するものであり、関節炎所見と後肢荷重量が相関することを過去に我々は示してきた。今回、MIA 投与前(0 日目)を基準として、PRP 投与側の荷重割合の増減を各群で比較した。

組織評価は 5 日目、14 日目に行い、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)で滑膜所見を、サフラニン 0 染色で軟骨所見を評価した。半定量的評価として、滑膜と膝蓋下脂肪体 (IFP) 所見は Infrapatellar fat pad inflammation score (IFP score, 正常 0 点-最高 6 点)、軟骨所見は Osteoarthritis association research society international score (OARSI score, 正常 0 点、最高 24 点)を用いて評価した。免疫組織学染色では OA 滑膜や IFP に出現し、痛みと滑膜炎に相関すると報告されている、カルシトニン関連ペプチド(CGRP)染色にて滑膜、IFP 内の CGRP 陽性神経線維を染色した。また、 α -smooth muscle actin(α -SMA)にて同部における血管新生について評価した。それぞれ、単位面積(mm²)あたりの CGRP 陽性神経線維数または α -SMA 陽性細胞数を ZEISS 社の AxioVision を用いて算出し、比較検討した。

組織学的評価において、左膝(PBS)をコントロールとして比較検定した。多群比較検定として Tukey HSD 検定を用いた。後肢荷重割合の群内変動(0 日目との比較検定)は paired-T 検定を用いた。P <0.05 を有意水準とした。

4 . 研究成果

~ PRP の調整 ~

各 PRP の血小板濃度は全血の 3.7 倍前後で調整した。白血球濃度はこれまでの報告に従い、pure-PRP では検出感度以下、LP-PRP では全血濃度未満、LR-PRP では全血濃度以上に調整した。

~ 疼痛関連行動の解析 ~

Incapacitance tester による後肢荷重量測定解析では、3 群ともに PRP 投与 14 日目までのすべての測定点で PRP 投与側の後肢荷重割合が 0 日目より高かった。荷重割合の増加量は pure 群では 7 日目まで増加したのに対し、LP 群では 2 日目、LR 群では 3 日目が増加量のピークだった。3 群間で比較すると 10 日目を除いたすべての測定点で pure 群が LR 群より有意に PRP 投与側の荷重割合が増加していた。

~ 組織学的所見による滑膜炎、軟骨変性の解析 ~

組織学的には、滑膜や IFP の炎症像を評価する HE 染色において、PRP 投与 5 日目では control 群に比べ PRP 投与膝では滑膜肥厚が軽度であった。投与 14 日目においては全群でそれぞれ IFP の線維化が進行したが、pure 群のみ IFP 内の脂肪組織が残存していた。半定量的に解析した IFP score においては PRP 投与 5 日目では pure 群が control 群及び LR 群より有意に低かった。一方投与 14 日目になると LP,LR 群共に control 群よりも低値であったが、pure 群のみ control 群より有意に低かった。

軟骨基質を評価するサフラニン 0 染色では、PRP 投与 5 日目では control 群、LR 群では pure 群及び LP 群より軟骨基質の染色性が低下した。一方、投与 14 日目は全群で軟骨変性が 5 日目より進行してしましたが、pure 群のみ脛骨側軟骨基質の染色性が保たれた。軟骨変性を半定量的に評価する OARSI score をつけると、PRP 投与 5 日目では各群間に有意差はなく、14 日目で pure 群でのみ control 群より有意にスコアが低値となった。

