

フラグミン・プロタミン微粒子含有  
多血小板血漿の創傷治癒促進効果に  
関する研究

高<sup>た</sup>林<sup>か</sup>勇<sup>ば</sup>気<sup>や</sup>  
し ゆ う き

(救急医学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成28年度

# 目 次

## 第1章 緒 言

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 はじめに                     | 1 |
| 1.2 多血小板血漿 (PRP)             | 2 |
| 1.3 フラグミン・プロタミン微粒子 (F/P 微粒子) | 4 |
| 1.4 本研究の意義と目的                | 5 |

## 第2章 分層採皮創ラットモデルにおける上皮化促進効果の検討

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 2.1 背景と目的             | 6  |
| 2.2 対象と方法             |    |
| 2.2.1 PRP の作製         | 7  |
| 2.2.2 F/P 微粒子と試験薬の作製  |    |
| 2.2.3 ラット分層採皮創モデル     | 8  |
| 2.2.4 組織学的検討          |    |
| 2.2.5 統計分析            | 9  |
| 2.3 結 果               |    |
| 2.3.1 安全性と外観          |    |
| 2.3.2 創縁からの上皮再生       | 10 |
| 2.3.3 分層採皮創における血管新生   |    |
| 2.3.4 分層採皮創の再生した上皮の厚さ |    |
| 2.4 考察                | 11 |
| 2.5 小括                |    |

## 第3章 全層植皮ラットモデルにおける植皮生着促進効果の検討

|                  |    |
|------------------|----|
| 3.1 背景と目的        | 12 |
| 3.2 対象と方法        |    |
| 3.2.1 全層植皮ラットモデル | 13 |
| 3.2.2 組織学的検討     | 14 |
| 3.2.3 統計分析       |    |

|         |                       |    |
|---------|-----------------------|----|
| 3.3     | 結 果                   |    |
| 3.3.1   | 植皮生着率                 |    |
| 3.3.2   | 植皮部血流量                | 15 |
| 3.3.3   | 血管数                   |    |
| 3.4     | 考 察                   | 16 |
| 3.5     | 小 括                   | 17 |
| 第4章     | ヒト分層採皮創における上皮化促進効果の検討 |    |
| 4.1     | 背景と目的                 | 18 |
| 4.2     | 対象と方法                 |    |
| 4.2.1   | 対 象                   |    |
| 4.2.2   | 方 法                   |    |
| 4.2.2.1 | インフォームドコンセント          |    |
| 4.2.2.2 | 血液採取と PRP の調製         | 19 |
| 4.2.2.3 | 試験薬の調製                |    |
| 4.2.2.4 | 分層採皮創の作製、試験薬の投与       |    |
| 4.2.2.5 | 写真撮影、解析               | 20 |
| 4.2.3   | 評価項目                  |    |
| 4.3     | 結 果                   |    |
| 4.4     | 考 察                   | 21 |
| 4.5     | 小 括                   |    |
| 第5章     | 総 括                   | 22 |
| 第6章     | 結 論                   | 24 |
| 謝       | 辞                     | 25 |
| 付       | 記                     | 26 |
| 引 用 文 献 |                       | 27 |
| 図       | 表                     | 33 |
| 略 語 一 覧 |                       | 57 |

## 第1章 緒 言

### 1.1 はじめに

近年、難治性創傷を有する患者は急激に増えてきている。以前より難治性創傷の一つと知られていた褥瘡に加え、最近では糖尿病や動脈硬化症による下腿潰瘍の患者が増えており、治療に難渋することも多い。治療が奏功せず、下肢切断に至ったり命を落としたりする危険性は高く<sup>1,2)</sup>、患者の QOL を維持改善するために、難治性創傷を治癒させることの社会からの期待は増々強まっており<sup>3)</sup>、集学的治療を行う創傷治療・難治性創傷専門のセンターを新設する動きが全国に広がっている。

多血小板血漿 (platelet rich plasma : 以下、PRP) を難治性創傷に用いる PRP 療法は集学的治療の一つである。PRP は血液を遠心分離で調製し、血小板を濃縮した血漿であり、PRP 療法は血小板に含まれる各種の増殖因子等の生理活性を局所に用いて創傷治癒を期待するものである。患者自身の血液から PRP を作製するため安全性は高く有用な治療法と見込まれているが、PRP 療法がより普及するためには PRP の効果を増強させ投与間隔を延ばし、PRP の投与回数を減らすことが実臨床では求められると考えた。

そこでわれわれは PRP 療法を改善するためにフラグミン・プロタミン微粒子 (以下、F/P 微粒子) に着目し研究を続けてきた。注射用医薬であるフラグミン、プロタミンの混和により作製される F/P 微粒子はヘパリン結合性増殖因子を吸着・安定化・活性化・徐放することで、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor -2: FGF-2)<sup>4)</sup>や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF)<sup>5)</sup>などのヘパリン結合性増殖因子の効果を顕著に増強することがこれまでの研究で明らかにされている。この F/P 微粒子を付加した PRP (以下、F/P 微粒子含有 PRP)

は創傷治癒効果を増強するかどうかを検証することを本研究の目標とし、F/P 微粒子含有 PRP の臨床応用を本研究の目的とした。

## 1.2 多血小板血漿 (PRP)

細胞増殖や組織再生において増殖因子が重要な役割を果たすことがわかってきている。増殖因子単独よりも複数を組み合わせて用いれば相乗効果により効果が増強することがわかっている<sup>6,7)</sup>。製品化されている増殖因子製剤はわが国では FGF-2 製剤 (trafermin: フィブラストスプレー®、科研製薬、東京) のみであり海外では FGF-2 製剤のほか、血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor: PDGF) 製剤 (becaplermin: REGRANEX®, Smith & Nephew, Inc. Fort Worth) が発売されている。HGF などの増殖因子は試薬としては販売されているが、PRP に含まれる増殖因子の量を使用するとなると、極めて高価になる<sup>8)</sup>。増殖因子を用いた新たな治療法として、HGF 遺伝子を細胞導入する HGF 遺伝子治療薬

(beperminogene perplasmid: コラテジェン®、アンジェス MG (株)、大阪) が開発されているが、いまだ上市する段階にはない<sup>9)</sup>。創傷治癒に増殖因子を用いた治療はこのように選択肢が少ないのが現状である。

血小板の $\alpha$ 顆粒内には増殖因子など多くの機能性タンパク質が含まれており、脱顆粒により増殖因子が放出される。 $\alpha$ 顆粒に含まれる代表的な増殖因子には PDGF、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor: TGF)、上皮性増殖因子 (epidermal growth factor: EGF)、インシュリン様成長因子

(insulin-like growth factor: IGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、ケラチノサイト増殖因子 (keratinocyte growth factor:

KGF)、FGF、HGF などがあり<sup>10,11)</sup>、このうち EGF、IGF を除き、ヘパリン結合性である<sup>12)</sup>。

血小板 $\alpha$ 顆粒から放出される増殖因子は創傷治癒機構において重要であり<sup>13,14)</sup>、これら増殖因子を創傷治癒や組織再生に利用する PRP 療法が 1988 年に Marx らにより歯科領域での報告がなされた<sup>15)</sup>。それ以来、創傷治癒や再生医療の分野でも研究、臨床応用が行われてきた。難治性潰瘍<sup>16)</sup>、熱傷治療<sup>17)</sup>、分層植皮の上皮化促進<sup>18,19)</sup>など外科領域、そして骨や関節、靱帯損傷といった整形外科領域<sup>20)</sup>などの報告があり、聖マリアンナ医科大学では 2011 年 9 月 30 日に第 2 項先進医療として国の承認を受け、難治性皮膚潰瘍治療に PRP 療法を用いている<sup>21)</sup>。

しかしながら、今現在、一般的な治療にまではなっていないのは、やはり PRP 療法に改善すべき点が存在するためと考えられる。PRP 療法の有効性が多く報告されている一方、分層採皮部、網状分層植皮部に対して行った無作為割り付け研究において PRP 治療群とコントロール群との間に創傷治癒の促進効果は認めなかったという報告<sup>22)</sup>もある。PRP 療法の効果が十分に得られないのは、PRP 投与後の早期流出<sup>23)</sup>、サイトカインの不活性化<sup>24)</sup>により PRP の効果の持続時間が短いという欠点のためと指摘されている。

その問題点を解決するために、PRP の効果を持続、増強させる徐放化の方法が検討されており、フィブリン糊<sup>25)</sup>やゼラチンハイドロゲル<sup>24,26)</sup>を用いたドラッグデリバリーシステム (drug delivery system: DDS) が報告されており、本研究で用いた F/P 微粒子の効果もわれわれのグループから報告<sup>12,27-29)</sup>している。

### 1.3 フラグミン・プロタミン微粒子 (F/P 微粒子)

フラグミンは低分子ヘパリン製剤である。ヘパリンはグリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化多糖であるヘパラン硫酸の一種であり、ヘパラン硫酸鎖がコア蛋白に共有結合しているプロテオグリカンとして存在している<sup>30)</sup>。ヘパリンは各種のヘパリン結合性物質と結合することで抗凝固作用のほかに、増殖因子の働き、細胞の接着、認識、遊走や酵素活性の調節などに関係しているとされている<sup>30-32)</sup>。低分子ヘパリンであるフラグミンはヘパリン結合性物質と結合する性質を有しつつ、低濃度で安定した予測可能な抗凝固反応を示すため投与量のモニタリングが不要であり、ヘパリンと比較し血小板に対する影響が少なく出血の危険性が低い<sup>33, 34)</sup>という利点がある。

プロタミンは魚類の精巢から抽出されるタンパク質である。プロタミンの抗凝固拮抗作用の作用機序はポリカチオンであるプロタミンがポリアニオンであるヘパリンやフラグミンとイオン結合し、抗凝固活性を欠く複合体を形成することである<sup>35)</sup>。

我々のグループでは、フラグミンとプロタミンを体積比 7 : 3 で混合し F/P 微粒子を作製してきた。フラグミンとプロタミンを混和してできる多電荷高分子複合体は直径約 100 nm の可溶性物質で、この複合体が凝集して、直径約 200 nm を中央値とする不溶性の F/P 微粒子が形成される<sup>36, 37)</sup> (図 1)。

この F/P 微粒子はヘパリン結合性増殖因子と結合し、その活性を保護、維持、活性化する。増殖因子と結合した F/P 微粒子が徐々に生分解されることで、増殖因子を徐放し、増殖因子の効果を長時間持続増強させ、創傷治癒を促進すると考えられている<sup>27, 36-38)</sup>。

#### 1.4 本研究の意義と目的

F/P 微粒子含有 PRP の先行研究によって、F/P 微粒子は PRP に含まれる多くのヘパリン結合性増殖因子を保持、安定化、徐放化することで、増殖因子の活性を顕著に維持・活性化する効果が確認された<sup>12)</sup>。マイトマイシン C を用いたラット難治性潰瘍モデルで行った研究では血管新生、肉芽形成が促進され創傷治癒が促進された<sup>29)</sup>。ラットの背部有茎皮弁モデルでは、血管新生促進効果による皮弁延長効果が認められた<sup>27)</sup>。またヒト頭髮薄毛部位に対して F/P 微粒子含有 PRP を局所注射した臨床研究では育毛効果と安全性が確認された<sup>28)</sup>。

このように、先行研究により F/P 微粒子含有 PRP の効果や安全性の検証はされつつあるが、ヒトの創傷治癒においての直接的な検証はいまだなされていない。そこで、F/P 微粒子含有 PRP をヒトの創傷治癒において臨床応用することを目的とし、必要となる動物実験と臨床研究を計画し F/P 微粒子含有 PRP の効果を検証することを本研究の目標とした。まず動物実験として、ラットの分層採皮創モデルで F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果の検討を行った。分層採皮創は一定の面積がある同じ性質の創傷であり比較、検討がしやすく、また、創傷治癒において重要な上皮化が評価できると考えた。また、さらなる臨床応用のために、ラットの自家植皮モデルでの植皮生着促進効果の検討を行った。臨床研究として、分層採皮創における F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果の検討を行った。

動物実験はすべて防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を受け実施した（承認番号 13066、13093、14102、15005）。臨床研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て実施し（承認番号 2104「多血小板血漿とフラグミン・プロタミンナノ粒子を用いた分層採皮創の上皮化の研究」26 年 10 月 16 日承認）、大学病院医療情報ネットワーク研究センターに登録した（UMIN000015974）。



## 第2章 分層採皮創ラットモデルにおける上皮化促進効果の検討

### 2.1 背景と目的

PRP を創傷治癒に用いた研究は多くなされており、PRP が創傷治癒を促進するという結果が数多く得られている<sup>39)</sup>。しかしながら PRP の単回の投与では効果がないという報告もあり<sup>22, 40)</sup>、PRP から放出されるサイトカインの生物活性の半減期が短いために、頻回の投与が必要になる。半減期の短いサイトカインの徐放化は創傷治癒分野において大きなテーマの一つである。FGF-2 を創傷被覆材などに担持させ徐放化させるという趣旨の研究は臨床研究としてもいくつか実施されており<sup>41, 42)</sup>、有用な DDS の開発が求められていることがわかる。

われわれのグループでは F/P 微粒子を DDS とする研究をこれまで行ってきた。F/P 微粒子は既存の医薬品のみを使用し、注射による投与も可能であり臨床応用しやすい利点がある。F/P 微粒子が PRP の DDS として有効かどうかはこれまでに瀧川らにより *in vitro* でサイトカイン濃度の測定、細胞増殖活性、PRP の活性維持効果について研究され、効果が確認されている<sup>12)</sup>。またラットの難治性潰瘍モデルで肉芽組織形成や血管新生効果などの創傷治癒促進効果が検証されている<sup>29)</sup>。

これまでの研究で F/P 微粒子含有 PRP が臨床での難治性潰瘍治療で有効であることが示唆されているが、難治性潰瘍の実診療として臨床研究を行うには、F/P 微粒子含有 PRP の有効性や安全性のさらなる積み重ねが必要と考えた。また、難治性潰瘍の病態は複雑であり、条件を一定に整えることが困難であることが予想された。そこで皮膚欠損創などの治療手技で用いられる植皮術に着目した。植皮術には皮膚組織全層を移植する全層植皮と表皮と真皮の一部を移植する分層植皮がある。分層植皮の際に分層採皮を行うが、分層採皮創は真皮の一部が残存した

一様の深さの創になり、分層採皮創は周囲の残存上皮組織から上皮再生がおき、上皮化する。この上皮化の程度を評価することで F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果を検証できると考え、分層採皮創ラットモデルによる上皮化促進効果の検討を行った。

## 2.2 対象と方法

### 2.2.1 PRP の作製

体重 170～190 g の 9 週齢 Fischer 344 雄ラット（日本エスエルシー、静岡）をペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル®、64.8 mg/mL、共立製薬、東京）麻酔下で心臓内穿刺により全血およそ 10 mL を採取した。血液 10 mL あたり 10 % クエン酸 Na 溶液（チトラミン®、扶桑薬品、大阪）1 mL を抗凝固薬として混合した。

この血液から遠心分離を 2 回行う方法(double spin 法)で PRP を得た(図 2)。血液を室温で 1700 rpm (455 G)、25 分間の遠心分離で、底部から赤血球層、白血球と血小板が含まれる buffy coat 層、血漿層の 3 層に分離した。buffy coat 層と血漿層を別の遠沈管に移し替え、室温で 3000 rpm (1418 G)、5 分間の遠心分離を行った。採血量 10 mL に対して 1 mL になるように上清を捨てた残りを PRP とした。PRP の活性化には PRP を-80℃で凍結した後に室温に融解する凍結融解法を用いた。

### 2.2.2 F/P 微粒子と試験薬の作製

F/P 微粒子と試験薬の作製方法を図 3 に示す。0.7 mL のフラグミン(6.4 mg/mL、キッセイ薬品、東京)に、0.3 mL のプロタミン(10 mg/mL、持田製薬、東京)を

滴下し、約 2 分間攪拌し白色に混濁する液体を得た。この白濁溶液に 4℃、8000 rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を捨て未反応物質を除去した。沈殿する白色物質が F/P 微粒子であり、約 6 mg の F/P 微粒子を得た。この F/P 微粒子に 1 mL の生理食塩水を加えたものを F/P 微粒子溶液(1 mL)とした。同様に 1 mL の PRP を加えたものを F/P 微粒子含有 PRP(1 mL)とした。

### 2.2.3 ラット分層採皮創モデル

体重 170～190 g の 9 週齢 Fischer 344 雄ラット（日本エスエルシー、静岡）56 匹を実験で使用した。塩酸メデトミジン 1 mg/kg（ドミトール®、1 mg/mL、日本全薬、福島）とペントバルビタールナトリウム 5 mg/kg の腹腔内麻酔下に背部皮膚の毛を剃り、脱毛クリーム（エピラット®、クラシエ、東京）を用いて脱毛した。手動式デルマトーム（ケイセイ医科工業、東京）を用いておおよそ縦 3 cm、横 4 cm、深さ 0.04 cm の分層採皮創を作製した（図 4 A、B）。

投与群を F/P 微粒子含有 PRP 群、PRP 単独群、F/P 微粒子単独群、生理食塩水（コントロール）群の 4 群（n = 7）にした。それぞれ試験薬 2 mL をラット背部の分層採皮創にまんべんなく皮内注射した（図 4 C）。処置終了後、塩酸アチパメゾール 1 mg/kg（アンチセダン®、5 mg/mL、日本全薬、福島）を腹腔内投与し麻酔から覚醒させた。

