



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1006 号
氏名	堀井 幸一郎
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Platelet-rich fibrin has a healing effect on chemotherapy-induced mucositis in hamsters (多血小板フィブリンはハムスター癌化学療法剤誘発口腔粘膜炎モデルにおいて、口腔粘膜炎の治癒促進効果を有する)</p> <p>Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology. (accepted for publication)</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 稲垣 宏, 村上 信五

【背景と目的】

癌化学療法剤に誘発される口腔粘膜炎は、癌化学療法を受けている患者のおおよそ 20-40% にみられる合併症である。口腔粘膜炎は重度の疼痛を伴い、栄養摂取および QOL の低下、さらには癌化学療法の遅延や中断を余儀なくされる場合もある。さらに、粘膜炎の重症化に伴い感染などの合併症から医療費が増加すると報告されている。つまり、口腔粘膜炎の発生を予防すること、または形成された粘膜炎を早期に治癒させることは癌化学療法を受ける患者の QOL 向上や癌化学療法の治療成績を上げるばかりではなく、医療費削減の効果も期待できる。現在、MASCC/ISOO による口腔粘膜炎の治療ガイドラインによると、cryotherapy など口腔粘膜炎の予防法およびオピオイドを用いた疼痛コントロールについての対応が知られているが、形成された粘膜炎の治癒促進に関しては未だ十分な対応が取られていない。

多血小板フィブリン(Platelet-rich fibrin: PRF)は Choukroun らにより報告された第二世代濃縮血小板で、自己の全血を遠心にかけて作製することができる。これまでの報告で、PRF には自己の血小板・白血球由来の成長因子(GF)やサイトカインを多く含み、軟組織および硬組織の組織修復を促進することが知られている。そこで、PRF の軟組織修復促進作用に着目し、5-FU 誘発口腔粘膜炎ハムスターモデルを用いて PRF の粘膜炎治癒促進効果について検討した。

【方法】

実験動物は雄性、7 週齢のシリアンゴールデンハムスターを使用した。

実験 0 日目および実験 2 日目に 60 mg/kg の 5-FU 溶液を腹腔内投与し、実験 1 日目および実験 2 日目にハムスターの左側頬袋内面粘膜に 18G 針で擦過刺激を加えることで、実験 3 日目に粘膜炎を形成した。作製された動物モデルは実験 4 日目に (1)PRF 群：PRF をフィブリン糊を用いて粘膜炎潰瘍部に適用、(2)フィブリン群：フィブリン糊のみを粘膜炎潰瘍部に適用、(3)対照群：経過観察のみの 3 群にランダムに振り分け、以下の項目の評価を行った。

- ・ハムスターの全身状態を評価するため、実験 0 日目から 14 日目まで体重を測定した。それぞれのデータは実験 0 日目の体重で除した相対的体重変化率で表した。
- ・潰瘍部面積の評価を行うために、実験 3 日目から 14 日目まで頬袋をめぐり返した状態で頬袋内面の標準規格写真撮影を行った。潰瘍辺縁を写真上でトレースし、長径×短径で潰瘍面積を計算した。面積データは実験 3 日目の値で除すことで相対的面積として表した。
- ・組織学的に評価を行うために実験 6 日目、10 日目、14 日目のサンプルに HE 染色を行った。炎症性細胞浸潤、血管拡張、充血部位、浮腫、潰瘍、膿瘍のパラメーターで二重盲検法を用いてスコア 0-3 で評価した。
- ・炎症性細胞の組織浸潤の程度を評価するためにミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を測定した。

【結果】

実験 3 日目までの体重変化はすべての動物で同様の挙動を示し、安定してモデルが作製されたことが確認された。実験 4 日目から 14 日目までの間に PRF 群は 8.76%、フィブリン群では 6.21%、コントロール群では 0.79% の体重増加が認められたが、各群の間に有意な差は認められなかった。

対照群では実験 4 日目、5 日目、6 日目に相対的潰瘍面積は最大値(1.32±0.09, 1.29±0.07, 1.32±0.13) となり、実験 7 日目(1.23±0.18) から減少し始めたのに対し、フィブリン群では実験 5 日目に最大値(1.23±0.07) となり、実験 6 日目(1.14±0.1) には減少し始め実験 8 日目

(0.77 ± 0.08), 9 日目(0.06 ± 0.05), および 11 日目(0.35 ± 0.05) で対照群と比較して有意に減少した($P < 0.05$). PRF 群は実験 4 日目(1.08 ± 0.03) で相対的潰瘍面積が最大値となり, 実験 5 日目(0.88 ± 0.04) 以降はすべての計測日で対照群と比較して有意に減少していた($P < 0.05$).

組織学的特徴を Lima らの組織学的スコアを用いた結果, 実験 6 日目および実験 10 日目に有意な差は認めなかったが, 実験 14 日目での PRF の組織スコア(0.5 ± 0.29) は対照群(1.75 ± 0.25) と比較して有意に減少していた($P < 0.05$).

実験 6 日目の正常粘膜, 対照群, フィブリン群, PRF 群の MPO 活性測定値はそれぞれ粘膜 1g あたり 0.39 ± 0.15 , 3.14 ± 0.42 , 3.26 ± 0.39 , 1.79 ± 0.39 ($\times 10^4$ mU/ml/g) で PRF 群の MPO 活性値は対照群と比較して有意に減少していた($P < 0.05$).

【考察・結論】

5-FU 誘発口腔粘膜炎ハムスターモデルを用いた今回の研究では, 粘膜炎局所に PRF を適用した PRF 群は, フィブリン糊のみを適用したフィブリン群および経過観察のみの対照群よりも治癒が促進されることが示された. また, PRF を適用することで患部の保護効果および過度な炎症を抑えることにより痛みを和らげる可能性が示唆された. PRF はその 3 次元構造のなかに多くの GF やサイトカインを吸着し, それらを持続的に放出することが知られている. 今回はこれらの GF やサイトカインが治癒促進および抗炎症作用に関与しているものと考えられた. しかし, PRF が口腔粘膜炎の治癒を促進するメカニズムについては未だにはっきりしていない部分もある. そのため, これらの問題を解決するためにさらなる研究が必要である. また, 病変部に対して PRF の適用法などを改良し, 実臨床での利用にむけたさらなる取り組みが必要である.

論文審査の結果の要旨

【目的】口腔粘膜炎や潰瘍は癌化学療法を施行している患者の 20-40%に生じる頻度の高い合併症である。重度の疼痛を伴うことで経口摂取が制限され、癌化学療法の中断・延期など、QOL 低下だけでなく医療費増加にも影響を及ぼす。現在、Oral cryotherapy や口腔ケアなどが口腔粘膜炎発生の予防目的で施行されているが、形成された粘膜炎や潰瘍の治癒促進を目的にした治療法は少ない。本研究は、抗がん化療療法に伴う口腔粘膜炎や潰瘍の新たな治療法を開拓するために、5-FU 誘発口腔粘膜炎ハムスターモデルを用いて、軟組織の組織修復を促す多血小板フィブリン(Platelet-rich fibrin: PRF)の粘膜炎治癒促進効果について検討した。

【方法】実験動物は7週齢の雄シリアンゴールデンハムスターを使用した。5-FU 溶液を 60 mg/kg の腹腔内投与し、左側頬袋内面粘膜に 18G 針で擦過刺激を加え口腔粘膜炎を惹起した。実験 4 日目に ① PRF 群：PRF をフィブリン糊で粘膜炎潰瘍部に塗布、②フィブリン群：フィブリン糊のみ塗布、③対照群：無処置の 3 群にランダムに振り分け、以下の項目について検討した。

1. 実験 0 日目から 14 日目まで体重を測定し、相対的体重変化率で全身状態を評価
2. 潰瘍部を写真撮影して長径×短径で潰瘍面積を計算し、その大きさを経時的に評価
3. 潰瘍組織における炎症細胞浸潤、血管拡張、出血、浮腫、潰瘍、膿瘍の程度をスコア化して評価
4. 組織のミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性による炎症細胞浸潤の程度を評価

【結果】実験中の体重は群間で有意な変動は認めなかった。相対的潰瘍面積は対照群で実験 6 日目に最大になり、7 日目から縮小したのに対し、フィブリン群では実験 5 日目に最大となり、6 日目には縮小傾向を認め、実験 8、9、11 日目で対照群と比較して有意に減少した。PRF 群は実験 4 日目で最大となり、5 日目以降はすべて対照群と比較して有意に縮小していた。組織学的な炎症程度を Lima らが報告した評価法を用いてスコア化した結果、実験 6、10 日目に有意な差は認めなかったが、実験 14 日目で PRF 群は対照群と比較して有意に減少しており ($P < 0.05$)、創傷治癒が有意に促進されていた。また、実験 6 日目における MPO 活性値は、PRF 群において対照群と比較し有意に減少していた ($P < 0.05$)。

【考察・結論】PRF は血小板・白血球由来の成長因子(GF)やサイトカインを多く含む第二世代濃縮血小板で、軟組織および硬組織の組織修復を促進させる効果を有することが報告されている。本研究では、ハムスターにおける 5-FU 誘発口腔粘膜炎に対して PRF を塗布することで、患部の保護および創傷治癒が促進されることが明らかになった。PRF は自己の静脈血をガラス採血管に採取し遠心にかけて簡便に作製することができるため、倫理面や組織適合性などの問題も少なく、今後の臨床応用が期待できる治療と考えられる。

【審査内容】主査の高橋から、PRF 作製のためにハムスターの血液を使用せずにヒトの血液を使用したのはなぜか、ヒトの血液を使用した場合に PRF 内に含まれる有効成分について個体差はないのか、PRF は口腔粘膜炎に伴う潰瘍だけではなく、諸臓器に発生するすべての潰瘍に対して治癒促進効果を望めるかなど 11 項目、第一副査の稲垣教授からは、組織学的評価を行う際に 6 個の parameter があるにも関わらず 0-3 の 4 段階にスコア化するには無理があるのではないかと、MPO データと実際の好中球浸潤の程度との相関はあったのかなど 9 項目、さらに第二副査の村上教授からは口腔癌のトピックス、今後の研究・臨床に対する抱負についての質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、癌化学療法時に生じる難治性かつ高頻度の合併症である口腔粘膜炎や潰瘍に対して、従来の対処療法ではなく、PRF が粘膜保護および炎症・潰瘍の治癒を促進させる新たな治療になりうる事を明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判定した。