~ CGRP、 α -SMA の免疫組織染色による解析 ~

では、PRP 投与 5 日目は CGRP、 α -SMA とともに pure 群で control 群より発現が有意に抑制されていた。一方投与 14 日目になると、pure 群は 5 日目と同様に他 3 群と比較して有意に CGRP の発現が抑制されていたのに対し、 α -SMA 発現は各群間の有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Hirao Masanobu, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 30
2. 論文標題 Portable imageless navigation system and surgeon's estimate for accurate evaluation of acetabular cup orientation during total hip arthroplasty in supine position	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology	6. 最初と最後の頁 707 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00590-020-02625-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Hirao Masanobu, Yoshii Toshitaka, Kawabata Shigenori, Okawa Atsushi	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Does surgical body position influence the risk for neurovascular injury in total hip arthroplasty? A magnetic resonance imaging study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 102817 ~ 102817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2021.102817	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Hirao Masanobu, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Incidence of tensor fascia lata muscle atrophy after using the modified Watson-Jones anterolateral approach in total hip arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00590-020-02806-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araya Naoko, Miyatake Kazumasa, Tsuji Kunikazu, Katagiri Hiroki, Nakagawa Yusuke, Hoshino Takashi, Onuma Hiroaki, An Saisei, Nishio Hirofumi, Saita Yoshitomo, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Intra-articular Injection of Pure Platelet-Rich Plasma Is the Most Effective Treatment for Joint Pain by Modulating Synovial Inflammation and Calcitonin Gene-Related Peptide Expression in a Rat Arthritis Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 2004 ~ 2012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546520924011	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Horie Masafumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Validity of intraoperative observation of graft length change pattern for medial patellofemoral ligament reconstruction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jor.2020.03.007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki Yoshie, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Investigation of association between the preoperative intra-articular anesthetic test and persistent pain after total knee arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.01.013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onuma Hiroaki, Tsuji Kunikazu, Hoshino Takashi, Inomata Kei, Udo Mio, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Fibrotic changes in the infrapatellar fat pad induce new vessel formation and sensory nerve fiber endings that associate prolonged pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24580	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amemiya Masaki, Tsuji Kunikazu, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Nakagawa Yusuke, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 523
2. 論文標題 Synovial fluid-derived mesenchymal cells have non-inferior chondrogenic potential and can be utilized for regenerative therapy as substitute for synovium-derived cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 465 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.068	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Nakagawa Yusuke, Otabe Koji, Ohara Toshiyuki, Shioda Mikio, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 The effect of a longitudinal tear of the medial meniscus on medial meniscal extrusion in anterior cruciate ligament injury patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Knee	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.knee.2019.07.019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Ryohei, Jinno Tetsuya, Miyatake Kazumasa, Hirao Masanobu, Yagishita Kazuyoshi, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi	4. 巻 105
2. 論文標題 Supine versus lateral position for accurate positioning of acetabular cup in total hip arthroplasty using the modified Watson-Jones approach: A randomized single-blind controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research	6. 最初と最後の頁 915 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2019.05.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Naoko Araya, Kazumasa Miyatake, Kunikazu Tuji, Takashi Hoshino, Hiroak Onuma, Saisei An, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2. 発表標題 Pure platelet-rich plasma is most effective for the treatment of arthritis.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumasa Kawata, Hiroki Katagiri, Kunikazu Tsuji, Kazumasa Miyatake, Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2. 発表標題 The enhancement of mesenchymal stem cells and chondrocytes proliferation by exosomes derived from human synovial mesenchymal stem cells
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Naoko Araya, Kazumasa, Miyatake, Kunikazu Tsuji, Hiroaki Onuma, Saisei An, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2 . 発表標題 Pure Platelet-rich Plasma Is Most Effective For The Treatment Of Arthritis.
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Aritoshi Yoshihara, Hiroki Katagiri, Yusuke Nakagawa, Kazumasa Miyatake, Tomomasa Nakamura, Kunikazu Tsuji, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2 . 発表標題 Synovial superficial cells proliferate toward deeper layer in a rat monoiodoacetic acid-induced arthritis model.
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Masaaki Isono, Kunikazu Tsuji, Yusuke Nakagawa, Hiroki Katagiri, Kazumasa Miyatake, Ichiro Sekiya, Atsushi Okawa, Hideyuki Koga.
2 . 発表標題 Hyaluronic acid/CD44 signal axis plays important roles during the formation and in the maintenance of mesenchymal stem cell (MSC) antigen-positive cells in vitro.
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kazumasa Kawata, Hiroki Katagiri, Kunikazu Tsuji, Kazumasa Miyatake, Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2 . 発表標題 Exosomes derived from mesenchymal stem cells regenerate meniscus and enhance endogenous cells proliferation and migration.
3 . 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 Guo Tang, Kunikazu Tsuji, Keiichiro Komori, Yusuke Nakagawa, Hiroki Katagiri, Kazumasa Miyatake, Ichiro Sekiya, Yoshinori Asou, Atsushi Okawa, Hideyuki Koga.
2. 発表標題 IL-1 Enhances The Proliferation fo Human Synovial Mesenchymal Stem Cells By Extending The Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2(erk1/2).
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷尚子, 宮武和正, 辻邦和, 星野傑, 小沼博明, 中川裕介, 片桐洋樹, 関矢一郎, 大川淳, 古賀英之.
2. 発表標題 ラット膝関節炎モデルに対する多血小板血漿(PRP) 療法はpure PRP が最も有効である.
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮武和正, 新谷尚子, 関矢一郎, 古賀英之.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 8
3. 書名 【整形外科領域のPRP 治療:どこまで明らかになったのか】(Part2)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関