### 2.2.4 組織学的検討

分層採皮創の作製後 3、4、5 日目、もしくは 5、7、10 日目に同一個体から 3 回皮膚組織を採取した。1 回目と 2 回目の皮膚組織採取の際は麻酔下に剪刀で皮膚を採取した後、採取部を 4-0 黒ナイロンで縫合閉鎖した。3 回目の際はペント

バルビタールナトリウムの過量投与で犠死させた後に採取した（図 4 D、E）。採取した皮膚組織は 10 %ホルマリン溶液（和光純薬工業、大阪）で固定した。毛流方向に検体を切り出し、パラフィンに包埋し、4  $\mu$  m の厚さに薄切したものを hematoxylin-eosin（以下、HE）染色しプレパラートを作製した。

顕微鏡（Nikon ECLIPSE 50i、ニコン、東京）（倍率 100 倍）と画像統合ソフトウェア（NIS-Elements D 4.13、ニコン、東京）を用いて以下の測定を行った。3、4、5 日目の各標本では創縁から再生した上皮の長さを測定した。5、7、10 日目の各標本では再生した肉芽組織の面積、およびその肉芽組織に含まれる、大血管（直径  $> 200 \mu$  m、含まれる赤血球数  $> 100$  個）、中血管（直径  $20 \sim 200 \mu$  m、含まれる赤血球数  $10 \sim 100$  個）、小血管（直径  $< 20 \mu$  m、含まれる赤血球数  $1 \sim 9$  個）の数を数え、肉芽組織面積平方ミリメートル当たりの新生血管の数を求めた。3、4、5、7、10 日目の各標本において分層採皮創で再生した上皮の面積と創傷の長さを測定し、再生した上皮の面積を創傷の長さで割ることで再生した上皮の平均の厚さを求めた。

## 2.2.5 統計分析

統計学的検定は JMP 10.0.0（SAS Institute Japan Inc、東京）を用いた。全ての値は平均  $\pm$  標準偏差として記載し、Tukey-Kramer HSD 検定を多重比較のために使用した。P  $< 0.05$  を統計学的に有意差有りとした。

## 2.3 結 果

### 2.3.1 安全性と外観

分層採皮創や注射部位において膿瘍形成や壊死などの兆候は 10 日間の実験期間の間認めず、分層採皮創は痂皮でおおわれていた（図 4 D）。

### 2.3.2 創縁からの上皮再生

図 5 は F/P 微粒子含有 PRP 群の画像であり、創縁から上皮が再生する経時的变化を観察した。3、4、5 日目の分層採皮創の創縁から再生した上皮の長さを、各群間で比較し、検討した。再生上皮長は F/P 微粒子含有 PRP 群では 3 日目に  $851 \pm 173 \mu\text{m}$ 、4 日目に  $1527 \pm 308 \mu\text{m}$ 、5 日目に  $1769 \pm 285 \mu\text{m}$  と測定された。これらの値は他群よりも有意に大きかった（図 6）。

### 2.3.3 分層採皮創における血管新生

F/P 微粒子含有 PRP 群の血管新生促進作用を確認するために、分層採皮創の再生した肉芽組織中の新生血管を観察し検討した。図 7 に 7 日目の各群の代表的な顕微鏡写真を示した。肉芽組織中の小血管と中血管の数は 7 日目と 10 日目に F/P 微粒子含有 PRP 群において他群よりも有意に多かった（図 8、9）。

### 2.3.4 分層採皮創の再生した上皮の厚さ

再生した上皮の面積を創傷の長さで割ることで再生した上皮の平均の厚みを求めた。5 日目の代表的な顕微鏡写真を図 10 に示した。F/P 微粒子含有 PRP 群の再生した上皮の厚さは 3、4、5、7、10 日にそれぞれ、 $6.6 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 、 $14.5 \pm 8.7 \mu\text{m}$ 、 $23.7 \pm 10.6 \mu\text{m}$ 、 $37.2 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 、 $40.0 \pm 12.1 \mu\text{m}$  であった。F/P 微粒子含有 PRP 群の再生した上皮の厚さは 3、4、5 日目において他群よりも有意に大きかった（図 11）。

## 2.4 考察

分層採皮ラットモデルにおいて F/P 微粒子含有 PRP は上皮再生と肉芽組織中の血管新生を促進させた。これは上皮細胞や血管内皮細胞にはたらく増殖因子の作用が増強されたためと考えられる。これまで F/P 微粒子含有 PRP の投与部位の血管新生を促進する効果は確認されていたが、上皮再生の促進効果は本研究ではじめて確認された。上皮の伸長促進に加え、上皮の重層形成においても効果が認められ、十分な厚みをもつ上皮が早く再生されることは、上皮化促進効果の検証として意義深い。分層採皮創部の肉芽組織中の血管新生が促進されたことは、F/P 微粒子含有 PRP の創傷治癒促進効果の検証の一つになったといえる。

分層採皮創における PRP の上皮化促進効果は臨床例での報告<sup>11, 40)</sup>があるが、動物実験における検証は本研究が初めてである。本研究では PRP 単独投与の上皮化促進効果は Day 5 において有意差をもって認められた。また、F/P 微粒子含有 PRP 投与は PRP 単独投与を含む他群と比較し、Day 3、4、5 で有意差をもって上皮化を促進し、F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果を確認した。このことは PRP 単独治療では奏功しない難治性創傷においても F/P 微粒子含有 PRP には治癒可能性があると期待でき、F/P 微粒子を付加する意義が大きいと考えられる。

## 2.5 小括

分層採皮創ラットモデルにおいて F/P 微粒子含有 PRP 群が他群に比較し有意に上皮再生と血管新生を促進させた。

### 第3章 全層植皮ラットモデルにおける植皮生着促進効果の検討

#### 3.1 背景と目的

難治性潰瘍などの広範囲皮膚欠損創や熱傷治療などで植皮術は頻用する手技であるが、しばしば、植皮の生着が不良のため複数回の手術を必要とし治療期間が長くなる。

植皮片の厚みが厚いほど植皮の生着は不良になる。つまり、全層植皮は分層植皮と比較し、植皮の生着条件として不利である。全層植皮には植皮部が軟らかく、術後の拘縮が抑制され、外観はより自然になるといった美容的效果があり、全層植皮の適応が広がることは大きなメリットがある。植皮の生着の成否は移植床の状態に左右され、血流の乏しい移植床には植皮の生着は不良である<sup>43)</sup>。血流の豊富な移植床を形成することが植皮術で重要なことであり、全層植皮術の適応を拡大するためにも必要である。

植皮の生着過程は植皮術後2日目までの血清浸透期と植皮術後2日目以降の血行再開期に分けられる。血清浸透期は植皮片内に積極的な血流はみられず、移植床の創面より漏出した血清成分で栄養と湿潤状態が維持される<sup>44)</sup>。血行再開期の植皮術後2～3日目の早期において移植床と植皮片の血管吻合による血行再開がおきるが<sup>45)</sup>、その際血管吻合がうまくいかない場合は移植床からの新生血管が侵入し血行が再開するとされている<sup>46)</sup>。血管吻合の確率を上げるか、移植床からの新生血管侵入を促進させるかが植皮片の血行再開の鍵となる。

F/P 微粒子含有 PRP の肉芽形成促進効果や血管新生促進効果は血流と新生血管の豊富な移植床を形成し、血管吻合の確率を上げ新生血管の侵入を促進し、全層植皮の生着率を向上させると考え、全層植皮ラットモデルにおける植皮生着促進効果の検討を行った。

## 3.2 対象と方法

### 3.2.1 全層植皮ラットモデル

体重 170～190 g の 9 週齢 Fischer 344 雄ラット 96 匹を実験で使用した。塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg（ドルミカム®、5 mg/mL、アステラス製薬、東京）、酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg（ベトルファール®、5 mg/mL、Meiji Seika ファルマ、東京）の三種混合腹腔内麻酔下に背部皮膚の毛を剃り、脱毛クリームを用いて脱毛した。背部中央に 2 cm × 2 cm の全層皮膚欠損創を作製した（図 12 A）。試験薬は 2.2.2 項と同様に作製し、F/P 微粒子含有 PRP 群、PRP 単独群、F/P 微粒子単独群、生理食塩水群の 4 群とし、それぞれ試験薬 0.5 mL をラット背部の皮膚欠損創部にまんべんなく注射した（図 12 B）。創傷被覆材としてポリウレタンドレッシング（ハイドロサイト薄型®、Smith & Nephew Wound Management、東京）を 5-0 黒ナイロンで縫着した（図 12 C）。処置終了後、塩酸アチパメゾール 0.15 mg/kg を腹腔内投与し麻酔から覚醒させた。

翌日、植皮術を施行した。前述の 3 種混合麻酔を用い、全層皮膚欠損創の 2 cm 尾側から 2 cm × 2 cm の全層皮膚を採取し、皮下脂肪を除去し全層皮膚移植片とした。創傷被覆材を除去した後、皮膚欠損創に植皮片を 5-0 黒ナイロンで縫着し、上から綿花をあて 3-0 ナイロン糸で圧迫固定し植皮を行った（図 12 D、E、F）。植皮術後 4 日目に綿花を除去し圧迫固定を解除した。植皮術後 10 日目にデジタルカメラ（Nikon 1 S1、ニコン、東京）で植皮部を撮影した写真を Adobe Photoshop CS6（Adobe Systems Inc、USA）で解析し植皮生着部と壊死部に区分し植皮生着率を求めた（n = 12）（図 13）。



植皮術直前直後と 2、4、5、6、7、8、9、10 日後に 2 次元レーザードップラー式血流画像化装置 (MoorLDI2-IR、Moor Instruments、United Kingdom) (以下、ドップラー血流量計) で植皮部の血流量 (perfusion units: PU) を測定した (n = 12) (図 13)。植皮術後 2 日目の血流量測定は、圧迫固定を解除した後に計測し、再度圧迫固定した。植皮術後 4、7、10 日目に犠牲死させ植皮部の皮膚組織を採取した。

### 3.2.2 組織学的検討

採取した皮膚組織は 10 %ホルマリン溶液で固定した。毛流方向に検体を切り出し、パラフィンに包埋し、4  $\mu$ m の厚さに薄切したものを HE 染色または CD34 抗体 (EP373Y、Abcam、USA) で免疫染色し (協同病理、兵庫)、プレパラートを作製した。顕微鏡 (倍率 100 倍) と画像統合ソフトウェアを用いて全層植皮片と移植床 (皮筋と肉芽組織) の面積、およびそれぞれに含まれる大血管 (直径 > 200  $\mu$ m、含まれる赤血球数 > 100 個)、中血管 (直径 20~200  $\mu$ m、含まれる赤血球数 10~100 個)、小血管 (直径 < 20  $\mu$ m、含まれる赤血球数 1~9 個) の数を数え、平方ミリメートル当たりの血管数を求めた (n = 6)。

### 3.2.3 統計分析

統計学的検定は JMP Pro 11.2.0 (SAS Institute Japan Inc、東京) を用いた。全ての値は平均  $\pm$  標準偏差として記載し、Tukey-Kramer HSD 検定を多重比較のために使用した。P < 0.05 を統計学的に有意差有りとした。

## 3.3 結 果

### 3.3.1 植皮生着率

植皮術後 10 日時点 (Day 10) での植皮生着率は、F/P 微粒子含有 PRP 群で  $55.0 \pm 11.5\%$ 、PRP 単独群で  $30.9 \pm 9.6\%$ 、F/P 微粒子単独群で  $32.9 \pm 11.2\%$ 、生理食塩水群で  $31.1 \pm 6.6\%$  であった (図 14)。F/P 微粒子含有 PRP 群は他群より有意に植皮生着率が高かった。

### 3.3.2 植皮部血流量

ドップラー血流量計で計測した植皮部血流量 (図 15) は Day 10 において、F/P 微粒子含有 PRP 群  $329.3 \pm 11.7$  PU、PRP 単独群  $270.5 \pm 12.6$  PU、F/P 微粒子単独群  $239.0 \pm 12.5$  PU、生理食塩水群  $227.4 \pm 12.1$  PU であり F/P 微粒子含有 PRP 群の植皮部血流量は他群より有意に高かった。また Day 5 から Day 9 において F/P 微粒子含有 PRP 群の植皮部血流量は F/P 微粒子単独群と生理食塩水群より有意に高かった。

### 3.3.3 血管数

図 16 は植皮部の Day 7 における各群の HE 染色と CD34 抗体免疫染色の代表的な顕微鏡写真である。小三角形は小血管、矢印は中血管を示し、破線は植皮片と移植床の境界を示している。

図 17 から図 20 は各群の植皮片と移植床に含まれる Day 4、7、10 における小血管数と中血管数が示されている。全層植皮片に含まれる小血管数 (図 17) は、Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $2.87 \pm 1.11$  個) は生理食塩水群 ( $1.44 \pm 0.70$  個) と比較し有意に多かった。中血管数 (図 18) は Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $1.73 \pm 0.52$  個) は生理食塩水群 ( $0.45 \pm 0.25$  個)、F/P

微粒子単独群 ( $0.81 \pm 0.29$  個)、PRP 単独群 ( $1.23 \pm 0.31$  個) と比較し有意に多く、また生理食塩水群と PRP 単独群間でも有意差が認められた。Day 10 では F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $1.07 \pm 0.43$  個) は生理食塩水群 ( $0.48 \pm 0.38$  個) と F/P 微粒子単独群 ( $0.53 \pm 0.31$  個) と比較し有意に多かった。

移植床に含まれる小血管数 (図 19) は、Day 4 において F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $5.41 \pm 0.85$  個) は生理食塩水群 ( $2.98 \pm 1.16$  個) と F/P 微粒子単独群 ( $3.36 \pm 0.85$  個) と比較し有意に多かった。Day 7 では F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $10.95 \pm 2.56$  個) は生理食塩水群 ( $5.28 \pm 0.98$  個)、F/P 微粒子単独群 ( $5.53 \pm 2.81$  個)、PRP 単独群 ( $5.87 \pm 2.45$  個) と比較し有意に多かった。中血管数 (図 20) は Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群 ( $5.47 \pm 3.54$  個) は生理食塩水群 ( $2.04 \pm 1.43$  個)、F/P 微粒子単独群 ( $1.88 \pm 0.82$  個) と比較し有意に多かった。大血管は植皮片、移植床ともに観察されなかった。

### 3.4 考 察

全層植皮ラットモデルにおいて F/P 微粒子含有 PRP は全層植皮の生着率を向上させた。ドップラー血流量計で計測した植皮部血流量は F/P 微粒子含有 PRP 群で高く植皮片の生着率を反映していた。植皮部血流量が増加したことは、F/P 微粒子含有 PRP が血管の豊富な移植床を形成したことにより移植床と植皮片との血管が再吻合する確率が上昇、もしくは、移植床から植皮片への血管新生が増加したことで植皮片への血流の再灌流が促進したためと考えられる。

Day 7 の移植床に含まれる小血管数と中血管数が F/P 微粒子含有 PRP 群において有意に増加したのは F/P 微粒子含有 PRP の血管新生促進効果により血流の豊富な良好な移植床が形成されたことを示している。また、Day 7 と Day 10 で植

皮片に含まれる中血管数が F/P 微粒子含有 PRP 群において有意に増加したのは植皮片が生着し血流が回復していることを反映しており、植皮片の中血管数の増加をドップラー血流量計で植皮部血流量の有意な増加として経時的に観察されたものと考えられる。

ドップラー血流量計で計測した植皮部血流量が Day 6、7 をピークにその後低下したのは血管数の評価から Day 7 が血管数のピークになる傾向が認められたことから、植皮片や移植床で増加した新生血管が Day 7 前後をピークに増加しその後次第に減少したためと考えられる。

### 3.5 小 括

全層植皮ラットモデルにおいて F/P 微粒子含有 PRP は全層植皮の生着率を向上させた。

## 第4章 ヒト分層採皮創における上皮化促進効果の検討

### 4.1 背景と目的

第2章の分層採皮創ラットモデルにおける動物実験において、F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果と血管新生促進効果を検証した。この動物実験で得られた知見を臨床研究でも確認できれば、F/P 微粒子含有 PRP は、現在の PRP 療法をより改善することができ、創傷治癒分野において大きな進展が得られると考え、ヒト分層採皮創における上皮化促進効果を検討する臨床研究を計画した。

分層採皮創は真皮の一部が残存した一様の深さの創であり、ヒト分層採皮創は一般的に10日～2週間で上皮化する。この上皮化の程度は外観の肉眼的観察で評価できる。分層採皮創を4分割しそれぞれに4つの試験薬を皮内注射し、試験薬による上皮化の進行具合を外観の画像から評価し、上皮化促進効果の検討を行った。

### 4.2 対象と方法

#### 4.2.1 対 象

対象者は全身麻酔下で分層採皮を伴う植皮手術を受ける20歳以上80歳未満の患者で、十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人の自由意思による文書同意が得られた患者とした。目標症例数は10例とした。除外基準、中止基準は表1の通りとした。

#### 4.2.2 方 法

##### 4.2.2.1 インフォームドコンセント

本研究のフローチャートを図 21 に示す。被験者の選定方針に合致する患者に対してインフォームドコンセントを文書で取得した。インフォームドコンセントの際に十分な問診を行い、被験者の除外基準に抵触しないことを確認した。

#### 4.2.2.2 血液採取と PRP の調製

予想される分層採皮創の面積に応じて PRP 作製のための血液を採取した。採取量は分層採皮創面積 10 cm<sup>2</sup>あたり血液採取を 2.5 mL とし、血液採取の最大量は 50 mL とした。血液採取時は採血部位を消毒し清潔野を展開し滅菌操作で血液を採取した。なお、以降の試験薬の調製もすべて滅菌操作で行った。

