

Platelet rich plasma (PRP) を用いた肺漏閉鎖に関する基礎的検討

木村 雅一 梶原 直央 平良 真博
林 博樹 鈴木 明彦 高橋 充
宮島 邦治 内田 修

東京医科大学外科学第一講座
(指導: 加藤治文 外科学第一講座主任教授)

【要旨】 【背景】 呼吸器外科領域では、肺表面全体を覆う臓側胸膜の損傷によって生じる肺漏は、しばしばその対応に難渋することのある病態の一つである。肺漏に対する臨床的処置として、フィブリン糊や吸収性ポリグリコール酸 (PGA) フェルトなどが使用されている。しかし、両者とも有効性が評価されているが、安全性や使用量制限などの克服すべき課題が残ったままである。今回は、自己血を遠心分離して得られる Platelet rich plasma (PRP) を用いて、胸膜の創傷治癒過程での再生効果について検討した。

【材料および方法】 8週齢の wistar 系雌ラットを使用した。同系ラットより全血 5 ml を採取、130 G で 10 分間遠心分離後、バッフィーコートのみ 1 ml を採取して PRP を作成した。全身麻酔下で左胸部を開胸し、左肺を露出させた。加熱したラット用食道ブジー金属棒を肺表面に接触させて、肺損傷モデルを作成した。また、肺損傷部表面に PGA シートを貼付し、PGA モデルを作成した。PGA シートに PRP を染み込ませた後、10% 塩化カルシウムを混和。それを損傷肺表面に貼付し、PRP モデルを作成した。肺漏の有無を経時的に確認し、2 週後に病理学的および免疫組織学的に検討すると共に、組織修復部における強度試験の解析も併せて検索した。

【結果】 PRP モデルのみ早期の肺漏閉鎖が可能であった。病理組織における修復胸膜の厚さの検索では、それぞれその厚さは肺損傷モデルで 0.17 mm、PGA モデルで 0.6 mm、PRP モデルで 1.5 mm であった。免疫組織学的検討では、PGA および PRP の両モデル共に、PCNA、Factor VIII および HBME-1 の染色性は、肺損傷モデルと比較して、陽性部分が多かった。修復胸膜強度試験では、肺損傷モデルの強度と比較して、PGA、PRP モデルの強度は有意 ($P < 0.05$) に高くなっていた。

【考察】 PRP 併用により肺胸膜損傷部の修復効果が促進されることが分かった。その理由として、PRP による血管新生の増加、並びに細胞増殖の亢進により強力な網状構造を再生し、より速く強固な組織が修復されたものと考えられた。本方法は気胸の再発予防や術後難治性肺漏などの治療法として、自己の組織修復因子を使用することから、安全で新しい再生治療法として期待できる。

はじめに

呼吸器外科領域においては、胸膜損傷の結果として

生じる肺漏は、しばしばその対応に難渋することのある合併症の一つである。呼吸器疾患 (肺組織由来の疾患) は再生能力が欠如しているため、肺漏などにおい

2008 年 1 月 15 日受付、2008 年 2 月 5 日受理

キーワード: 再生、Platelet rich plasma (PRP)、肺漏、胸膜、気胸

(別冊請求先: 〒 193-0094 東京都八王子市館町 1163 東京医科大学八王子医療センター 呼吸器外科)

Tel: 042-665-5611 Fax: 042-665-1796

て肺組織自体の自然治癒を期待することはできず、胸膜の癒着以外に修復される可能性は少ないと考えられている。この肺自体に再生能力がないという致命的な問題は、肺組織由来の疾患に対する保存的治療が無効な場合、外科的切除という侵襲の高い治療法が選択される。実際の臨床では、その対処法として、第1にフィブリン糊による肺表面の被覆、第2に吸収性ポリグリコール酸 (PGA) フェルトによる臓側胸膜の補強が行われ、第3にその二つを併合させた方法もあり、それぞれの有効性が評価されている¹⁻³⁾。しかしながら、依然として克服しなくてはならない問題点が幾つかある。まず第一にウシやヒト由来の血液製剤であるフィブリン糊は、未知のウイルス感染に関する安全性が不透明であり、その使用には慎重を要するという点である⁴⁻⁶⁾。第二にPGAフェルトは生体内の組織再生の足場 (scaffold) として理想的な人工的材料とされているが、臓側胸膜が完全に修復されるまでには数日を要するという点である。特に気胸のような肺の縫合を必要とする手術や、肺気腫を合併している難治性肺漏を伴い易い呼吸器手術では、合併症予防や再発防止の点からも切除断端の補強が極めて重要である。以上のことから、感染や拒絶反応の懸念がない自己の組織修復因子を利用する安全で新しい胸膜再生治療の開発が求められている。

近年、創傷治癒のメカニズムに関する基礎的研究により、血液中の血小板から放出される成長因子群が初期創傷治癒過程に重要な役割を担っていることが明らかにされた⁷⁾。再生医療領域では、血液を遠心分離することによって作製した血小板を多量に含む血漿 (Platelet-Rich Plasma: PRP) が使用されている。このPRP内には platelet derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor: (TGF- β)、insulin-like growth factor (IGF)、fibroblast growth factor: (FGF) および epidermal growth factor (EGF) 等の組織再生に重要な役割を果たす多数の成長因子が豊富に含まれている⁸⁾⁹⁾。

PRPの臨床応用は、最初に Marx ら (1998)¹⁰⁾ により歯科口腔外科領域で報告された。彼等は自家腸骨海綿骨細片を用いた下顎骨再建にPRPを使用した際、自己PRPゲルの有効性を検討し、自己PRPゲルの使用により高い骨成熟度を示すと共に再建下顎骨の骨面積率も大きかったとしている。この研究以外にも、ゲル化されたPRPを創傷部や外科手術部位に使用し、良好な結果を得ている¹¹⁾。

現在までに自己PRPゲルの臨床応用は急速に普及し、整形外科領域での骨欠損や、歯科領域におけるデンタルインプラントの際の骨との結合促進などに応用されるようになった¹²⁾¹³⁾。これまでの呼吸器分野における再生医療工学の臨床応用は不十分であり、他臓器と比較しても大きく遅れているのが現状である。その主たる理由は、肺が大気と循環血液とのガス交換の場という特殊な役割を担っており、生理的に緻密な臓器であるという点と、その特異的な解剖学的構造が挙げられる。さらに、肺は気道を介して外界と直接的交通を有しているために易感染性であり、免疫反応にも敏感である臓器である。また、肺の成長機構が未解明である点が多いことなども、呼吸器疾患における再生医療分野での研究を遅らせる要因になっているものと思われる。種々研究施設では、肺の再生医療の応用分野での部分的な構造修復により、肺機能を再生させるという視点から独創的な研究が行われてきた¹⁴⁾。肺実質における再生治癒力の補助を目的として考案されたのが本実験におけるPRP法であり、さらにPGAフェルトを細胞増殖の平面的な足場として利用し、血液を細胞の栄養分として増殖の促進を試みるのが本実験の目的である。すなわち、本研究は肺実質部分の再生ではなく、胸膜の創傷治癒課程におけるPRPの再生効果を検討し、難治性の肺漏閉鎖に対する新しい治療法を確認しようとしたものである。

研究材料および方法

I. 実験動物

8週齢の体重 162.9 ± 3.7 g の wistar 系雌ラット (日本クレア) を用いて、各群につき5匹のモデルを作製した。

尚、本研究は動物実験に関する東京医科大学動物実験指針 (東京医科大学雑誌 51 巻 3 号 1993 年) を遵守し、博愛の精神に基づき実験を行った。

II. 使用薬物・機材

実験には以下の薬物および機材を使用した。

フォーレン[®] (イソフルラン アボットジャパン株式会社) を用いて、ラットを吸入麻酔し、自発呼吸を残したまま気管を露出した。その際、市販の除毛クリームを用いて気管切開部を除毛した。露出気管に 20 G インサイト針 (BD Insyte[™] 20 GA 1.16IN 1.1×30 mm) を挿入し、人工呼吸器 (シナノ製作所 SN-480-7) に接続した。麻酔器の条件設定はイソフルレン 1.5%、100% 酸素 3 ml/分、呼吸回数 80 回/分、換気量

5.0 ml/分に調節し、維持した。腹部正中切開により下大動脈を露出し、24G サーフロ針を用いて全血 5 ml を採取した。

PRP の作製：血液を抗凝固剤入り採血管 (TE-RUMO ベノジェクト II 真空採決管 3.8% クエン酸ナトリウム 0.5 ml) に入れ、遠心分離装置 (株式会社トミー精工 LT-015) を用いて 1,250 rpm (130 G) で 10 分間遠心分離した。本操作により、血液は上層 (主に血漿成分) と下層 (赤血球などの細胞成分を含む) の二層に分離し、上下層の境界部分のバッフィーコート を 1 ml 採取した。この部分が PRP である。実際には 2 回法がより濃縮されるが、臨床の場を想定し可能な限り迅速かつ簡便な方法を選択し、今回は一回法を用いた。採取した PRP に 10% 塩化カルシウムを混和 (PRP: 10% 塩化カルシウム=6:1 の割合 (0.17 ml)) した場合には短時間 (75 秒~90 秒間) にゲル化するため、本実験ではゲル化する直前の状態のものを使用した。

III. 実験モデルの作成

ラットに上記と同様の全身麻酔操作を施し、右側臥位により左第 5 肋間を開胸し、左肺を露出した。その後、以下の 3 群に分けた (Fig. 1)。

A 群：肺損傷モデル (N=5)

ガスバーナーを用いて、先端部分が赤くなるまで加熱したラット用食道ブジー金属棒を、左肺中央部分の肺胸膜表面に、金属棒との接触面が垂直になるように 2 秒間接触させ、肺損傷モデルを作製した。全例において、モデル作製直後に 10 ml の生理食塩水を胸腔内に満たし、water sealing test を施行し、肺漏が完成できたことを確認した。上記処置後に型の如く閉胸し、ラットを完全覚醒させてから自発呼吸を確認した後には抜管し、頸部閉創を施した。

B 群：PGA モデル (N=5)

A 群と同様のモデルを作製した後、肺損傷部表面に二重の PGA シート (幅 10×10 mm、厚さ 0.15 mm) を貼付し、PGA モデルとした。

C 群：PRP モデル (N=5)

A 群と同様のモデル作製した後、同系ラットより採取した PRP を PGA シート (幅 10×10 mm、厚さ 0.15 mm) に染み込ませ、10% 塩化カルシウムを混和させてから 1 分後に肺損傷部に二重のシートを貼付し、PRP モデルとした。

IV. 評価方法

各群のモデル作製後、14 日目にラットを深麻酔によ

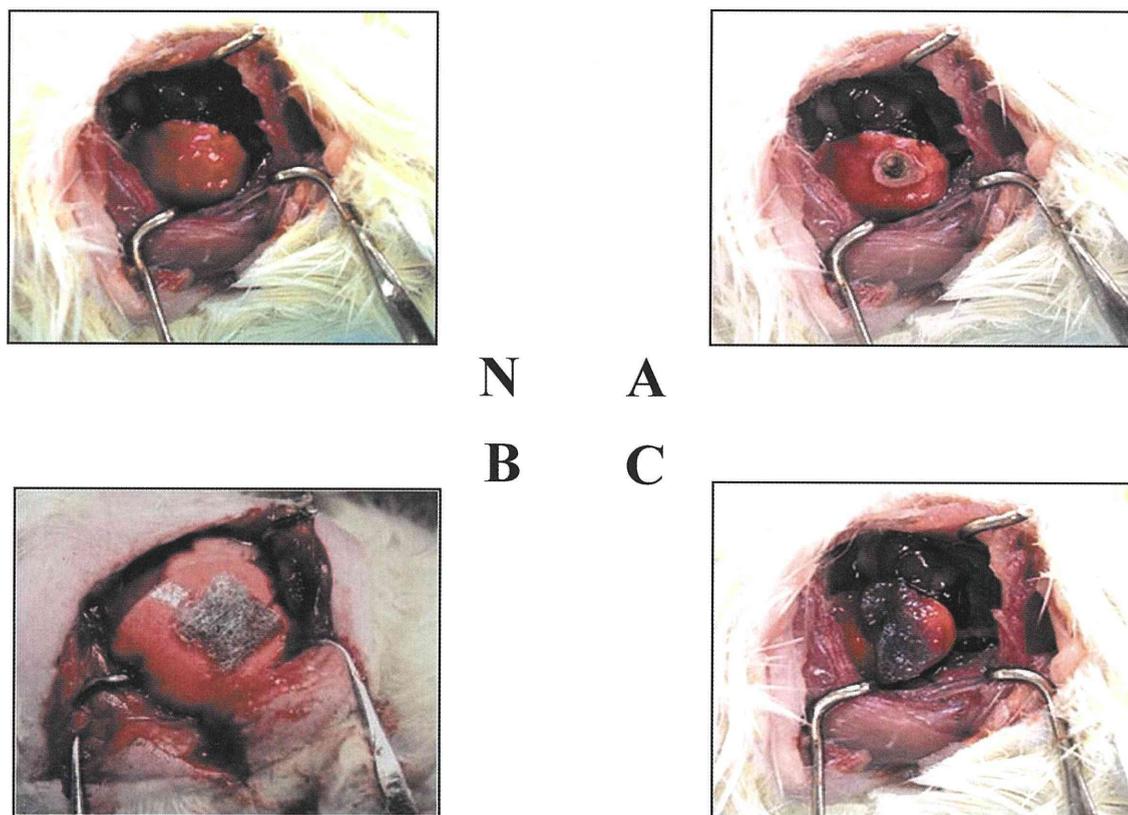


Fig. 1 Photomicrographs showing the exposed left lung in non-injured group (N), injured group (A), PGA model group (B) and PRP model group (C).

り屠殺し、各群間の損傷部位を比較検討した。モデルを作製してから21日目以降はPGAが吸収されるために、群間の比較ができないために、すべて14日目に屠殺し、左肺を摘出した。

(1) 病理組織学的検討: 摘出肺は10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin-eosin (HE) で染色した。

(2) 免疫組織化学的検討: 上記と同様の検体を使用して組織再生の指標として代表的なPCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, clone (PC-10) [DAKO, JP]、HBME-1: Anti-Mesothelial cell, Rabbit-polyclonal [DAKO, JP]、Factor VIII: Coagulation Factor VIII related antigen, clone (HBME-1) (F-VIII RA, 別名: Von Willebrand factor: vWF) [DAKO, JP]を選択し、Detection kit: Histofine Simple Stain Rat MAX-PO (M, R) [株式会社ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, JP]を用いて以下の手順で免疫染色を施した。

① 脱パラフィンおよび親水操作: キシレンで5分間3回、アルコールで1分間処理し、流水で洗浄した。② 内因性ペルオキシダーゼの阻止: 0.3%過酸化水素加メタノールで20分間処理した。③ 抗原性の賦活化: citrate buffer に浸し、オートクレーブ中で処理した。④ 抗原抗体反応: 一次抗体 (PCNA、HBME-1は1,000倍希釈、Factor VIIIは400倍希釈液を使用) を室温で一晩反応させた。検出キットを用いて室温で30分間反応させ、検体の染色を行った。⑤ 発色: DABを用いて発色させた。⑥ 核染色: ヘマトキシリンで後染色を行った。濃度勾配のアルコール系列により脱水し、キシレンで透徹後、封入した。

(3) 修復組織における強度試験: 肺損傷部におけ

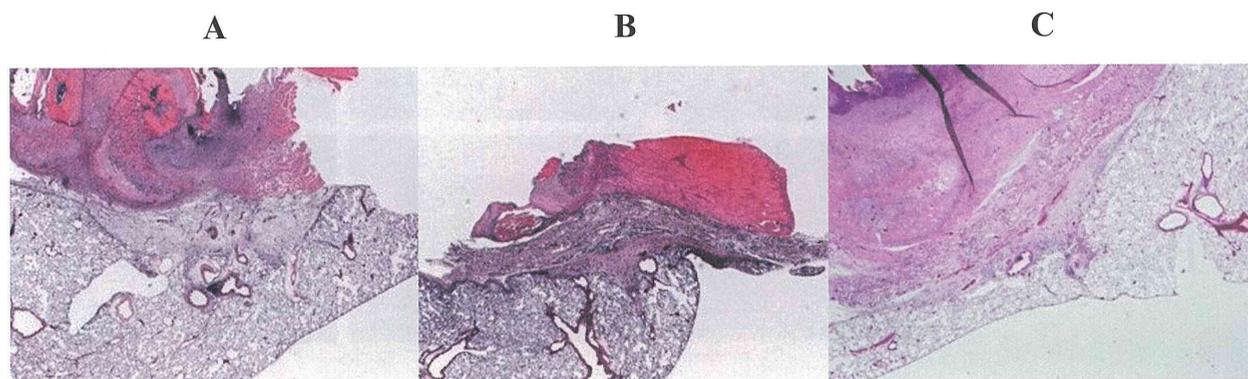
る経時的な肺強度の変化を測定し、各群を比較検討した。肺損傷部分のみを摘出し、摘出組織の片方を把持、他方を牽引することで組織強度を数値化した。強度測定器には低荷重ロードセル (デジタルフォースゲージ FGC-□ B トクシュ 日本電産シンボ株式会社)、荷重簡易試験スタンド (FGS-50V-L 日本電産シンボ株式会社) を用いた。

V. 統計処理

測定結果は平均値±標準誤差で表記した。各群間の統計学的有意差検定には一元配置分散分析および多重比較検定を用いた。危険率5%未満 ($P < 0.05$) を有意差と評価した。

結 果

(1) 病理組織学的所見: 熱した金属棒を接触させたことによって生じた肺損傷部に、熱傷による組織破壊が全例において観察された。肺胸膜の欠損、および肺胞内深部におよぶ重度の炎症性変化、ならびに組織壊死が広範に認められた。モデル作成2週後のHE染色により、肺胸膜における組織の修復を群間で比較した (Fig. 2)。A群では熱傷による肺損傷部位は壊死し、同部には壁側胸膜との癒着が認められた。B群はPGAシート部分に炎症性変化が見られ、壁側胸膜との癒着が認められた。また、シート部分には多くの巨細胞が見られた。C群ではPGAシート部位に炎症性変化と、豊富な血管および結合組織が観察され、胸膜が重度に肥厚していた。さらに、各群における修復された胸膜面の厚さを比較検討した結果、修復された胸膜の厚さはA群で0.17 mm、B群で0.6 mmであった。A、B群と比較して、C群では1.5 mmとより肥厚していた。以上の結果より、PRPの併用がPGAシート単



X 20

Fig. 2 Light microscopic photographs of lung tissue (HE stain) in injured group (A), PGA model group (B) and PRP model group (C). The pleura in C group was thicker than that in B and A groups. $\times 20$ (original magnification)

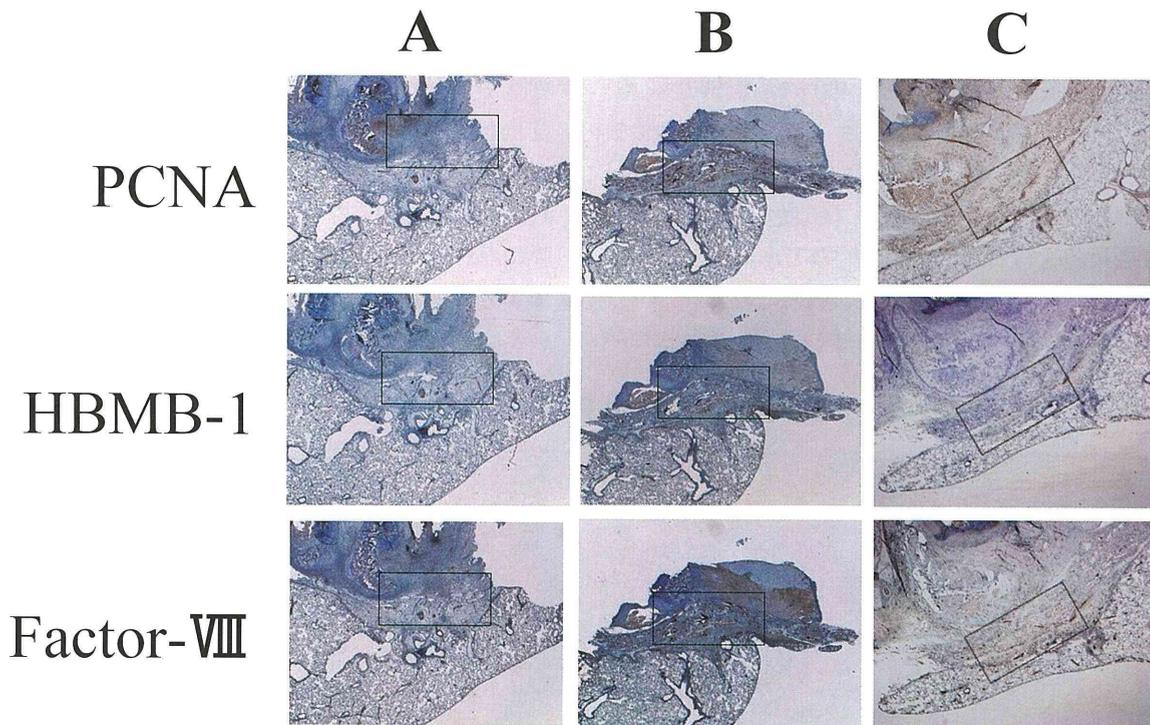
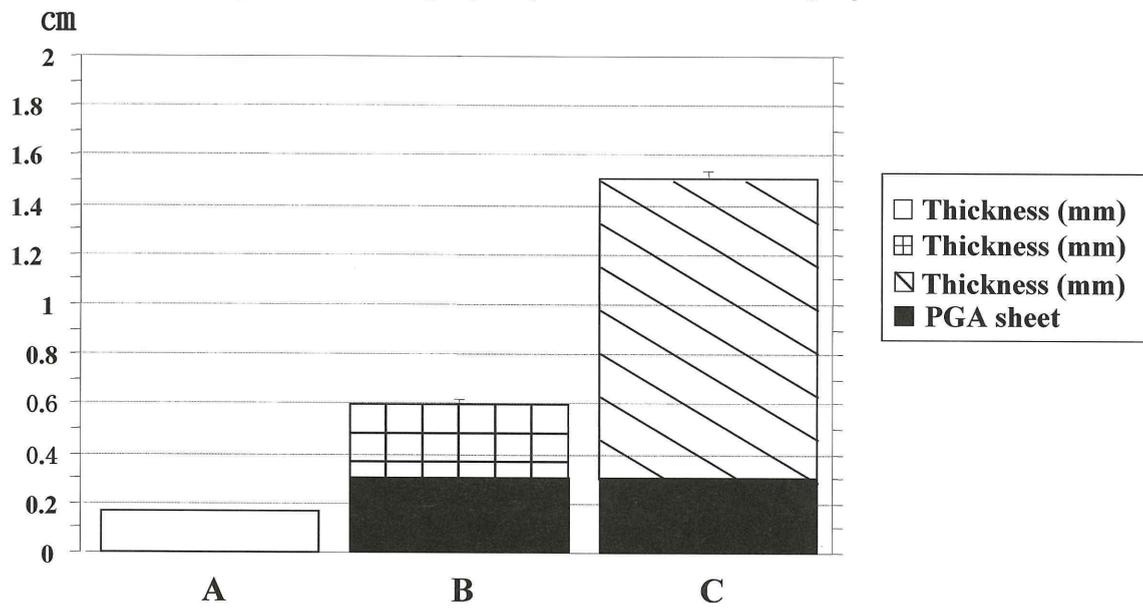
独よりも修復胸膜を肥厚させ、強固に再生されることを示していた (Table 1)。

(2) 免疫組織化学的所見

PCNA 染色: 胸膜における PCNA 陽性部位は

PRP モデル、PGA モデル、熱傷モデルの順に多く認められた。すなわち、PRP の併用が、修復過程では肺臓側胸膜部の細胞増殖を促す傾向にあることを示していた (Fig. 3)。

Table 1 The thickness of the healing pleura 2 weeks after treatment in lung injured group (A), PGA model group (B) and PRP model group (C).
Note the thicker pleura in C-model group compared with that in A and B group.

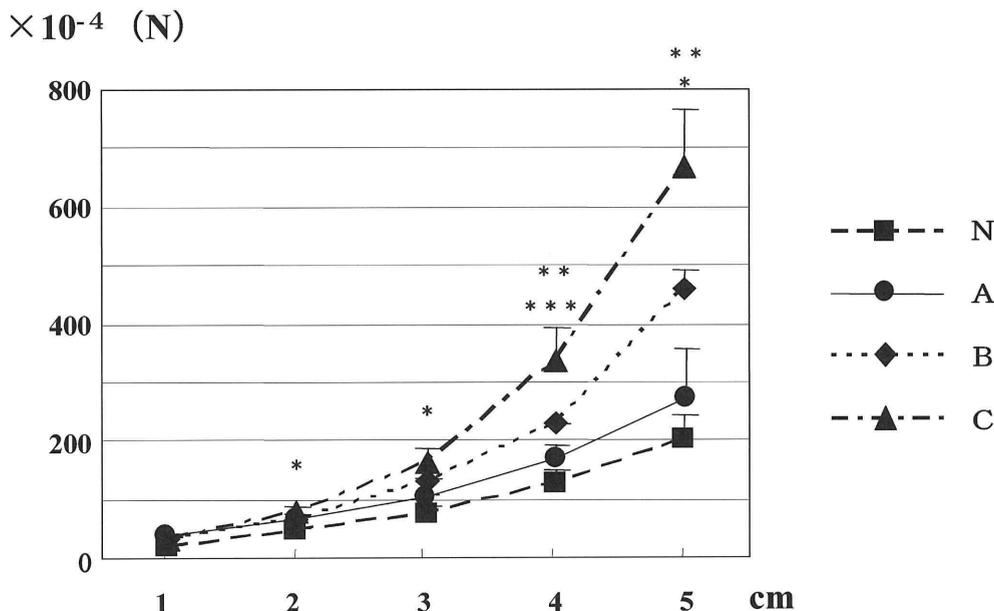


X 20

Fig. 3 Immunohistochemical staining : PCNA, HBMB-1 and Factor-VIII in the lung.
A : injured group, B : PGA model group, C : PRP model group. Insets indicate the boundary between the lung and chest wall. ×20 (original magnification)

Table 2 Strength of pleura in injured group (A), PGA model group (B) and PRP model group (C). Values are means \pm S.E.M. of five animals for each point.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ compared with injured group (A), ** $p < 0.05$ compared with non-injured group (N).



FVIIIIRA (Von Willebrand factor) 染色: 胸膜における FVIIIIRA の発現は、熱傷モデル及び PGA モデルよりも PRP モデルの方が多くの部位に見られた。すなわち、PRP の併用が、修復過程における肺臓側胸膜部の血管新生を促す傾向にあることを示していた。

HEME-1 染色: 胸膜における HEME-1 の発現は、熱傷モデルや PGA モデルよりも PRP モデルの方が全体的に多部位に認められた。すなわち、PRP モデルの損傷部位には多くの中皮が存在し、修復過程では肺臓側胸膜部で胸膜が再生していることを示していた。

(3) 修復組織における強度の測定

1~5 cm 長の組織に対する牽引に必要な力を組織強度 (N: ニュートン) として、群間で比較検討した (Table 2)。

牽引 2 cm では A-C 群間に有意差 ($P < 0.05$) が認められ、牽引 3 cm では A-C 群間に有意差 ($P < 0.05$) が見られた。また、牽引 4 cm では A-C 群間および N-C 群間でも有意差 ($P < 0.05$) があった。また、牽引 5 cm では A-C 群間および対照-C 群間に有意差 ($P < 0.05$) を認めた。

考 察

人工的に試験管内で分化誘導させた細胞を疾病に冒された生体内に投与するなど、最新のバイオテクノロジーの技術が医療に応用されるようになり、特に、再生医療の研究は難治性疾患に対する光明として注

目を集めている。しかしながら、気道系の複雑な機能や構造などの要因により、幹細胞移植を呼吸器科領域で実用化のためには克服すべき課題が多い。上記理由により、肺における幹細胞の基礎的研究は立ち遅れている。肺は自己修復機能をもち、それには2つの様式がある。一つは組織破壊後の近傍実質細胞の細胞分裂による修復 (置換性増殖) である。すなわち、傷害臓器の実質組織の細胞の多くは死滅するが、生き残った実質細胞が増殖・移動・再配列することにより、秩序ある形態形成、機能修復が行われる。一方の自己修復機能は肺切除後の残余肺に誘導される代償性肺成長である。したがって、肺自体が損傷を受けた場合、肺組織は炎症や細胞死の有無によって置換性増殖あるいは代償性成長による再生パターンを示す。一般的に、気胸や気腫性呼吸器疾患の肺漏等では、肺組織自体が再生するのではなく、胸膜との癒着により肺漏が閉鎖し治癒に至ると考えられている。この自己修復を目的とした保存的治療が無効な場合、肺損傷部の外科的切除という患者にとっては侵襲の高い治療法を選択することを余儀なくされる。このような背景から、本研究で用いた PRP 法は、肺実質における自己修復の補助を目的として考案された方法である。本研究では胸膜再生の促進効果として、PGA フェルトを細胞増殖の平面的な足場として利用し、さらに血液を細胞の栄養分として増殖を促すという方法を提案した。この方法はこれまでにない新しいアプローチによる治療法

である。

近年の研究は肝再生因子である hepatocyte growth factor (HGF) が肺の器官形成因子および組織修復因子として重要な機能をもつことを明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。HGF は4つのクリングルドメインを含む α 鎖およびセリンプロテアーゼ様の β 鎖からなる分子量 8.4 万のヘテロダイマーとして活性を示す成長因子である。HGF 受容体である c-Met は肺では気管上皮細胞や肺胞 II 型上皮細胞に発現し、HGF の作用によりチロシンキナーゼによるリン酸化が起これ、細胞の増殖や運動、形態形成に必要なシグナルが細胞内に伝播される¹⁷⁻¹⁹⁾。また、HGF は血管新生促進因子および抗アポトーシス因子としての機能も有するという²⁰⁾²¹⁾。以上のことから、HGF のみならず、その他の増殖因子も含有する PRP を併用することで肺損傷部の修復に促進効果が期待できるという仮説が考えられた。

病理組織像および免疫染色の結果から、A 群では熱傷による肺損傷部は炎症性変化を示すのみで、それに伴う壁側胸膜との癒着が見られた。また、B 群では PGA シートの異物反応による炎症性変化とそれに伴う壁側胸膜との強度の癒着が見られた。C 群では PGA シートによる異物反応に加え、PRP による組織修復のための胸膜肥厚や多くの血管新生が認められた。

PCNA は、元来 SLE 患者の血清中の抗核抗体に対する対応抗原であるが、本研究では DNA の複製・修復に関する転写因子の検出のために使用した。特に G1~S 期で多く合成されるため増殖細胞のマーカーとして用いられる。免疫染色の結果では C 群に陽性部分が多いことから、PRP 群では細胞増殖が活発であると考えられた。また、血管内皮細胞で産生される FVIII_A は、血小板の血管壁への粘着・活性化や第 VIII 凝固因子の運搬や安定化に関与することから、本研究では、血管内皮の活性化の程度を免疫染色で確認する目的で使用した。その結果、PGA シートに PRP を併用 (C 群) した部分に多くの陽性変化が認められたことから、多くの血管が新生されたものと考えられる。さらに、胸膜を確認する目的で、HBME-1 の免疫染色を使用した。HBME-1 は悪性中皮腫患者の中皮細胞を免疫源として作成された抗体で、一般的には抗ヒト中皮細胞抗体として利用されている。本研究では C 群の損傷部に多くの陽性変化が認められたことから、PRP 周囲の胸膜の増殖が確認された。PRP 群の病理組織像における組織修復は、大部分が中皮細胞と巨細

胞によるものであり、それらが強固な臓側胸膜の補助になっているものと考えられる。肺実質の損傷部位近傍の中皮細胞が分裂増殖すると共に、PGA シートに対する異物反応として巨細胞が増殖したことが要因となり、C 群 PRP を併用することによって肺損傷部の修復が促進されたものと考えられる。さらに、C 群では PRP により血管が新生され、細胞増殖が亢進された結果、強度の高い網状構造を再生し、組織修復がより速く強固に完成したものと考えられる。

本研究では、各群それぞれ 1~5 cm 長の組織に対する牽引に必要な力、すなわち各組織における強度(N)を測定した。その結果、牽引長 2 cm から 5 cm で A-C 群間に有意差が認められたことから、損傷部位の修復が PGA シートだけでは脆弱で、PRP の併用により強度が高められることを示していた。また、牽引長 4 cm と 5 cm では対照-C 群間にも有意差がみられたことから、胸膜が正常よりも厚く強固になっていることも示唆された。

PRP は自己血より凝固は迅速、且つゲル状になるために、肺漏閉鎖に早期に効果を示すと考えられる。さらに、血液成分から十分な栄養が種々増殖因子により修復された細胞に供給されることで、気胸の再発予防や難治性肺漏の処置にも有効であると考えられる。本研究では、肺実質の再生補助として PRP が修復の効果を促進し、肺実質における再生治癒力の補助が人工的に可能であることを立証した。さらに、本方法は他のフィブリン製剤と異なり、自己血を使用するために、未知のウイルス等の感染のリスクも低く、安全性も高い。したがって、本方法は臨床の場においても使用できる。

今後、臨床における PRP の作成や使用方法における至適条件等を模索し、実際に応用できるようにさらに検討する必要がある。

結 論

- ① PRP の使用により、肺損傷部の胸膜は迅速かつ強固に修復される。
- ② PRP は PGA より修復細胞の増殖能が高く、血管新生に影響を及ぼす。
- ③ 肺損傷ラットモデルを用いた本実験の結果より、PRP は胸膜再生に有効である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対しご懇篤なご指導

とご高配を賜りました東京医科大学、Patoric J. Barron 教授に厚くお礼申し上げます。また、東京医科大学外科学第一講座医局員および同動物実験センターの方々よりご配慮、ご支援を頂きましたことに深く感謝いたします。また本実験は平成18年度東京医科大学研究助成金の援助により行われ、本論文の要旨は第159回東京医科大学医学会総会(2007年6月)で発表された。

文 献

- 1) Kawamura M, Kase K, Sawafuji M, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayasi K: Staple-line reinforcement with a new type of polyglycolio acid felt. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* **11**: 43-46, 2001
- 2) Miyamoto H, Futagawa T, Wang Z, Yamazaki A, Morio A, Sonobe S, Izumi H, Hosoda Y, Hata E: Fibrin glue and bioabsorbable felt patch for intraoperative air leaks. *J Thorac Cardiovasc Surg* **51**: 232-236, 2003
- 3) 徳島 武、福田幹久、前田啓之、藤岡真治、中井 勲: 呼吸器外科手術の肺瘻閉鎖術におけるボルヒールとネオベール併用法の有効性の検討。 *Ther Res* **25**: 2245-2249, 2004
- 4) Kawamura M, Swafuji M, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayasi K: Frequebcy of transmission of human parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during thoracic surgery. *Ann Thorac Surg* **73**: 1098-1100, 2002
- 5) 須藤博之、嘉悦 洋、福永信人、田川力一、佐藤哲朗、船津昭信、大橋高明: 加熱処理によるボルヒール (HG-4) のウイルス感染に関する安全性の検討。 *基礎と臨床* **23**: 4915-4920, 1989
- 6) 川村雅文、木村吉成、小山孝彦、山本 学、神山育男、後藤太郎、井上芳正、大塚 崇、堀口早史、山内徳子、澤藤 誠、渡辺真純、堀之内宏久、小林 紘一: フィブリン糊によるパルボウイルスと肝炎ウイルスの感染の可能性について。 *日呼外会誌* **16**: 528-532, 2002
- 7) Garg AK: Grafting material in repair and restoration. *Quintessence* **5**: 83-101, 1999
- 8) Landesberg R, Roy M, Glickman RS: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac surg* **58**: 297-300, 2000
- 9) Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE: Growth factor level in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac surg* **30**: 97-102, 2002
- 10) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR: Platelet Rich Plasma: Growth factor enhancement for bone graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**: 638-646, 1998
- 11) Marx RE: Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Quintessence* **4**: 71-82, 1999
- 12) Antitua E: Plasma rich in growth factor: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **14**: 529-535, 1999
- 13) 澤裕一郎、川野 大、福井克仁、中山敦史、土井田 誠、宮城島俊雄: 自己血からの多血小板血漿 (PRP: Platelet Rich Plasma) を用いた上顎前歯自家骨移植の1例—インプラント治療における骨移植への有用性—。 *日口外誌* **46**: 372-374, 2000
- 14) Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Ohta M, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H: Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation* **111**: 1407-1414, 2005
- 15) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of Hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res commun* **122**: 1450-1459, 1984
- 16) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte grow factor. *Nature* **342**: 440-443, 1989
- 17) Yanagida K, Matsumoto K, Sekiguchi K, Ishibashi H, Niho Y, Nakamura T: Hepatocyte growth factor may act as a pulmotropic factor on lung regeneration after acute lung injury. *J Biol Chem* **268**: 21212-21217, 1993
- 18) Mason RJ, Leslie CC, McCormic-Shannon K, Deterding RR, Nakamura T, Rubin JS, Shannon JM: Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 561-567, 1994
- 19) Singh-Kaw P, Zarnegar R, Siegfried JM: Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* **268**: 1012-1020, 1995
- 20) 水野信哉、中村敏一: 移植医療における HGF の役割。 *医学のあゆみ* **196**: 905-912, 2000
- 21) Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor; Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* **59**: 2023-2038, 2001

Basic examination closure of pulmonary air leak using platelet rich plasma (PRP)

Masakazu KIMURA, Naohiro KAJIWARA, Masahiro TAIRA,
Hiroki HAYASHI, Akihiko SUZUKI, Mitsuru TAKAHASHI,
Kuniharu MIYAJIMA, Osamu UCHIDA

First Department of Surgery, Tokyo Medical University
(Director : Harubumi KATO, Professor and Chairman of the First Department of Surgery)

Abstract

[Background] In the field of respiratory surgery, a pulmonary air leak caused by injury to the visceral pleura, which covers the entire pulmonary surface, is a pathologic condition that is often difficult to treat. At present, fibrin glue and polyglycolic acid (PGA) felt sealant are used clinically for the treatment of this condition. Efficacy has been demonstrated for both of these materials, but several problems remain, including safety and dosage limitations. Based on this background, we investigated the regenerative effect of platelet rich plasma (PRP), obtained by centrifugal separation of autologous blood, during the wound-healing process of pleura.

[Materials and Methods] Female Wistar rats of 8 weeks of age were used in the study. 5 ml of whole blood was collected from the rats and centrifuged at 130 g for 10 minutes. 1 ml of buffy coat was collected and PRP was isolated. A left thoracotomy was performed under general anesthesia and the left lung was exposed. A pulmonary injury model was generated by contacting the lung surface with a heated metal probe, which is used for rat esophageal bougienage. A PGA model was made by placing a PGA sheet on the site of injury of the lung surface, and a PRP model was generated by placing a PGA sheet soaked with PRP mixed with 10% calcium chloride on the injured site. The presence or absence of pulmonary air leakage was evaluated continuously, and histopathological evaluation (HE staining), immunohistochemical examination and a strength test were performed 2 weeks after treatment.

[Results] Closure of the pulmonary leak at an early stage was achieved only in the PRP model. The histopathological examination showed that the thickness of the healing pleura was 0.17 mm in the lung injury model, 0.6 mm in the PGA model, and 1.5 mm in the PRP model. Immunohistochemical staining for PCNA, Factor VIII, and HBME-1 resulted in larger positive areas in the PGA and PRP models than in the lung injury model. In the healing pleura strength test, significantly greater strength was demonstrated in the PGA and PRP models, compared to the lung injury model ($P < 0.05$).

[Discussion] Healing of injury to the pulmonary pleura was promoted by PRP, suggesting that neovascular and cellular proliferation induced by PRP may lead to stronger reproductive construction of the plexus, thereby making tissue repair more rapid and viable. Therefore, our results suggest that use of a self-tissue repair factor for prevention of recurrent pneumothorax or management of postoperative intractable pulmonary leakage is effective for stronger and safer pleura regrowth.

<Key words> Regeneration, Platelet rich plasma (PRP), Pulmonary air leak, Pleura, Pneumothorax
