

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462278

研究課題名(和文) 高分子ヒアルロン酸と高濃度血小板血漿を併用した腱附着部症の治療

研究課題名(英文) A combined therapy with PRP and hyaluronan for tendinopathy

研究代表者

吉田 衛 (Yoshida, Mamoru)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10266702

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)：本研究では、血小板濃度50-100万/micro Lの自己多血小板血漿を、腱附着部症に注入した結果、疼痛誘発分子の発現が低下し、疼痛が消失し、自発運動量が増加し、組織と遺伝子発現レベルで腱の修復が促進され、細胞アポトーシスが抑制され、酸化ストレスが軽減した事が明らかになり、腱附着部症の治療に、PRPが安全で有効であることが、動物実験で判明した。ヒアルロン酸単独注入でも、本疾患に対する治療効果は得られるが、PRP治療と比較すると、その効果は弱く、ヒアルロン酸とPRPの混合による治療相乗効果は、本研究では、得られないことが判明した。今後は、治療に至適な血小板濃度の確定などの研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that an injection of PRP at the platelet concentration of a half million to a million/micro L against the animal tendinopathy inhibited the expressions of pain-inducing molecule resulted in the loss of pain and the increase of the spontaneous activity and a PRP therapy accelerated the reparative reaction at the level for the gene-expression or histopathology. Moreover, a PRP therapy inhibited the occurrence of cellular apoptosis and improved the acidic condition. These findings in the study suggested that a PRP therapy was effective and safety for the treatment of the tendinopathy in animal model. An injection of hyaluronan was also effective for the tendinopathy therapy, however, the efficacy was weaker than that of a PRP therapy. No synergistic effect combined with a hyaluronan and a PRP was observed in the animal model study. Further investigation to determine the optimal concentration of the platelets in PRP is necessary.

研究分野：自己多血小板血漿療法

キーワード：PRP tendinopathy

## 1. 研究開始当初の背景

腱附着部症・慢性腱症は、スポーツや就労による繰り返しの運動負荷が原因で発症する疾患である。本症は、日常の診療で多く遭遇するが、病因病態が解明されていないため、有効な治療方法が未だ確立しているとは言い難く、治療に難渋することが多い。我々は、これまで、疼痛抑制作用、酸化ストレス抑制作用、アポトーシス抑制作用、組織修復促進作用（線維芽細胞増殖、マトリックス分子合成促進、蛋白分解酵素抑制など）などの生化学的作用を有する高分子ヒアルロン酸製剤が、動物実験や臨床において、本症の治療に有効であることを見出している。一方、本症に対して、自己多血小板血漿(Platelet-Rich Plasma, PRP)を用いた治療の報告も散見されるが、治療効果は安定しておらず、有効とはいえない。

## 2. 研究の目的

本研究では、腱附着部症の治療方法の確立を目的とし、本症の実験動物モデルを作製し、自己多血小板血漿療法と自己多血小板血漿に高分子ヒアルロン酸を混合し併用した治療方法を試み、その有効性と安全性について検証した。また、自己多血小板血漿療法における至適血小板濃度について検証するため、血小板濃度の違いによる治療効果についても検討した。

## 3. 研究の方法

1) 腱附着部症の実験動物モデルの作製. Flatow の方法に従い、トレッドミル機械を用いて、ウイスターラットに走行運動を負荷し、膝蓋腱の腱附着部症動物モデルを作製した。すなわち、生後 16~18 週の雄のウイスターラットに 2 週間の馴化訓練を行い、走行可能なラットを選択後、10%の傾斜を設けたトレッドミル機械(KN-73 夏目製作所)を用いて、40 日間で合計 40km(平均速度 0.5km/h)の走行運動をラットに負荷し、膝蓋腱の腱附着部症モデルを作製した。

2) 自発運動量の測定による腱附着部症ラットの選択. 自発運動測定装置(スーパーメックセンス、室町機械)を用いて、ラットの夜間 12 時間の自発運動量を測定した。ラットの自発運動量は、個体差が大きいため、同一個体における自発運動量の変化率を測定した。トレッドミル走行前に、各ラットの自発運動量を測定し、トレッドミル走行終了後に、再び自発運動量を測定し、25%以上自発運動量の低下したラットを、腱附着部症発症ラットとして選択し、以後の実験に使用した。

3) ラットの自己多血小板血漿 (PRP) の作製. 同系ラット 5 匹の心臓から、合計 10mL の全血を採血し、ケイライト社製 MyCells 精製キットを用いて、約 2mL の PRP を得た。この中から、100 $\mu$ L を採取し、最終容量が 1mL になるように生食に溶解し、自動計測器を用いて、血小板と白血球濃度を測定した。測定の結果、血小板濃度は、約 130 万/ $\mu$ L で、白血球濃度は、約 4500/ $\mu$ L(全血の約半分)であった。こ