2.2.1 項に記載の PRP の調製法 (10 %クエン酸 Na 溶液添加、double spin 法) で PRP を調製し、-80 °Cで凍結保存した。投与当日に PRP を融解し活性化させた (凍結融解法)。

#### 4.2.2.3 試験薬の調製

フラグミン液量 7に対しプロタミン液量 3を混和し F/P 微粒子溶液 (6 mg/mL) を作製した。F/P 微粒子含有 PRP 投与群で用いる試験薬は PRP 2 mL に対し F/P 微粒子溶液 1 mL を混和し調製した。PRP 群で用いる試験薬は PRP 2 mL に対し生理食塩水 1 mL を加え調製した。F/P 微粒子群で用いる試験薬は生理食塩水 2 mL に対し F/P 微粒子溶液 1 mL を加えて調製した。生理食塩水群では生理食塩水を用いた。

#### 4.2.2.4 分層採皮創の作製、試験薬の投与

全身麻酔下に手動式デルマトーム（ケイセイ医科工業、東京）を用いて深さ 0.04 cm の分層採皮創を作製した。図 22 A に示した通り、分層採皮創面積が可能な限り 4 等分になるように分割線を設定し、分割線の両端を分割点とし皮膚に手術用ペンで印をつけた。分割点から両側に 10 mm の位置に印をつけその印を注射限界点とした。すべての辺に注射限界点を設定し、それぞれ対側にある対応する点を結んだ線を注射限界線とし、注射限界線を越えて試験薬を投与しないようにした。

F/P 微粒子含有 PRP 群、PRP 群、F/P 微粒子群、生理食塩水群の試験薬をそれぞれ創面積 10 cm<sup>2</sup> あたり 1 mL をまんべんなく皮内注射し（図 22 B、C）、親水性ゲル化創傷被覆材（アクアセルフフォーム®、コンバテック、東京）を貼付した。

#### 4.2.2.5 写真撮影、解析

1 日から 2 日おきに創傷被覆材を取り換え、その際、デジタルカメラで分層採皮創を撮影した。Adobe Photoshop CS6 を用いて分層採皮創部の写真から上皮化部分と未上皮化部分の面積を算出し各群の上皮化率を求めた。

#### 4.2.3 評価項目

上皮化率を主要評価項目とした。局所感染の有無、皮内・皮下出血の有無、アレルギー反応の有無を安全性評価項目とした。

### 4.3 結 果

再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）（以下、再生医療新法）の施行に伴い、1 症例のみに対し本研究を行った。

術後 7 日目のデジタルカメラの写真を解析した（図 23 A）。生理食塩水投与部位の上皮化率 66.2 %、F/P 微粒子投与部位 72.6 %、PRP 投与部位 80.3 %、F/P 微粒子含有 PRP 投与部位は 89.3 %と試験薬による上皮化率の差を認めた（図 23 B）。術後 14 日目で、投与部間で肉眼的な差は認めず一様に上皮化が完了し、治癒した（図 23 C）。有害事象は認めず、安全性評価項目においても問題は認めなかった。

#### 4.4 考 察

実施したのは 1 症例のみであるが、F/P 微粒子含有 PRP 投与のヒトでの上皮化促進効果や安全性を示唆する成果が得られ、今後の F/P 微粒子含有 PRP の創傷治療の臨床応用の第一歩となったと考えている。評価をより確実なものとするためにはさらなる症例の蓄積が必要であるが、現在、新規症例の組み入れを見合わせている。

再生医療新法が平成 26 年 11 月 25 日に施行された。PRP 療法は第三種再生医療に分類され、特定細胞加工物製造事業者としての届出や再生医療等提供計画の作成、認定再生医療等委員会での審査が必要になった。現在、再生医療新法に定められた各種申請の準備中である。

#### 4.5 小 括

ヒト分層採皮創において F/P 微粒子含有 PRP が上皮再生を促進させる可能性と安全性が示唆された。



## 第5章 総括

各種の増殖因子が創傷治癒を促進することはよく知られており、わが国では FGF-2 製剤（フィブラストスプレー®）が広く使用されている。また増殖因子を複数組み合わせて用いれば相乗効果により効果が増強することがわかっている<sup>6,7)</sup>が、一般に増殖因子は高価であるため、費用対効果に優れる PRP 療法が注目され臨床での使用が行われてきた。PRP 療法の有効性は臨床使用により蓄積されているが、一方で効果が不十分との報告もあり<sup>22)</sup>、改善の必要性がある。

第2章ではラットの分層採皮創モデルで F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果と血管新生促進効果を検証した。第3章ではラットの自家植皮モデルでの植皮生着促進効果を検証した。F/P 微粒子含有 PRP の血管新生促進効果により良好な移植床を形成し植皮生着率が向上した。これら動物実験で PRP 群はコントロールである生理食塩水群や F/P 微粒子群と比較し、同等かそれ以上の創傷治癒効果を認めたが、一部結果では PRP 群とコントロール群とが有意差がないという結果であった。このことは PRP の効果が不十分であると報告されていることにも合致する。F/P 微粒子含有 PRP は上皮化促進効果や血管新生促進効果、植皮生着率促進効果においてコントロール群である生理食塩水群や F/P 微粒子群とはもちろん、PRP 群に対しても有意な効果を認めた。F/P 微粒子が PRP の効果を増強した結果であると考えた。

第4章では臨床研究として、分層採皮創における F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果の検討を行った。実施した1症例では有害事象は認めず、F/P 微粒子含有 PRP 投与により上皮化が促進した。再生医療新法により iPS 細胞、ES 細胞や各種幹細胞などとともに PRP 療法も再生医療の一つとして定められ、再生医療を提供するに際し必要な手続きが規定された。それとともに、これまでは認めら

れていなかった企業の工場での細胞培養や PRP 作製が可能になり、再生医療を提供する医療機関は企業にこれら製造の委託をすることが可能になった。それゆえこれまでは高度な施設を備えた医療機関でしか行うことができなかった PRP 療法が今後は広く普及していく可能性が開かれたといえる。しかしながら再生医療新法施行に伴う各種手続きのため PRP 療法のハードルが上がったのも事実といえる。

サイトカイン療法において細胞加工物を用いずサイトカインのみを投与する場合は再生医療新法の対象外である<sup>47)</sup>ため、PRP を用いないサイトカイン療法に F/P 微粒子を応用することを今後の展望として考えている。すでに FGF-2 に F/P 微粒子を添加する研究はわれわれのグループで行っており成果が得られている

4, 48)。

本研究を含め、サイトカイン療法における増殖因子の供給源として PRP を取り扱った研究が多く、PRP 中の増殖因子の至適濃度や増殖因子の至適な組み合わせまでは一定の見解が得られていない<sup>49)</sup>。今後はそれらを解明していくことで PRP 療法を超える効果を持つサイトカイン療法を生み出すことができる可能性がある。またそこに F/P 微粒子を添加することでサイトカインの効果を増強することも可能であると考えられる。本研究は F/P 微粒子含有 PRP の臨床応用を目標に研究を進めてきたが、今後は F/P 微粒子添加サイトカイン複数併用療法についても研究する必要があると考える。

## 第6章 結 論

1. 分層採皮創ラットモデルを用いて、F/P 微粒子含有 PRP の血管新生促進効果と上皮化促進効果を検証した。
2. 全層植皮ラットモデルを用いて、F/P 微粒子含有 PRP の全層植皮生着率促進効果を検証した。
3. ヒト分層採皮創での F/P 微粒子含有 PRP の上皮化促進効果を検証する臨床研究を実施した。法律施行の影響で1症例のみにとどまったが、F/P 微粒子含有 PRP の安全性、有効性を支持する結果が得られた。

## 謝 辞

本研究にあたり、研究立案、実験方法、学会発表、論文執筆等、多くのご指導ご鞭撻を賜りました、防衛医科大学校病院形成外科 清澤智晴教授ならびに防衛医学研究センター医療工学研究部門 石原雅之教授に心より深く感謝致します。

研究の各所においてご指導を賜りました防衛医科大学校病院形成外科 東隆一准教授、青木伸峰講師、防衛医学研究センター医療工学研究部門 中村伸吾講師、服部秀美助教、また実験手技にご協力頂きました栗原征宏先生、鷲見友紀先生、瀧川真人先生に厚く御礼申し上げます。

またあらゆる場面におきまして、日常적으로ご支援を下さいました防衛医科大学校病院形成外科ならびに防衛医学研究センター医療工学研究部門、動物実験施設、共同利用研究施設関係諸氏に御礼申し上げます。

また陰ながら支えてくれた、妻 あずさ、長女 渚、母 富美子に心より感謝致します。

付 記

本論文の一部は

- ・ 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2014 年 10 月 9-10 日 長野)
- ・ 第 33 回日本臨床皮膚外科学会学術集会 (2015 年 3 月 27-28 日 千葉)
- ・ 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2015 年 10 月 8- 9 日 岩手)
- ・ 第 45 回日本創傷治癒学会 (2015 年 11 月 30 日-12 月 1 日 東京)

で発表し、

基礎論文

Takabayashi Y, Ishihara M, Sumi Y, Takikawa M, Nakamura S, Kiyosawa T.

Platelet-rich plasma-containing fragmin-protamine micro-nanoparticles promote epithelialization and angiogenesis in split-thickness skin graft donor sites. J Surg Res. 2015;193:483-91.

に掲載された。

また、

Takabayashi Y, Ishihara M, Kuwabara M, et al. Improved survival of full-thickness skin graft with low-molecular-weight heparin-protamine micro/nanoparticles including platelet-rich plasma.

が Annals of Plastic Surgery に 2017 年 1 月 3 日、掲載受理された。

## 引用文献

- 1) Aulivola B, Hile CN, Hamdan AD, Sheahan MG, Veraldi JR, Skillman JJ, et al. Major lower extremity amputation: outcome of a modern series. *Arch Surg.* 2004;139:395–9.
- 2) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl S:S5–67.
- 3) 水野博司, 林礼人, 宮本英子, 古元将和, 宮本正章, 百束比古. 難治性創傷治療に対する形成外科の果たす役割: 細胞, 増殖因子による非手術的治療の現状と展開. *創傷.* 2010;1:107–11.
- 4) Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Nakamura S, Ohno C, Horio T, et al. Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J Biomed Mater Res A.* 2009;91:814–23.
- 5) Kishimoto S, Ishihara M, Nakamura S, Fujita M, Takikawa M, Sumi Y, et al. Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carriers in vivo. *Acta Biomater.* 2013;9:4763–70.
- 6) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:585–601.
- 7) Chen F-M, Zhang M, Wu Z-F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31:6279–308.
- 8) Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology.* 2015;103:126–35.
- 9) アンジェスMG(株). 開発パイプラインの状況.  
[https://www.anges-mg.com/project/pdf/pipeline\\_201606.pdf](https://www.anges-mg.com/project/pdf/pipeline_201606.pdf) [cited 2016-7-7].

- 10) Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118:147e – 159e.
- 11) Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489–96.
- 12) Takikawa M, Nakamura S-I, Nakamura S, Nambu M, Ishihara M, Fujita M, et al. Enhancement of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97:373–80.
- 13) Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204:322–30.
- 14) Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest.* 1985;76:2323–9.
- 15) Marx R, Carlson E, Eichstaedt R, Schimmele S, Strauss J, Georgeff K. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638–46.
- 16) Driver VR, Hanft J, Fylling CP, Beriou JM. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage.* 2006;52:68–70, 72, 74 passim.
- 17) Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns.* 2010;36:4–8.
- 18) Schade VL, Roukis TS. Use of platelet-rich plasma with split-thickness skin grafts in the high-risk patient. *Foot Ankle Spec.* 2008;1:155–9.
- 19) Waiker VP, Shivalingappa S. Comparison between Conventional Mechanical Fixation and Use of Autologous Platelet Rich Plasma ( PRP ) in

- Wound Beds Prior to Resurfacing with Split Thickness Skin Graft. *World J Plastic Surg.* 2015;4:50–9.
- 20) Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:298–307.
  - 21) 聖マリアンナ医科大学病院. 多血小板血漿を用いた難治性皮膚潰瘍治療.  
[http://www.marianna-u.ac.jp/hospital/daigakubyuin/koudo/koudo\\_03.html](http://www.marianna-u.ac.jp/hospital/daigakubyuin/koudo/koudo_03.html) [cited 2016-3-30].
  - 22) Danielsen P, Jørgensen B, Karlsmark T, Jørgensen LN, Agren MS. Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1431–40.
  - 23) Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:521–8.
  - 24) Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y. Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12:77–88.
  - 25) Yazawa M, Ogata H, Nakajima T, Mori T, Watanabe N, Handa M. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant.* 2003;12:509–18.
  - 26) Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikeda T, et al. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg.* 2009;50:870–9.e2.
  - 27) Takikawa M, Sumi Y, Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, Yanagibayashi S, et al. PRP&F/P MPs improved survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats. *J Surg Res.* 2011;170:e189–96.



- 28) Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Ishihara M, Kishimoto S, Sasaki K, et al. Enhanced effect of platelet-rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatologic Surg.* 2011;37:1721–9.
- 29) Takikawa M, Ishihara M, Takabayashi Y, Sumi Y, Takikawa M, Yoshida R, et al. Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with PRP-containing fragmin/protamine microparticles (PRP&F/P MPs). *J Plast Surg Hand Surg.* 2015;1–7.
- 30) Ishihara M, Ono K. Structure and function of heparin and heparan sulfate; heparinoid library and modification of FGF-activities. *Trends Glycosci Glycotechnol.* 1998;10:223–33.
- 31) Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 1991;71:481–539.
- 32) Tanaka Y, Kimata K, Adams DH, Eto S. Modulation of cytokine function by heparan sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110:118–25.
- 33) Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest.* 2001;119:64S – 94S.
- 34) Wolzt M, Weltermann A, Nieszpaur-Los M, Schneider B, Fassolt A, Lechner K, et al. Studies on the neutralizing effects of protamine on unfractionated and low molecular weight heparin (Fragmin) at the site of activation of the coagulation system in man. *Thromb Haemost.* 1995;73:439–43.
- 35) Pan M, Suárez de Lezo J, Medina A, Romero M, Hernández E, Segura J, et al. In-laboratory removal of femoral sheath following protamine

- administration in patients having intracoronary stent implantation. *Am J Cardiol.* 1997;80:1336–8.
- 36) Ishihara M, Kishimoto S, Takikawa M, Mori Y, Nakamura S, Fujita M. Low-molecular-weight heparin and protamine-based polyelectrolyte nano complexes for protein delivery (a review article). *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011;2:500–9.
- 37) Mori Y, Nakamura S, Kishimoto S, Kawakami M, Suzuki S, Matsui T, et al. Preparation and characterization of low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles (LMW-H/P NPs) as FGF-2 carrier. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:147–55.
- 38) Kishimoto S, Ishihara M, Takikawa M, Mori Y, Hattori H, Fujita M, et al. Novel experimental and clinical therapeutic uses of low-molecular-weight heparin/protamine microparticles. *Pharmaceutics.* 2012;4:42–57.
- 39) Sclafani AP, Azzi J. Platelet Preparations for Use in Facial Rejuvenation and Wound Healing: A Critical Review of Current Literature. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39:495–505.
- 40) Kakudo N, Kushida S, Minakata T, Suzuki K, Kusumoto K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. *Med Mol Morphol.* 2011;44:233–6.
- 41) 松本茂, 田中里佳, 岡田佳世子, 有田佳代, 百束比古, 宮本正章, et al. 塩基性線維芽細胞増殖因子徐放化ゼラチンシートを用いた難治性皮膚潰瘍治療. *再生医療.* 2015;14:42–7.
- 42) 河合勝也, 森本尚樹. bFGF徐放性人工真皮の基礎的評価と臨床応用について. *形成外科.* 2015;58:1303–13.
- 43) 鬼塚卓弥. 形成外科手術書.基礎編.改訂第3版. 南江堂; 1996. 72-73 p.
- 44) 川添剛, 鈴木茂彦. 植皮と血管新生・血管吻合 これまでのあゆみ、現状、今後の展望. *医学のあゆみ.* 2006;219:503–6.

- 45) O'Ceallaigh S, Herrick SE, Bluff JE, McGrouther DA, Ferguson MWJ. Quantification of total and perfused blood vessels in murine skin autografts using a fluorescent double-labeling technique. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:140–51.
- 46) Smahel J, Ganzoni N. Contribution to the origin of the vasculature in free skin autografts. *Br J Plast Surg.* 1970;23:322–5.
- 47) 厚生労働省医政局研究開発振興課. 事務連絡「再生医療等の安全性の確保等に関する法律等に関するQ&A について」平成26年11月21日.
- 48) Takikawa M, Nakamura S, Ishihara M, Takabayashi Y, Fujita M, Hattori H, et al. Improved angiogenesis and healing in crush syndrome by fibroblast growth factor-2–containing low-molecular-weight heparin (Fragmin)/protamine nanoparticles. *J Surg Res.* 2015;196:247–57.
- 49) 副島一孝, 田邊裕美, 櫻井裕之, 八巻隆, 河野太郎, 野崎幹弘. 血小板由来細胞増殖因子(PDWHF). *形成外科.* 2009;52:509–15.

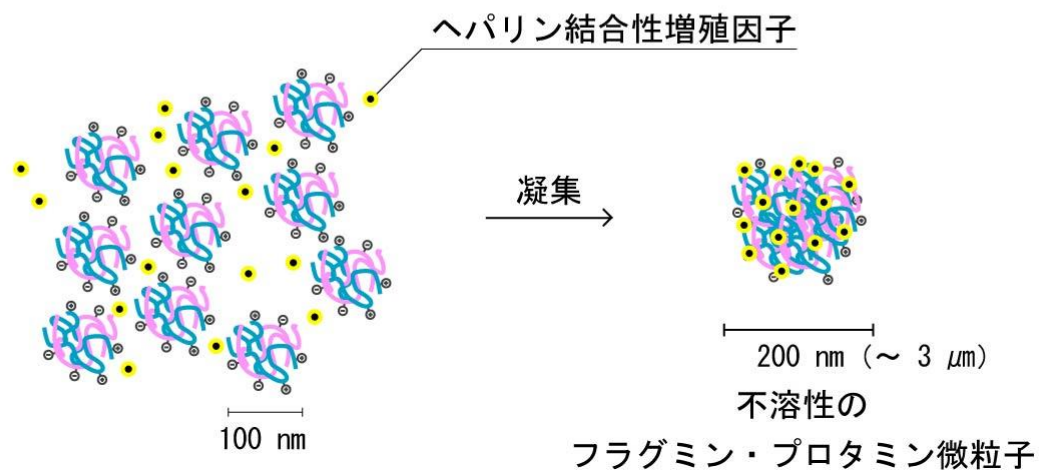
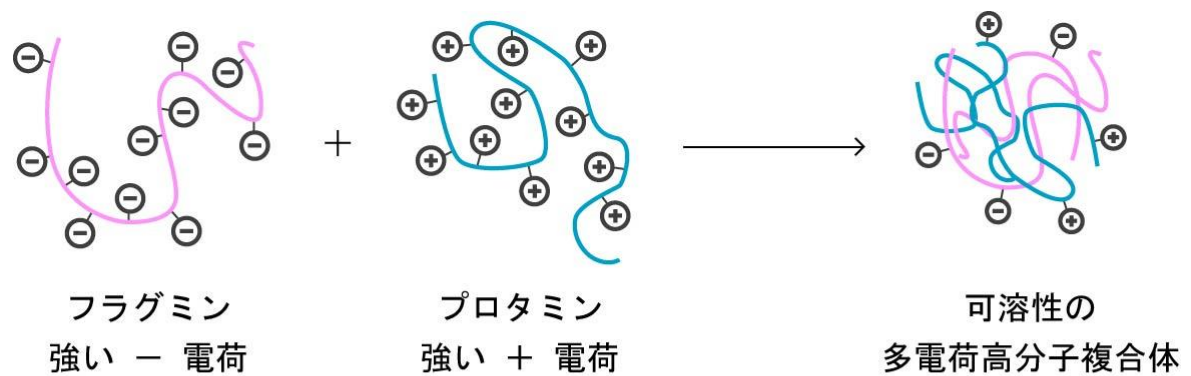


図1 フラグミン・プロタミン微粒子

強いマイナス電荷を帯びたフラグミンと、強いプラス電荷を帯びたプロタミンを混和すると、直径約 100 nm の可溶性の多電荷高分子複合体を形成する。この複合体が凝集して、直径約 200 nm ~ 3 μm の不溶性の F/P 微粒子が形成される。

(参考文献 38、Figure 3 より引用、改変)

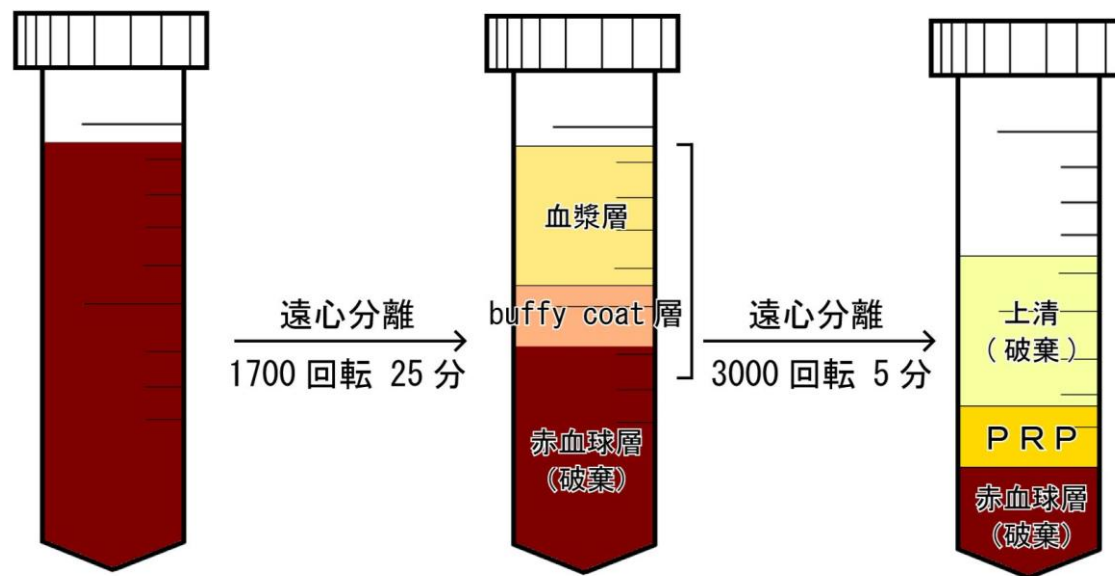


図2 PRP の作成方法 (double spin 法)

血液を 1700 回転、25 分間遠心分離し、底部から赤血球層、buffy coat 層、血漿層の 3 層に分離した。buffy coat 層と血漿層を別の遠沈管に移し替え、3000 回転、5 分間の遠心分離を行った。採血量 10 mL に対して 1 mL になるように上清を捨てた残りを PRP とした。

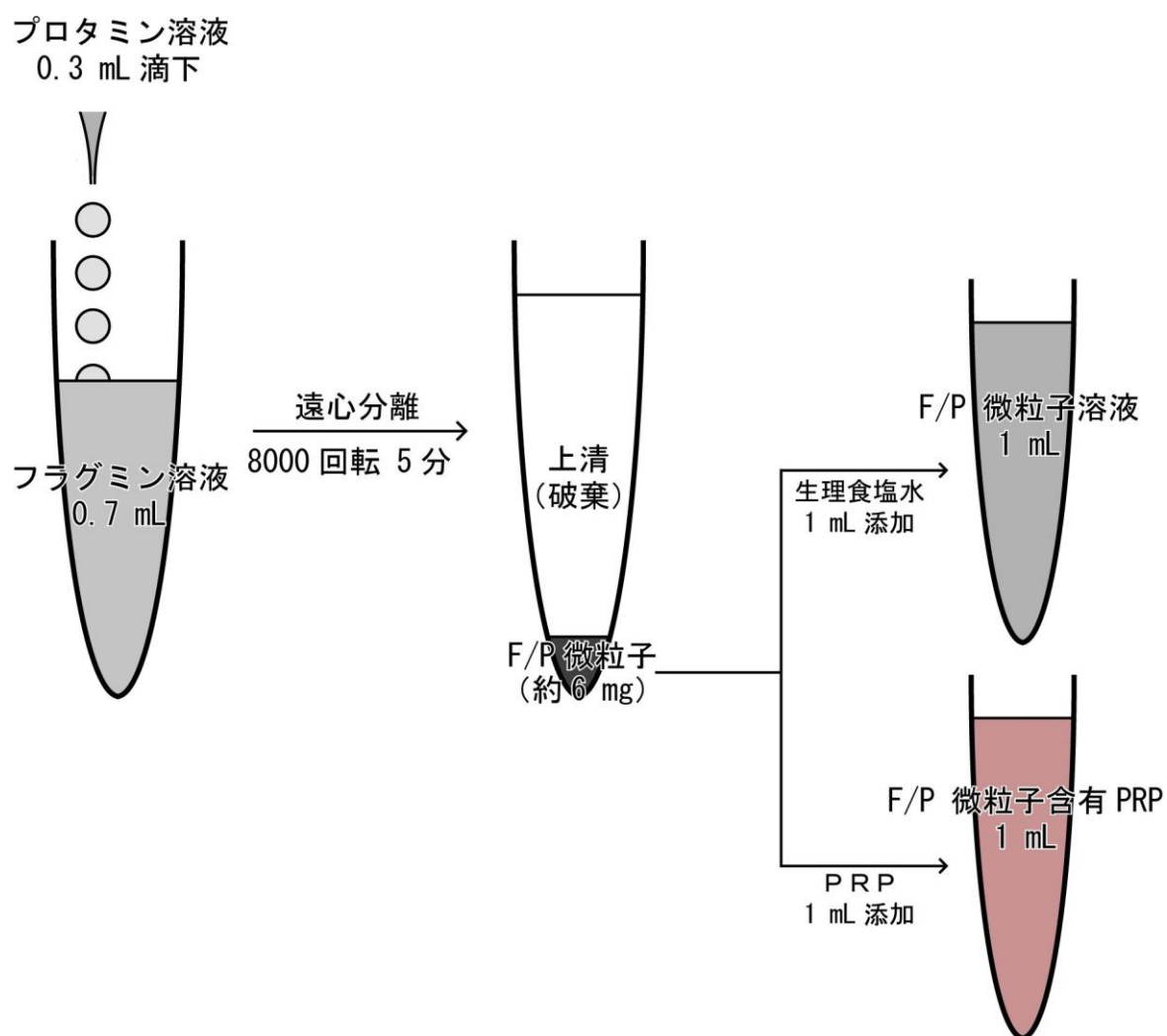


図 3 F/P 微粒子と試験薬の作製方法

0.7 mL のフラグミン溶液 (6.4 mg/mL) に 0.3 mL のプロタミン溶液 (10 mg/mL) を滴下し、約 2 分間攪拌した後、8000 回転、5 分間の遠心分離を行い、沈殿する約 6 mg の F/P 微粒子を得た。この F/P 微粒子に生理食塩水を加えたものを F/P 微粒子溶液、PRP を加えたものを F/P 微粒子含有 PRP とした。

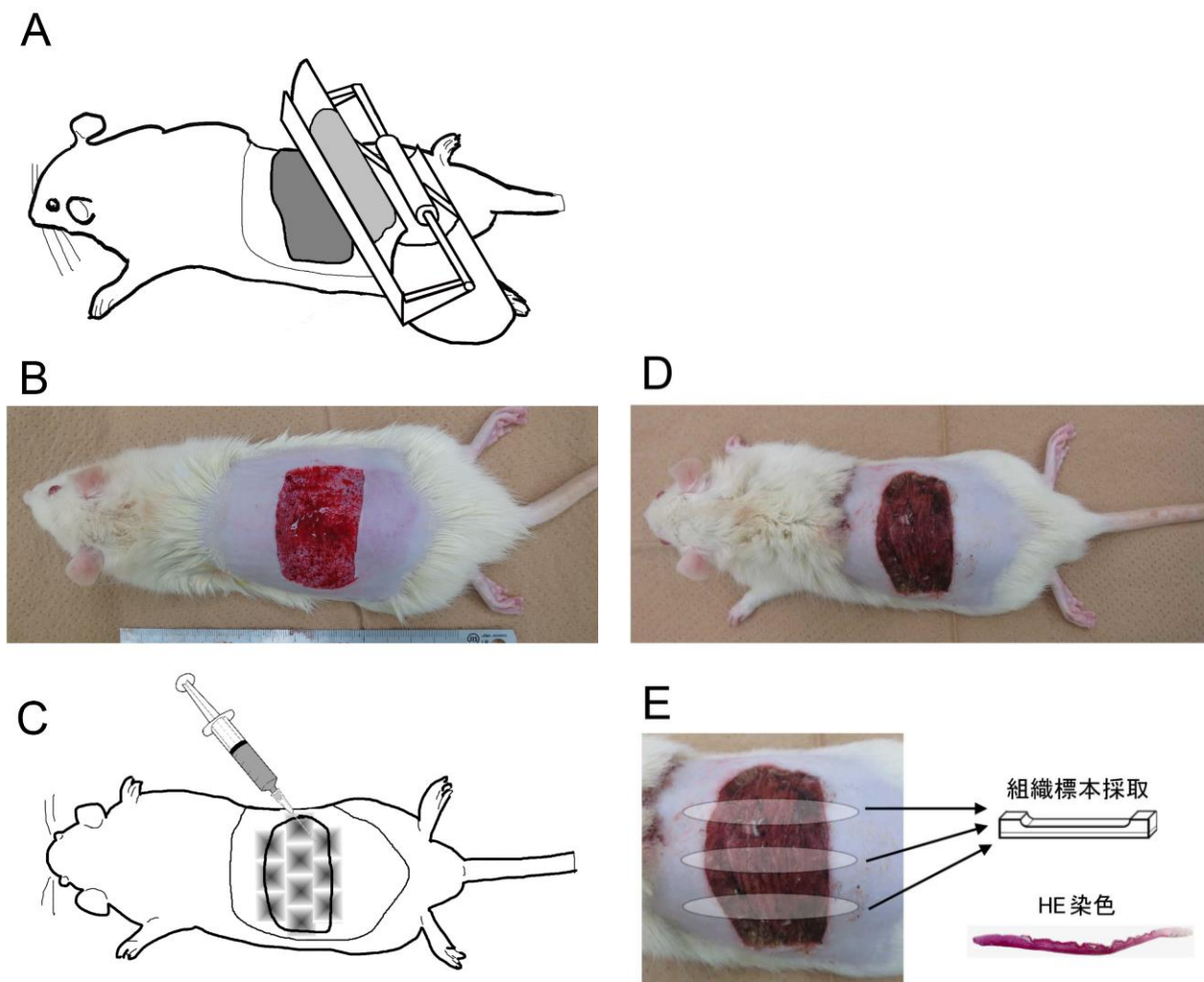


図4 ラット分層採皮創モデル

- A 手動式デルマトームでラット背部に分層採皮創を作製した。
- B 分層採皮創作成直後の外観
- C 皮内注射
- D 処置後3日目の外観。創部は痂皮でおおわれていた。
- E 1個体から3回、組織標本を採取した。

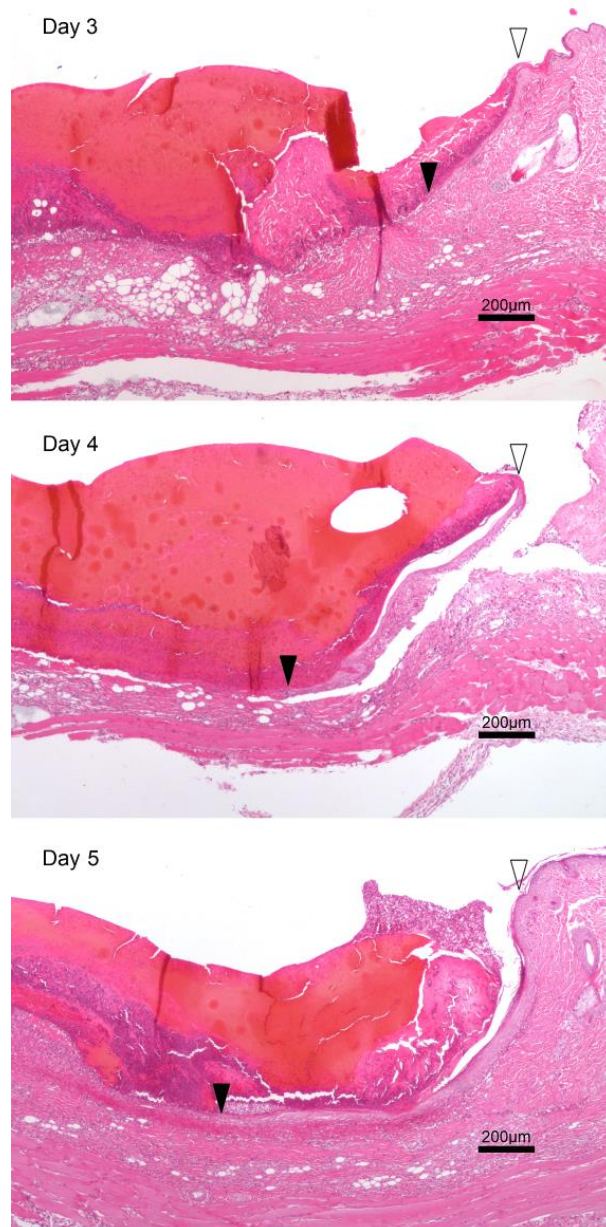


図5 創縁からの上皮再生の1例（HE 染色）

上段から順に処置後3、4、5日目の組織標本画像で、F/P 微粒子含有 PRP 群の1例である。白い三角形（▽）は創縁を示し、黒い三角形（▼）は再生した上皮の先端を示している。創縁から再生上皮の先端までを再生上皮長として計測した。



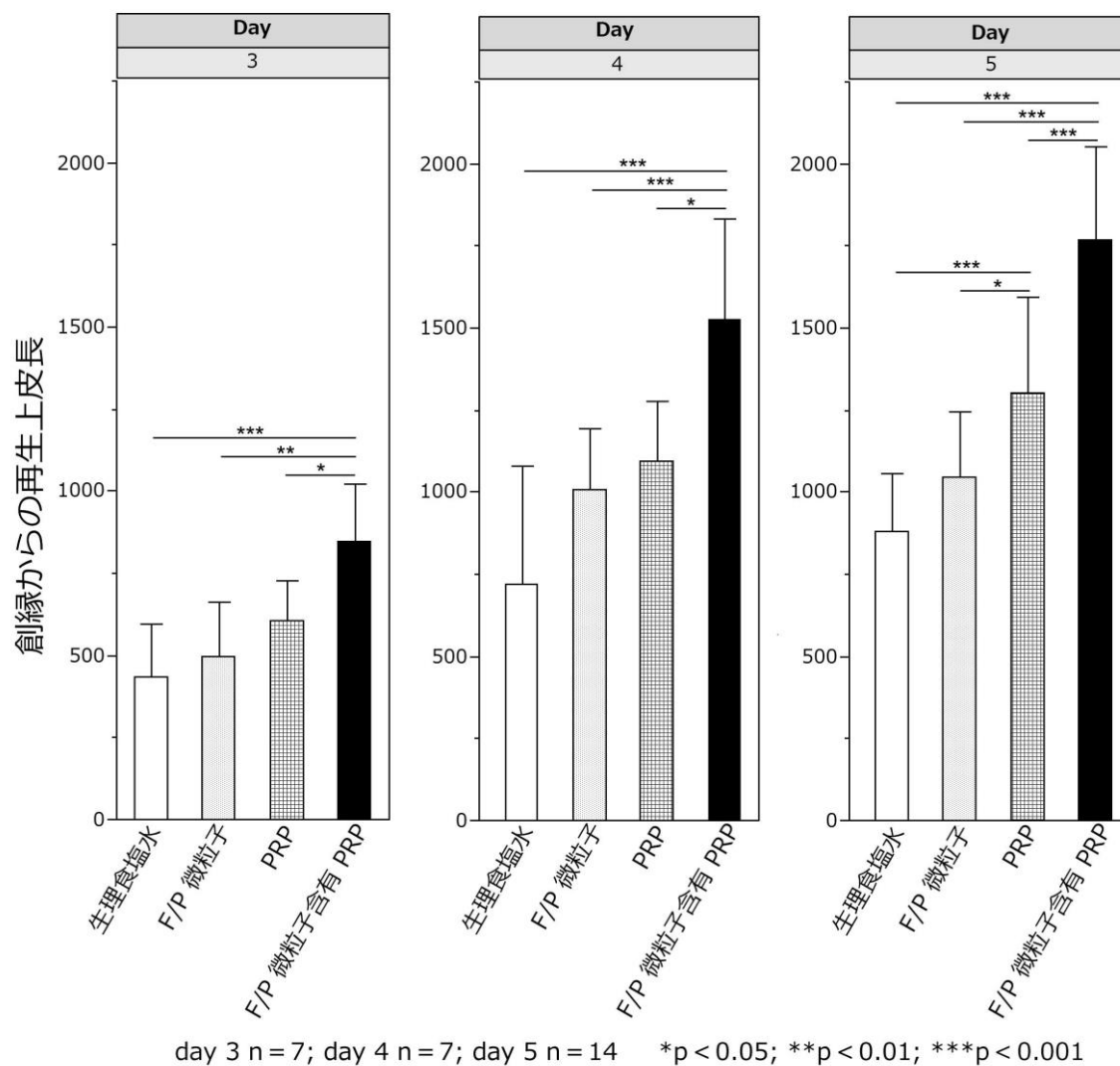


図6 創縁からの再生上皮長

F/P 微粒子含有 PRP 群は他群と比較し有意に再生上皮長は長く、F/P 微粒子含有 PRP の上皮再生促進効果が認められた。(Day 3、4: n = 7、Day 5: n = 14、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001)

Day 7

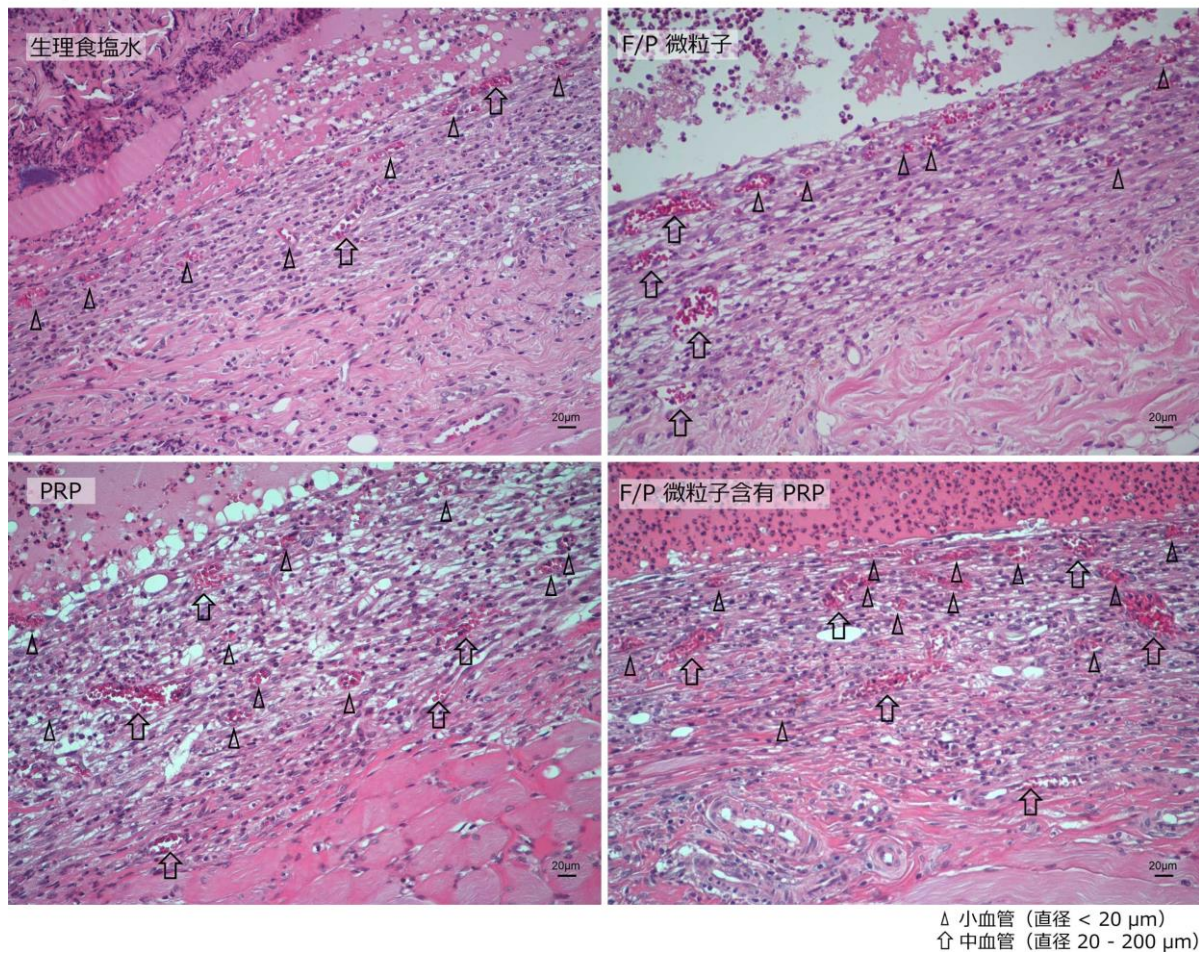


図7 肉芽組織中の新生血管（分層採皮創部、Day 7、HE 染色）

各群の肉芽の組織標本の1例である。三角形（Δ）は小血管を示し、矢印（⇧）は中血管を示している。F/P 微粒子含有 PRP 群で多くの新生血管が認められた。

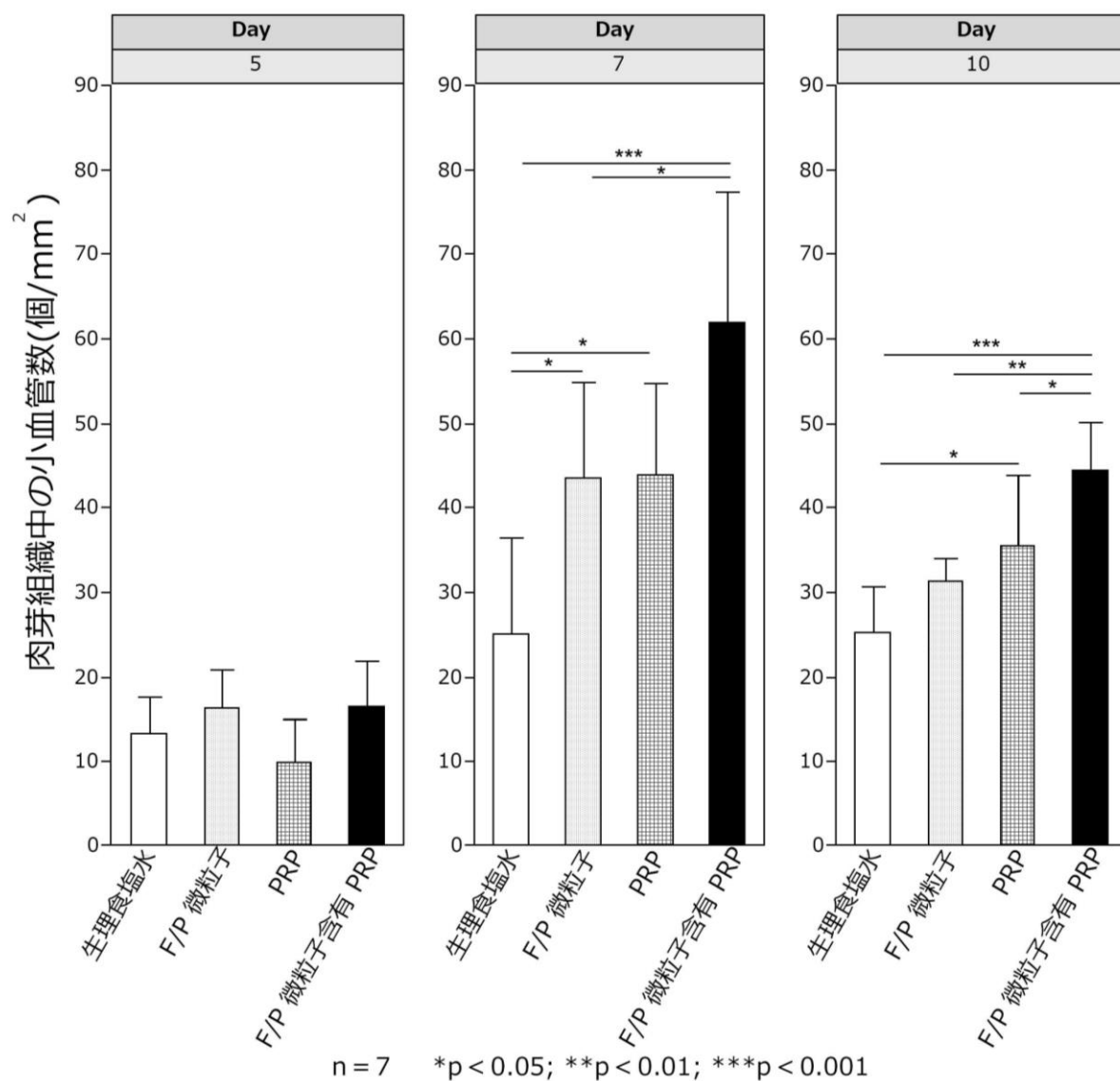


図 8 肉芽組織中の小血管数（分層採皮創部）

Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と F/P 微粒子群に対し、  
Day 10 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、肉芽組織中の小血管数は有意に増加していた。（n = 7、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001）

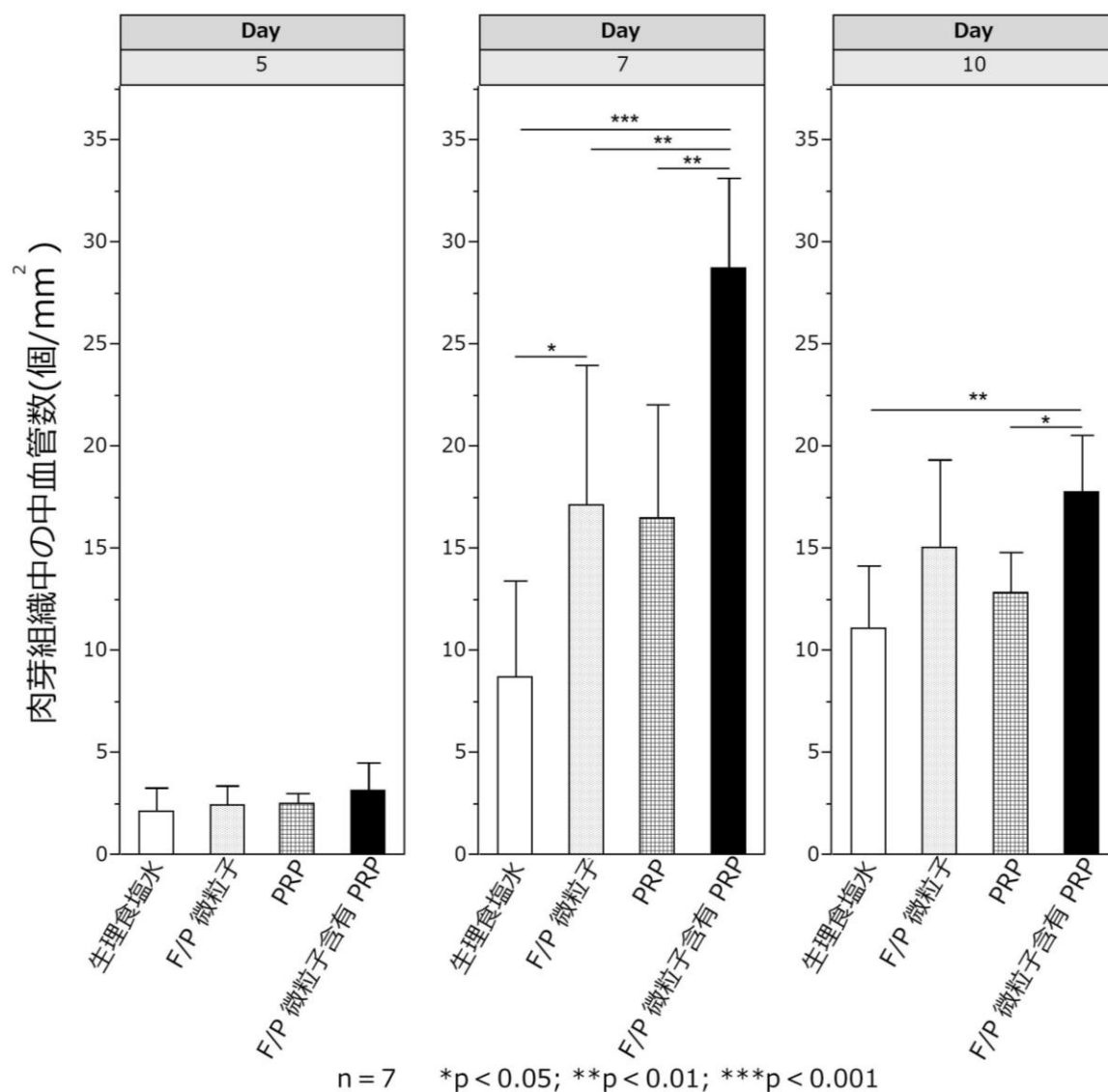


図9 肉芽組織中の中血管数（分層採皮創部）

Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、Day 10 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と PRP 群に対し、肉芽組織中の中血管数は有意に増加していた。（n = 7、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001）



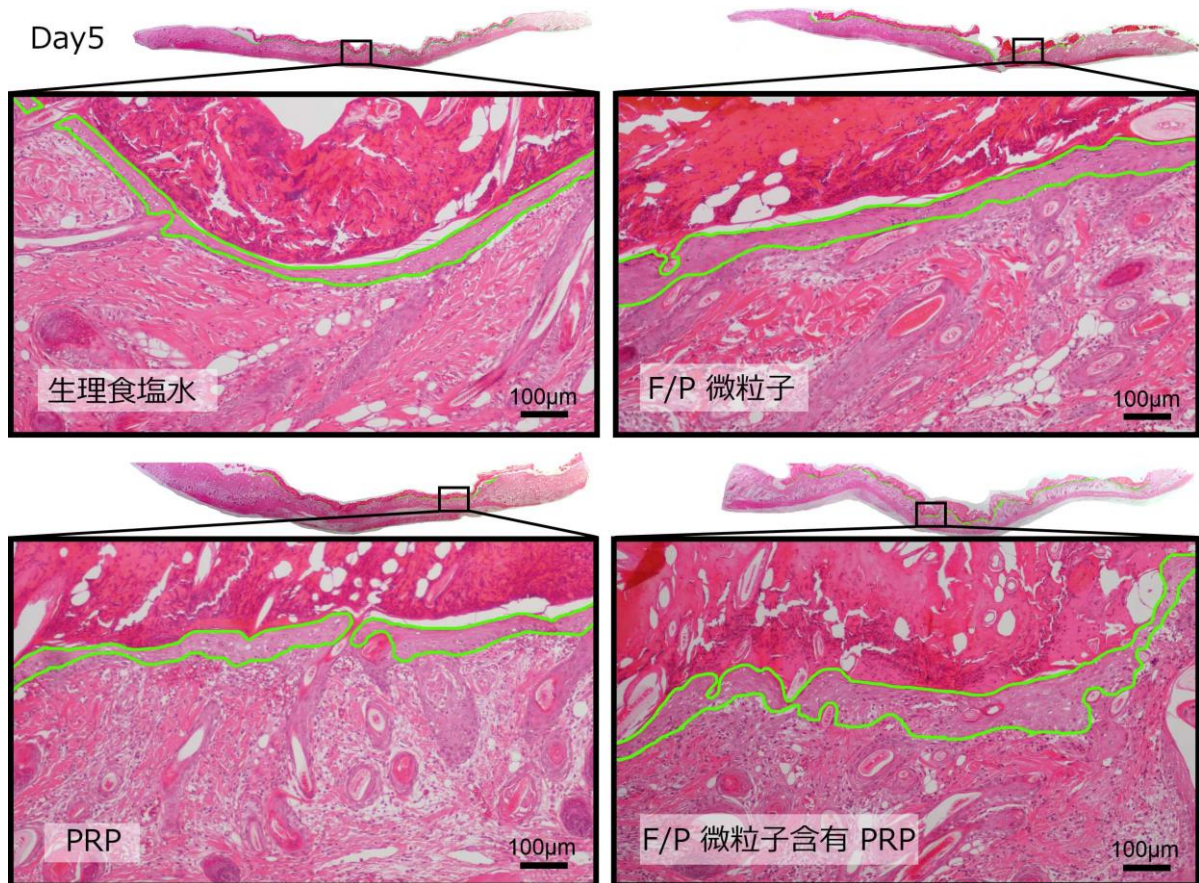


図 10 再生上皮の代表的顕微鏡写真 (Day 5、HE 染色)

各群の分層採皮創部の組織標本の 1 例である。再生上皮は 2 本の線で囲まれた部分である。F/P 微粒子含有 PRP 群でより厚みのある再生上皮が認められた。

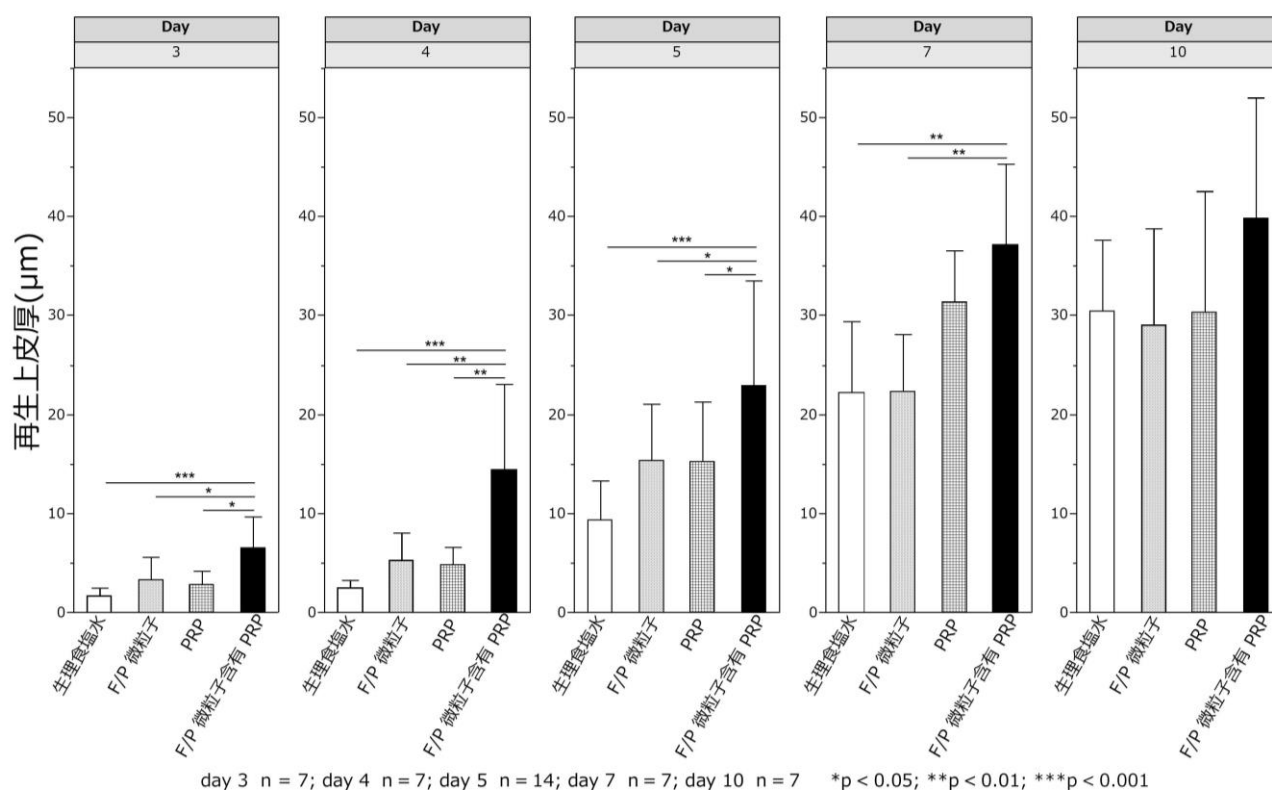


図 11 再生上皮厚

Day 3、4、5 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と F/P 微粒子群に対し、再生上皮厚の有意な増加を認めた。(Day 3、4、7、10: n = 7、Day 5: n = 14、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001)

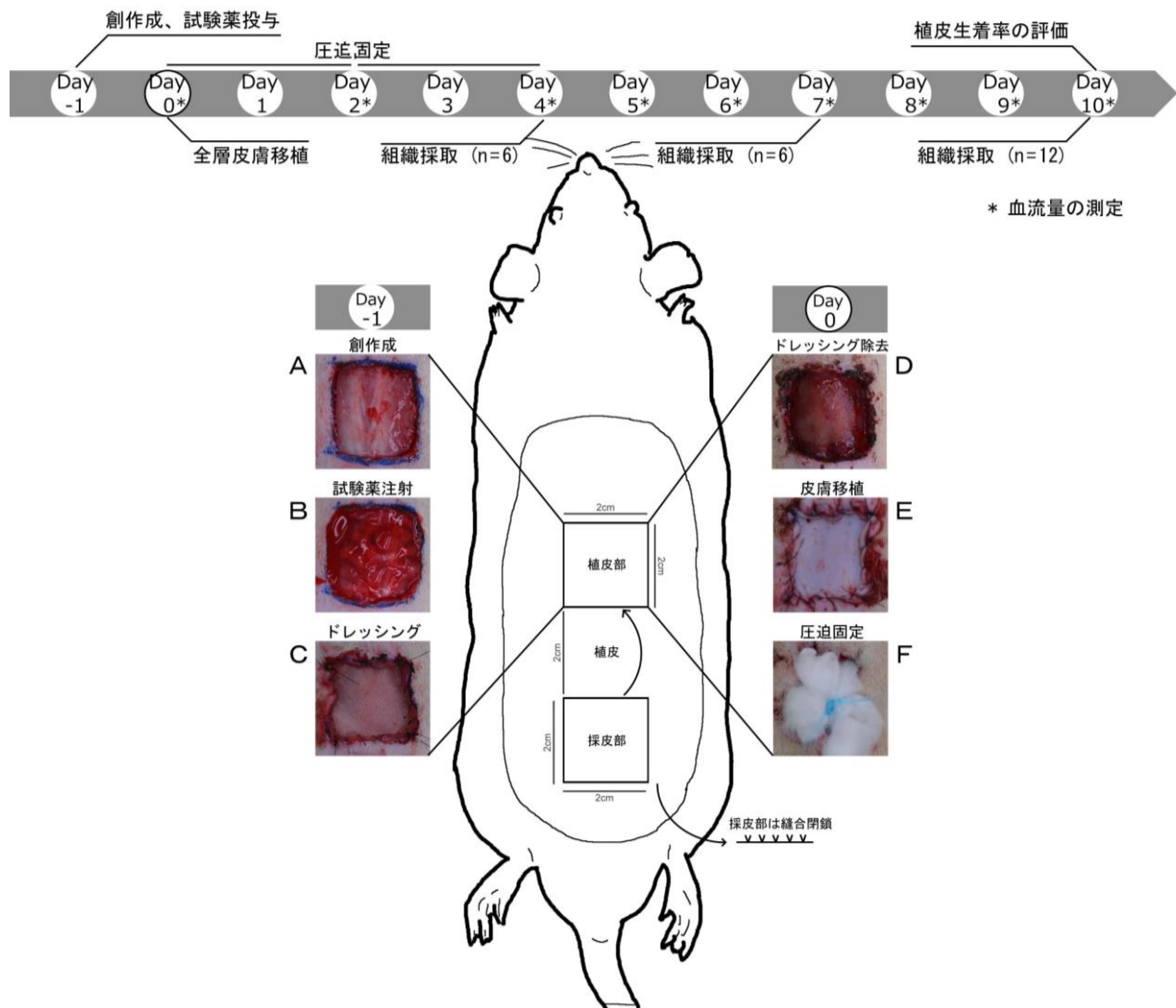
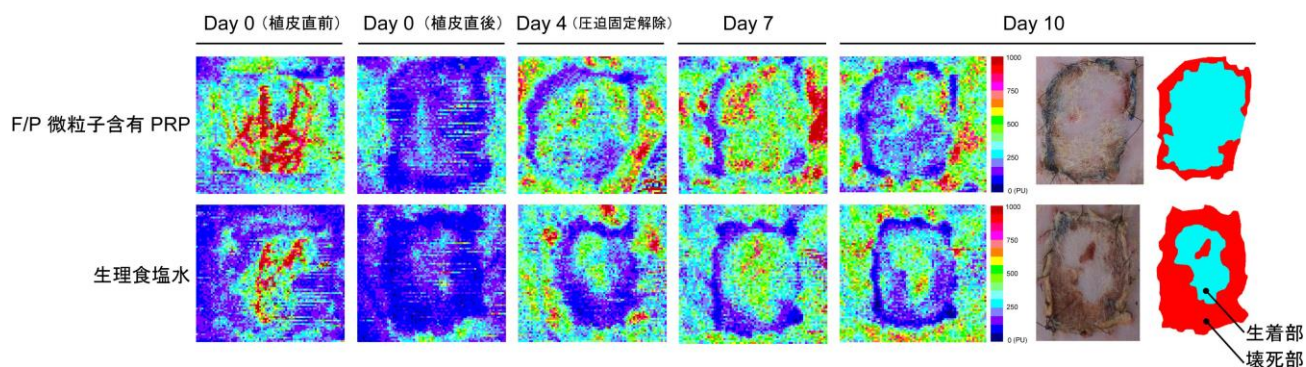


図 12 ラット全層植皮モデル

- A ラット背部中央に 2 cm × 2 cm の全層皮膚欠損創を作製した。
- B 試験薬 0.5 mL をまんべんなく創部に注射した。
- C 創傷被覆材で被覆
- D 創作製翌日の創部。表面に肉芽組織の形成が認められた。
- E 尾側背部から採取した 2 cm × 2 cm の皮膚を移植した。
- F 4 日間圧迫固定した。



$$\text{植皮生着率 (\%)} = \frac{\text{生着部面積}^*}{\text{生着部面積}^* + \text{壊死部面積}^*}$$

\* 単位は pixel

図 13 ドップラー血流量計の画像の 1 例と植皮生着率の測定

F/P 微粒子含有 PRP 群と生理食塩水群の Day 0、4、7、10 のドップラー血流量計の画像の 1 例である。この例では Day 0（植皮直前）、Day 4、Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群で生理食塩水群よりも特に高い血流信号が得られた。

Day 10 の外観の写真から生着部と壊死部を区分し、植皮生着率を求めた。



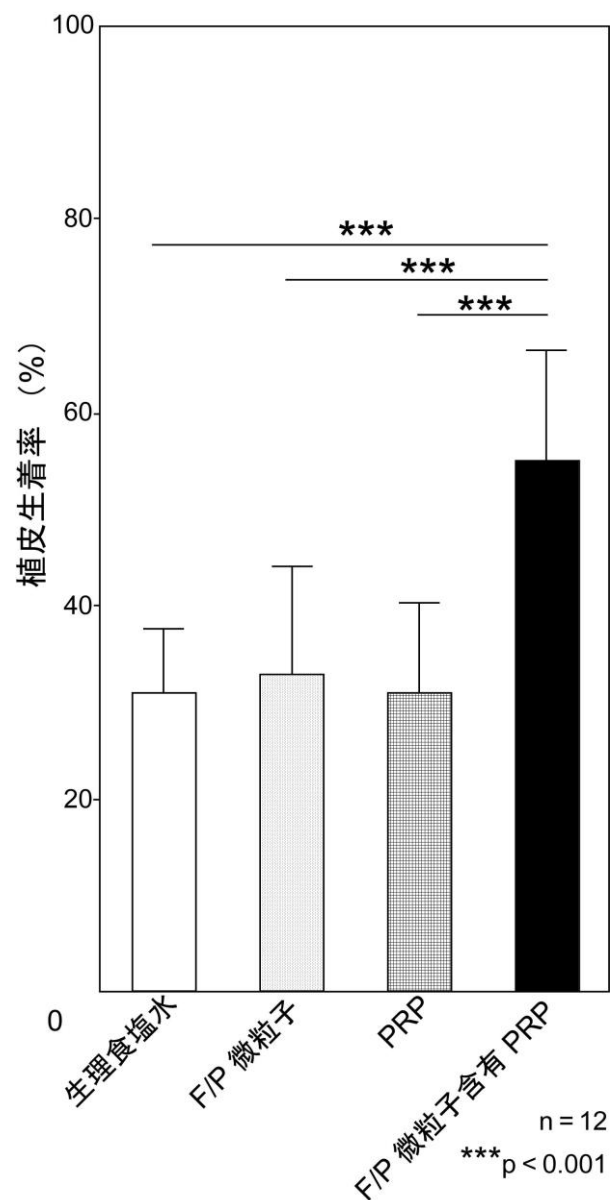


図 14 植皮生着率

Day 10 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、植皮生着率の向上を認めた。(n = 12、\*\*\*p < 0.001)

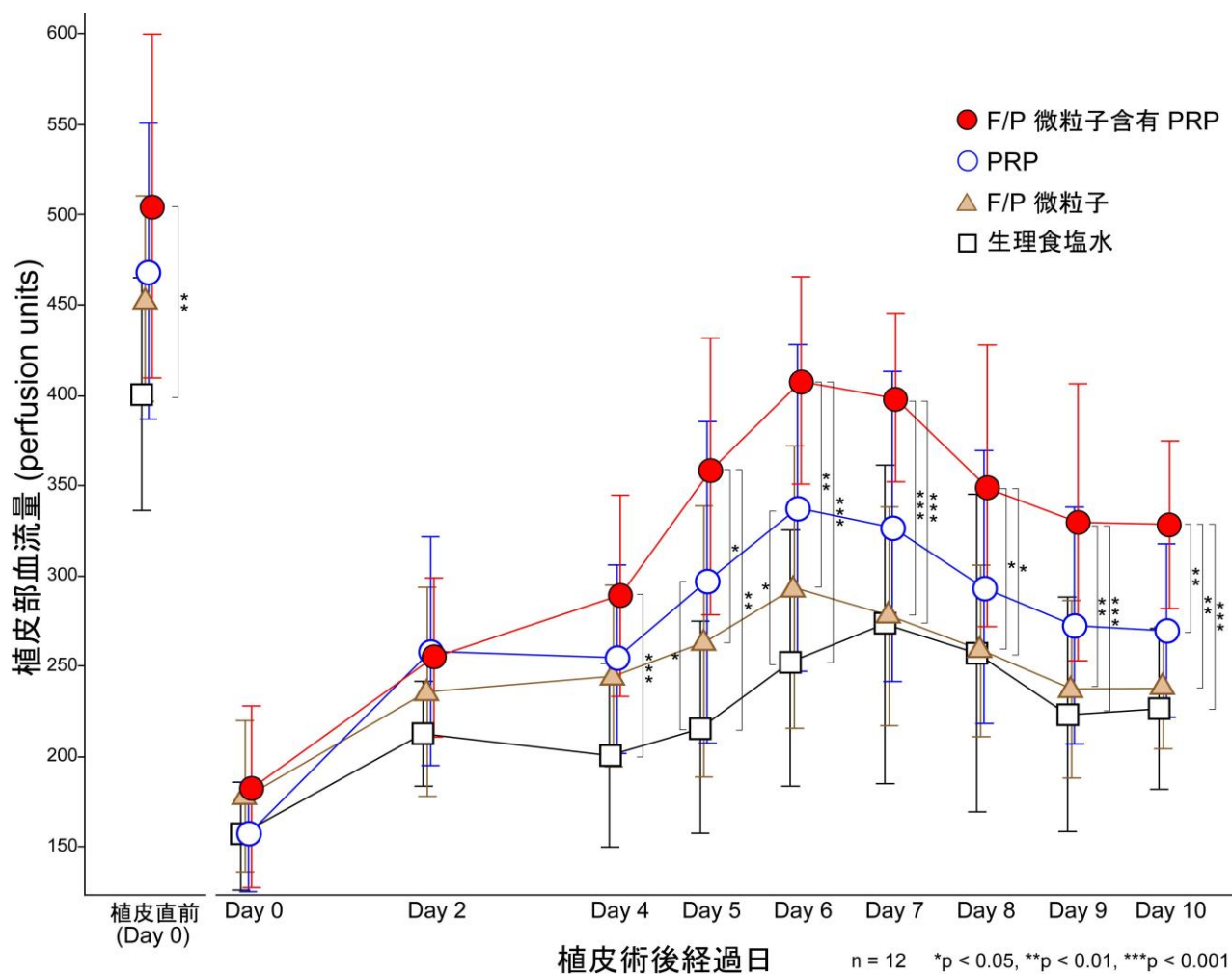


図 15 植皮部血流量

植皮部血流量は圧迫固定解除した Day 4 以降急速に回復し、Day 6、Day 7 でピークとなりその後減少した。F/P 微粒子含有 PRP 群は Day 4 以降生理食塩水群と、Day 5 以降は F/P 微粒子群と有意差が認められた。また Day 10 において PRP 群との有意差も認められた。(n = 12、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001)

Day 7

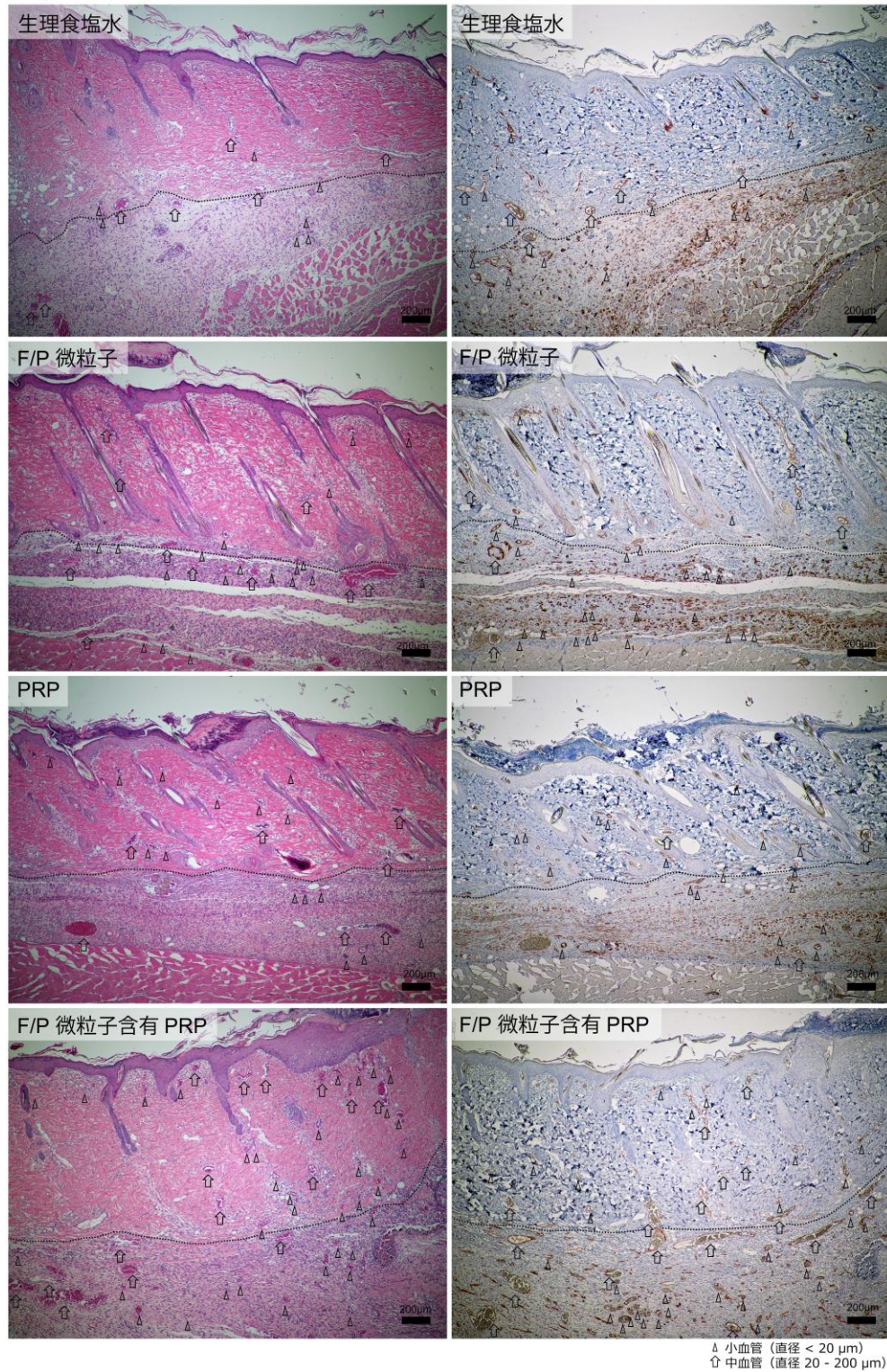


図 16 植皮部の新生血管 (Day 7、左 : HE 染色、右 : CD34 抗体免疫染色)  
各群の植皮部の組織標本の 1 例である。三角形 (△) は小血管、矢印 (⇧) は中血管を示し、破線は植皮片と移植床の境界を示している。F/P 微粒子含有 PRP 群で多くの新生血管が認められた。

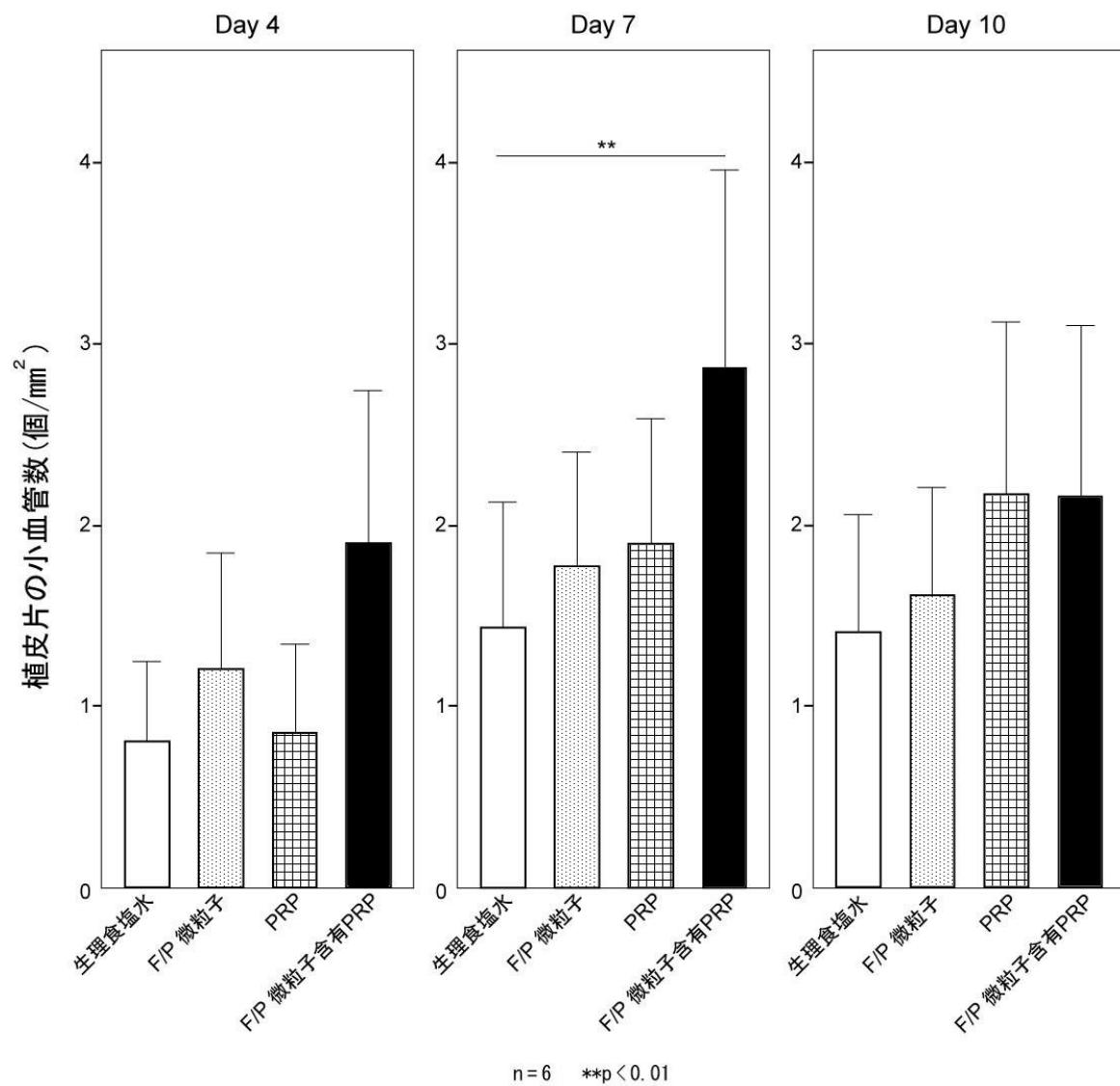


図 17 植皮片の小血管数

Day 7においてF/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と植皮片の小血管数は有意に増加していた。(n = 6、\*\*p < 0.01)



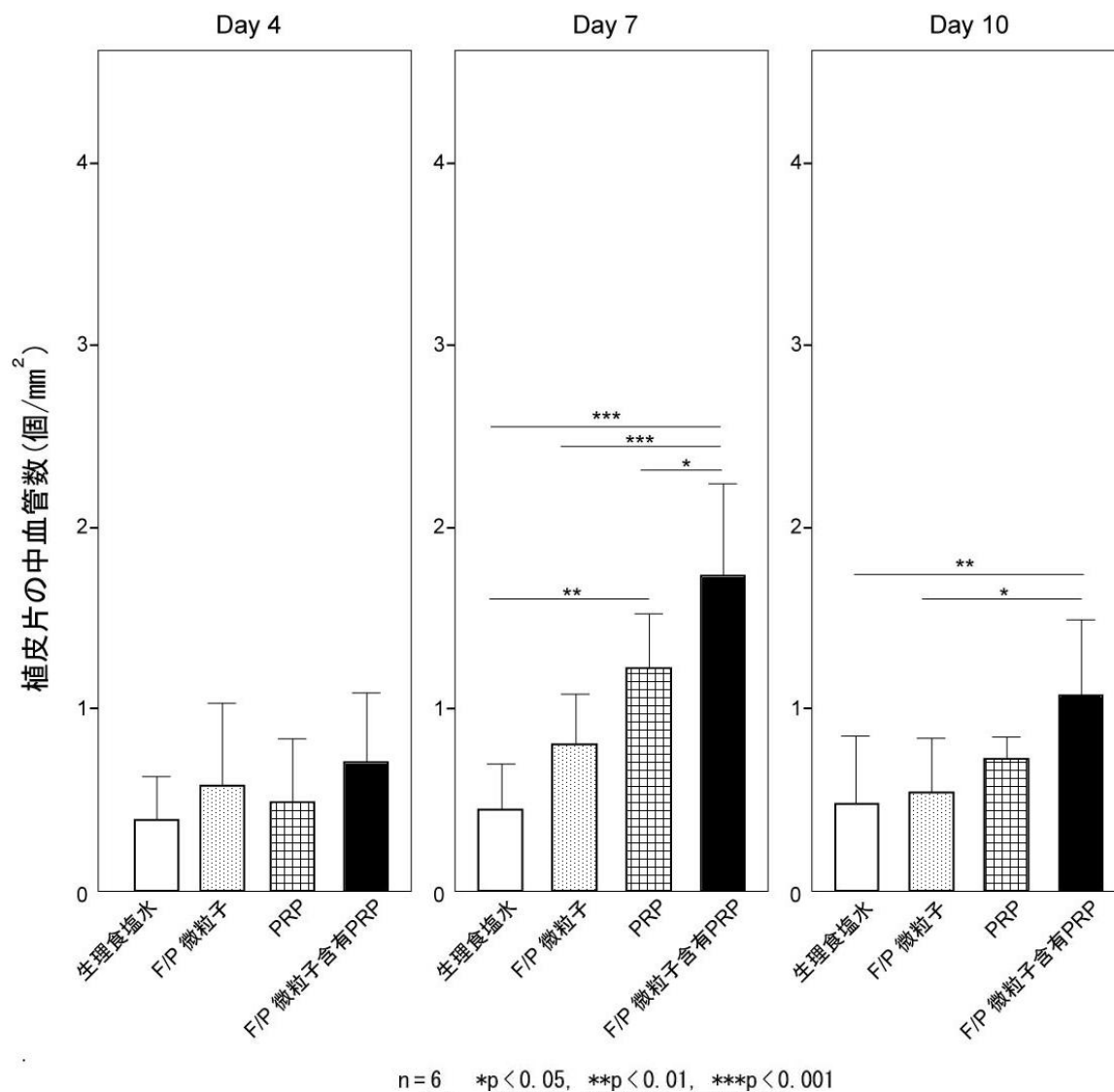


図 18 植皮片の中血管数

Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、Day 10 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と F/P 微粒子群に対し、全層植皮片の中血管数は有意に増加していた。(n = 6、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001)

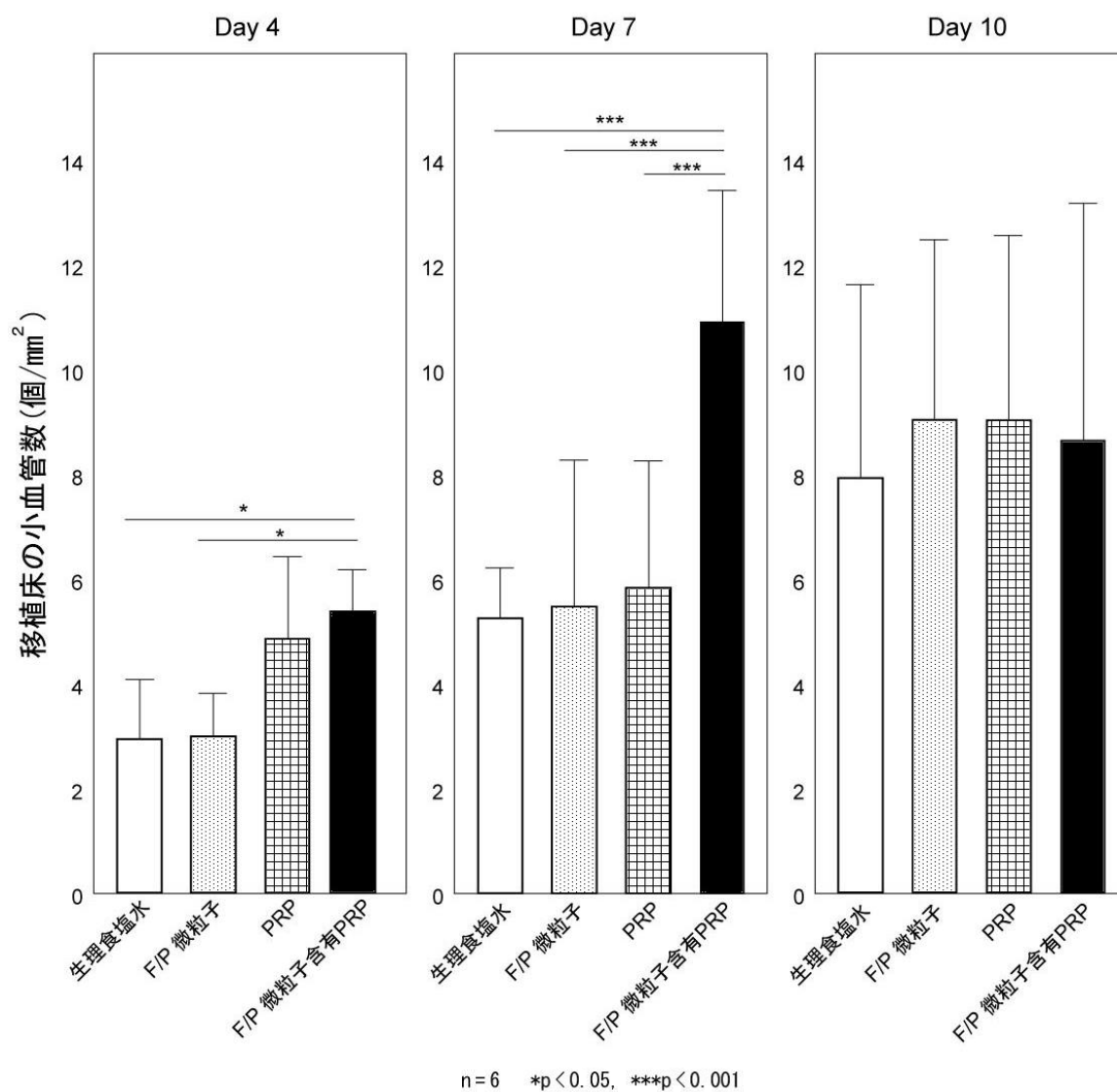


図 19 移植床の小血管数

Day 4 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と F/P 微粒子群に対し、Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は他群すべてに対し、移植床の小血管数は有意に増加していた。(n = 6、\*p < 0.05、\*\*\*p < 0.001)

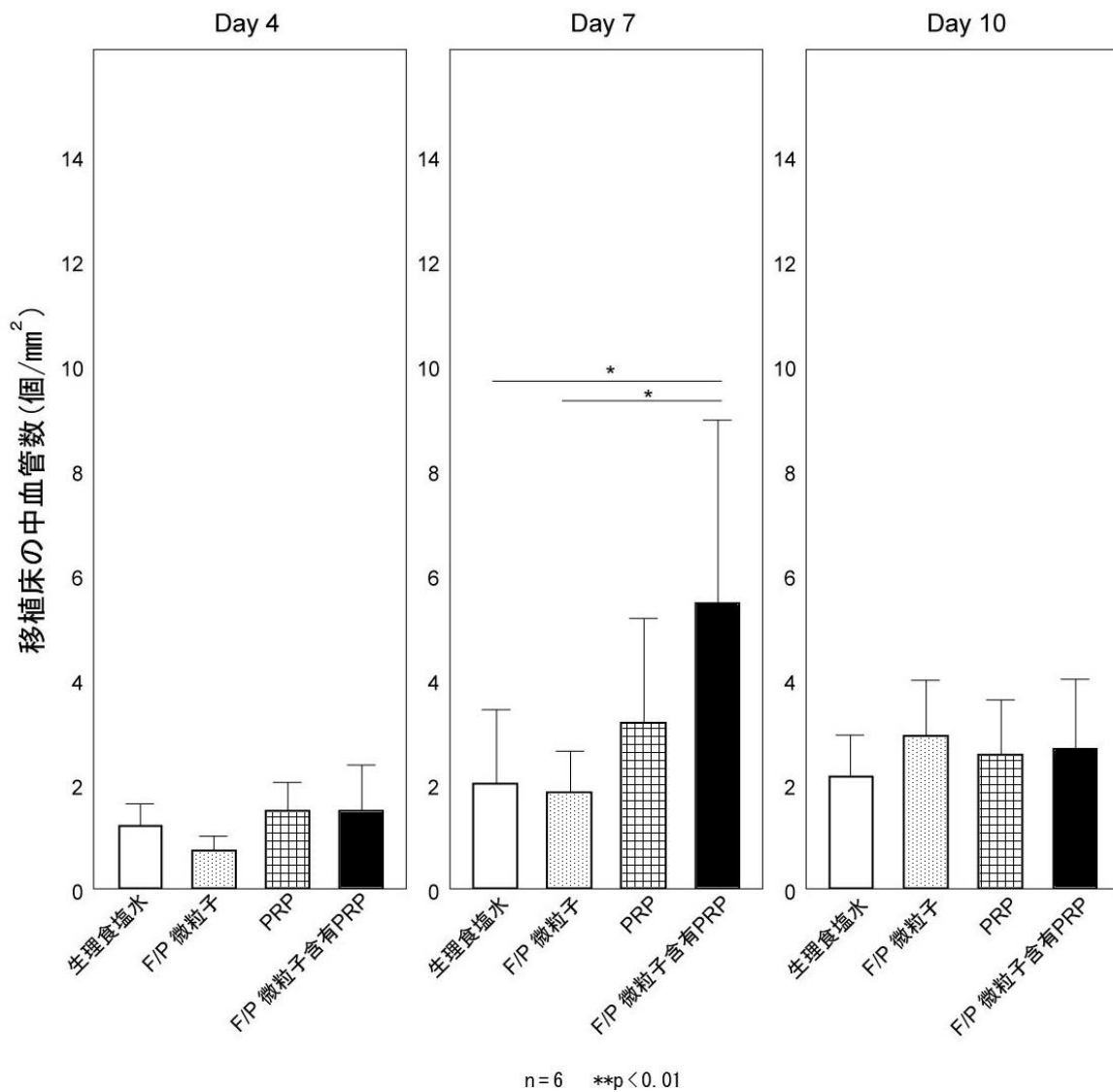


図 20 移植床の中血管数

Day 7 において F/P 微粒子含有 PRP 群は生理食塩水群と F/P 微粒子群に対し移植床の中血管数は有意に増加していた。(n = 6、\*p < 0.05)

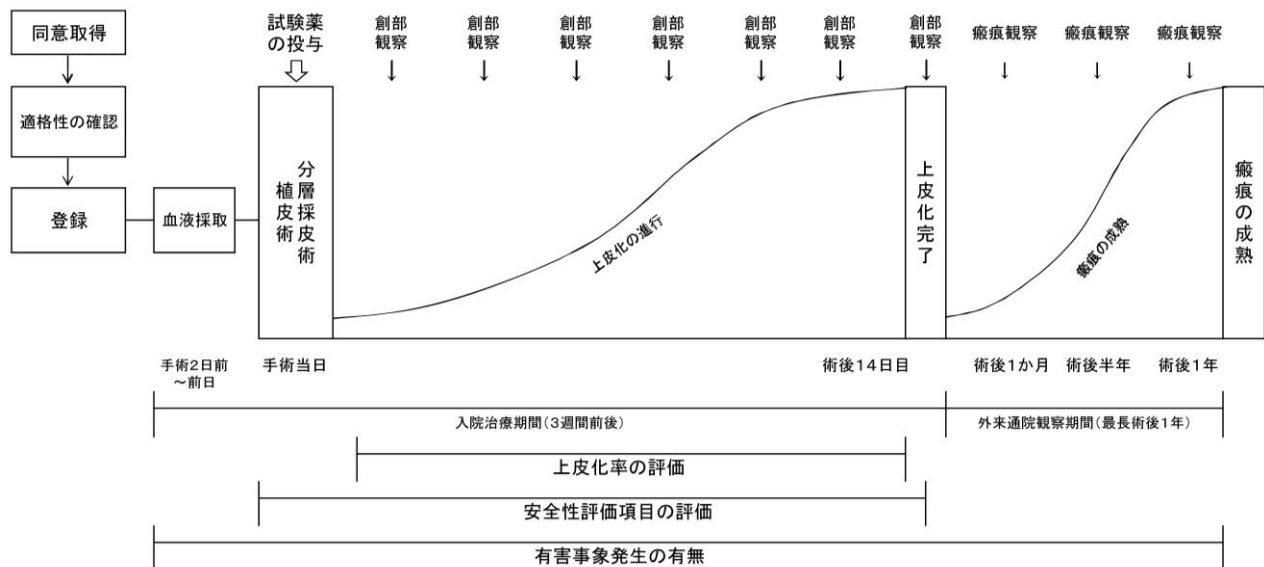


図 21 臨床研究のフローチャート

主要評価項目の評価、安全性評価項目の評価は上皮化完了まで、有害事象発生の有無は外来通院が終了するまで（最長術後 1 年）と計画した。



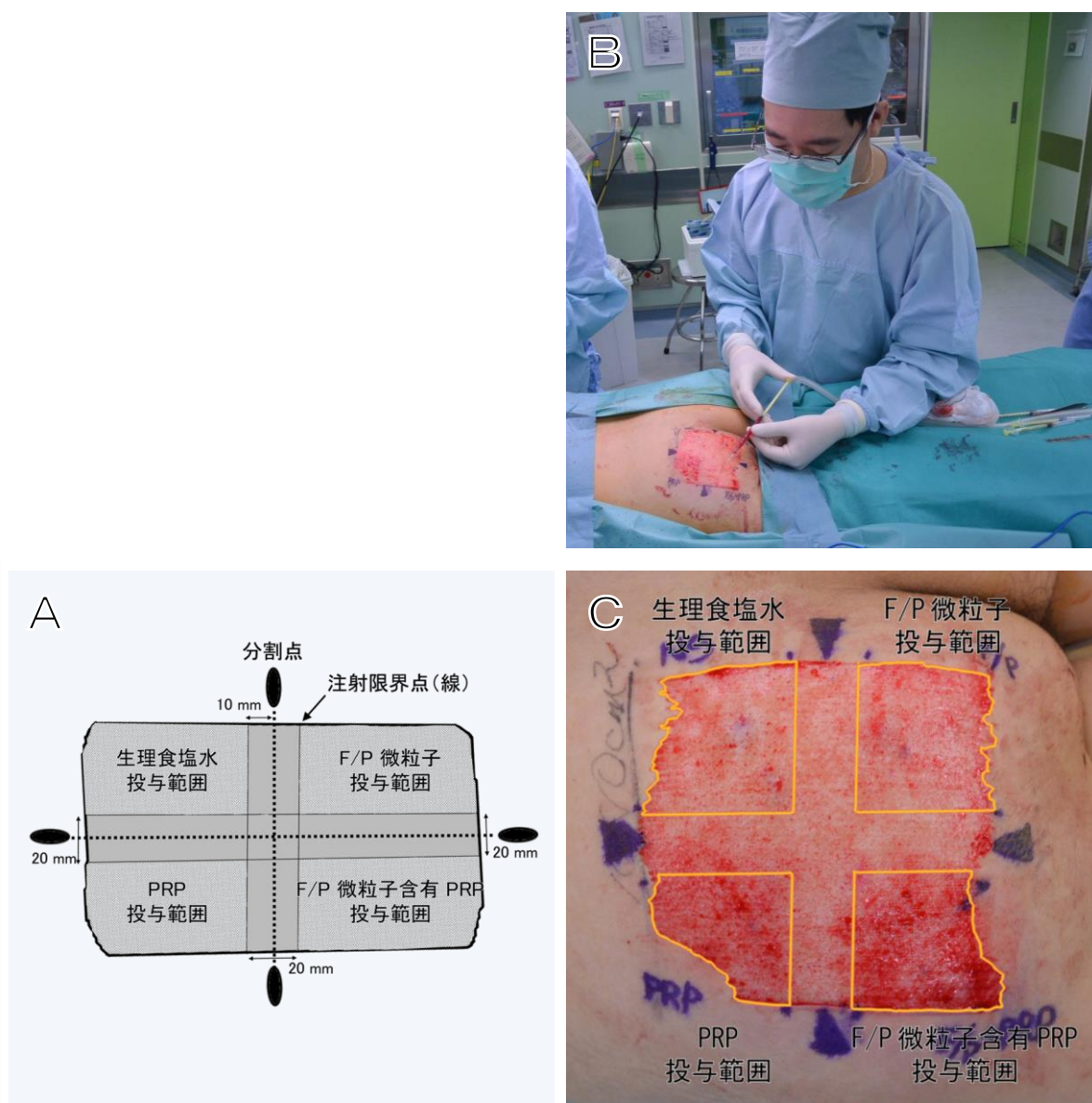


図 22 試験薬投与

- A 試験薬投与範囲の模式図。図に示した投与範囲内に試験薬を注射した。
- B 試験薬投与の様子
- C 試験薬投与直後の分層採皮創。黄色線で示した範囲内に試験薬を注射した。

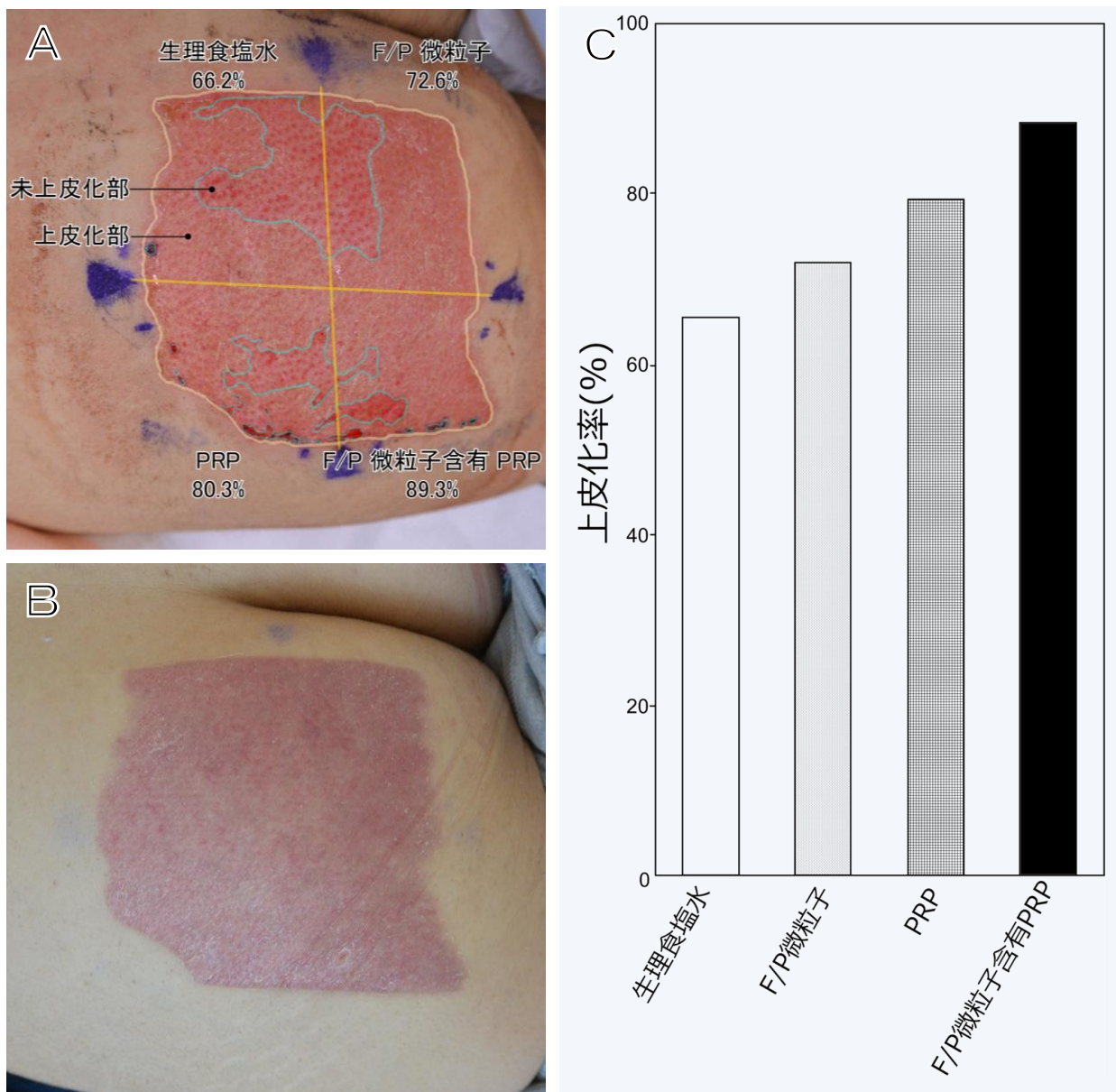


図 22 術後の創部写真と上皮化率

- A 術後 7 日目。上皮化部と未上皮化部を区分し上皮化率を求めた。
- B 術後 14 日目。上皮化が完了した。
- C 術後 7 日目の上皮化率 (n = 1)。F/P 微粒子含有 PRP 群でもっとも上皮化率が高かった。

### 除外基準

以下のいずれかに抵触する患者は本試験に組み入れないこととする。

- |   |   |
|---|---|
| ア | ヘモグロビン値 9.0 未満の貧血患者                                 |
| イ | 術前に輸血を行った患者   |
| ウ | 術前検査で B 型肝炎、C 型肝炎、梅毒もしくは HIV 陽性の患者                  |
| エ | 重症な腎疾患を有する患者 (BUN 25 mg/dL 以上、もしくは Cr 2.0 mg/dL 以上) |
| オ | 人工透析患者  |
| カ | 重篤な肝疾患を有する患者 (AST (GOT) もしくは ALT (GPT) が 100 U 以上)  |
| キ | 血中アルブミン値が 3.0 g/dL 未満の患者                            |
| ク | コントロール不良な糖尿病患者                                      |
| ケ | 副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤の内服、点滴治療中の患者                        |
| コ | 出血性素因等を有する患者  |
| サ | 薬物アレルギーのある患者  |
| シ | 妊娠中あるいは妊娠の可能性のある女性、授乳中の女性                           |
| ス | 手術の際に脊椎麻酔や硬膜外麻酔が施行される患者                             |
| セ | 試験薬投与予定日 (手術予定日) に別の被験者の試験薬投与が予定されている場合             |
| ソ | その他、主任 (分担) 研究者が被験者として不適当と判断した患者                    |

### 設定根拠

- |     |             |
|-----|-------------|
| ア～セ | 安全性への配慮     |
| キ～ケ | 有効性評価への影響   |
| ク～サ | 安全性評価への影響   |
| セ   | 検体取り違い防止のため |

### 中止基準

以下のいずれかにあてはまる場合はその症例の試験継続を中止する。

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| ア | 被験者から試験参加の辞退の申し出や同意の撤回があった場合     |
| イ | 登録後に適格性を満足しないことが判明した場合           |
| ウ | 原疾患や合併症の増悪により試験の継続が困難な場合         |
| エ | 皮膚欠損創の改善等、分層採皮を伴う植皮術が不要になった場合    |
| オ | 有害事象により試験の継続が困難な場合               |
| カ | 試験全体が中止された場合                     |
| キ | その他の理由により、医師が試験を中止することが適当と判断した場合 |

表 1 臨床研究被験者の除外基準、中止基準

# 略語一覧

| 略語            | 外国語  | 日本語                                      | 備考                       |
|---------------|--|--|--------------------------|
| DDS           | drug delivery system                         | ドラッグデリバリーシステム                            |                          |
| EGF           | epidermal growth factor                      | 上皮性増殖因子                                  | 非ヘパリン結合性                 |
| FGF           | fibroblast growth factor                     | 線維芽細胞増殖因子                                | ヘパリン結合性                  |
| FGF-2         | fibroblast growth factor-2                   | 線維芽細胞増殖因子-2                              |                          |
| F/P 微粒子       | Fragmin/Protamine 微粒子                        | フラグミン/プロタミン微粒子                           | 直径 0.1 - 3 $\mu\text{m}$ |
| F/P 微粒子含有 PRP | Fragmin/Protamine 微粒子含有 platelet-rich plasma | フラグミン/プロタミン微粒子含有多血小板血漿                   | 多血小板血漿に F/P 微粒子を添加したもの   |
| HE            | hematoxylin-eosin                            | ヘマトキシリン・エオジン                             | 染色法の 1 つ                 |
| HGF           | hepatocyte growth factor                     | 肝細胞増殖因子                                  | ヘパリン結合性                  |
| IGF           | insulin-like growth factor                   | インシュリン様成長因子                              | 非ヘパリン結合性                 |
| KGF           | keratinocyte growth factor                   | ケラチノサイト増殖因子                              | ヘパリン結合性                  |
| PDGF          | platelet derived growth factor               | 血小板由来増殖因子                                | ヘパリン結合性                  |
| PRP           | platelet rich plasma                         | 多血小板血漿                                   |                          |
| PU            | perfusion unit                               | パーフュージョンユニット                             | 2 次元ドップラー式血流画像化装置での血流単位  |
| TGF           | transforming growth factor                   | トランスフォーミング増殖因子                           | ヘパリン結合性                  |
| VEGF          | vascular endothelial growth factor           | 血管内皮増殖因子                                 | ヘパリン結合性                  |
| 再生医療新法        |  | 再生医療等の安全性の確保等に関する法律<br>(平成 25 年法律第 85 号) |                          |