れを調整し、血小板濃度が 100 万/ $\mu$ L と 50 万/ $\mu$ L の PRP を作製し、以後の実験に使用した。

4) ラット膝蓋腱への注射. ラット専用の気化器とイソフルラン(商品名: エスカイン)を用いて、ラットを吸入麻酔し鎮静化した後に、膝関節部を剃毛し、膝関節の内側または外側より、27 ゲージの二段針と 0.5mL シリンジを用いて、膝蓋骨附着部よりやや中枢側の位置の膝蓋腱と膝蓋下脂肪体との間に、PRP, HA, HA と PRP の混合製剤、生理食塩液 25 microL を両側に 1 回注射した。注射容量の 25 microL は、膝関節内へ漏出しない最大量であることを、色素を混ぜた容量の異なるヒアルロン酸製剤をラット膝蓋腱へ実験的に注射することにより確認している。

5) 実験群の作製. 附着部腱症を発症したラットに対して、両側の膝蓋腱に HA と PRP の混合製剤を注射する群(HA-PRP 群)と、HA のみを注射する群(HA 群)と、血小板濃度が 100 万/ $\mu$ L と 50 万/ $\mu$ L の PRP を注射する群(P10 群, P5 群)と、両側の膝蓋腱に生理食塩液を注射する群(対照群)と、多数回針を刺し何も注射しない群(MN 群)を、それぞれ 8 匹作製した。

6) 自発運動量の測定. 各群の夜間 12 時間の自発運動量を毎日測定した。各群において、経時的な自発運動量の相対的な変化率を計算し、各群間において統計学的解析を行い、有意差を検定した。

7) 病理組織染色標本の作製. 実験終了後、各群の膝関節全体の組織標本を採取し、脱灰後、矢状断のプレパレート組織標本を作製した。組織染色は、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、TUNEL 法を用いた免疫組織染色を行い、アポトーシス抑制効果、腱組織修復促進効果について評価判定した。また、疼痛に対する軸索反射により知覚神経から放出される CGRP と Substance P 物質に対する特異抗体を用いた免疫組織染色を行い、疼痛抑制効果について判定した。

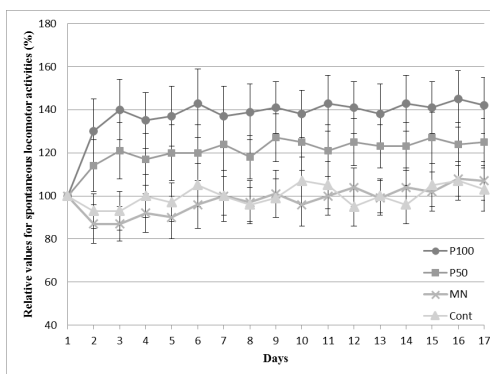
8) 腱修復に関わる遺伝子群の発現解析. 各群において、組織より total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法を用いて、type I & III procollagen などの分子の遺伝子発現を定量評価した。

## 4. 研究成果

1) 腱附着部症の実験動物モデルの作製. トレッドミルを完走し自発運動量が 25%以上低下したラットは、全体の約 70%であった。これらのラット 10 匹の両側膝蓋腱の組織標本を調査した結果、腱症にみられる micro tear や lamination の所見が有意にみられ、腱症を発症したことが判明した。

2) 膝蓋腱症ラットに対する PRP 注射の治療効果. 膝蓋腱症ラットの両側膝蓋腱に対し、血小板濃度 100 万/ $\mu$ L の PRP(P10)と血小板濃度 50 万/ $\mu$ L の PRP(P5)各 25 $\mu$ L を 1 回注射後、夜間 12 時間の自発運動量を 17 日間毎日測定した。その結果、P10(8 匹)の自発運動量は、注射後 2 日目から、健常状態の運動レベルまで

回復し、以降、16 日間にわたり、その自発運動量は維持された(図 1)。一方、P5(8 匹)の自発運動量は、注射後 2 日目から、約 20% 増加し、以降 16 日間にわたり維持されたが、健常状態の運動量までには回復しなかった。また、多数回の針穿刺のみを施行した MN 群(8 匹)の自発運動量は、有意に増加せず、対照群と有意差はなかった(図 1)。



**図 1 PRP 注射後のラット自発運動量の経過.** Day1 に両側の膝蓋腱と脂肪体との間に注射後、夜間 12 時間のラット自発運動量を毎日測定した。血小板濃度が 100 万/microL の PRP を注射した群は、注射後 2 日目から、自発運動量が健常状態の運動量レベルまで有意に回復し、以降 16 日間にわたり、自発運動量は維持された。一方、血小板濃度が 50 万/microL の PRP を注射した群の自発運動量は、約 20% 増加し、16 日間にわたり維持されたが、健常状態の運動量レベルまでは回復しなかった。また、多数回の針穿刺のみを施行した群の自発運動量は増加せず、コントロールと有意差はなかった。P100 : 血小板濃度 100 万/microL の PRP を注射した群(8 匹)。P50 : 血小板濃度 50 万/microL の PRP を注射した群(8 匹)。MN : 多数回針穿刺群(8 匹)。Cont : 無注射の対照群(8 匹)。\*p < 0.05

**3) 膝蓋腱症ラットに対する PRP と高分子ヒアルロン酸の混合注射の治療効果.** 血小板濃度 100 万/ $\mu$ L の PRP15 $\mu$ L と、高分子ヒアルロン酸(平均分子量 120 万)15 $\mu$ L の混合液を注射した群と、ヒアルロン酸の代わりに同量の生食を混合した群を作製し、自発運動量を測定した。その結果、両群の自発運動量は、ともに、注射後 2 日目から約 20% 増加し、以降 16 日間維持されたが、健常レベルの運動量までは回復せず、両群に有意差はなかった。また、両群の自発運動量の経過は、血小板濃度が 50 万/ $\mu$ L の PRP を注射した群の自発運動量の経過と相似していた。PRP と HA の相乗効果はみられなかった。

**4) PRP の組織修復効果.** PRP 群の組織標本では、腱症群でみられた micro tear や lamination などの病的所見はほとんどみられず、腱組織は修復されており、組織所見をスコア化した評価では、有意差があった。P10 群と P5 群との間では、スコアに有意差はみられなかった(表 1)。

**表 1 . 各群の組織スコア**

群	組織スコア
腱症	16 ± 5
対照	15 ± 6
MN	17 ± 7
P10	6 ± 2 *
P5	8 ± 3 *
PRP+HA	7 ± 3 *
PRP+NS	8 ± 3 *

\*P<0.05

**5) PRP のアポトーシス抑制効果.**

PRP 群の TUNEL 染色でのアポトーシス細胞数は、対照群腱症群と比較し、有意に低下していた。P10 群と P5 群との間では、細胞数に有意差はみられなかった(表 2)。

**表 2 . 各群のアポトーシス細胞数**

群	アポトーシス細胞数
腱症	24 ± 10
対照	23 ± 12
MN	25 ± 12
P10	5 ± 2 *
P5	7 ± 3 *
PRP+HA	6 ± 3 *
PRP+NS	7 ± 3 *

\*P<0.05

**6) PRP+HA 混合剤の組織修復効果とアポトーシス抑制効果.** 混合製剤群の組織標本のスコアは、腱症群対照群と比較し、有意に低下しており、組織は修復されていた。また、アポトーシス細胞数は、腱症群対照群と比較し、有意に低下していた。これらの混合製剤の指標は、P10 群と P5 群と比較し、有意差はみられず、PRP と HA の相乗効果はみられなかった(表 1, 2)。

**7) 腱修復遺伝子群の発現.**

PRP 群の type I & III procollagen 遺伝子発現は、対照群腱症群のそれと比較し有意に増加していた。PRP+HA 混合製剤の遺伝子発現量は、PRP 群と有意差はなく、対照群腱症群のそれと比較し有意に増加していた。

**8) 結論.**

1 回の PRP (血小板濃度 50 万/micro L 以上) 注射により、モデル動物の腱症は安全に修復、治癒した。その治療効果は、ヒアルロン酸単独投与と比較すると、有意に強く、そのため、PRP+HA 投与では、明らかな相乗効果はみられなかった。また、血小板濃度の違いにより治療効果に差がみられたことから、PRP 治療における至適血小板濃度の探索が今後の課題と考える。

## 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 ) Mamoru Yoshida, Hiroki Funasaki and Keishi Marumo.

Efficacy of autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for patellar tendinopathy in a rat treadmill model.

Muscles Ligaments Tendons J.

2016;6(2):205-215.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 ) Mamoru Yoshida, Hiroki Funasaki and Keishi Marumo.

Efficacy of an autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for patellar tendinopathy in a rat treadmill model.

第 90 回日本整形外科学会総会

H29/5/19 仙台市

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者: 吉田 衛 (Yoshida, Mamoru)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10266702

(2) 研究分担者

舟崎 裕記 (Hiroki, Funasaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70199412

丸毛 啓史 (Keishi, Marumo)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70199925

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし