

博士論文

ウマにおける新しい創傷治療法である  
多血小板血漿（PRP）療法の有用性に関する研究

福田 健太郎

# 目 次

## 第 1 章 緒言

1-1. ウマにおける創傷治療	1
1-2. 新しい創傷治療法である多血小板血漿療法	2
1-3. ウマにおける <i>in vitro</i> での PRP の効果	4
1-4. ウマ臨床における PRP 療法	5
1-5. 本研究の目的	5

## 第 2 章 高濃度の成長因子を含有するウマ PRP の最適な作製方法および活性化方法

2-1. 序論	7
2-2. 材料と方法	9
2-2-1. 使用動物	
2-2-2. PRP 作製実験	
2-2-3. PRP 活性化試験	
2-2-4. PRP 反復的凍結融解試験	
2-2-5. 成長因子濃度測定	
2-2-6. 塗抹検査	
2-2-7. 統計学的解析	
2-3. 結果	14
2-3-1. PRP 作製実験	
2-3-2. PRP 活性化試験および反復的凍結融解試験に使用された PRP の性状	
2-3-3. PRP 活性化試験	

2-3-4. PRP 反復的凍結融解試験	
2-4. 考察	17
2-4-1. 最適な PRP 作製方法	
2-4-2. 最適な PRP 活性化方法	
2-5. 小括	23
図表	25

### 第3章 健全な骨格筋に対する PRP 投与がもたらす影響

3-1. 序論	34
3-2. 材料と方法	35
3-2-1. 使用動物	
3-2-2. PRP 作製方法	
3-2-3. 中殿筋への PRP 投与方法	
3-2-4. 免疫組織化学的および形態学的解析	
3-2-5. リアルタイム RT-PCR	
3-2-6. 統計学的解析	
3-3. 結果	40
3-3-1. PRP	
3-3-2. 筋形態解析	
3-3-3. リアルタイム RT-PCR	
3-4. 考察	42
3-5. 小括	46

図表	48
第4章 実験的に作製された筋損傷に対して PRP 投与がもたらす影響	
4-1. 序論	53
4-2. 材料と方法	55
4-2-1. 使用動物	
4-2-2. 筋損傷モデル作製実験	
4-2-3. PRP 作製および活性化方法	
4-2-4. PRP 投与試験	
4-2-5. 成長因子濃度測定	
4-2-6. リアルタイム RT-PCR	
4-2-7. 免疫組織化学染色	
4-2-8. 統計学的解析	
4-3. 結果	61
4-3-1. プピバカイン筋損傷モデル	
4-3-2. PRP	
4-3-3. PRP 投与組織中の PDGF-BB および TGF-β1 濃度	
4-3-4. PRP 投与組織における遺伝子発現量	
4-3-5. 組織学的解析	
4-4. 考察	63
4-5. 小括	70
図表	71

第5章 ウマ創傷治療にPRP療法を適用した2症例

5-1. 序論 . . . . . 78

5-2. 材料と方法 . . . . . 78

5-2-1. 症例馬の履歴と病歴

5-2-2. PRP作製および投与方法

5-3. 結果 . . . . . 81

5-4. 考察 . . . . . 81

5-5. 小括 . . . . . 83

図表 . . . . . 84

第6章 総括 . . . . . 90

謝辞 . . . . . 95

参考文献 . . . . . 96

## 第1章 緒言

### 1-1. ウマにおける創傷治療

ウマは外傷を負うことが多い動物である。特に競走用のウマでは、創傷は日常的に生じる疾患である[1、2]。トレーニング中に生じる下肢部の挫創は極めて一般的であるが、体幹部における打撲や薬物の筋肉内投与に起因するような血腫を伴う筋挫傷はしばしば感染を伴って上皮組織を侵し遷延化する。こういった創傷の効率的な治療法について、これまで多くの議論および提案がなされてきた。

かつては受創直後からの積極的な消炎が推奨され、ステロイドや NSAIDs のような消炎剤の全身あるいは局所投与が早期から行われていたが、近年では急性期の適切な炎症反応が創傷の治癒に必要であるとされ、消炎剤の投与は最小限にすることが推奨されている[1]。投薬方法だけではなく患部の被覆材についても、急性期では敢えて炎症を惹起させるような素材によるものが用いられている[1]。患部が十分肉芽組織で覆われた後は、適切な消炎剤および被覆材の使用により炎症が制御されることで上皮化と創収縮が促進される。近年では創における血行不良の予防や創傷治癒に必要な成長因子およびサイトカインの十分な供給を目的とした湿潤療法が創傷治療のゴールドスタンダードとして行われている[1]。

一般的な創傷であればこのような治療法により早期の治癒機転を得られるが、場合によっては予期せぬ細菌感染や不適切な投薬および被覆材の選択により治癒の遅延が生じる。患

部の血行の回復が不十分な場合、低酸素、低温および成長因子の不均衡が生じ治癒カスケードが十分機能しなくなることで症状は遷延化される[3、4]。特にウマ臨床において創傷局所における炎症と血行の管理は困難で、特に体幹部の挫創では湿潤療法を行うための環境が得られず上皮化が進まないケースも多く見られる[1、3]。このような創傷治癒の遅延を改善するような治療法が長らく求められてきた[1]。

## 1-2. 新しい創傷治療法である多血小板血漿療法

近年ヒト医療では再生医療が盛んに導入されており、創傷治療の分野でも注目されている[5]。再生医療の主役は多能性幹細胞の分化能や細胞由来の様々な生理活性物質による治癒促進効果を期待して行われる細胞療法である[5、6]。近年になり細胞の利用だけでなく、細胞を活性化させる成長因子や、これらを損傷部位において長期間作用させるための足場材料を組み合わせることによってより効率的に新たな組織の再生と構築を促す「組織工学」という概念が提唱され、「細胞」、「成長因子」および「足場材料」という3つの要素は「再生医療の三大要素」と称されるようになった[7]。特に最近では、これらのうち成長因子を利用した新しい再生医療が注目されている[8]。すなわち、自己血由来の血小板を濃縮させて作製された多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を用いた治療法であり、多血小板血漿 (PRP) 療法と呼ばれている[8-10]。

PRP については、2004 年に Marx [9] によって詳細に紹介され、その後多くの形成外科医や歯科医によって臨床応用されてきた。PRP に含まれている血小板が含有する  $\alpha$  顆粒や濃染顆粒には多種多様の生理活性物質が貯蔵されており、特に  $\alpha$  顆粒には、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factors; PDGFs)、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ; TGF- $\beta$ )、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) といった、細胞の活性化に関わる多くの成長因子が含まれていることが知られている [9、10]。例えば、PDGF のアイソフォーム BB (PDGF-BB) は炎症の初期段階で白血球や線維芽細胞といった組織修復に関わる多くの細胞の分裂能や遊走能を促進し、血管再生過程の起点として機能している [11]。TGF- $\beta$  アイソフォーム 1 (TGF- $\beta$ 1) は創傷治癒過程において血管再生や肉芽組織再生を促進する。VEGF は血管内皮細胞に作用して血管再生を促進する [11]。PRP 中で濃縮された血小板にはこのような様々な成長因子が高濃度のカクテルとして存在しており、PRP 療法はこれらが損傷組織へ曝露されることにより得られる組織修復促進効果を目的として適用される [10]。PRP 療法は、自己血から作製される PRP を用いるため安全性が高いこと、作製方法が簡単で培養過程が不要なこと、そして確かな組織修復効果が期待できることから、ヒトだけでなくウマの臨床においても近年特に普及が進んでいる治療法である。

PRP に含まれている血小板はヒトとウマではほぼ同じ構造や機能を有していると考えられている。ウマ血小板は直径 2.5~3.5  $\mu\text{m}$  の円形あるいは楕円形をしており、ウマの品種に



もよるが、血中に 75,000~300,000 個/ $\mu$ L 存在する [12、13]。これらの血小板は非活性型として循環しているが、物理的あるいは化学的刺激によって活性化され、形態を変化させて血小板凝集を生じたり顆粒内の成長因子を放出したりすることで止血作用や組織修復作用を局所的にもたらすことが広く知られている[9、10、14]。PRP はこういった血小板の濃縮液であるため、PRP 療法を行う際は PRP 中の多量の血小板に対して人為的に活性化反応を引き起こし、適切に高濃度の成長因子を抽出する作業工程が必要であると指摘されている [14、15]。

### 1-3. ウマにおける *in vitro* での PRP の効果

PRP がもたらす *in vitro* での細胞活性化作用についてはヒトで多く報告されているが[9、16]、ウマでの報告も散見される。*Schnabel* らは 100%PRP 液中でウマ浅肢屈筋腱の 3 日間の組織培養を行い、腱組織におけるコラーゲン遺伝子の発現促進および腱組織再生に関わる Cartilage Oligometric Matrix Protein (COMP) 遺伝子の発現促進効果を確認した[17]。また *Smith* らは、ウマ繋靱帯由来線維芽細胞を無細胞骨髓液、PRP、ウマ血清およびウシ胎児血清中で培養し、いずれにおいても培養液中 COMP 生成量および総タンパク生成量が著しく増加することを示した[18]。このような結果から、PRP はウマ *in vivo* においても組織再生を促進させる可能性があると考えられている。

#### 1-4. ウマ臨床における PRP 療法

ヒトでは主に口腔外科や歯科領域において PRP 療法が臨床応用されてきた[19–21]。整形外科分野では、特に腱靭帯、骨関節および筋肉といった幅広い部位の傷害に対して PRP 療法を適用して良好な治療成績を得たという報告が続出した[22、23]。こうしたことからウマでも PRP 療法の臨床応用が試行されるようになり、特に腱靭帯炎に対する新しい治療法として良好な治療成績を得たという報告が散見されるようになった [24–26]。

先述のとおり、ウマ創傷治癒の遷延化には患部における成長因子およびサイトカインの不均衡が大きく関わっている。このことを改善することを目的で創傷治療に PRP 療法を適用し、良好な治療成績を得たという報告が見られる[3、4、27]。一方、ウマだけでなくヒトや小動物臨床において治療に用いられる PRP の作製方法や適用方法は統一されていない。このため投与効果の検討には様々な特性の PRP が使用されており、このことが PRP 治療の有効性を不明瞭にしていると指摘されている[26、28]。

#### 1-5. 本研究の目的

本研究ではウマ創傷治療法として有用な PRP 療法を確立するために、高濃度の成長因子を含んだ PRP を確実に患部に適用することを目指し、第 2 章において創傷治療に有用な成長因子を最大限に含んだ PRP の作製方法や活性化方法を標準化することとした。次に第 3 章では、このような PRP の健全な骨格筋への投与による筋肥大効果や有害事象の発現の可

能性を検討するために実験を行った。この結果に鑑み第 4 章では、筋挫傷に対する PRP 療法を想定し、実験的に骨格筋損傷を作製して高濃度の成長因子を含んだ PRP の投与を行い、PRP が創傷治癒過程に及ぼす影響を調査した。最後に第 5 章では得られた結果を元にした適切な PRP 療法を、筋挫傷を伴うウマ創傷症例に応用し、創傷治療法としての PRP 療法の有用性および効率的な適用方法について検討した。

## 第 2 章 高濃度の成長因子を含有するウマ PRP の最適な作製方法および活性化方法

### 2-1. 序論

近年臨床分野において PRP 療法が普及している原因として、PRP の作製方法の簡便さが大きく寄与している。自己血由来の血小板を濃縮することで PRP を作製する場合、GPS II、Magellan、Cell Saver 5 といった広く流通している作製キットを使用するか、汎用の卓上遠心機を使用して異なる 2 つの遠心力を段階的に用いて作製する方法（ダブルスピン法）が一般的である[10、15、29、30]。前者は常に一定の血球成分で構成されている PRP を無菌的にかつ簡便に作製できるという利点がある[29、31]。その反面、最終産物の血小板濃度はダブルスピン法に劣るという報告も散見される[15、29、32]。ヒト医療で有効とされる PRP の血小板濃度は全血の 4~5 倍以上で  $1.0 \times 10^{12}$  個/L 以上であるが[9、10]、専用キットによるウマ PRP の作製ではこの血小板濃度を達成できない[15、29]。このためウマ PRP 作製にはダブルスピン法が多用されている。しかしこの方法では遠心条件の相違によって PRP を構成する血球成分にばらつきが生じ、このことが PRP 療法の効果に影響している可能性があるため、最適な PRP 作製法について多くの議論が行われてきた[9、33-36]。PRP 中血小板濃度が高いほど治療に有効な成長因子が高濃度で存在するため[9、10、35]、可能な限り高い血小板濃度を得るための作製条件について検討する必要がある。

一方、PRP を構成する血球成分として、白血球濃度も併せて考慮すべきとの議論もある[34]。Yoshida らは、好中球以外の白血球を含む PRP は線維芽細胞を活性化させる効果があるとし[37]、King らは、白血球には抗炎症性サイトカインが含まれており、高濃度の白血球を利用した治療法はヒト臨床において有効である可能性があると主張した[38]。一方で、白血球が多く含まれている PRP には多くの蛋白分解酵素が含まれていることがよく知られており、これらが組織再生に負の効果をもたらす可能性が指摘されている[30、36、39、40]。本研究では組織修復を促進させ、かつ安全性が高い PRP 療法を確立することを目指し、可能な限り血小板濃度が高く白血球濃度が低い PRP を安定的に得るためのダブルスピン法の遠心条件について検討を行った。

さらに、PRP 中の血小板に含まれている大量の成長因子を放出させる方法、いわゆる活性化方法に関しても多くの議論がある。ウマ臨床における PRP の活性化方法としては、物理的に血小板膜を破壊して内包されている成長因子を放出させる凍結融解法や、PRP に対してカルシウムおよびトロンビンが含有されている自己血清を加えて血小板の生理的活性化を促す方法が広く用いられている[4、24]。血小板は細胞外マトリックスにおけるコラーゲン線維に接触するだけで活性化を生じるため[41]、事前の活性化処理は必要ではないとされていた。しかし Textor らによって、活性化を行っていない PRP を病変へ投与しても、含有されている成長因子の一部しか利用されず、効果が不十分となることが示唆された[15]。このため事前に PRP の活性化を行い、高濃度の成長因子を上清中に放出させた状態で患部に

曝露させることがより良い臨床成績を得るために必要であると考えられるようになった。

一方、PRP 中成長因子濃度を安定的かつ再現性良く最大にするための最適な活性化方法についてウマではほとんど議論されておらず、作製方法同様に活性化方法を標準化することは、臨床において PRP 療法を適切に実施するうえで必要不可欠であると考えられている [28]。

そこで本章では、高い血小板濃度を有するウマ PRP を異なる 2 つの方法 (凍結融解法 (*Fr*)、あるいはカルシウムおよびトロンビン含有自己血清添加法 (*Ca*)) により活性化を行い、上清中に存在する組織修復に関係の深い 2 つの成長因子 (PDGF-BB および TGF- $\beta$ 1) 濃度を定量後比較し、最大濃度の成長因子を抽出する方法について検討した。また、ヒト PRP では繰り返し凍結融解を行うことにより高濃度のサイトカインが得られたと報告されていることから [42, 43]、ウマ PRP における凍結融解の回数が成長因子濃度に与える影響についても比較検討を行った。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 使用動物

PRP 作製実験には 5 頭の健康なサラブレッド種 (牡 3 頭、牝 2 頭、4~8 歳、体重 411~541 kg) を使用した。また、PRP 活性化試験および反復的凍結融解試験については 11 頭の健康なサラブレッド種 (牡 7 頭、牝 4 頭、 $5.0 \pm 1.5$  歳、 $496 \pm 26$  kg (平均  $\pm$  SD)) を用い

た。なお、全ての実験内容について日本中央競馬会競走馬総合研究所における動物実験委員会の審査を受け許諾された（許諾番号 2019-7、16-7 および 17-8）。

## 2-2-2. PRP 作製実験

採血量に対する 10%量のクエン酸ナトリウム（ACD-A 液、テルモ BCT、東京）を事前に容れたディスポーザブルシリンジを用いて、頸静脈から静脈血 220 ml を採取した。自動血球計算機（thinka CB-1010、アークレイ(株)、京都）で血球数を測定した後、採取した血液をポリプロピレン製コニカルチューブに 10 ml ずつ分注した。

PRP は以下に示すようなダブルスピン法で作製した（図 2-1）。分注した血液は 4℃で 5 分静置後に遠心機（himac CR21G、日立工機(株)、茨城）による遠心処理を行った。1 回目の遠心では、4 種類の異なる相対遠心力（relative centrifugal force: RCF）のいずれか（160 g、400 g、900 g、2000 g）の条件で 4℃、7 分間の遠心を行った。遠心後、血漿分画をポリプロピレン製シリンジを用いて吸引し、ポリプロピレン製ラウンドチューブへ内容に移し血球数を測定した。

初回遠心後の血球数測定結果に基づき最適であると判断された RCF のサンプルを用いて 2 回目の遠心条件を比較検討した。すなわち、初回に適用した 4 種類の RCF 条件のうち初回の RCF 以上となる条件で 4℃、7 分間の遠心を行った。2 回遠心後の上清を、チューブの底から 1 ml を残して吸引により除去し、チューブの底に残った残渣を再懸濁して PRP と

した。PRP 中白血球および血小板濃度を測定し、RCF 条件間で白血球および血小板濃度を比較した。

### 2-2-3. PRP 活性化試験

最適であると判断された作製方法に基づき、静脈血 100 ml より 10 ml の PRP を作製した。2 回目の遠心後に上清を採取し、乏血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) として別のチューブに移し 4°C で保存した (図 2-1)。得られた PRP および PPP 中の白血球および血小板数を測定後、PRP を個体ごとに 2 つのグループに分け、11 頭のうち 6 頭分を活性化試験、残り 5 頭分を後述の反復的凍結融解試験に使用した。同時に採血管 (BD Vacutainer SST™ II Advance Tube, BD Limited, Plymouth, UK) にて静脈血を採取した後、4°C、2,000 g で 10 分間の遠心を行って自己血清を作製し、PRP の活性化に用いた。

活性化試験では 2 種類の方法について比較検討を行った。*Fr* 法では、作製した PRP を一 80°C で 2 時間凍結後、室温で 30 分静置して完全に解凍した。*Ca* 法では、PRP に 1/40 量の 10% 塩化カルシウム液と 3/40 量の自己血清を添加してマイクロチューブ内でよく混合し、37°C 5 分間のインキュベーションを行いゲル化させた後、4°C、10,000 g にて 5 分間の遠心を行い、上清を採取した。*Fr* および非活性化 PRP サンプル (*No*) についても同条件にて遠心を行い、上清を採取した。*Ca*、*Fr*、*No* サンプル上清は、PPP と共に成長因子濃



度定量まで 4℃で保存した。これらのサンプル中の PDGF-BB および TGF-β1 濃度を定量し、比較を行った。

#### 2-2-4. PRP 反復的凍結融解試験

1 か月間凍結保存された PRP サンプルに対して、1 回 (*Fr1*)、2 回 (*Fr2*)、3 回 (*Fr3*) および 4 回 (*Fr4*) の凍結融解処理を行った。凍結融解処理では -30℃で一晩凍結後、室温 30 分静置による解凍を繰り返した。凍結融解処理を行った各サンプルに対して、図 2-2 のような処理を行った。すなわち、すべてのサンプルを 2 分割して、一方のサンプルは 4℃、10,000 g で 5 分間の遠心を行い、上清を採取した。遠心残渣中の成長因子濃度を測定するため、プロテアーゼインヒビター (cOmplete™ ULTRA Tablets、Roche Ltd、Basel、Switzerland) 入り 0.5% Triton™ X-100 (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis., MO., USA) PBS 溶液中で残渣を溶解し、室温 30 分間のインキュベーションによる抽出処理を行った。血小板膜を溶解して PRP 中に含まれる成長因子の全量を定量するため、他方のサンプルについて同様に Triton 溶液中で室温 30 分間のインキュベーションを行った (洗淨 *Fr*)。PRP 上清、残渣、洗淨 *Fr* (全量) 中の PDGF-BB および TGF-β1 濃度を定量し、比較を行った。

さらに、凍結融解処理自体が成長因子濃度の測定値におよぼす影響を確認するため、PRP 上清を 2 つに分注し、片方については -30℃で一晩凍結後室温 30 分で解凍した (凍結融解上清)。このサンプルにおける PDGF-BB および TGF-β1 濃度も定量し、他方 (凍結融解前

の上清)の濃度と比較した。加えて、凍結融解処理によって PRP 中で増加した成長因子量を明らかにするため、凍結融解 PRP の上清と凍結融解上清中の成長因子濃度を比較した。

#### 2-2-5. 成長因子濃度測定

PDGF-BB および TGF- $\beta$ 1 濃度定量は市販の ELISA キット (Quantikine Human PDGF-BB ELISA DBB00 and Quantikine Human TGF- $\beta$ 1 ELISA DB100B、R&D Systems、Minneapolis、MN.、USA) を用いて、添付説明書どおりデュプリケートにて実施した。これらのキットはヒト用に製作されたものであるが、ウマでも使用可能であることが確認されている [14、15、24、29、44]。これらの成長因子濃度は PRP 作製後 6 時間は安定していることが報告されているため、PRP 作製 (反復的凍結融解試験では解凍時) から濃度測定開始まで 6 時間以内に完了するようにした[44]。

#### 2-2-6. 塗抹検査

白血球および血小板の形態変化を確認するため、PPP、非活性化 PRP (*No*-PRP)、*Ca*-PRP 上清および凍結融解 PRP (*Fr1*~*4*) の塗抹サンプルを作製し、染色キット (ディフクイック染色キット、シスメックス(株)、神戸) にて染色を行い鏡検した。

#### 2-2-7. 統計学的解析

最適な PRP 作製方法の検討に関して、PRP 中白血球濃度と血小板濃度についての比較評価では、一元配置分散分析を行った。これにより統計学的有意差が検出された場合、Tukey's test による事後検定を行った。

活性化方法の検討に関して、成長因子濃度の実数データの多重比較では一元配置分散分析を実施し、事後検定として Tukey's test を行った。濃縮率の多重比較では Kruskal–Wallis test を実施し、事後検定として Steel–Dwass test を行った。凍結融解上清中濃度に関する比較検討では、対応のある t 検定を用いた。解析にはマイクロソフトエクセル 2013 マクロアプリケーションソフト (Excel 統計 ver. 7.0、(株)エスミ、東京) を用い、有意水準は 5% とした。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. PRP 作製実験

#### 1) 1 回目の遠心後のサンプル所見

1 回目の遠心後の血球数測定結果から、血小板濃度は 160 g および 400 g で遠心されたサンプルにおいて、900 g および 2000 g で遠心されたものより有意に高く、また 900 g および 2000 g では全血以下の濃度を示した (図 2-3A)。白血球濃度は 160 g で遠心されたサンプルにおいて他の RCF に比べて有意に高かった (図 2-3B)。いずれの RCF 条件においても、白血球濃度は全血以下となった。

## 2) 2回目の遠心後のサンプル所見

2回目の遠心後の血球数測定結果から、いずれの条件でも血小板の濃縮を達成し、160×2000 g、160×900 g、400×2000 gの順に高濃度であった（表 2-1、図 2-4A）。特に160×2000 gおよび160×900 gでは、160×160 gに対して有意に高濃度の血小板を含有していた。白血球濃度は1回目に400 gで遠心されたPRPにおいて160 gで遠心されたものより有意に低かった（図 2-4B）。全血中の値に対する比を算出すると、400×400 g、400×900 g、および400×2000 gで作製されたPRPにおける白血球数の比はほぼ1以下であった（表 2-1）。

### 2-3-2. PRP 活性化試験および反復的凍結融解試験に使用された PRP の性状

全血および作製されたPRP中の血小板濃度および白血球濃度を表 2-2 に示す。塗抹鏡検の結果、PRP中のほとんどの白血球（概ね90%以上）はリンパ球であった。一方、PPPおよびCaゲル上清には白血球や血小板を認めなかった。さらに、Fr1、Fr2、およびFr3中では、多くの血小板が形態を維持していた（図 2-5）。

### 2-3-3. PRP 活性化試験

PDGF-BB について、PPP および *No* サンプルではいずれも検出範囲以下の濃度であった (<31.2 pg/ml)。 *Ca* における濃度 (平均±SD、5,222 ± 3,957 pg/ml) は他に比べて有意に高かった (*Fr*; 1,369 ± 1,138 pg/ml、図 2-6A)。

TGF-β1 について、*Fr* (7,235 ± 2,842 pg/ml) および *Ca* (8,084 ± 2,257 pg/ml) における濃度は、PPP (1,779 ± 461 pg/ml) および *No* (1,994 ± 442 pg/ml) に比べて有意に高かったが、*Fr* と *Ca* との間に差は認められなかった (図 2-6B)。

#### 2-3-4. PRP 反復的凍結融解試験

PDGF-BB 濃度については、凍結融解回数に関係なく、全量 (*Fr1*; 9,486 ± 553 pg/ml、*Fr2*; 11,545 ± 1,873 pg/ml、*Fr3*; 12,295 ± 1,709 pg/ml、*Fr4*; 11,288 ± 1,591 pg/ml) は上清 (*Fr1*; 2,698 ± 1,510 pg/ml、*Fr2*; 5,224 ± 913 pg/ml、*Fr3*; 6,294 ± 1,254 pg/ml、*Fr4*; 6,351 ± 1,419 pg/ml) や残渣 (*Fr1*; 3,512 ± 2,045 pg/ml、*Fr2*; 2,906 ± 654 pg/ml、*Fr3*; 2,236 ± 344 pg/ml、*Fr4*; 2,069 ± 572 pg/ml) に比べ有意に高い濃度であった (図 2-7A)。 *Fr1* については上清と残渣の濃度に差が見られなかったが、*Fr2*、*3* および *4* については、残渣よりも上清中濃度の方が有意に高かった。 *Fr1* および *Fr2* の上清中濃度は凍結融解処理により有意に減少した (凍結融解上清: *Fr1*; 2,154 ± 1,188 pg/ml、*Fr2*; 4,218 ± 852 pg/ml、*Fr3*; 5,180 ± 929 pg/ml、図 2-7B)。 さらに *Fr2* および *Fr3* については、凍結融解 PRP において凍結融解上清に比べて有意に高い濃度を示した。 *Fr1* の濃度に対する各

凍結融解 PRP の濃度比を比較すると、*Fr2*、*3*および*4*上清中濃度は*Fr1*に対して有意に高かったが、*Fr2*、*3*および*4*の間では差が見られなかった (図 2-7C)。残渣および全量については、凍結融解回数に関する所見は見られなかった。

TGF-β1 濃度については、*Fr4* の全量濃度が有意に残渣よりも高かったが、この所見以外に全量 (*Fr1* ; 32,610 ± 2,556 pg/ml、*Fr2* ; 44,660 ± 17,225 pg/ml、*Fr3* ; 45,028 ± 23,544 pg/ml、*Fr4* ; 55,506 ± 22,461 pg/ml)、上清 (*Fr1* ; 27,870 ± 15,031 pg/ml、*Fr2* ; 41,428 ± 22,438 pg/ml、*Fr3* ; 40,386 ± 14,338 pg/ml、*Fr4* ; 40,938 ± 21,341 pg/ml) および残渣 (*Fr1* ; 19,564 ± 3,000 pg/ml、*Fr2* ; 17,834 ± 4,985 pg/ml、*Fr3* ; 18,278 ± 9,282 pg/ml、*Fr4* ; 15,166 ± 3,210 pg/ml) 間での濃度差は見られなかった (図 2-7D)。*Fr3* の上清中濃度は凍結融解処理により有意に減少した (凍結融解上清 : *Fr1* ; 21,658 ± 5,322 pg/ml、*Fr2* ; 23,044 ± 3,887 pg/ml、*Fr3* ; 27,074 ± 5,336 pg/ml、図 2-7E)。さらに *Fr3* については、凍結融解 PRP において凍結融解上清に比べて有意に高い濃度を示した。*Fr1* の濃度に対する各凍結融解 PRP の濃度比を比較すると、*Fr2* および *Fr4* 上清中濃度は *Fr1* に対して有意に高かったが、*Fr2*、*3* および *4* の間では差が見られなかった (図 2-7F)。残渣および全量については、凍結融解回数に関する所見は見られなかった。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. 最適な PRP 作製方法

ダブルスピンの法による PRP 作製の詳細は次のとおりである[33]。1 回目の遠心後全血は、主に血小板と白血球が多く含まれる上層の血漿分画、白血球が多く含まれる中間層であるバフィーコート分画、主に赤血球が多く含まれる下層の赤血球分画の 3 つの層に分かれる。PRP は血小板を主成分とするため、初回遠心後は血漿分画のみ採取する。2 回目の遠心では血球成分をチューブの底にペレット状に沈殿させ、上清を廃棄することで血球成分を濃縮することを目的とするため、1 回目よりも大きな RCF で遠心させる必要がある。上清の廃棄後に底部の残渣を残りの上清中に再懸濁させることで主に血小板で構成された濃縮液が作製される。

1 回目の遠心後、3 つの層に含まれる血球成分の構成は RCF や遠心時間によって変化する[33]。このため、初回遠心後に抽出された血漿分画サンプルにおいてすでに血小板や白血球の成分構成に相違が生じていた。血球成分の構成に大きな影響を与えるもう一つの大きな要因である遠心時間の設定を行うに当たり、初回遠心の RCF を 160 g で実施した場合、7 分未満の設定で遠心を行うと血漿分画に赤血球が浮遊していた。このため遠心時間を 7 分間で設定し統一した。

本研究では初回遠心の RCF が大きくなるとサンプル中の白血球濃度が減少していく傾向を認め、900 g 以上では白血球をほとんど認めなかった。この結果は、RCF が大きくなると血漿分画に存在している白血球がバフィーコートに集積していく傾向があることを示している。血小板においても同様の所見を認め、特に 900 g および 2000 g で遠心されたサンプル

ルでは血小板濃度が常に全血以下の数値となっていた。同様の所見はイヌでも報告されており、大きな RCF によって血漿分画の血小板がパフィーコート分画以下に沈み込んでしまっただけのためと考えられた[45]。これにより 1 回目の遠心条件は、血小板の濃縮を達成可能な 160 g または 400 g が最適であるとして、2 回目の遠心の RCF はこれらと同じかこれ以上で設定を行った。

RCF の組み合わせ条件の比較検討を行った結果、160 × 900 g、160 × 2000 g、および 400 × 2000 g で遠心した場合に高い血小板濃度が得られたことから、これら 3 条件について白血球濃度を比較した。その結果、400 × 2000 g における白血球濃度は著しく低く、全血中の値以下となっていた。こうした事実から、血小板濃度が高く白血球濃度が低い PRP を作製する場合は 400 × 2000 g の条件が最適と考えられた。

#### 2-4-2. 最適な PRP 活性化方法

損傷を受けた組織では、最初に PDGF-BB が白血球、線維芽細胞および平滑筋細胞の増殖性と走化性を高めるとともに、*VEGF* 遺伝子発現を促すことにより血管再生を促進する[11]。また PDGF-BB は骨格筋再生過程において筋芽細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられている[46]。TGF-β1 は未分化の幹細胞の増殖を促進して細胞外マトリクスの再生、線維芽細胞の増殖および I 型コラーゲンの生成を促し、PDGF-BB と協調して筋原細胞の前駆細胞であるサテライトセルを活性化させ、血管新生を促進する[46]。これら 2 つの成長因



子は血小板に多量に含まれているため、PRP が筋組織修復におよぼす影響を検討する上で特に重要なタンパクであると考えられた。さらに活性化 PRP の上清中に組織修復に有効な成分が多量に抽出されていることで投与部位における効果が即時的に得られるため、上清中のこれら 2 つの成長因子濃度を安定的に最大とするような活性化方法を最適な方法とした。

PRP 活性化試験の結果、活性化 PRP 上清には高濃度の成長因子が含まれていることがわかった。PDGF-BB は *Ca* 法によって濃度が最大となったが、TGF- $\beta$ 1 では活性化方法による差が見られなかった。この結果は既報と同様であった[14]。一方、1 回凍結融解 PRP の鏡検所見を鑑みれば、1 回の凍結融解では血小板中の PDGF-BB が十分抽出されていない可能性があり、このことがカルシウム自己血清添加法より PDGF-BB 濃度が低かった原因と考えられた。TGF- $\beta$ 1 でも同様であろうと推測されたが結果は異なり、活性化方法による濃度差が見られなかった。一方で、1 回凍結融解により上清中に抽出される TGF- $\beta$ 1 の量には個体差が大きかった。ヒトでは凍結融解により白血球が破壊されることによって放出されるサイトカイン量が PRP 中の成長因子濃度に影響すると報告されている[42、43]。本研究ではなるべく白血球が混入しないように PRP を作製したにもかかわらず、わずかな量の白血球が最終的に PRP に混じていた。本研究の結果はこういった白血球由来の無視できないほどの量の TGF- $\beta$ 1 が大きな個体差の原因となり、活性化方法の違いによる差を打ち消してしまっている可能性があると考えられた。このような結果から、上清中成長因子濃度が

高いカルシウム自己血清添加法が最適な活性化方法のように考えられるが、この方法により活性化された PRP の成長因子濃度はばらつきが大きく、より安定的に高濃度の成長因子が得られる活性化方法を検討する必要がある。

反復的凍結融解試験の結果から、1 回凍結融解 PRP の残渣中には依然として上清中に抽出された量に匹敵するほど多くの PDGF-BB が含まれ、凍結融解処理を繰り返し行うことでカルシウム自己血清添加法によって得られる量に匹敵するほどの成長因子量を安定的に上清中に抽出させることができた。カルシウム自己血清添加法で活性化させた PRP の上清中 PDGF-BB 濃度は 1 回凍結融解法のおよそ 3~4 倍であったが、2 回以上の凍結融解によって同等の濃度まで高めることが可能だった。ヒトの研究では、凍結融解処理は 1 回よりも 2 回の方が PRP 上清中成長因子濃度は高くなることが報告されている[43]。本研究では、1 回よりも 2 回以上凍結融解させた方が明らかに PRP 上清中濃度は高くなり、2 回以上凍結融解させても濃度の変化は見られなかった。凍結融解の回数を増やすと残渣中の血小板の破壊が進み、含有されている成長因子が上清中に抽出されていくため PRP 上清中の両成長因子濃度は増加するものと考えていたが、実際には 2 回以上では変化が見られなかった。

上清のみの凍結融解の結果を鑑みると、PDGF-BB は凍結融解処理に対してかなり脆弱であることが推測された。また凍結融解 PRP と凍結融解上清の濃度差は残渣中の血小板が破壊されて新たに抽出された成長因子量によるものと考えられた。こうしたことから、2 回以上の凍結融解を行っても、上清中に含まれていて処理によって損なわれた量と残渣中の血小

板から新たに抽出された量がほぼ等しかったため濃度が変わらなかったものと考えられた。

一方、ヒトで報告されているように、TGF-β1 については凍結融解処理に対して高い耐性が見られた[45、47]。このため、2 回目の凍結融解では新たに抽出された TGF-β1 が 1 回凍結融解 PRP の上清濃度に加算されているような所見が見られたが、PDGF-BB 同様に 3 回以上の上清のみの凍結融解により濃度減少が見られるようになり、PRP 上清中濃度も変化が見られなくなってしまった。また繰り返し凍結融解処理を行っても、全量、上清および残渣間における TGF-β1 濃度の差が明らかにならなかった。このことは、PRP 中 TGF-β1 濃度が血小板だけでなく、白血球のような他の血球成分によって影響を受けていることを示唆している[42、43]。これらのことから、PRP の凍結融解活性化法では、最低 2 回の凍結融解処理によって PRP 上清中 PDGF-BB および TGF-β1 濃度を安定的に高濃度にすることが可能であると考えられた。

PRP に含まれている組織修復を促す成長因子は、本研究で検討した 2 種類以外にも存在する[46、48]。特に筋挫傷の治療を考慮する場合、筋修復に関係の深いインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor-1; IGF-1)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factors; FGFs) および肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) 含有量の活性化方法による相違について検討が必要である。IGF-1 についてはウマではほとんど血小板に含まれていないため、作製および活性化方法に関わらず PRP 中濃度は全血と変わらないことが多数報告されている[15、24、29]。一方、FGFs や HGF についてはウマにおける信頼性の高い

定量方法が確立されていない。このためこれらを高濃度で含有する PRP の作製および活性化方法については、定量法と共に今後検討を行う必要がある。

さらに本研究では、1 か月凍結保存を行った PRP に対して凍結融解処理を行うことにより十分高濃度の成長因子が得られた。同一の PRP を複数回適用する場合は、一度に大量の PRP を作製した後に分注して凍結保存し、使用する分だけ解凍処理を行えば簡便である。これらのことから凍結融解法による PRP 活性化法は簡便で最適な方法であると考えられた。

## 2-5. 小括

PRP 療法の戦略は、PRP 中の血小板に主に含まれている成長因子を活用して組織修復を促進させることである。血小板に含まれる成長因子の多くは細胞活性を促進させる。本章では、ウマ PRP に含まれる血小板濃度および血小板に含まれている成長因子量に着目し、これらを安定的に高めるような方法について検討を行った。近年、PRP に含まれる白血球由来の成長因子およびサイトカインも治療に適用可能であるという報告が散見されるが、白血球由来の成長因子やサイトカインが血小板由来の成長因子に対していかなる影響をおよぼすのか、また投与された組織の修復に対してどのように作用するのかいまだ明らかにされておらず、ヒト臨床では PRP 中の白血球の混入の是非について議論が分かれている。

このため、本研究ではまず白血球の影響を最小限にした PRP が投与組織におよぼす影響を確認する必要があると考え、*in vivo*における投与試験においては 400 × 2000 g の遠心条件によるダブルスピン法により作製された PRP を適用し、成長因子の長期保存が可能な凍結融解法にて活性化を行うこととした。

表2-1. ダブルスピン法で作製された多血小板血漿 (PRP) 中  
白血球および血小板数の、全血中の値に対する比

RCF	白血球		血小板	
	Ratio	95%CI	Ratio	95%CI
160 × 160 g	1.8	1.4 - 2.2	2.4	1.8 - 3.0
160 × 400 g	2.4	1.8 - 3.0	3.8	2.4 - 5.2
160 × 900 g	2.4	2.2 - 2.6	5.9	3.5 - 8.3
160 × 2000 g	2.0	1.4 - 2.6	6.1	4.3 - 7.9
400 × 400 g	0.3	0.2 - 0.4	3.0	2.2 - 3.8
400 × 900 g	0.5	0.3 - 0.7	4.2	3.3 - 5.1
400 × 2000 g	0.5	0.3 - 0.7	5.5	4.8 - 6.2

RCF: 相対遠心力 (relative centrifugal force)

表2-2. 活性化試験および反復的凍結融解試験において作製された多血小板血漿 (Platelet-rich plasma:PRP)の概要 (n = 11、mean ± SD)

	白血球 ( $\times 10^9/l$ )	血小板 ( $\times 10^{10}/l$ )
全血	6.7 ± 1.2	12.0 ± 2.0
PRP	3.7 ± 1.6	92.0 ± 16.0
濃縮率	0.6 ± 0.3	7.4 ± 0.9

濃縮率は、PRP/全血の値

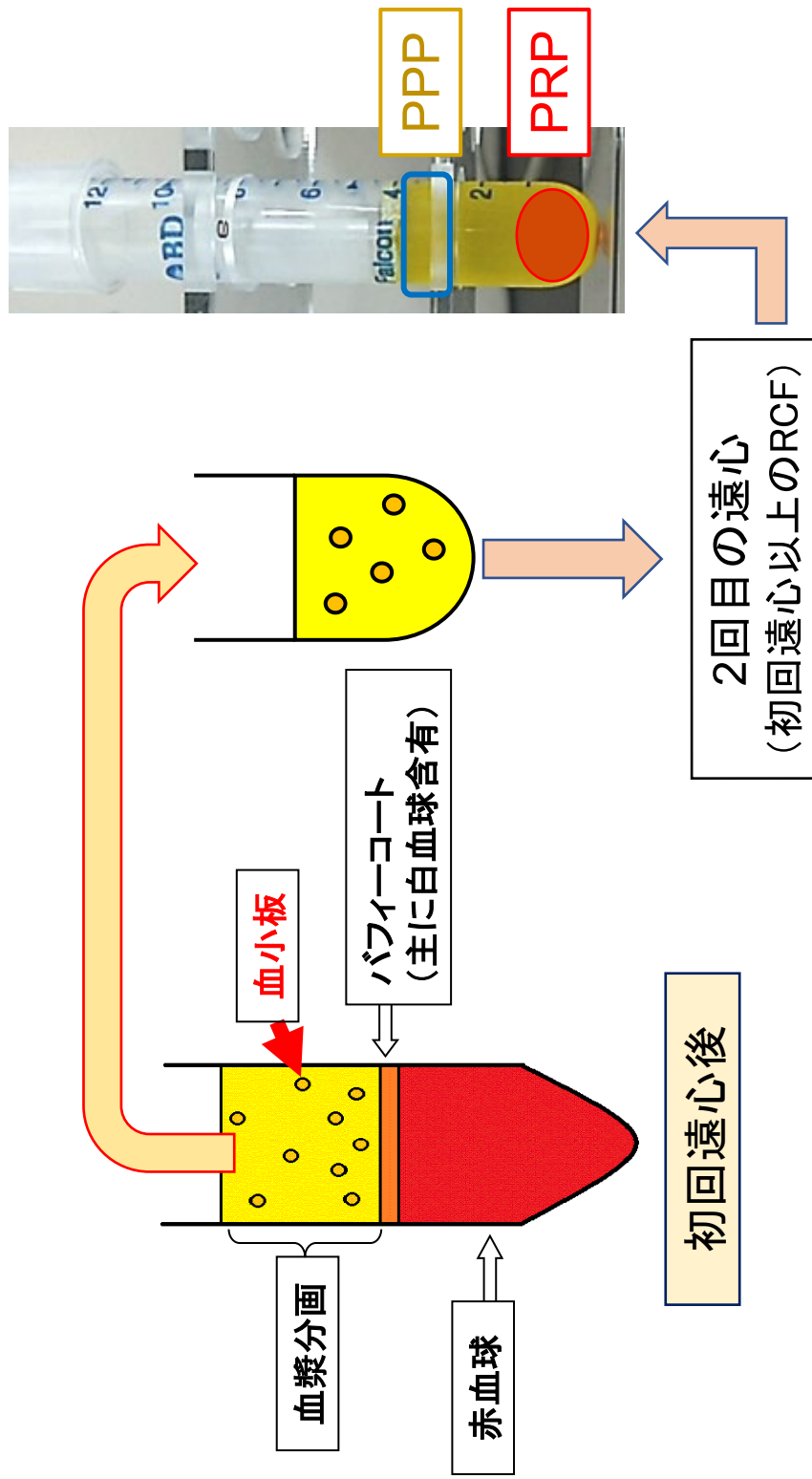


図2-1. 多血小板血漿 (PRP) の作製法 (ダブルスピンの法) の詳細。初回遠心後に血小板を含む血漿分画のみを採取し、さらに初回以上の相対遠心力 (relative centrifugal force: RCF) による2回目の遠心を行う。遠心後に容器の底から1 ml を残して上清を採取したものを乏血小板血漿 (PPP)、残った上清で底部に固着した残渣を再懸濁したものをPRPとした。



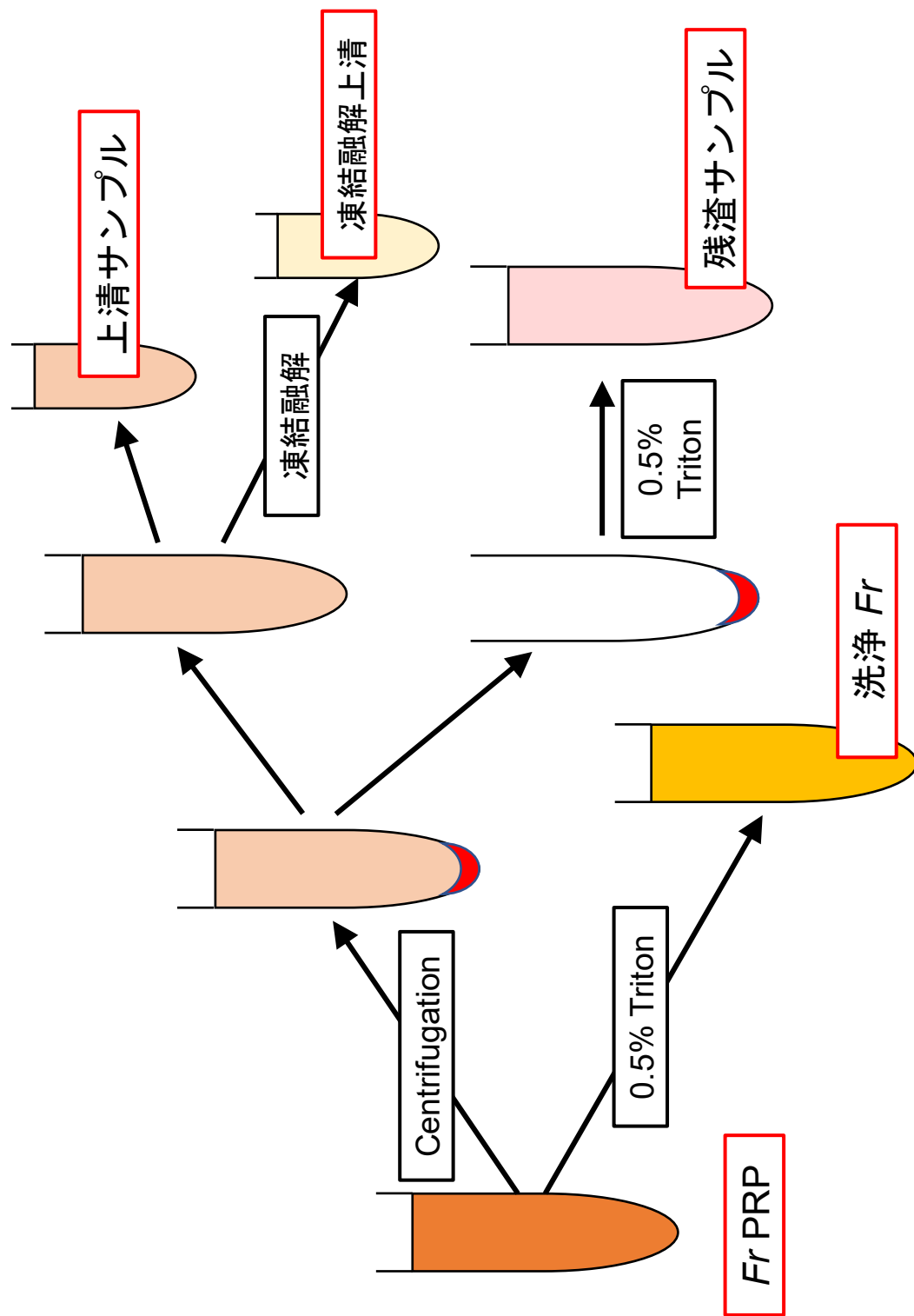


図2-2. 多血小板血漿 (PRP) 反復的凍結融解試験の概要。Fr PRP: 凍結融解PRP。

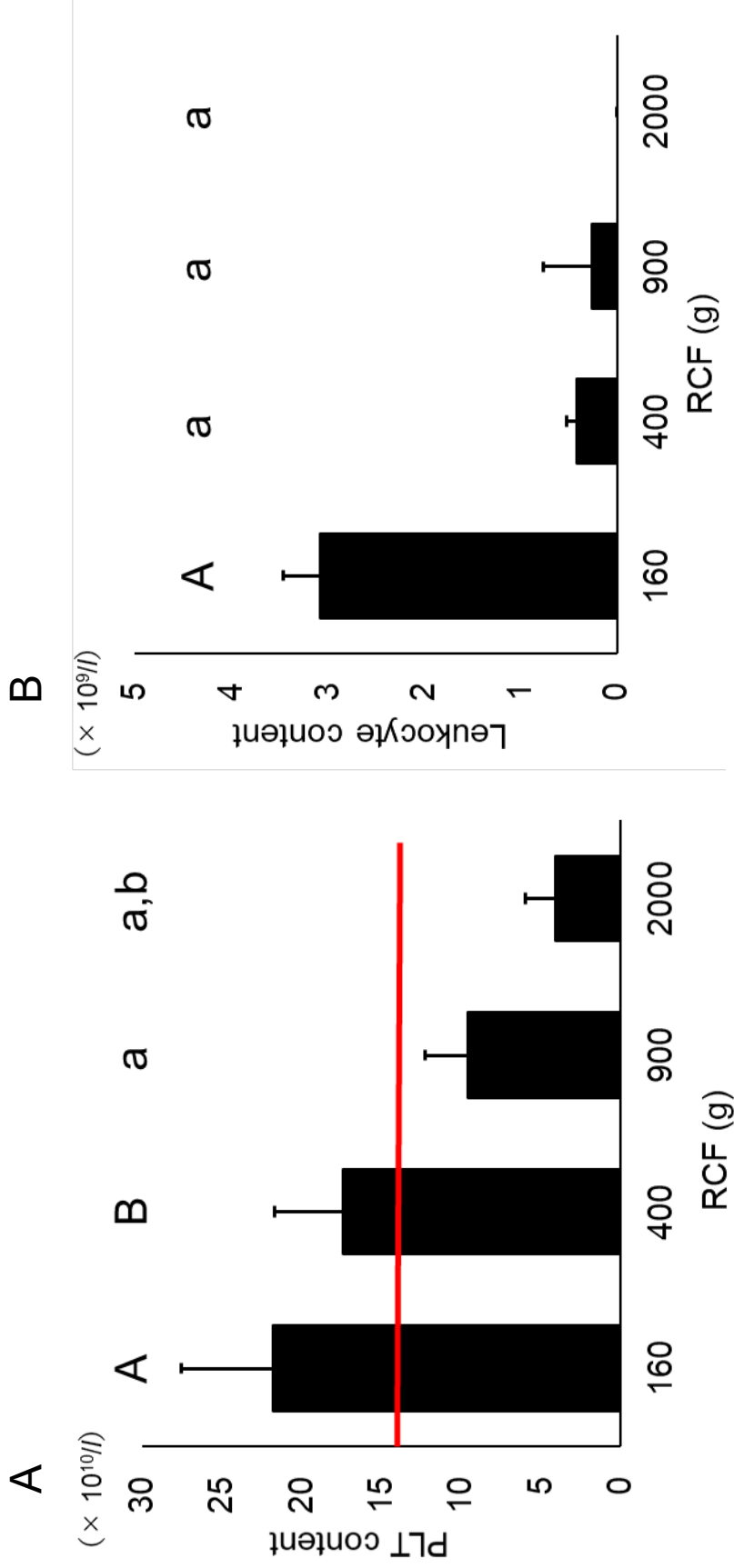


図2-3. 1回目の遠心後の多血小板血漿 (PRP) に含まれる(A) 血小板濃度および(B) 白血球濃度 (mean  $\pm$  95%CI)。血小板濃度における赤線は全血中濃度の平均値を示す。白血球濃度は全て全血以下であった。同じ文字の大文字と小文字間で有意差あり。  
 $P < 0.01$ 。

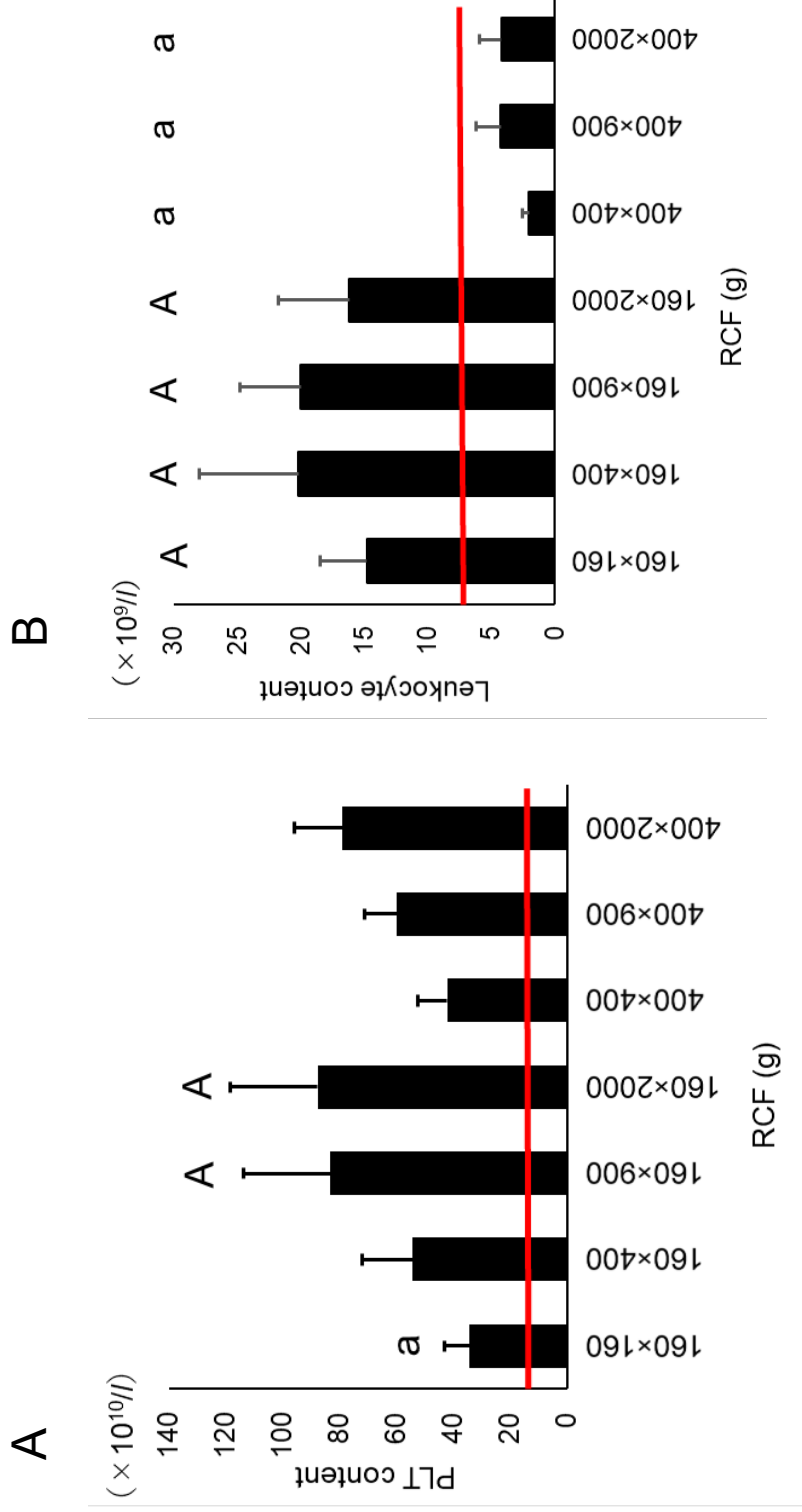


図2-4. 2回目の遠心後の多血小板血漿(PRP)に含まれる(A)血小板濃度および(B)白血球濃度(mean±95%CI)。赤線は全血中濃度の平均値を示す。同じ文字の大文字と小文字間で有意差あり。 $P < 0.05$ 。

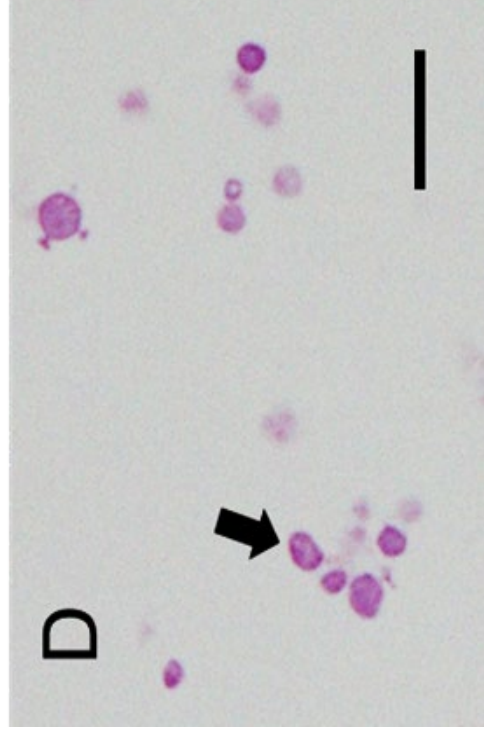
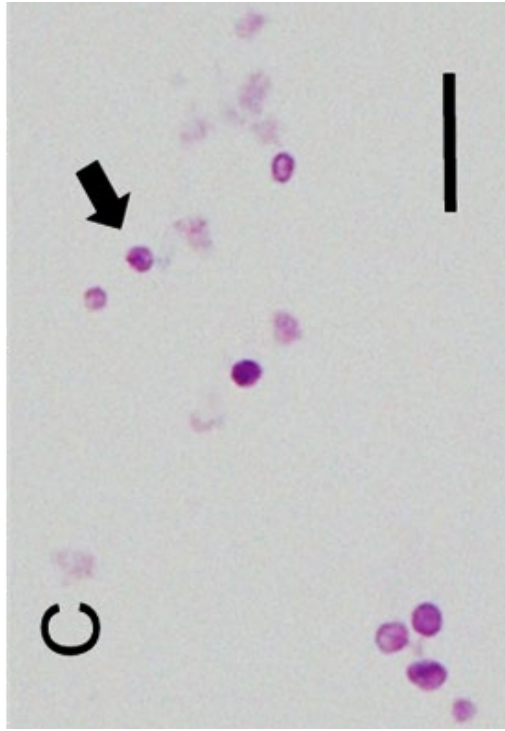
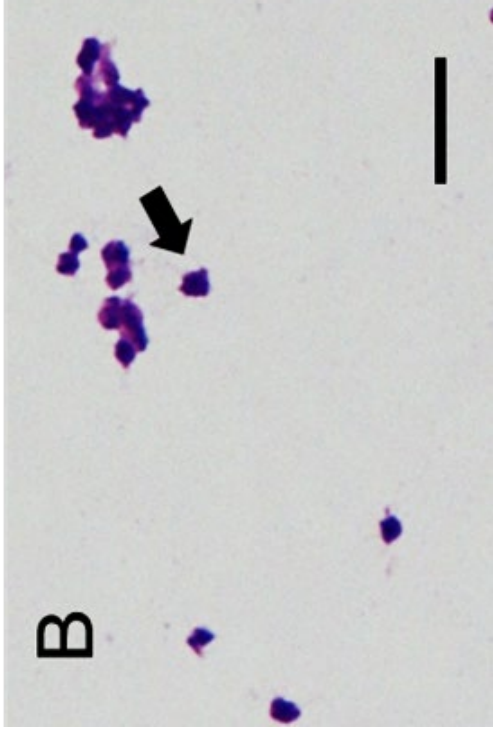
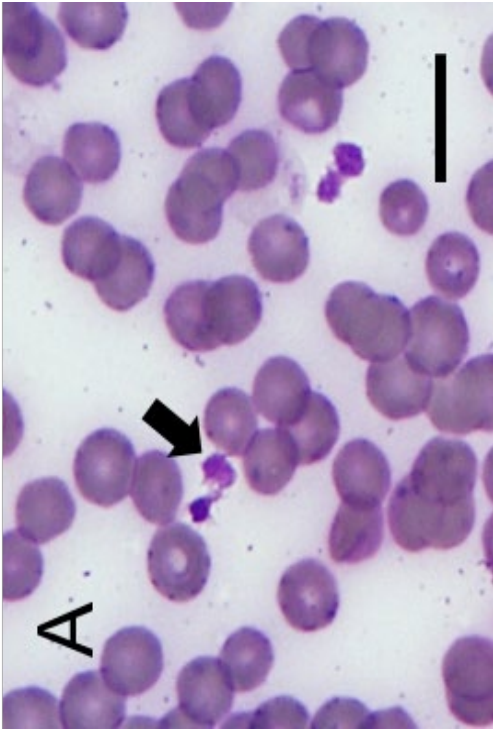
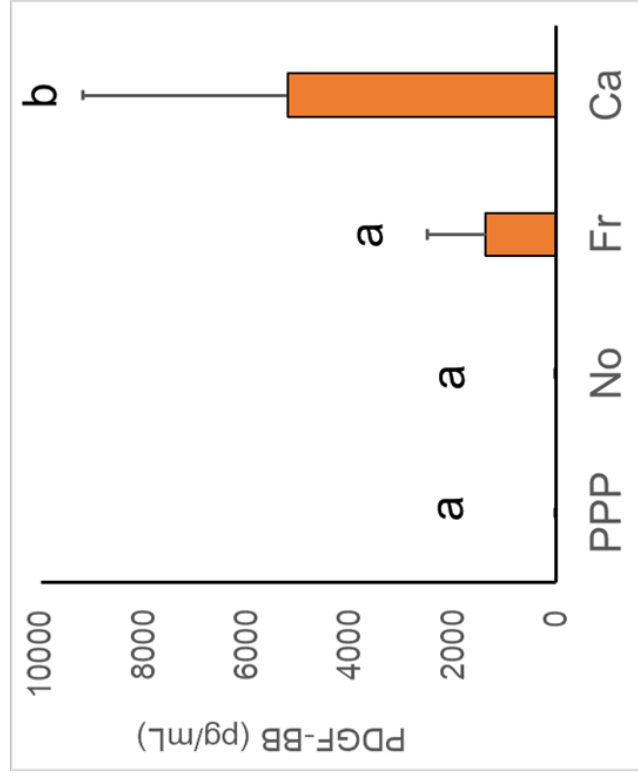


図2-5. (A)全血、(B)作製直後の多血小板血漿(PRP)、(C)1回凍結融解後のPRP、(D)3回凍結融解後のPRPの塗抹鏡像。ディフイク染色。黒矢印で示された血小板は形態を維持している。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。

A



B

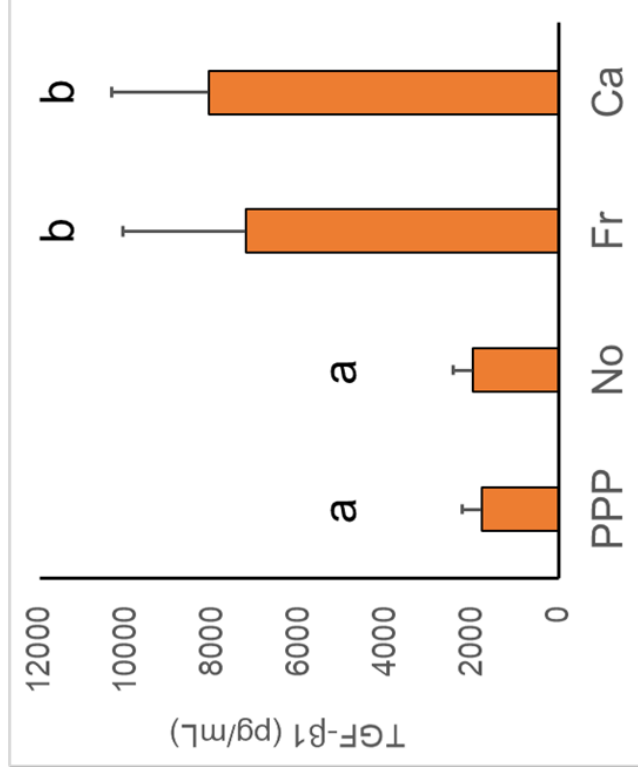


図2-6. 乏血小板血漿(PPP)、非活性化多血小板血漿(No)、凍結融解多血小板血漿(Fr)、カルシウム自己血清添加多血小板血漿(Ca)中の(A)血小板由来成長因子-BB(PDGF-BB)、(B)トランスフォーミング増殖因子-β1(TGF-β1)濃度(mean±SD、n=6)。異なる文字間に有意差あり( $P < 0.05$ )。

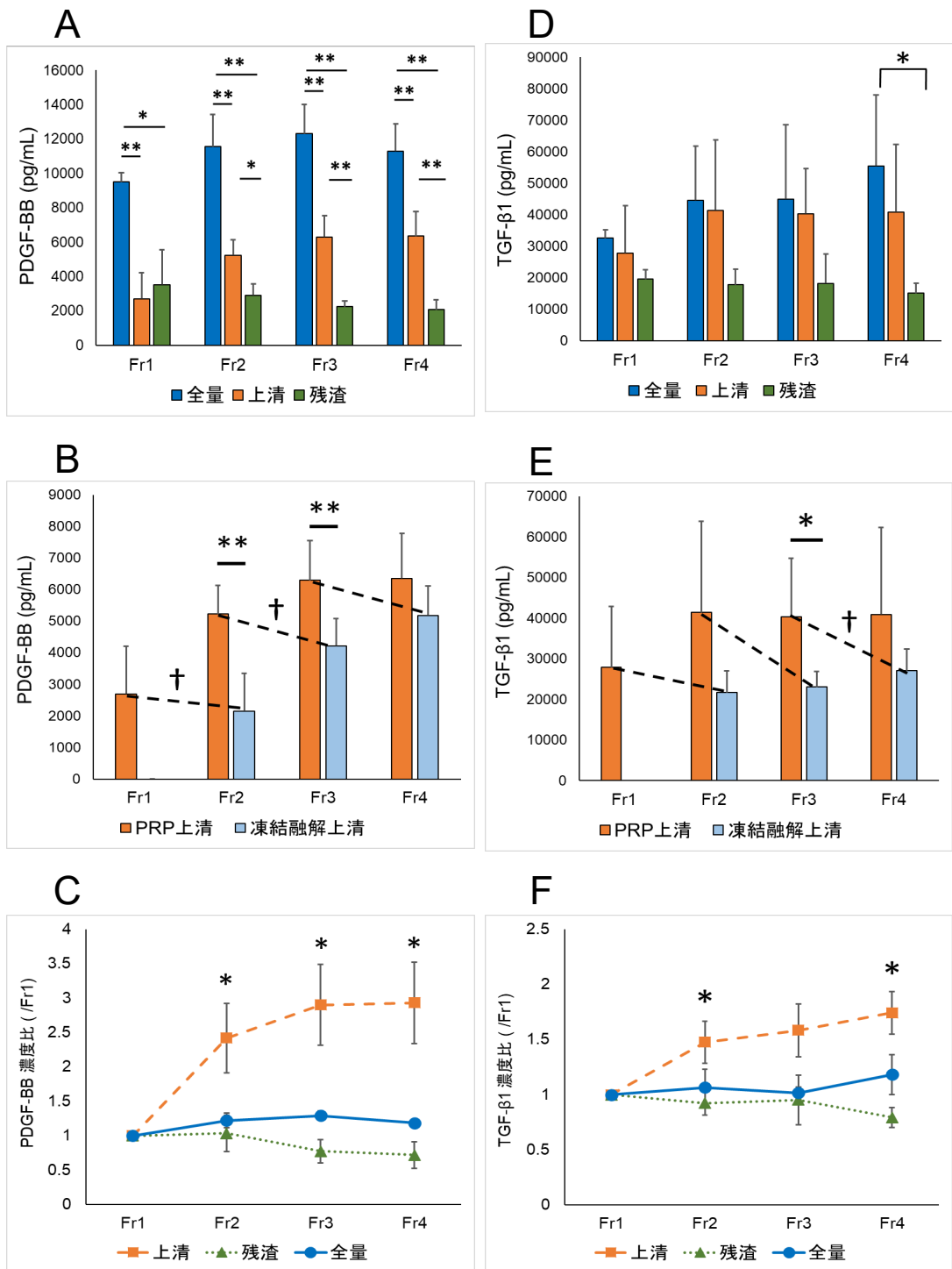


図2-7. 1回 (Fr1)、2回 (Fr2)、3回 (Fr3) および4回 (Fr4) の凍結融解を行った多血小板血漿 (PRP) 中の (A) 血小板由来成長因子-BB (PDGF-BB)、(D) トランスフォーミング増殖因子-β1 (TGF-β1) 濃度 (mean ± SD, n=5)。全量、サンプル遠心後の上清および残渣中濃度を比較。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。凍結融解させたPRP上清中の (B) PDGF-BB、(E) TGF-β1濃度の比較。「PRP上清」= (A) (D) の「上清」。破線は凍結融解前後の濃度比較を示す。\* † $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Fr1の値に対する (C) PDGF-BB、(F) TGF-β1濃度比 (mean ± SE)。(C) Fr2、Fr3およびFr4の上清中濃度はFr1に対して有意に高値であった。(F) Fr2およびFr4の上清中濃度はFr1に対して有意に高値であった。いずれも、Fr2、Fr3、Fr4間で上清中濃度に差は認められなかった (\* $P < 0.05$ )。

## 第3章 健全な骨格筋に対する PRP 投与がもたらす影響

### 3-1. 序論

ヒト臨床では、PRP 療法は近年骨格筋損傷の新しい治療法として期待されている[22、49]。*A Hamid*らは、ランダム化比較試験の結果、ヒトのハムストリングスの急性損傷に対する自己 PRP 投与が治癒を促進させることを報告した[49]。また *Mei-Dan*らは、ヒトの筋損傷に対して PRP 投与が効果的であったという多くの症例をまとめて報告した[22]。ラットの筋損傷モデルを使用した実験では、PRP 投与によって筋修復が形態学的に促進されたと報告されている[32]。このような事実を考慮すると、ウマの筋損傷に対しても PRP 療法が奏効する可能性がある。ところがウマ骨格筋損傷に対する PRP 療法の詳細に関しては、症例報告を除いてこれまでほとんど報告されていない[3、27]。

一方 *Tambella*らは、臨床における PRP の治療効果を正確に検討するためには、作製方法や活性化方法が標準化された PRP を用いて段階的でシステマチックな臨床試験を行い、適切な効果判定と安全性の評価を実施する必要があるとしている[28]。このことから本章では、損傷筋に対して PRP 投与がもたらす影響を検討する前に、健全な骨格筋に対して PRP を投与することで筋組織および筋細胞の前駆細胞であるサテライトセルにもたらされる組織学的および分子生物学的変化を確認するとともに、競走馬に対する筋力増強を目的とした用法や有害事象の発生の可能性を検討することを目的とした。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 使用動物

健康なサラブレッド種 7 頭（牡 6 頭、牝 1 頭、6～12 歳、体重 435～493kg）を使用した。

なお、全ての実験内容について日本中央競馬会競走馬総合研究所における動物実験委員会の審査を受け許諾された（許諾番号 2012-9）。

### 3-2-2. PRP 作製方法

前章において最適とした遠心条件に従い、ダブルスピン法により PRP を作製した。詳細には、採血量の 10%量のクエン酸ナトリウム（ACD-A 注射液、テルモ BCT）をあらかじめ満たしたディスポーザブルシリンジを用いて、頸静脈より 100ml の静脈血を採血した。得られた血液を 10 本のポリプロピレンチューブへ等量ずつ分注し、4℃、400×g 条件で 7 分間遠心した。各チューブの血漿分画を別のポリプロピレンチューブへ移し、4℃、2,000×g 条件で 7 分間遠心した。各チューブの底から 1 ml を残して上清を廃棄し、残渣を再浮遊させ PRP とした。得られた PRP を集めた後、自動血球計算機（Sysmex K-4500、シスメックス(株)、神戸）を用いて血小板数を測定し、全血中の血小板数と比較した。最終的に得られた PRP を -30℃で凍結保存し、投与直前に室温で解凍し血小板を活性化させ成長因子を放出させた。



解凍させた PRP 中の PDGF-BB および TGF- $\beta$ 1 濃度を ELISA キット (Quantikine Human PDGF-BB ELISA DBB00 および Quantikine Human TGF- $\beta$ 1 ELISA DB100B、R&D systems) を使用して、添付説明書どおりデュプリケートにて測定した。

### 3-2-3. 中殿筋への PRP 投与法

実験全行程を塩酸メドミジン (ドミツール、日本全薬工業(株)、福島 : 5  $\mu$ g/kg BW、IV) による十分な鎮静下で行った。柵馬内にて四肢均等に負重した状態でウマを駐立させ、右中殿筋に 2 $\times$ 2 cm の正方形範囲で 3 域の剃毛洗浄を行った。それぞれのエリアは 5 cm 以上間隔を確保した。まず、3 域のうち 1 域に 2 %リドカイン注射液 (キシロカイン注射液、アストラゼネカ(株)、大阪) による皮下浸潤麻酔を行い、SuperCore™ Biopsy Instrument (Argon Medical Devices, Inc., Plano, TX, USA) を用いた針生検により健常筋サンプル (PRE) を採材した。続いて、残りの 2 域にそれぞれ 4 ml の活性化自己 PRP および生理食塩水 (生食) を、皮下 2~3 cm に均一になるように筋肉内投与した。この処置の 5 日後、左中殿筋の右側と対称の位置に同様の処置を行った。最初の投与から 7 日後、両中殿筋のすべての筋注部位より鎮静および皮下浸潤麻酔下で針生検を行った。右側から得られたサンプルを 7D 群 (投与 7 日後群)、左側から得られたサンプルを 2D 群 (投与 2 日後群) とした。得られたすべての生検サンプルを液体窒素中で急速凍結し、定量解析まで -80 $^{\circ}$ C で保管した。生検後は抗生剤 (マイシリン注、日本全薬工業(株)) の頸部筋肉内投与および滅菌

ドレッシング（プリマポア、スミス・アンド・ネフュー(株)、東京）による保護を行った。

実験期間中、被検馬は馬房内休養とした。

#### 3-2-4. 免疫組織化学的および形態学的解析

バイオプシー試料からの凍結組織標本作製および免疫組織化学染色は、河合らの方法に基づいて行った[50]。簡潔に記載すると、筋線維長軸と直角をなす凍結筋組織の横断面を、 $20^{\circ}\text{C}$ 下でクリオスタット（CM510、ライカマイクロシステムズ(株)、東京）を用いて厚み  $8\ \mu\text{m}$  の連続切片とし、風乾固定した。その後、各筋線維のミオシン重鎖（myosin heavy chains: MHCs）分子種を識別するために、酵素抗体法を用いて免疫組織化学染色を行った。1次抗体として抗 MHC-II マウス・モノクローナル抗体（MY-32、SIGMA-Aldrich Japan、東京）および抗 MHC-IIa マウス・モノクローナル抗体（SC-71、DSHB、Iowa City、IA、USA）を使用し、2次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体（Bio-Rad laboratories、Hercules、CA、USA）を使用した。発色には DAB を用いた。

並行して、サテライトセルの局在を確認するために、4%パラホルムアルデヒドを用いて他の連続切片を固定後に免疫蛍光染色を実施した。1次抗体としてサテライトセルマーカーである抗 Pax7 マウス・モノクローナル抗体（DSHB、Iowa City）および筋基底膜マーカーであるウサギ抗 Laminin 抗体（L9393、Sigma-Aldrich Co. LLC、St Louis、MO、USA）

を使用し、2次抗体として Pax7 には Cy3 標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA) を、Laminin には Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, 東京) を使用した。対比染色として DAPI による筋核染色を実施した。

得られた免疫組織化学染色所見から、筋線維の型別分類を行った。顕微鏡撮影画像解析ソフト (ACT-2U、ニコン(株)、東京) により記録された筋線維の染色像を、MHC-II 陰性かつ MHC-IIa 陰性の Type I、MHC-II 陽性かつ MHC-IIa 陽性の Type IIa、および MHC-II 陽性かつ MHC-IIa 陰性の Type IIx に分類し、筋線維の組成を山野らの方法で算出した[51]。一方、Pax7、Laminin および DAPI 各染色画像を画像処理ソフト Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) 上で重ね合わせ、基底膜より内側かつ筋線維より外側の Pax7 陽性核を持つ細胞をサテライトセルとした[50]。その後、Type I は 25 本、Type IIa および Type IIx は各 50 本程度の筋線維を無作為に抽出し、各筋線維型別に筋核数、サテライトセル数および筋線維横断面積を ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) にて計測した。以上の計測結果から、筋核数/筋線維、中心核存在割合、筋核ドメインサイズ (筋線維横断面積/筋核数)、サテライトセル数/筋線維を算出した。

### 3-2-5. リアルタイム RT-PCR

筋線維再生に関わる各遺伝子発現状況を確認するため、河合らの方法に基づきグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH*) mRNA を内在性コントロールとするリアルタイム RT-PCR 法を行った[50]。簡潔に記載すると、全 RNA を TRIzol (Invitrogen、東京) を用いて抽出し、純度と収量を測定した。その後、サンプルからゲノム DNA を除去するため、TURBO DNase (Ambion、東京) を混合して 37°C 30 分間処理した。得られた RNA サンプル 0.5 µg に対して Exscript™ RT Reagent Kit (タカラバイオ(株)、滋賀) を用いて cDNA を作製し、StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems Japan、東京) の SYBR Green PCR Master Mix プロトコルを用いて解析を行った。RNA 増幅プロトコルは、熱変性条件を最初 95°C 10 分間とし、その後 95°C 30 秒間で 40 回行った。アニーリングおよび伸長反応は 58°C で 1 分間行った。定量後の融解曲線解析の結果、非特異的な PCR 生成物は認められなかった。確認した項目は、筋線維の分化度を示す *MHC-I*、*MHC-II*、および未分化 *MHC* (*embryonic MHC; MHC-e*)、サテライトセルの増殖分化度を示す *Pax7*、*myogenic determination factor* (*MyoD*)、および *myogenin*、筋修復に関わるサイトカインおよび成長因子として知られるインターロイキン 6 (*interleukin-6; IL-6*)、インシュリン様成長因子 (*insulin-like growth factor isoform 1; IGF-1*)、および肝細胞増殖因子 (*hepatocyte growth factor; HGF*) とした。プライマーの塩基配列は付表のとおりであった。各プライマーの設計は専用ソフトウェア (Primer Express software v3.0) にて行い、オリゴヌクレオチド鎖はファスマック(株)

(神奈川)より購入した。得られた結果については、各項目の PRE の mRNA 発現量を 1 としたときの相対値で表した。

### 3-2-6. 統計学的解析

組織学的解析により得られたデータの比較では、筋線維型別に一元配置分散分析法による各処置群 (PRE、生食、PRP) 間の有意差検定を行った。生食と PRP 群間の遺伝子発現の比較では、ウイルコクソン符号順位検定を行った。すべての検定において、解析にはマイクロソフトエクセル 2007 マクロソフト (Statcel3、(有)オーエムエス出版) を使用し、有意水準は 5% とした。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. PRP

実験に供用されたウマ 7 頭から得られた全血中の血小板数は、 $5.4 \sim 13.3 \times 10^4/\mu\text{l}$  (mean  $\pm$  SD ;  $9.8 \pm 2.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ ) であり、PRP 中の血小板数は、 $62.6 \sim 85.0 \times 10^4/\mu\text{l}$  ( $72.3 \pm 8.2 \times 10^4/\mu\text{l}$ ) であった。血小板濃縮倍率は  $5.4 \sim 12.1$  倍 ( $7.9 \pm 2.3$  倍) であった。凍結解凍された PRP 中には、PDGF-BB が  $5.0 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$ 、TGF- $\beta$ 1 が  $15.4 \pm 6.6 \text{ ng/ml}$  存在した。これらは血清中の濃度に比べて、それぞれ  $5.0 \pm 0.7$  倍および  $3.7 \pm 1.7$  倍高かった。PRP 中の血小板数、PDGF-BB 濃度、TGF- $\beta$ 1 濃度の間で相関は認められなかった。

### 3-3-2. 筋形態解析

免疫組織化学染色および免疫蛍光染色の典型的な画像例を図 3-1 に示す。得られた筋形態計測結果を表 3-1 に示す。筋線維型別に各処置（PRE、生食、PRP）群間の比較を行った結果、2D 群、7D 群ともに処置群間で有意な差は認められなかった。

### 3-3-3. リアルタイム RT-PCR

筋線維の分化度を示す遺伝子について、投与 2 日後では、*MHC-e* について、PRP 群 (mean  $\pm$  SE ;  $4.09 \pm 1.54$ ) において生食群 ( $1.20 \pm 0.18$ ) に比べ有意に高く発現していた (図 3-2)。投与 7 日後では、*MHC-I* について、PRP 群 ( $1.78 \pm 0.26$ ) において生食群 ( $1.33 \pm 0.22$ ) に比べ有意に高く発現していた (図 3-3)。

サテライトセルの増殖分化度を示す遺伝子について、*Pax7*、*MyoD* および *myogenin* では、いずれの投与群においても投与 2 日後での発現はわずかであったが、7 日後には発現が認められた。しかし両投与群間に差を認めなかった (図 3-2、3-3)。

筋修復に関わるサイトカインおよび成長因子の遺伝子について、*IL-6* および *IGF-1* では、両群共に投与 2 および 7 日後に同様の発現動向を示し、投与群間の差は見られなかった (図 3-2、3-3)。また *HGF* でも同様の所見が認められたが、投与 7 日後では PRP 投与群 ( $2.91 \pm 1.03$ ) において生食 ( $1.58 \pm 0.29$ ) に比べ有意に高く発現していた (図 3-3)。

### 3-4. 考察

損傷を受けた筋肉の一般的な再生過程の詳細は以下のとおりである[48、52]。筋細胞の前駆細胞はサテライトセルと呼ばれ、*Pax7*を発現して筋細胞膜と基底膜の間に存在している。通常は休眠状態であるが運動や損傷刺激により活性化し、*Pax7*に代わり *MyoD*を発現しながら増殖して筋芽細胞となる。その後 *myogenin* を発現した筋芽細胞は相互に融合して筋管を形成した後、*MHC-e*を発現した筋原線維となり、神経支配が成立すると *MHC-I*を発現した I 型筋線維あるいは *MHC-II*を発現した II 型筋線維に分化する。筋原線維から筋線維に分化する過程で線維の中心に存在していた筋核は辺縁へ移動する。筋再生に必要なサテライトセルが新生筋線維の筋核として十分供給されると、筋芽細胞に完全に分化していないサテライトセルに発現している *MyoD* は *Pax7* に取って代われ、休眠状態のサテライトセルとなって再び基底膜の内側で待機することとなる。骨格筋の再生過程におけるサテライトセルの増殖分化は損傷を受けた場合の筋修復も強い運動刺激に起因する筋肥大も基本的には同じメカニズムで行われる。

本研究では PRP の単回投与が健常筋組織におよぼす影響を調査検討するため、形態計測値やサテライトセル増殖および分化マーカーの発現変化を生理食塩水投与と比較した。生理食塩水を投与された群は、注射針刺入による出血や投与された液体の水圧の影響などを評価するためのコントロールである。また筋修復過程は IL-6、IGF-1 および HGF のような

様々なサイトカインや成長因子にも大きく影響されている[48]。これらの遺伝子発現を定量し PRP および生食投与処置群間で比較することで、投与された PRP が筋線維再生過程のいずれの段階に影響をおよぼすのかを明確にすることが可能である。

ヒトにおける PRP の理想的な血小板濃縮倍率は全血中の 4~5 倍といわれており、最終的な PRP 中の血小板数は約  $1.0 \times 10^6/\mu\text{l}$  が目標値とされている[9、10]。ウマについては明確な基準はいまだ提唱されていないが、本研究において使用された PRP の血小板濃縮倍率、および PRP が含有する血小板数および成長因子濃度は従来報告に匹敵するものであった[15、17]。これにより、すべての PRP において適切な濃縮がおこなわれたと考えられた。

ヒトの損傷筋では、受傷 2~3 日後にサテライトセル増殖のピークを迎え、5~7 日後には中心核を持つ多くの新生筋線維が著明に認められるようになることが知られている [52]。本研究では採材時期や処置に関係なく、形態変化の相違が認められなかった。小動物の筋損傷モデルを用いた同様の研究報告によると、*Hammond* ら[32]は PRP が筋再生を機能的にも組織学的にも早めたと報告した一方で、*Delos* ら[53]は生理食塩水投与と変わらなかったという相反した報告を行っている。ところが、共に「PRP 投与は、筋鞘のみ損傷を受ける程度の軽度な筋損傷よりも、サテライトセル活性が必要となるような重篤な筋損傷の治療に効果的である」という見解は一致していた。一方、本研究では PRP は重篤な損傷ではなく健常な筋肉に投与されており、PRP がサテライトセルや筋線維の形態変化に影響をおよぼすまでに至らなかったものと考えられた。



遺伝子変化については、マウス筋損傷モデルにおいて PRP が *MyoD* や *myogenin* の発現を促進させたという報告がある[32]。しかし本研究では、サテライトセル活性に関わる遺伝子群 (*Pax7*, *MyoD*, *myogenin*) の発現量について、処置間の差を見ることはできなかった。この理由を本研究で得られたデータで明らかにすることはできなかった。今回採材を行っていない時期に処置群間に差が認められることがあったとしても、投与 7 日後における筋線維の形態に差がないことから、PRP が健常筋のサテライトセルに及ぼす影響もわずかであったと考えられた。

損傷刺激により炎症細胞の活性化が生じ、IL-6 などの多種のサイトカインが放出され、この結果サテライトセルが活性化されることが知られている[48、54、55]。本研究では健常筋に投与しているにもかかわらず、投与周囲の筋肉から *IL-6* の発現が見られ、PRP 投与群において生食投与群に比べて高い発現をしている傾向があった。しかし標準誤差が大きく、両群間に差は認められなかった。ラット筋損傷モデルでは、PRP は *IL-6* の発現を高めることができないとしている報告がある[56]。本研究は健常筋への投与であるが、同様の結果を得た。これらの結果から、PRP の *IL-6* 発現に対する影響は個体差がかなり大きい可能性が考えられた。こういったことから、健常筋への PRP 投与が投与部位に与える影響は生食と変わらないものと考えられた。

また、投与 2 日後および 7 日後の両投与群で *HGF* や *IGF-1* の発現が認められたが、群間の差は認められなかった。ただ投与 7 日後では、PRP 投与群において生食群に比べて有意

に高い *HGF* 発現が認められた。*HGF* や *IGF-1* は PRP に含有されていることが知られており [17、24、57]、これらは骨格筋再生を促進することが知られている [48、52]。また損傷部位における局所出血は血中の血小板を活性化させ、血小板由来の多種多様な成長因子が周囲に放出されることにより血小板凝集反応や脱顆粒反応が連鎖的に進行していくことも知られている [10、11]。PRP や生理食塩水の筋注投与により想定以上の出血が生じれば、活性化された血小板が *HGF* や *IGF-1* のような成長因子を放出し、投与した薬液に関係なく投与部位周辺のこれらの遺伝子発現をパラクライン的に高める可能性が考えられる [9、11]。投与 7 日後の PRP 投与群における高い *HGF* 発現についての原因は不明であるが、本研究において PRP 投与によってもたらされる変化が生理食塩水投与と変わらなかったことから、健常筋に対する PRP 投与はサテライトセル活性や *IL-6* の発現だけでなく成長因子活性に対しても注射針刺入により生じる出血や物理的ストレスと同等の影響しか与えられないことが示唆された。

一方、PRP 投与 2 日後の *MHC-e* および PRP 投与 7 日後の *MHC-I* において、生食投与群に比べて有意に高い遺伝子発現が認められた。PRP が筋細胞の増殖や分化を促進させるという事実はこれまで数多く報告されている [22、32、56]。MHC の再生には活性化したサテライトセルが必要不可欠であることを鑑みると、これらの MHC 関連遺伝子の高発現は PRP によって活性化されたサテライトセルが原因であろうと考えられた [48、58]。しかし、PRP が *Pax7*、*MyoD* および *myogenin* のようなサテライトセル活性に関わる遺伝子発現に

およぼす影響が不明瞭なうえ、投与7日後の筋線維の形態に大きな影響を与えていない事実を鑑みれば、この高発現がPRP投与7日後以降に筋線維に与える影響も軽微である可能性が考えられる。

まとめると、PRPの健全骨格筋内投与は周囲の筋組織に形態学的変化をもたらさないことから、筋力増強を目的としたPRPの使用は現実的でないと考えられた。一方、投与部の筋組織における筋線維の分化に関連する遺伝子発現が増強されていることから、骨格筋の損傷に対するPRP投与はサテライトセルの増殖あるいは分化過程を活性化させ治癒を促進させる可能性が考えられた。さらに、本研究においてPRP投与によるネガティブエフェクトの所見は認められず、PRP投与により筋組織で有害事象が生じる可能性は低いと考えられた。

### 3-5. 小括

本章により、健全骨格筋組織へのPRP投与は筋線維を肥大増数させるような形態の著しい変化をもたらさないことが明らかとなった。また有害事象も認められず、損傷筋に対するPRP投与試験は実施可能であると判断された。

一方で、投与されたPRPが筋組織におよぼす影響について生食投与と差が見られず不明瞭であった理由には、①PRPの活性化が不十分で、放出された成長因子量が形態の変化に影響をおよぼすほどではなかったこと、②投与されたPRPが局所の出血とともに流出し、

投与部位に残存しなかったことが考えられた。これらは本実験のリミテーションである。これらの問題を解消して PRP が損傷筋修復にもたらす影響を明瞭に評価するため、PRP 由来の成長因子が可能な限り長期にわたり投与部位に残存可能となるような骨格筋損傷モデルを確立し、投与試験を行うことが必要と考えられた。本章における研究では生食投与群における局所出血による無視できない影響がデータを不鮮明にさせており、また過剰な局所出血は投与された PRP を流出させてしまうことから、投与試験では出血が少ない筋損傷モデルを確立した後、モデルに対し十分に活性化された PRP の投与を行い、PRP 由来の高濃度の成長因子が損傷組織に確実に曝露されるような方法で行うこととした。

表 3-1. 筋組織の各種形態計測値

			Type I	Type IIa	Type IIx	
筋線維型組成 (%)	2D	PRE	12.8 ± 4.1	47.7 ± 4.6	39.5 ± 5.4	
		生食	10.0 ± 3.9	49.0 ± 5.4	41.0 ± 8.3	
		PRP	11.9 ± 2.7	46.4 ± 7.4	41.7 ± 8.5	
	7D	PRE	11.7 ± 5.3	46.5 ± 5.2	41.8 ± 7.7	
		生食	12.1 ± 3.0	47.9 ± 6.3	40.0 ± 7.5	
		PRP	11.9 ± 3.3	44.6 ± 4.0	43.5 ± 6.5	
	筋線維横断面積 (× 10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup> )	2D	PRE	2.61 ± 0.80	3.25 ± 0.50	4.22 ± 0.45
			生食	2.66 ± 0.83	3.18 ± 0.46	3.75 ± 0.43
			PRP	2.61 ± 1.04	3.15 ± 1.15	3.85 ± 0.93
7D		PRE	2.38 ± 0.77	3.10 ± 0.55	4.06 ± 0.78	
		生食	2.86 ± 0.81	3.06 ± 0.76	3.76 ± 1.01	
		PRP	2.69 ± 0.79	2.92 ± 0.58	3.97 ± 0.90	
筋核数/筋線維		2D	PRE	2.63 ± 0.41	2.83 ± 0.42	2.92 ± 0.35
			生食	3.06 ± 0.45	2.87 ± 0.48	2.85 ± 0.30
			PRP	2.83 ± 0.43	3.11 ± 0.55	3.02 ± 0.47
	7D	PRE	2.91 ± 0.35	3.00 ± 0.32	3.18 ± 0.33	
		生食	3.00 ± 0.49	3.13 ± 0.55	3.05 ± 0.61	
		PRP	3.14 ± 0.38	3.12 ± 0.37	3.20 ± 0.40	
	中心核存在割合 (%)	2D	PRE	4.00 ± 6.11	4.57 ± 7.09	7.42 ± 8.46
			生食	1.71 ± 4.53	2.57 ± 2.76	9.71 ± 11.10
			PRP	0.57 ± 1.51	1.71 ± 1.80	4.57 ± 2.23
7D		PRE	0	0	1.00 ± 2.00	
		生食	3.42 ± 6.29	5.42 ± 6.80	8.29 ± 6.68	
		PRP	1.14 ± 1.95	4.00 ± 4.47	8.57 ± 10.11	
筋核ドメインサイズ (× 10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup> )		2D	PRE	1.14 ± 0.41	1.23 ± 0.36	1.60 ± 0.35
			生食	0.93 ± 0.28	1.19 ± 0.28	1.50 ± 0.28
			PRP	0.98 ± 0.35	1.07 ± 0.26	1.39 ± 0.28
	7D	PRE	0.89 ± 0.28	1.13 ± 0.21	1.45 ± 0.36	
		生食	1.00 ± 0.14	1.06 ± 0.19	1.36 ± 0.35	
		PRP	0.91 ± 0.25	1.04 ± 0.26	1.36 ± 0.25	
	サテライトセル数/筋線維 (× 10 <sup>-1</sup> )	2D	PRE	2.91 ± 1.84	3.86 ± 1.93	3.34 ± 2.09
			生食	3.63 ± 1.81	3.40 ± 1.33	3.49 ± 1.54
			PRP	3.74 ± 1.54	3.74 ± 1.46	3.20 ± 1.97
7D		PRE	2.10 ± 0.60	3.25 ± 1.35	2.70 ± 0.35	
		生食	3.23 ± 1.93	3.74 ± 1.68	3.17 ± 1.53	
		PRP	3.14 ± 1.95	3.87 ± 1.00	3.57 ± 1.00	

筋線維型別に各処置 (PRE、生理食塩水 (生食)、多血小板血漿 (PRP)) 群間の比較を行った結果、投与 2 日後 (2D) 群、7 日後 (7D) 群ともに処置群間で有意な差は認められなかった (mean ± SD)。

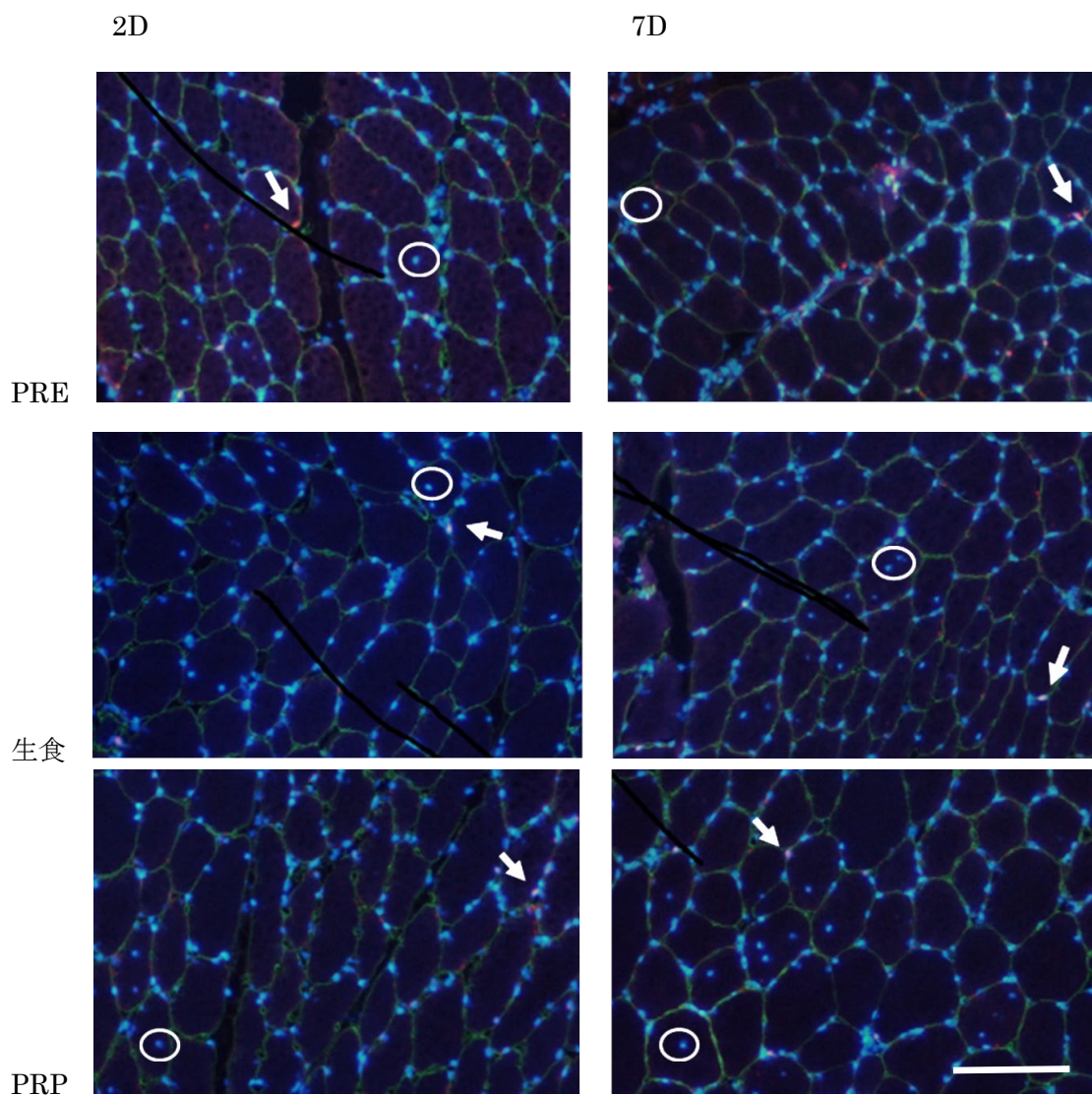


図 3-1. 多血小板血漿 (Platelet-rich plasma: PRP) あるいは生理食塩水 (生食) 投与前、2 日後 (2D) および 7 日後 (7D) の投与筋組織の三重免疫蛍光染色像。左側が 2D 群、右側が 7D 群を示す。緑: Laminin (基底膜)、赤: Pax7、青: 核。白矢印は Laminin 陽性の基底膜より内側かつ筋線維より外側で Pax7 陽性核をもったサテライトセルの一例。白円は新生筋線維に特徴的な中心核の一例。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。

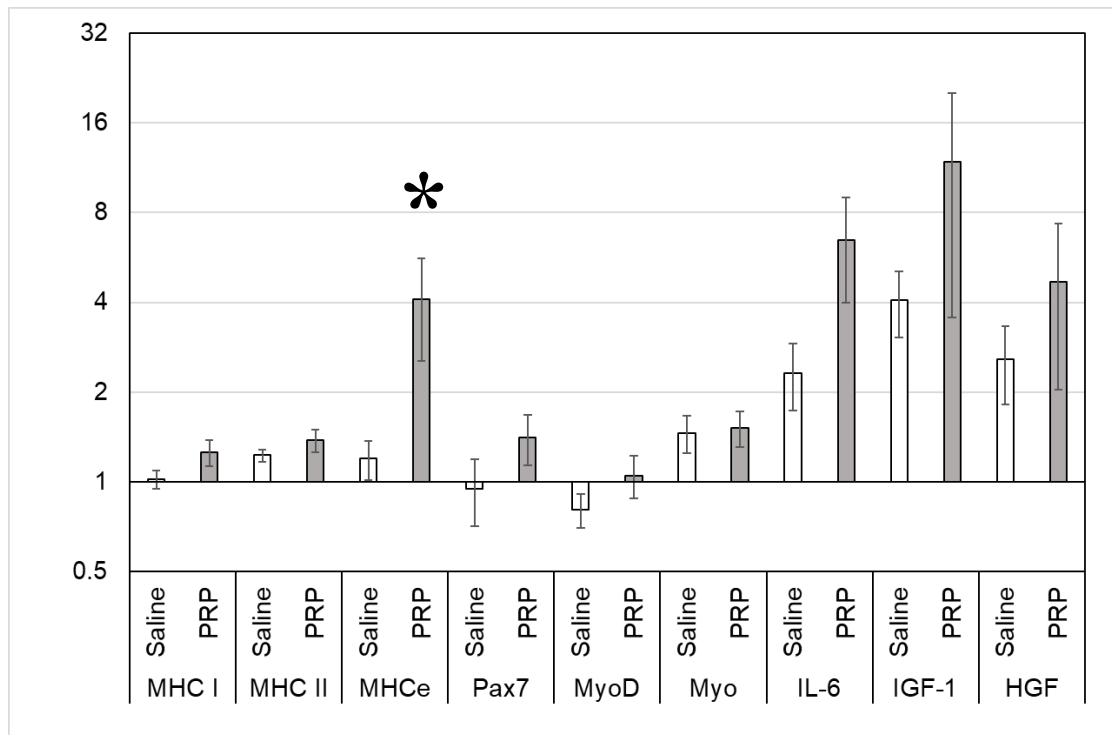


図 3-2. 筋肉内投与 2 日後に採材された筋組織における mRNA 発現量 (n=7; mean ± SE; 縦軸は対数目盛)。各目的遺伝子発現量は、PRE を 1 とした相対定量 (relative quantification: RQ) 値。MHC-e では PRP 投与群において、生理食塩水投与群に対する有意に高い発現が見られる (\* $P < 0.05$ )。Myo = myogenin。

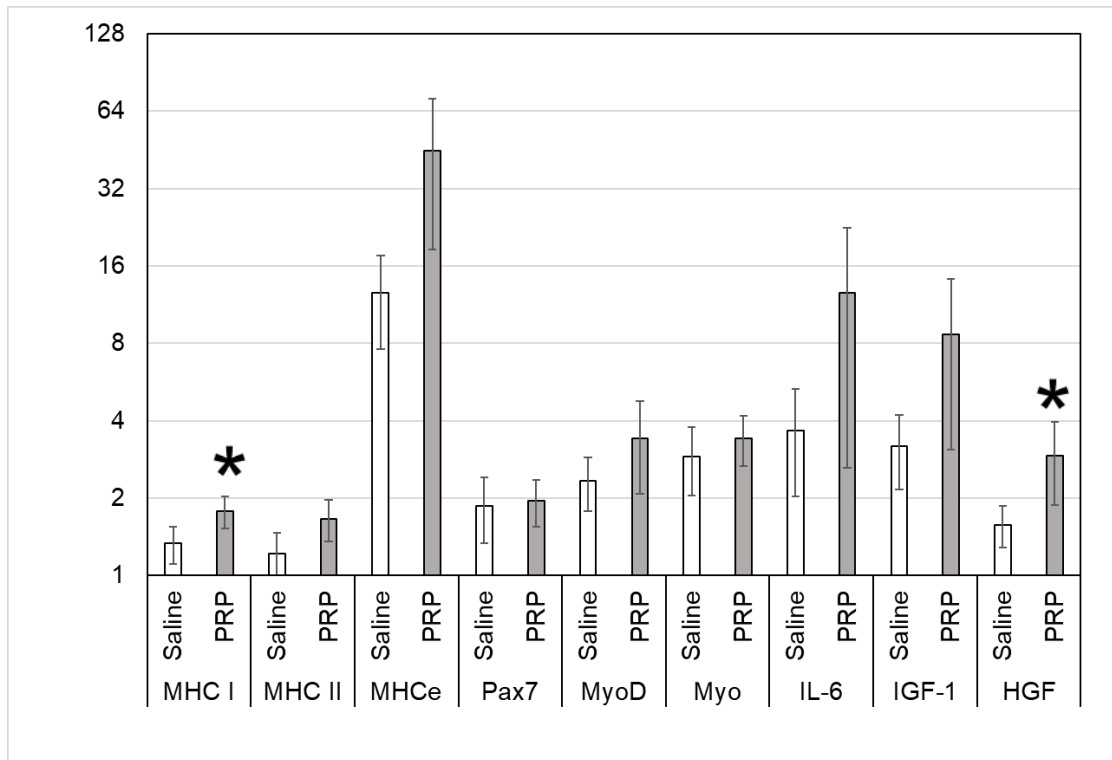


図 3-3. 筋肉内投与 7 日後に採材された筋組織における mRNA 発現量 (n=7; mean ± SE; 縦軸は対数目盛)。各目的遺伝子発現量は、PRE を 1 とした相対定量 (relative quantification: RQ) 値。*MHC-I* および *HGF* では PRP 投与群において、生理食塩水投与群に対する有意に高い発現が見られる (\* $P < 0.05$ )。Myo = myogenin。



付表

・本研究で使用されたリアルタイム RT-PCR プライマー配列一覧。

GAPDH	F	CAAGGCTGTGGGCAAGGT
	R	GGAAGGCCATGCCAGTGA
MHC-I	F	GGAATGACAACCTCCTCTCGCTTT
	R	TCAATATCAGCAGAAGCCAGTTTC
MHC-II	F	CCCATGAACCCTCCCAAATA
	R	GCAGGCTCATGCAGGTGAGT
MHC-e	F	TCACTTTGTGCGCTGTATAATTCC
	R	CTGGTGCAGGACAAGGCTATG
Pax7	F	CATCGGCGGCAGCAA
	R	TCCTCGATCTTTTTCTCCACATC
MyoD	F	ACGGCTCTCTGCAACTTTG
	R	GAGTCGAAACACGGGTCATCA
Myogenin	F	TCACGGCTGACCCTACAGATG
	R	GGTGATGCTGTCCACAATGG
IL-6	F	AACAACCTCACCTCATCCTTCGAA
	R	CGAACAGCTCTCAGGCTGAAC
IGF-1	F	TGTCCTCCTCACATCTCTTCTACCT
	R	CGTGGCAGAGCTGGTGAA
HGF	F	GGTACGCTACGAAGTCTGTGACA
	R	CCCATTGCAGGTCATGCAT

## 第4章 実験的に作製された筋損傷に対して PRP 投与がもたらす影響

### 4-1. 序論

ヒト臨床における骨格筋損傷に対する PRP 療法については多くの良好な治療結果が報告されている一方で、近年のランダム化比較試験の結果では期待されたほどの効果が得られなかったという報告も散見される[22、49、59]。実際の臨床における病態の多様性を考慮すると、*in vivo*において PRP が損傷筋組織へもたらす影響を明確に検討するためには、作製される病変の再現性が良い疾患モデルを使用して投与試験を実施することが望まれる[56]。多くの場合、疾患モデル動物としてはマウス、ラットのような実験小動物が用いられ、骨格筋損傷モデルについても多くの作製方法が考案され使用されている[60]。これまでげっ歯類筋損傷モデルに対する PRP 投与の影響について治癒促進効果が明らかにされている一方、明瞭な影響が認められなかったとの報告も見られる[32、53]。こういった相反する結果の一因として不適切な損傷モデルの選択適用が考えられており、治療効果を正確に評価するためには臨床における筋損傷の病態および修復過程をできる限り模倣できるようなモデルを適切に選択することが重要である[53]。

こういったことから、ウマ臨床における骨格筋損傷に対する最適な PRP 療法を検討するために、PRP 投与試験を適切に実施するためのウマ筋損傷モデル作製方法の検討を行い、作製されたモデルの特性を確認する必要がある。前章の結果から、健常筋に対する PRP 投

与によってもたらされる IGF-1 や IL-6 のような成長因子およびサイトカイン遺伝子の筋組織における発現量は生食投与と変わらなかったが、このことは薬液投与時の出血によって投与された PRP の希釈あるいは流出が生じたことが原因と考えられた。このため、用いられる筋損傷モデルは実際の病態や筋損傷修復過程を模倣していながら PRP 投与時に生じる出血が最小限となるものが望ましい。一方、マウスやラットでは局所麻酔薬ブピバカインの筋肉内投与により容易に筋損傷モデルが作製可能であることが知られており頻繁に用いられている[61-64]。このモデルでは基底膜、筋原細胞、血管および神経を損傷させることなく筋細胞膜のみを破壊することが可能で、これにより出血を最小限にしたモデルが作製できる[61、63、64]。また、ブピバカイン投与モデルにおける筋修復過程は実際の筋損傷修復過程をよく模倣している[63、64]。このため本章では、ウマでも同様の方法で出血の少ない筋損傷モデルが作製可能であるかを組織学的に検討した。

次に PRP が投与部位周囲の損傷筋組織におよぼす影響を検討するため、確立された筋損傷モデルに対し、血小板が多く含まれる自己血由来の PRP を成長因子が高濃度となるような 2 回凍結融解法で活性化させた後に投与し、投与部位周囲の筋組織における血小板由来の成長因子濃度や筋増殖および分化に関わる遺伝子発現量を経時的に測定した。また、筋損傷に対する PRP 投与 5 日および 7 日後に筋サンプルを採材し、組織学的検索を行って筋修復の程度を評価した。対照としては生理食塩水の投与を行い、PRP 投与との比較を行った。

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. 使用動物

健康なサラブレッド種 6 頭（牡 4 頭、牝 2 頭、 $5.2 \pm 2.4$  歳、体重  $494.3 \pm 31.1$  kg（平均  $\pm$  SD））を使用して筋損傷モデル作製実験を行った。確立された方法に従って別の 25 頭の健康なサラブレッド種（牡 16 頭、牝 9 頭、 $4.8 \pm 1.4$  歳、体重  $505.6 \pm 46.4$  kg）に対して筋損傷モデルを作製し、PRP 投与試験を行った。なお、全ての実験内容について日本中央競馬会競走馬総合研究所における動物実験委員会の審査を受け許諾された（許諾番号 2015-11、16-6、17-8、18-7）。

### 4-2-2. 筋損傷モデル作製実験

塩酸メデトミジン（ドミツール、日本全薬工業(株)： $5 \mu\text{g}/\text{kg BW}$ 、IV）による十分な鎮静下で、中殿筋の投与予定部位に異状が認められないことを超音波検査によって確認し、剃毛および洗浄を行った後に 0.5%塩酸プピバカイン（マーカイン、アスペンジャパン(株)、東京）10 ml を皮下 2~3 cm の深さで筋肉内投与した。中殿筋の複数箇所に投与する場合は、互いに 5 cm 以上の間隔を開けた。投与後はウォーキングマシンによる 15 分間の常歩運動を毎日行った。

投与 24 時間、2 日および 7 日後に、塩酸メデトミジン鎮静下におけるチオペンタールナトリウム（ラボナール注射用、ニプロ ES ファーマ(株)、大阪）2 g およびスキサメトニウ

ム塩化物（レラキシン注、杏林製薬(株)、東京）2 g 静脈内投与による安楽殺を行った。投与部位における筋組織の状態を肉眼的に観察後、サンプルを採材して 20%中性緩衝ホルマリン液（マイルドホルム 20N、富士フィルム和光純薬(株)、大阪）によって固定した。その後パラフィンブロックを作製して 8  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

#### 4-2-3. PRP 作製および活性化方法

前章における PRP 作製方法と同様のダブルスピン法で、自己血から採血量の 1/10 量の PRP を必要量作製した。作製後、自動血球計算機（Sysmex K-4500、シスメックス(株)）を用いて血小板数を測定し、全血中の血小板数と比較した。最終的に得られた PRP は $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、投与前日に室温で解凍した後再び $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結し、投与直前に再び室温で解凍することで血小板を活性化させ、成長因子を放出させた（第 2 章記載の 2 回凍結融解法）。

また作製直後の PRP のうち 1 ml を分注し、成長因子濃度測定のために $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。濃度測定直前に同様の 2 回凍結融解法により活性化を行った後、 $10,000\times\text{g}$  で 5 分間の遠心を行い、採取した上清中濃度を測定した。

#### 4-2-4. PRP 投与試験

実験全行程を塩酸メドミジンによる十分な鎮静下で行った。事前に超音波検査を行い健全な中殿筋であることを確認した 22 頭に対して殿部の剃毛洗浄を行い、中殿筋の 5 か所に 0.5%塩酸ブピバカイン 10 ml を筋肉内投与して損傷部位を作製した(図 4-1A)。損傷部位同士は最低 5 cm の間隔を取り、筋線維走行方向に重ならないように設定した。

これらの損傷部位から十分間隔を取って、健全筋である PRE の中殿筋サンプルをニードルバイオプシーにて採取した(図 4-1A)。2%リドカイン注射液(キシロカイン注、アスペンジャパン(株))による皮下浸潤麻酔を行った後 Co-axial Biopsy Introducer Needle (ARGON Medical Devices Inc.)を皮下 2 cm の位置まで刺入して内筒を抜去し、SuperCore™ Biopsy instrument (ARGON Medical Devices Inc.)を挿入して生検を行った。採取したサンプルは液体窒素で急速凍結し、その後-80°Cで保存した。

損傷作製翌日(1D)に、5 か所のうち 2 か所の損傷部位をランダムに選択し、エコーガイド下で活性化自己 PRP あるいは生理食塩水を 10 ml 投与して、それぞれ PRP 群、生食群とした(図 4-1)。また、5 か所のうち 1 か所の損傷部位をランダムに選択し、エコーガイド下で PRE サンプル採取時と同様の方法で損傷筋サンプルを採取し冷凍保存した。

損傷作製 2、3、4 および 7 日後(すなわち 2D、3D、4D および 7D)に各 PRP(あるいは生理食塩水)投与部位よりエコーガイド下で損傷筋サンプルを同様に採取し冷凍保存した(図 4-1B)。PRP(あるいは生食)が投与されていない損傷部位からも同時に筋サンプルを採取した(シヤム)。

すべての薬液投与後、あるいは生検実施後に抗生剤（マイシリン注、日本全薬工業(株)）の頸部筋肉内投与および滅菌ドレッシング（プリマポア、スミス・アンド・ネフュー(株)）による針刺入部の保護を行い、実験期間中は馬房内休養とした。

一方、PRP が投与された筋損傷部位の組織学的評価を行うため別の 3 頭の左右中殿筋を使用し、サンプル採取日の 5 日前および 7 日前にブピバカイン 10 ml 筋肉内投与により損傷部位を各日 2 か所ずつ作製し、翌日に活性化自己 PRP および生理食塩水を 10 ml ずつエコーガイド下で各損傷部位に投与した。サンプル採取日に先述と同様の方法で安楽殺を行い、損傷作製 5 日後(5D)および 7 日後(7D)の薬液投与部位の筋サンプルを外科的に採取して、ドライアイスによって冷却させたアセトン中で凍結させた。その後 30 分程度ドライアイス上で乾燥させ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 4-2-5. 成長因子濃度測定

2 回凍結融解法にて活性化させた PRP や採取された筋サンプルに含まれる PDGF-BB および TGF- $\beta$ 1 濃度を定量するため、ELISA キット（Quantikine Human PDGF-BB ELISA DBB00 および Quantikine Human TGF- $\beta$ 1 ELISA DB100B、R&D systems）を使用して前章までと同様に測定した。ニードルバイオプシーによって得られた筋サンプルについては、サンプルのうち 100 mg を遺伝子発現定量用に残し、残りのサンプルに対してプロテアーゼインヒビター（cOmplete™ ULTRA Tablets、Roche Ltd）入りタンパク質抽出用バッ

フアー (T-PER™、Thermo Fisher Scientific K.K.、東京) を筋湿重量 100 mg あたり 300  $\mu$ l 加えて 30 秒間氷上でホモゲナイズした。常温にて 5 分間静置後、4°C 10,000 $\times$ g にて 5 分間の遠心を行って上清を採取し、濃度定量まで-80°Cで保存した。筋サンプル中成長因子濃度については PRE サンプル中の濃度に対する比 (変化率) を算出することで経時的な比較を行った。また、2D、3D、4D および 7D のシャムサンプル中成長因子濃度について PRE サンプル中の濃度に対する変化率を同様に算出し、PRP および生食群の濃度変化率を対応するシャムの変化率で除した値 (シャム比) を用いて投与薬の群間比較を行った。

#### 4-2-6. リアルタイム RT-PCR

ニードルバイオプシーにより採取された筋サンプルにおける筋再生に関わる遺伝子発現量を確認するため、前章と同様の方法でリアルタイム PCR を行った。確認した項目は、*Pax7*、*MyoD*、*myogenin*、*IL-6*、*HGF*、*IGF-1* および *MHC-e* とし、PRP 群、生食群およびシャムについて PRE サンプルに対する目的遺伝子発現量の比 (Relative quantification value: RQ 値) を経時的に算出した。さらに PRP 群と生食群の RQ 値について、それぞれ対応するシャムの RQ 値で除した値 (シャム比) を算出して投与薬の群間比較を行った。

#### 4-2-7. 免疫組織化学染色



組織学的評価を行うために採材された凍結筋組織については、筋線維長軸と直角をなす横断面を $-20^{\circ}\text{C}$ 下でクリオスタット（CM3050S、ライカマイクロシステムズ(株)）を用いて厚み  $8\ \mu\text{m}$  の連続切片とし風乾した。4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬(株)）にて固定後、1 次抗体として抗 myogenin マウス・モノクローナル抗体（BD556358、BD Biosciences、San Jose、CA）あるいは抗 MHC-e マウス・モノクローナル抗体（F1.652、DSHB）を使用し、それぞれ筋基底膜マーカーであるウサギ抗 Laminin 抗体（L9393、Sigma-Aldrich Co. LLC）を併用した。2 次抗体として myogenin および MHC-e には Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（ab150117、abcam、Cambridge、UK）を、Laminin には Cy3 標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（Cy3™ AffiniPure、Jackson ImmunoResearch Inc.）を使用した。対比染色として DAPI による核染色を実施した。同時に別の連続凍結切片に対して HE 染色を適用した。

蛍光組織画像をオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X710、キーエンス(株)、大阪）によって鏡検した。Myogenin あるいは MHC-e 陽性の筋線維を陽性筋線維とし、損傷部位における 1 視野あたりの陽性筋線維本数を BZ-X 解析アプリケーション（キーエンス(株)）を用いて計数し、任意の 4 視野について得られた本数を各馬の値とした。

#### 4-2-8. 統計学的解析

成長因子濃度の経時的群内比較は Steel 法にて、成長因子濃度と目的遺伝子発現量の各採材時におけるシャム比の群間比較ではマンホイットニーの U 検定により有意差検定を行った。また、myogenin または MHC-e 陽性筋線維数の群間比較では、対応のある t 検定を行った。解析にはマイクロソフトエクセル 2013 マクロアプリケーションソフト (Excel 統計 ver. 7.0、(株)エスミ) を用い、有意水準は 5%とした。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. ブピバカイン筋損傷モデル

ブピバカイン投与部位の筋組織は白色あるいは黄白色で浮腫を呈していた。病変は長さが頭尾方向に 3~10 cm、幅は 2~6 cm におよび、投与部位を中心に筋走行に沿って拡大していた。また、作製された損傷部位は超音波検査によって特定可能であった (図 4-2A)。HE 染色所見では、投与 24 時間後に筋線維の空洞化が認められ、2 日後には崩壊した筋細胞を貪食する多数の炎症細胞が見られた (図 4-2B、C)。さらに投与 7 日後には、好塩基性に染色された新生筋線維が見られた (図 4-2D)。出血は針刺入部位に認められる程度で、血管構造は維持されていた。

#### 4-3-2. PRP

25頭のうち14頭の自己血からPRPを作製した。最終的に作製されたPRPの血小板濃度（平均 ± 標準偏差）は  $84.9 \pm 15.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、白血球濃度は  $39.2 \pm 19.5 \times 10^2/\mu\text{l}$  で、それぞれ全血に対して  $7.7 \pm 2.3$  倍、 $0.6 \pm 0.3$  倍であった。2回凍結融解法により活性化されたPRPの上清には、PDGF-BBが  $7.2 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$ 、TGF- $\beta$ 1が  $24.0 \pm 7.9 \text{ ng/ml}$  含まれ、いずれのPRPにも高濃度のPDGF-BBおよびTGF- $\beta$ 1が含有されていた[66]。

#### 4-3-3. PRP投与組織中のPDGF-BBおよびTGF- $\beta$ 1濃度

PRP群における損傷筋組織中PDGF-BB濃度はPRP投与翌日である2DにおいてPREに対する有意な高値を示し（ $P = 0.001$ ）、生食群では生食投与翌日である2DにおいてPREに対する有意な低値を示した（ $P = 0.005$ ）（図4-3A、B）。シャム比による群間比較を行った結果、2DにおけるPRP群で生食群に対して高い値を示す傾向が見られた（ $P = 0.096$ ）（図4-3C）。

PRP群における損傷筋組織中TGF- $\beta$ 1濃度は2D（ $P = 0.001$ ）および4D（ $P = 0.044$ ）においてPREに対する有意な高値を示した。生食群では有意な変化が見られなかった（図4-4A、B）。シャム比による群間比較を行った結果、PRP群では2Dにおいて生食群に対して高い値を示す傾向が見られ（ $P = 0.096$ ）、4Dにおいて生食群に対して有意な高値を示した（ $P = 0.016$ ）（図4-4C）。

#### 4-3-4. PRP 投与組織における遺伝子発現量

PRP 群と生食群間でシャム比を用いて経時的に比較を行った結果、3D における *MyoD* ( $P=0.002$ )、4D における *HGF* ( $P=0.026$ ) において PRP 群における有意な高発現が認められ、2D における *IL-6* ( $P=0.096$ )、4D における *IL-6* ( $P=0.096$ ) および *Pax7* ( $P=0.094$ ) で PRP 群における高い発現が見られる傾向があった (図 4-5、6)。一方、7D における *myogenin* では、PRP 群において生食群に対する発現が低い傾向が見られた ( $P=0.096$ )。 *IGF-1* および *MHC-e* では全採材時期において両群間に差は見られなかった。

#### 4-3-5. 組織学的解析

凍結筋サンプルの免疫蛍光染色の結果、*myogenin* および *MHC-e* 陽性筋線維が両投与群共に認められた (図 4-2E)。 *Myogenin* 陽性筋線維数は採材時期に関わらず両投与群間に有意差は認められなかった (5D: PRP  $14.7 \pm 13.8$  本 生食  $16.0 \pm 20.8$  本、7D: PRP  $7.5 \pm 8.7$  本 生食  $17.2 \pm 19.1$  本、平均  $\pm$  標準偏差) (図 4-7)。一方、*MHC-e* では 5D の PRP 群で生食群に対して陽性筋線維数が多い傾向が見られた (PRP:  $30.8 \pm 27.2$  本、生食:  $15.8 \pm 14.7$  本、 $P=0.079$ )。7D では有意な差は認められなかった (PRP:  $74.9 \pm 34.7$  本、生食:  $82.8 \pm 43.9$  本)。

#### 4-4. 考察

マウス・ラットのような小動物の筋損傷モデルを使用した PRP 投与試験の報告は数多く存在する[60]。外科的筋損傷モデルは様々な作製方法が用いられており、筋組織の部分切除あるいは切断[56, 67]、錘の落下による鈍性損傷[53]など多岐にわたる。また、化学薬品を用いた損傷モデルも用いられ、カルディオトキシン (cardiotoxin: CTX) 投与モデルがよく利用されている[68]。

本研究で求められる筋損傷モデルの条件は、実際の筋損傷修復過程を模倣していながら出血が少ないモデルであった。外科的筋損傷モデルはその作製方法から出血が避けられないが、CTX により作製された筋損傷は出血が少ない[69]。しかし薬物の毒性が強く取扱いが困難である[69]。そこで CTX と同様に局所投与により簡便に出血の少ない筋損傷が作製可能な薬品として、近年ではブピバカインが用いられている[62]。ウマにおいてブピバカイン投与による筋損傷モデルを作製したという報告はなく、本研究が初めてである。

本実験により、ブピバカイン 10 ml の筋肉内投与によって再現性良く広範囲の筋線維壊死病変を作製可能であった。一般的な動物の筋損傷修復過程では、受傷 48 時間以内に炎症細胞が損傷部位に集簇し、破壊された筋線維を貪食する[48]。これによりサテライトセルが活性化されて増殖および筋芽細胞への分化が進み、筋芽細胞が互いに融合することにより幼若な好塩基性の筋原線維 (MHC-e) が構築される[48, 52, 65]。本研究で作製されたブピバカイン筋損傷モデルで認められた組織所見の変化は、このような一般的な筋損傷修復過程と同様であった。作製された筋損傷部位は超音波検査にて特定可能であったため、エコー

ガイド下での損傷部位への PRP あるいは生食投与、および損傷筋組織のバイオプシーが可能であった。一方、作製された損傷はブピバカイン投与部位を中心に筋走行に従って頭尾方向に拡大するため、中殿筋に複数の損傷を作製する場合は同一の筋走行に重ならないよう注意する必要があった。中殿筋が皮下に露出している面積は小さいため、投与するブピバカイン量を 10 ml より増やすことで損傷範囲がさらに拡大してしまうと、作製された複数の損傷部位がお互いに干渉してしまう可能性があったため、ブピバカインの投与量はこれが適量と考えられた。著しい出血所見も認められなかったことから、ウマにおいてもブピバカイン投与により簡便に出血が少ない筋損傷モデルが作製可能であることがわかった。

PRP 療法の原理は PRP に含まれている高濃度の様々な成長因子を利用して投与部位の組織活性を高めることにあるため、PRP の損傷部位への投与が周辺の筋組織におよぼす影響を検討する場合、PRP 由来の高濃度の成長因子がどれだけの期間投与部位に残存しているかを確認する必要があった。PRP に高濃度で含まれている PDGF-BB は一般的な創傷修復の初期段階で組織修復に関わる多くの細胞の分裂能や遊走能を促進させる [11]。また PDGF-BB は筋損傷修復過程において筋芽細胞の増殖や分化を促進させる [46]。同じく高濃度で含まれている TGF- $\beta$ 1 は創傷治癒過程において血管再生や肉芽組織再生を促進させる [11]。これらの成長因子は創傷治癒過程に大きな影響をおよぼすため、PRP 投与後の筋組織中の含有濃度の変化を確認することには大きな意味がある。一方、ウマを含め PDGF-BB や TGF- $\beta$ 1 が動物の筋組織に投与された場合の残存期間について既報は存在せず定かではな

いが、静脈内投与された場合の残存期間は極めて短時間であることが知られている[70、71]。本研究においても PRP 筋肉内投与によるこれらの成長因子の濃度上昇は投与翌日（2D）まで認められる程度であった。一方、TGF- $\beta$ 1 についてはその後一度組織濃度が下がったが、投与 3 日後（4D）に再び濃度が上昇した。今回得られたデータのみでこの理由を明確に説明することはできない。一般的な筋損傷修復過程では損傷部位に集簇した炎症細胞から TGF- $\beta$ 1 が放出されることが知られている[8、11]。本研究における筋損傷モデルの組織所見でも損傷作製 2 日後に炎症細胞の著しい集簇像が認められており、この細胞活性を PRP 由来の成長因子がさらに高めている可能性がある[11]。つまり投与 3 日後における濃度上昇は PRP 投与によって活性化された炎症細胞より TGF- $\beta$ 1 が大量に放出されたことによる可能性がある。

このことを示すように損傷筋組織における *IL-6* の遺伝子発現が、TGF- $\beta$ 1 濃度が高値を示す投与翌日（2D）および 3 日後（4D）に生食投与に比べて高まる傾向が見られた。*IL-6* は損傷修復過程において主にマクロファージから放出されることがよく知られている[48、54、55]。PRP 中にも *IL-6* が含有されているが[72]、前章のとおり健常筋組織に活性化 PRP を投与しても投与部の *IL-6* 発現に明瞭な影響をおよぼさない。このため今回の高発現は、筋損傷に伴って集簇している炎症細胞と関連があるものと推察された。

ヤギ由来の筋線維を培養した過去の報告では、活性化した Pax7 陽性のサテライトセルが 4 日間にわたり増殖し、MyoD および myogenin 陽性の細胞が培養 3～4 日目に筋線維に出

現している[73]。またウマ由来のサテライトセルを7日間培養することにより筋管が形成されることも知られている[74]。これらのことを鑑みると、筋修復過程を *in vivo* で調査する場合、筋修復に関連したマーカーの推移を損傷後少なくとも7日間モニタリングすることが必要であると考えられた。本研究では筋損傷モデル作製翌日に PRP を投与し損傷作製7日後まで筋修復関連マーカーのモニタリングを実施した結果、サテライトセル関連マーカーの発現が PRP によって遺伝子レベルでも組織レベルでも影響を受けていることが確認された。

サテライトセルに発現している *Pax7* は 4D において生食群に対して高い発現を示す傾向が見られ、また活性化したサテライトセルに発現する *MyoD* は 3D において高い発現を示した。通常サテライトセルは健常筋組織においては *Pax7* を発現して休眠しているが、損傷刺激によって活性化され *Pax7* に代わって *MyoD* を発現させる[48]。*MyoD* が発現したサテライトセルは筋芽細胞となり、互いに融合して筋管を形成するが、十分量の筋管が形成されると余剰の活性化サテライトセルは再び *Pax7* を発現して休眠する[48]。本研究における *MyoD* と *Pax7* の高発現は、損傷部位のサテライトセルが PRP 投与によって活発に増殖したことを示している。こういったサテライトセルの活性化には、IL-6、HGF、IGF-1 といったサイトカインや成長因子が関与していると考えられている[48]。HGF および IGF-1 は PRP に含有されており[17、24、57]、筋損傷に対する PRP 投与ではこのような成分による治癒促進効果が期待されている。*HGF* については前章において、健常筋組織に対する PRP



投与でも投与7日後に筋組織における発現が高まっており、本研究でも4Dにおいて生食群に対する有意な高発現を示していた。HGFは再生中の筋管や受傷後の細胞外マトリクスで生成されることが知られているが、HGFの生成はパラクライン的に行われることも知られている[48]。このことから、これらの高発現は投与されたPRPに含まれているHGFによる投与筋組織におけるパラクライン効果である可能性が考えられた。一方で、同様の効果はIGF-1では認められなかった。健常筋組織における投与試験でも遺伝子の変化が認められなかったことを鑑みれば、PRP中IGF-1は筋組織に対してほとんど影響を与えないと考えられた。

成長因子、サイトカインおよびサテライトセル増殖に対するPRP投与による活性化効果が明らかに認められた一方、主に筋芽細胞の融合から筋管形成に至る過程に関与することで知られている*myogenin*の発現は、7DのPRP群において生食群に対する発現が低い傾向が見られた。また、筋原線維への分化を示す幼若筋線維マーカーである*MHC-e*についても実験期間中にPRP群と生食群で差が見られなかった。5Dおよび7Dの筋組織サンプルに対して免疫蛍光染色を行ってタンパク質発現量を比較検討した結果、*myogenin*陽性筋線維数に所見を認めなかった一方、*MHC-e*では5DのPRP群において対照群に対して陽性筋線維数が多い傾向を認めた。7Dの*MHC-e*陽性筋線維数に両群間の差が認められなかったことやウマサテライトセル培養に関する過去の*in vitro*の研究報告[74]から、PRP投与

によって損傷作製 5 日後の時点で筋管形成が促進され、7 日後には既に十分な量の筋管形成が終了していたと考えられ、*myogenin* の発現が低下したものと考えられた。

さらに HGF が *myogenin* や MHC-e の発現を抑制することが知られている[48]。本研究において PRP 投与によってもたらされた *HGF* の損傷作製 4 日後 (4D) の高発現が *myogenin* や MHC-e の発現に何らかの影響をおよぼしている可能性も考えられたが、本研究でこのことを明らかにするまでには至らなかった。

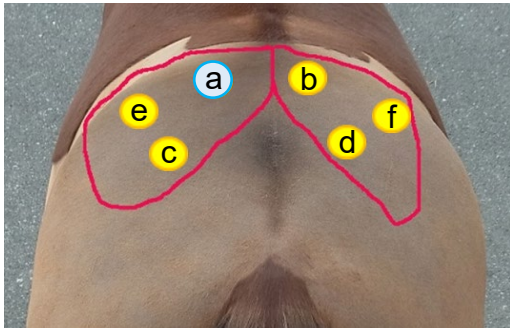
一方 PRP 療法では、PRP に含まれる高濃度の TGF- $\beta$ 1 が損傷組織に過剰な肉芽形成を伴った筋線維症を誘導する懸念が存在する[46]。本研究において凍結筋組織サンプルを鏡検したところ、PRP 群および生食群ともに等しく筋周膜部に線維組織が入り込んでおり、再生筋線維における著しい肉芽組織の増生は両群ともに認められなかった。これにより、PRP を投与された筋損傷を有するウマを適切に管理していれば有害事象の可能性も少ないものと考えられた。

まとめると、ブピバカイン筋肉内投与法により出血が少ない筋損傷モデルを再現性良く作製することがウマでも可能であった。また本モデルに活性化 PRP を投与すると、PRP 由来の成長因子は 2 日で投与組織から消失したが、筋修復に関わる成長因子、サイトカインおよびサテライトセル増殖に関わる遺伝子はその後も高発現を示し、組織レベルでの筋再生も促進されていた。さらに筋分化に関わる遺伝子が 7 日で低発現を示したことから、PRP 投与によって筋修復過程の初期段階が早期に終息した可能性が考えられた。

#### 4-5. 小括

本章により、筋損傷に対する活性化 PRP 投与は筋再生を促進するうえ有害事象を生じないため、簡便かつ効果的で、さらに安全な治療法であることが示された。しかし本実験で用いられた損傷モデルは骨格筋組織のみを選択的に破壊させたモデルである。実際に臨床で見られる創傷では、筋組織だけではなく血管、結合組織および表皮の損傷を伴うことが多い。既報では臨床におけるウマの重症創傷症例に対して PRP 療法を適用して良好な結果を得たとされているが、こういった症例報告において使用された PRP の詳細は明らかになっていない。このため本章において有効性が明らかとなった高濃度の血小板および成長因子が含まれた PRP を臨床症例に適用した場合の影響について、実際に検証する必要があると考えられた。

A



- a : PRE biopsy
- b : 1D biopsy
- c : 2D (3D) PRP (or saline) injected
- d : 2D (3D) sham
- e : 7D (4D) sham
- f : 7D (4D) PRP (or saline) injected

B

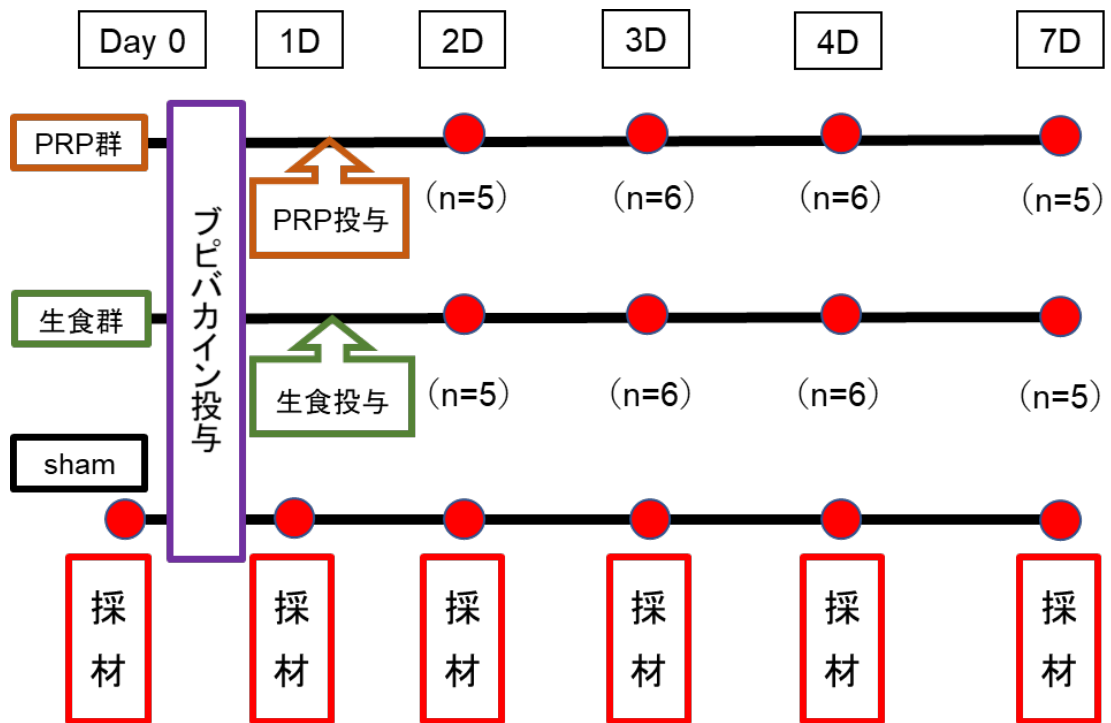
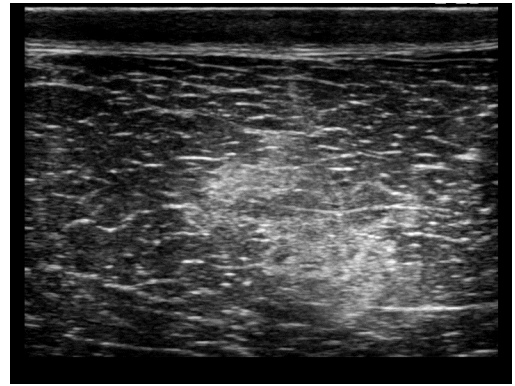
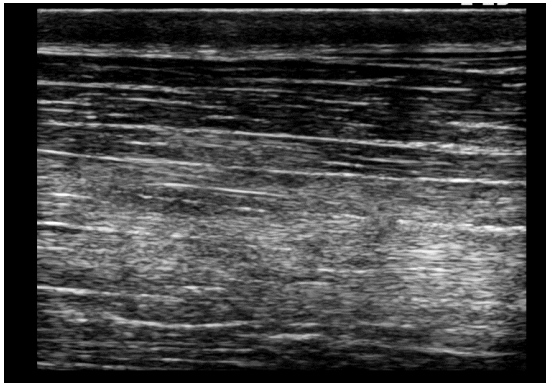
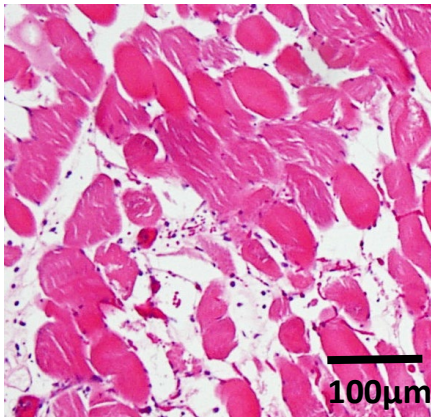


図4-1. (A)中殿筋からの採材箇所の一例。b~fの部位はブピバカイン投与により損傷が作製されている。実際には損傷および採材箇所はウマによってランダムに決定された。(B)本実験のプロトコル。Day 0でPRE採材を実施後、ブピバカインによる損傷を5か所に作製。うち1か所から1Dで採材実施後、多血小板血漿 (PRP)あるいは生理食塩水 (生食)を損傷部位2か所に投与。その後経時的に筋採材を行った。採材は薬液投与を行っていない損傷部位からも実施された (シャム)。2Dおよび7D (n=5)、3Dおよび4D (n=6)は同一の個体を使用。

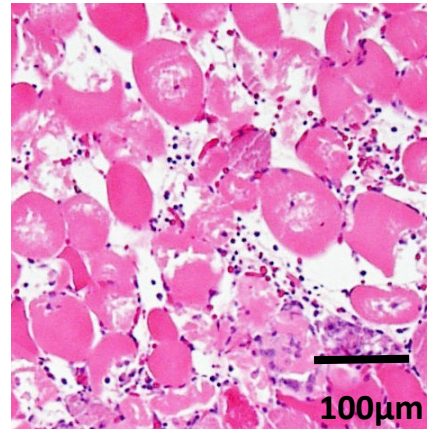
A



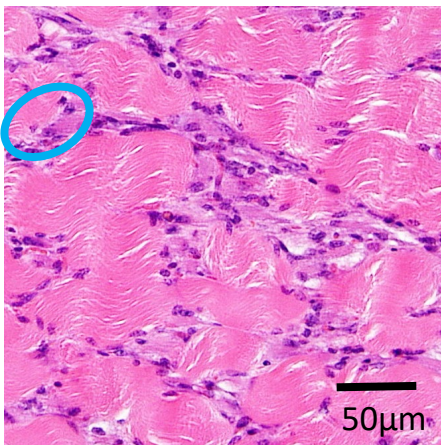
B



C



D



E

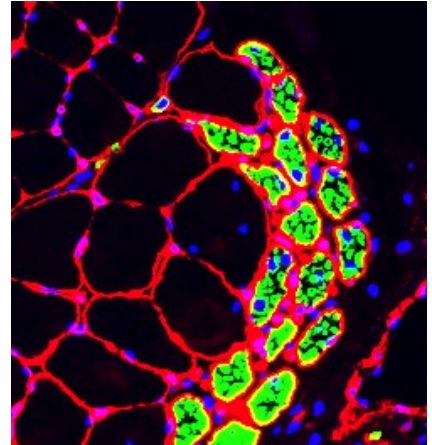


図4-2. (A) プピバカイン 10 ml 投与2日後の超音波画像。左:長軸方向、右:短軸方向。筋損傷部位が高輝度で描出される。(B) プピバカイン投与24時間後の筋組織HE染色像。(C) プピバカイン投与2日後の筋組織HE染色像。(D) プピバカイン投与7日後の筋組織HE染色像。青楕円は好塩基性に染色される新生筋線維。(E) 損傷7日目の筋線維の三重免疫蛍光染色像。緑(図はMHC-e)で標識され、赤:Lamininで囲まれた筋線維が陽性。青:核染色。

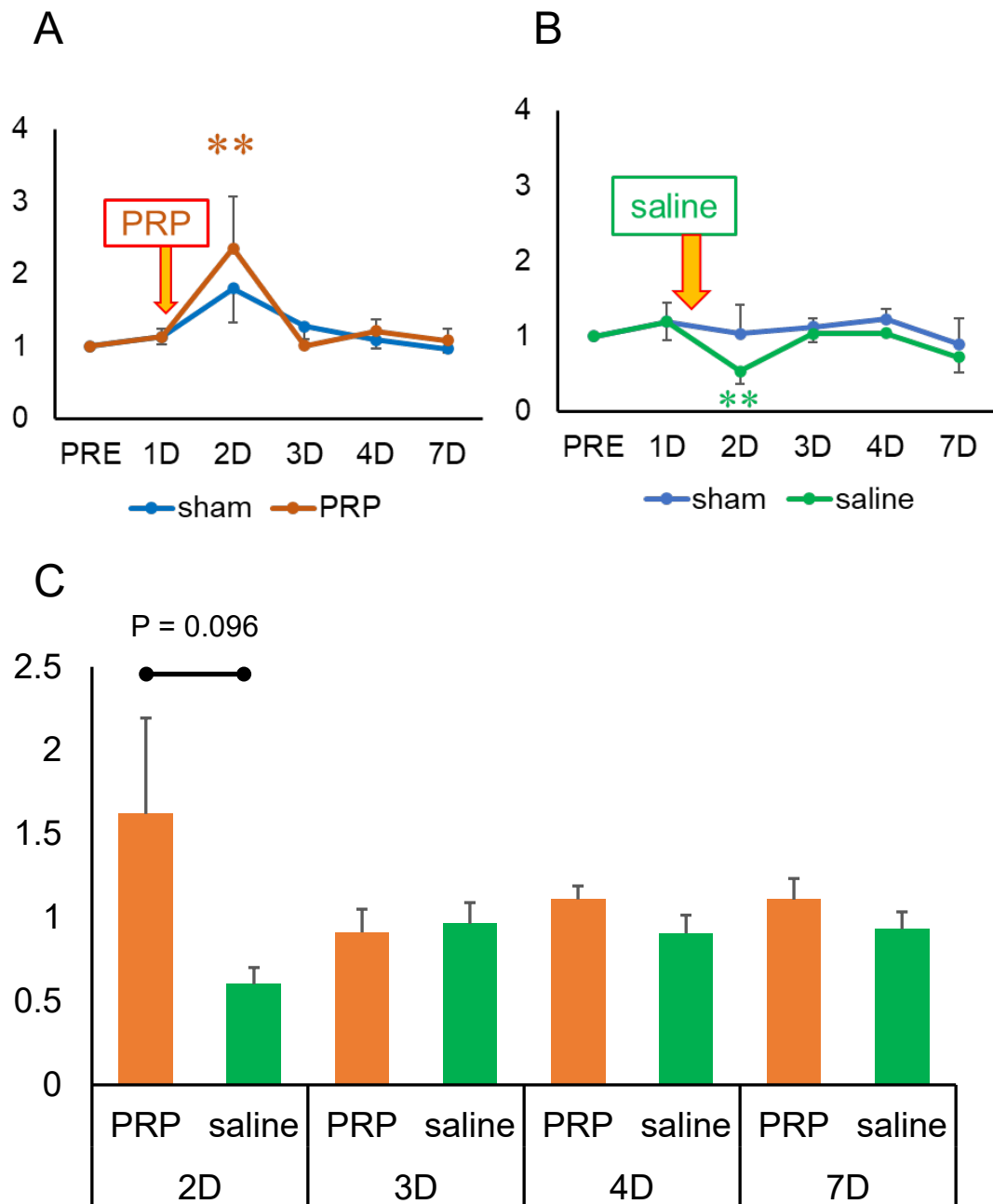


図4-3. (A) (B) 損傷筋組織中PDGF-BB濃度の推移。数値はPRE (健常) サンプル濃度を1とした時の比(変化率)。1Dの筋サンプル採材後に(A) 多血小板血漿 (PRP)、(B) 生理食塩水を投与している。\*: Steel法にてPREに対する有意差あり (P<0.01)。 (C) PDGF-BB濃度の経時的群間比較。縦軸はシャムの濃度に対する比(シャム比)。いずれも平均±SE。

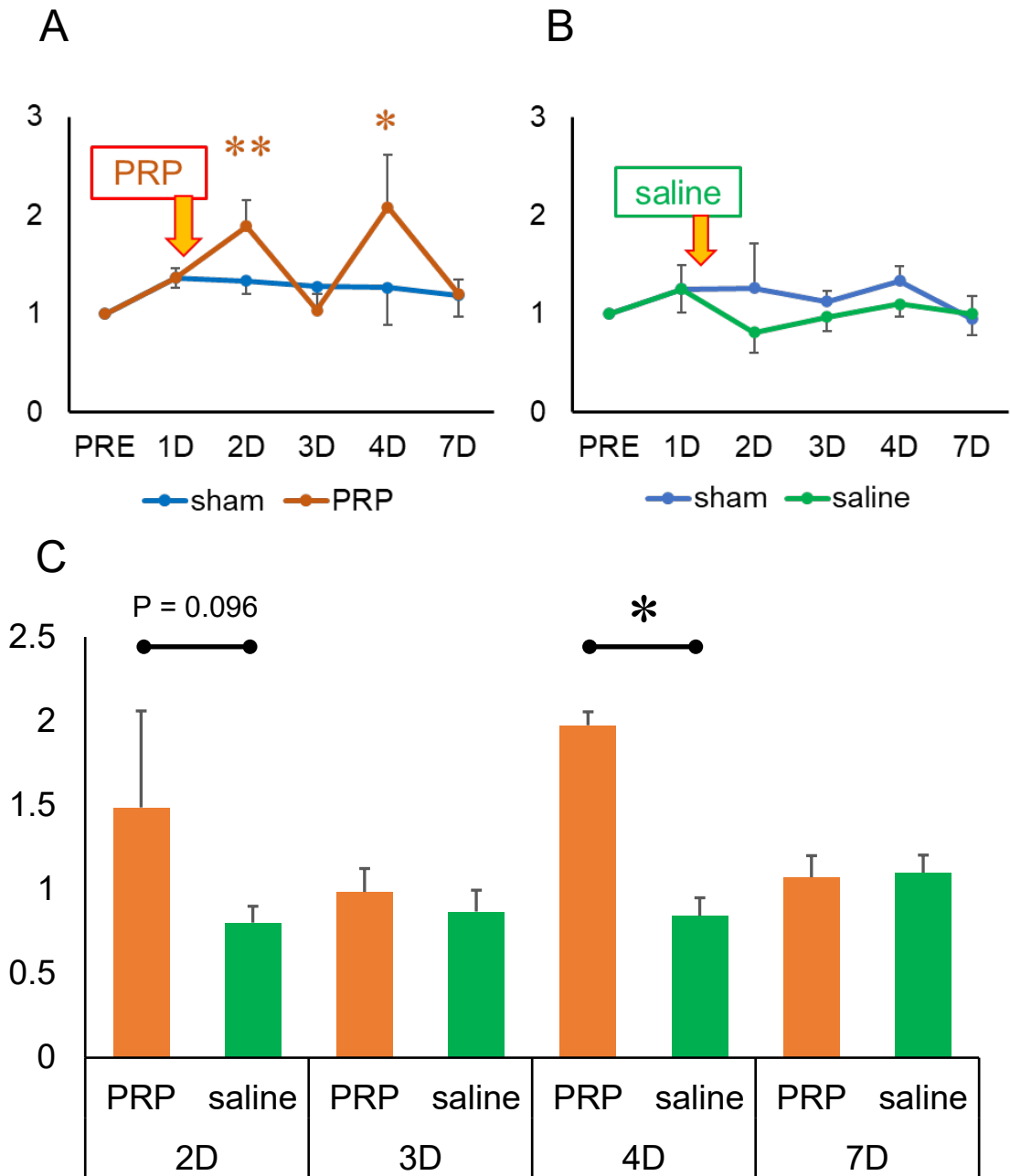


図4-4. (A) (B) 損傷筋組織中TGF-β1濃度の推移。数値はPRE(健常)サンプル濃度を1とした時の比(変化率)。1Dの筋サンプル採材後に(A)多血小板血漿(PRP)、(B)生理食塩水を投与している。Steel法にてPREに対する有意差あり(\*: P<0.05, \*\*: P<0.01)。(C) TGF-β1濃度の経時的群間比較。縦軸はシャムの濃度に対する比(シャム比)。いずれも平均±SE。マンホイットニーU検定にて群間の有意差あり(\*: P<0.05)。

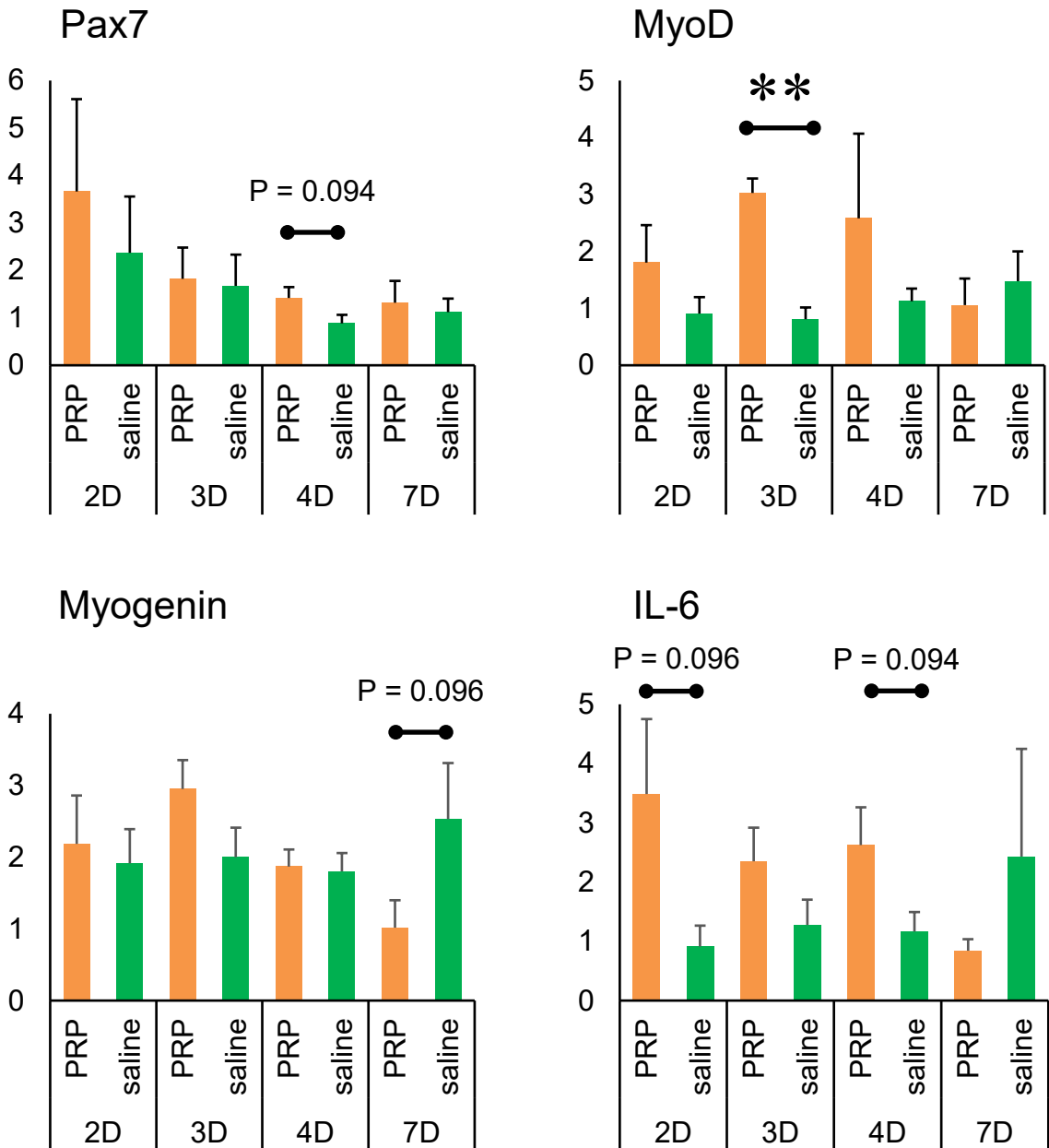


図4-5. 損傷筋組織における遺伝子発現の経時的群間比較。縦軸は各処置群のシャムに対する比(シャム比)。いずれも平均±SE。

\*\*：マンホイットニーU検定にて有意差あり(P<0.01)。



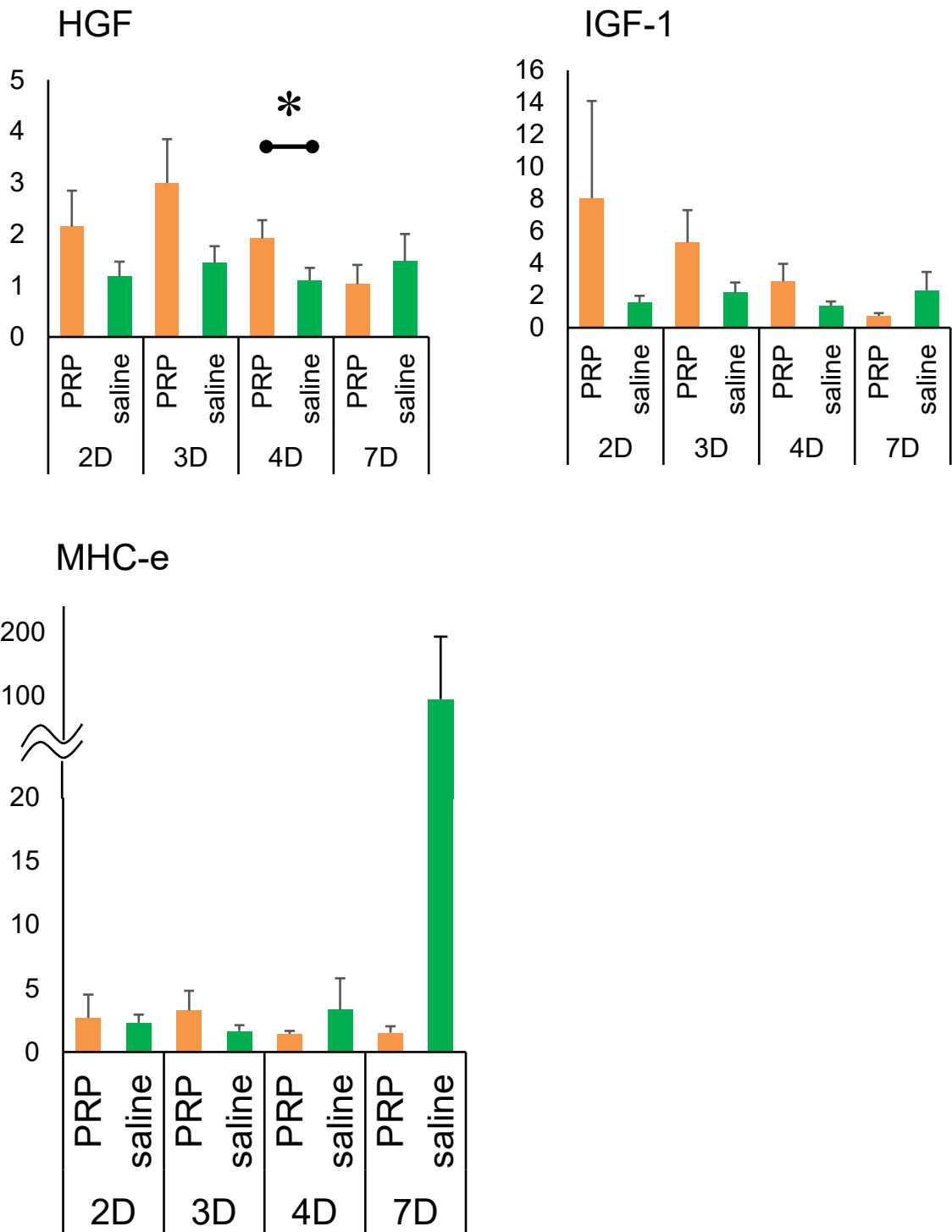


図4-6. 損傷筋組織における遺伝子発現の経時的群間比較。縦軸は各処置群のシャムに対する比(シャム比)。いずれも平均±SE。  
\*: マンホイットニーU検定にて有意差あり(P<0.05)。

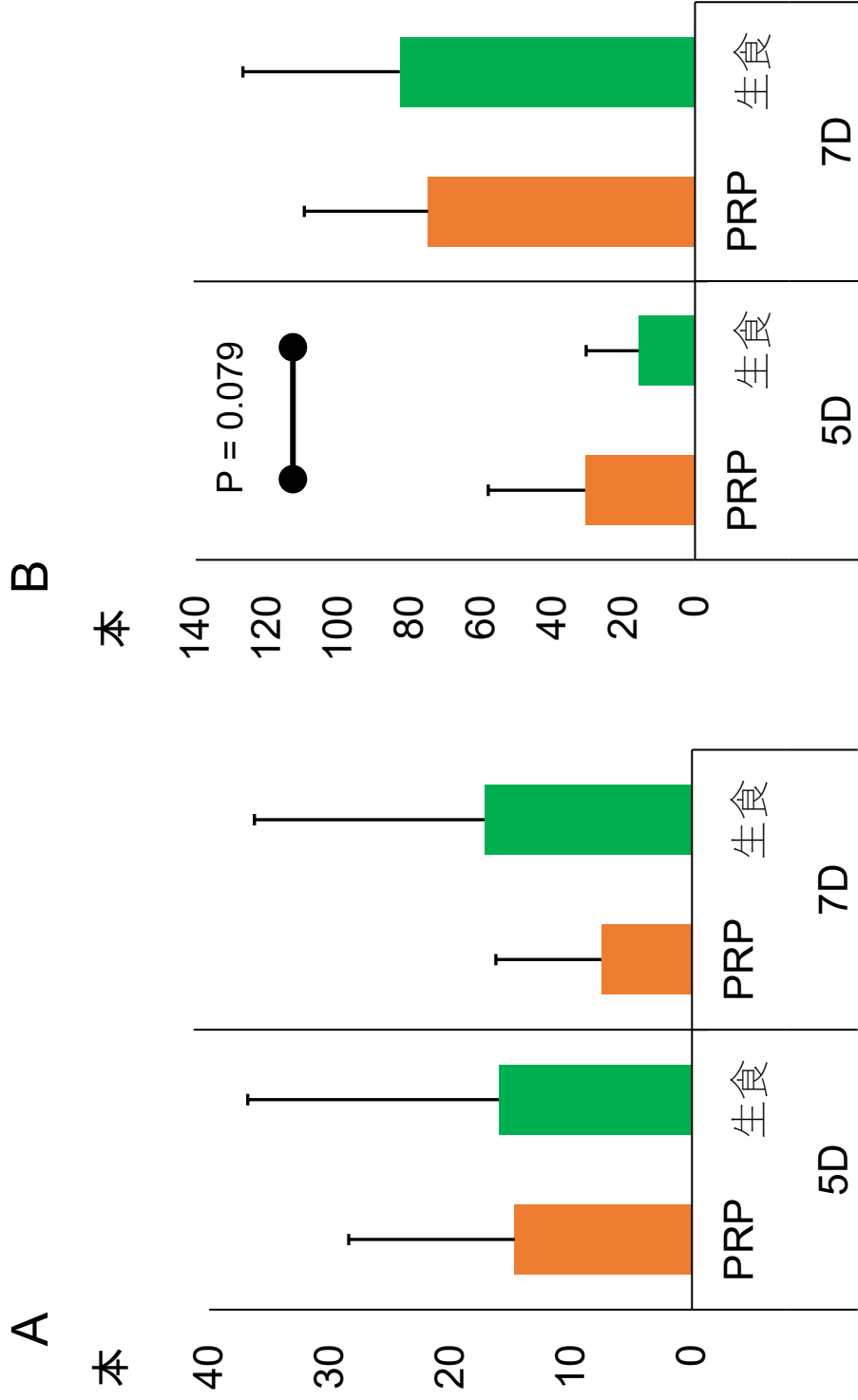


図4-7. 損傷作製5日後(5D)および7日後(7D)の筋組織における、(A)myogenin (B)MHC-e 陽性筋線維数。平均±SD。投与群間で対応のある t 検定を実施した。

## 第 5 章 ウマ創傷治療に PRP 療法を適用した 2 症例

### 5-1. 序論

これまでの実験結果から、含有成長因子濃度を最大限とした活性化 PRP を損傷筋に投与すると治癒が促進されることが示唆された。一方、第 4 章の結果から、凍結融解法により活性化させた PRP の上清を直接創に注入あるいは曝露する方法では、含有されている成長因子が損傷組織に対して作用している時間は極めて短時間であると予想される。このため、臨床における創傷治療に対する最適な PRP 投与方法について検討を行う必要がある。

Iacopetti らは筋層にまで達するようなウマの重症外傷の慢性症例に対して、カルシウムを添加して活性化させた PRP ゲルを用いて治癒促進に成功した[3]。また、DeRossi らも同様の PRP ゲルがウマの表皮の創傷治癒を促進させることを示した[4]。PRP ゲルの利点は含有されている成長因子の長期にわたる患部への曝露であるが、組織に曝露されている成長因子の時間当たりの濃度は低くなるため、PRP に貯蔵されている成長因子量は著しく高濃度であることが望ましい。本章では骨格筋の損傷を伴うような重症の外傷に対し、第 2 章の方法により作製された高濃度の成長因子を含む PRP を適用して治療を行った症例 2 例について報告する。

### 5-2. 材料と方法

### 5-2-1. 症例馬の履歴と病歴

骨格筋の断裂を伴う重症の創傷を受傷したサラブレッド3歳牝馬2頭に対してPRP療法を実施した。

症例1は軽運動中に放馬し、右腋窩部に20 cm×7 cm程度の筋断裂を伴う裂創を受傷した。創は下方に約15 cmのポケットを形成。ポケット内の多量の砂を洗浄した後ドレナージを行い、皮下組織を7列連続縫合、表皮をステープラーにて14針縫合した。患部は非固着性ドレッシング（プリマポア、スミス・アンド・ネフュー ウンド マネジメント(株)、東京）で被覆し、NSAIDsと抗生剤セファロチンの投与を継続していたが、第4病日に縫合面が離開した。その後感染徴候は認められなかったものの、創周囲の皮膚組織の壊死を伴いながら経時的に離開部は拡大した。第7病日に縫合針抜去およびドレナージを解除し、ポリウレタンドレッシング（ハイドロサイト、スミス・アンド・ネフュー ウンド マネジメント(株)）による湿潤療法を開始した。この結果、肉芽組織の増生が進み、第19病日には創からの滲出も認められなくなった。一方、皮下組織の閉鎖により筋層の断裂は目視できなくなったが、上皮化は進まず皮下組織が露出したままとなった（図5-1A）。

症例2は初診日より以前から腋窩部から胸部にかけて軽度の腫脹を呈していたが、疼痛を伴い始めたため抗生剤セファロチンの投与を開始した。翌日疼痛および腫脹が悪化し移動を嫌うようになったためNSAIDs投与を開始したが、第3病日に腫脹部位が自潰し、約20 cmのY字型創が形成された。創の内腔は頭側の創端のさらに10 cm奥まで拡張し、壊死

組織を容れていた。また創底までの深さは最大約 5 cm で、皮下組織および横行胸筋の一部が損傷していた (図 5-2)。壊死組織の除去後、筋および皮下組織を縫合。さらに表皮を減張縫合した。しかし滲出液の排出は継続し、第 8 病日までに縫合面は離開した。以降は創内の洗浄のみ実施し、肉芽増生は順調であったが上皮化は進まなかった。

### 5-2-2. PRP 作製および投与方法

いずれの症例においても第 2 章のとおり、頸静脈より採取した 36 ml の自己血から 1 回目 400×g、2 回目 2,000×g のダブルスピニング法により 4 ml の PRP を作製した。

症例 1 では第 20 病日に PRP を作製した。その後、100 µl の 10%塩化カルシウム液と 300 µl の自己血清をシャーレ上で PRP に添加し、37°C でインキュベートすることで平板状の活性化 PRP ゲルを投与直前に作製した。このゲルを創に貼付し、プリマポアにて被覆した (図 5-1B)。

症例 2 では第 16 病日に PRP を作製した。その後 -30°C 凍結および常温下での解凍を 2 回繰り返して、活性化を行った。活性化済 PRP 4 ml のうち 2 ml を 37°C 下にてゼラチンハイドロゲルシート (メドジェル PI5、(株)メドジェル、東京) に 1 時間かけてシャーレ上で含浸させ、創のポケット内に留置した (図 5-3)。さらに残りの活性化済 PRP を第 2 章のカルシウム自己血清添加法同様の方法でゲル化させ、創に貼付してプリマポアによって被覆した。

### 5-3. 結果

症例 1 では PRP 投与翌日の第 21 病日には創が湿潤状態となり、良性肉芽の増生を認めた(図 5-4)。不潔な滲出液は認められなかった。第 21 病日にも前日同様の処置を行ったが、翌日にかけてドレッシングがはがれてしまったため、PRP ゲルの貼付を終了し開放創とした。第 25 病日には著しい創面の収縮が認められ、さらに 2 週間後に創は完全に閉鎖された(図 5-5)。

症例 2 では第 18 病日には良性肉芽の増生がさらに進み、多量の滲出液が認められた(図 5-6A)。さらに第 21 病日には滲出液が著しく減少し、肉芽のさらなる増生および創の収縮が認められた(図 5-6B)。第 28 病日までに創は乾燥し閉鎖した。

### 5-4. 考察

先述の Iacopetti らの報告を含め、ウマの創傷治療に対する PRP 療法では、PRP にカルシウムを添加して PRP ゲルを作製し適用する方法が有効であるとする報告が散見される[3、75、76]。PRP をゲル化させることで含有されている成長因子は周囲の組織へ徐放されるようになり、直接投与方法よりも長期間患部に影響をおよぼすことが可能となる[10]。PRP をゼラチンハイドロゲルのような「足場：スキャホールド」とされる物質に吸収させても同様の効果が得られる[77]。今回の 2 症例ではいずれも PRP 中成長因子を徐放させて投与する

方法を適用したが、これにより治癒促進効果が得られたことは、必ずしも高濃度の成長因子を直接的に損傷組織に曝露させずとも、より低濃度の成長因子を持続的に曝露させることでも PRP による効果を得られることを示しており注目に値する[77]。

また、前章における筋損傷モデルを用いた PRP 投与試験では比較的急性期の筋損傷を想定していたのに対し、今回の症例では慢性損傷において良い効果が得られた。過去のメタアナリシスでも PRP 療法は慢性損傷でこそ効果を発揮するというデータが報告されている[78]。慢性損傷におけるこのような効果は、PRP に含まれる成長因子のうち細胞の増殖および活性化を促す成長因子である PDGF-BB によってもたらされていると考えられる[11]。前章の結果によれば、高濃度の成長因子を含有する活性化 PRP の単回投与がもたらす損傷筋内 PDGF-BB 濃度の上昇は極めて短期的であり、このことによってもたらされるサテライトセルの活性も 1 週間程度で終息した。今回の 2 症例については骨格筋内に直接 PRP を投与されていないうえ、筋断裂の組織修復が確認されていないため比較が難しいが、活性化 PRP 上清の単回局所投与では治癒促進効果が持続しなかった可能性が考えられた。

症例 2 では 2 回凍結融解によって活性化を行った PRP に対し、さらに第 2 章のとおりカルシウム自己血清添加法を行うことでゲル化させることに成功した。第 2 章で述べた通り、2 回凍結融解によって活性化された PRP 中には未だ破壊されていない血小板が残存しており、こういった血小板を活性化させることでフィブリンの足場が形成されるものと考えられた[4、10]。このように PRP の凍結保存を行っても依然として PRP 中には多量の成長因

子が含有されているうえ、凍結融解させた後もゲル化が可能であることから、ウマ臨床においても PRP は取り扱いが簡便であることが明らかとなった。適用される組織やステージによって PRP がおよぼす影響は変化する可能性があり、臨床における最適な PRP 療法については今後さらなる詳細な検討が必要であるが、重症の創傷症例に対しては PRP に含まれる高濃度の成長因子を長期間にわたって徐放させる投与法が有効となる可能性が考えられた。

#### 5-5. 小括

外科手術によって完全な治癒に至らなかった筋損傷を伴うような重症の外傷に対して、高濃度の成長因子が含まれる PRP を活性化させて投与することで治癒促進効果を得ることができた。また、PRP 中の成長因子をゼラチンハイドロゲルのような足場に含浸させて投与しても同様の効果を得た。PRP に含まれる成長因子の組織中半減期は極めて短時間であり、直接単回投与では期待されるほどの効果が得られない可能性がある。PRP をゲル状にすることで成長因子をフィブリン網の中に留めることが可能であることが知られており、このゲルを患部に適用することで持続的に成長因子を作用させることができる。PRP に含まれている成長因子量が多ければ、組織に対する成長因子の曝露を長時間継続させることが可能となるが、本章における症例の治癒促進はこれを示唆していた。本章の結果から、重症の創傷に対する PRP 療法では、成長因子を徐放させる投与法が有用であると考えられた。



A



B



図5-1. (A)症例1における第19病日の患部。皮下組織は閉鎖し滲出も認められないが、上皮化は進んでいない。(B)第20病日に自己血より多血小板血漿(PRP)を作製し、カルシウムおよび自己血清の添加による活性化によりゲル状にした(左図)。このゲルを創に添付し、ドレッシングで被覆した(右図)。

A



B



図5-2. 症例2における第16病日の患部。(A) Y字型の創は離開したままだが、肉芽の増生は継続している。(B) 創端より鉗を挿入すると、約10 cmの鉗身が全て挿入可能であった。

**A****B****C**

図5-3. (A) 治療に使用したゼラチンハイドロゲルシート。(B) 2 ml の多血小板血漿 (PRP) を含浸させたゼラチンハイドロゲル。(C) 症例2における頭側の創端に存在するポケット内に、PRP含浸ゼラチンハイドロゲルシートを留置した。



図5-4. 症例1における第21病日の患部。創が湿潤状態となり、良性肉芽の増生が認められる。

A



B



図5-5.症例1における(A)第25病日、(B)第29病日の患部。著しい創面の収縮が認められる。これより2週間後に創は完全に閉鎖した。

A



B



図5-6. (A)症例2における第18病日(多血小板血漿投与2日後)の患部。旺盛な良性肉芽増生が認められる。(B)第21病日(多血小板血漿投与5日後)の患部。滲出液が著しく減少し、創の収縮が認められる。

## 第6章 総括

他馬に蹴られたり障害物に突進したりすることで生じる重度の筋挫傷をともなうようなウマの体幹部の損傷では、たとえ患部の洗浄、壊死組織の除去、外科縫合および術後の消炎処置を適切に行っても縫合面の離開、滲出液の大量排出や感染が生じてしまうことがある。さらに創局所において過剰なプロテアーゼによる上皮組織の欠落や血行不良を生じた場合、上皮化はさらに遅延する。ヒト臨床ではこのような症例に成長因子製剤であるヒトリコンビナント bFGF 製剤が使用されることがあり、血行不良が治癒阻害要因となっている場合に著しい上皮形成促進効果を発揮する。ヒト同様にウマリコンビナント成長因子製剤のウマ臨床における導入を検討する場合、研究開発にかかるコストと労力がニーズに見合うかどうか疑わしい。またヒト bFGF 製剤をウマ創傷に対して試行的に使用すると、特に下肢部の創において過剰な肉芽形成を生じる場合がある。我々の行った先行研究においても、外科的に作製された創傷モデルにヒト bFGF 製剤を含侵させたゼラチンハイドロゲルを埋め込むと、ハイドロゲル単独の場合に比べて多量の出血を伴った過剰な肉芽増生を認めた。動物種差による影響の有無は不明だが、ヒト bFGF 製剤はウマ創傷治療薬としては少々効果が強すぎる印象があった。

このような遷延化した創傷症例に対し、組織修復に有用な成長因子を多く含む自家 PRP を使用した治療法は、ウマにおいてコストパフォーマンスや操作性に優れた成長因子療法

である。ウマの臨床獣医師は厩舎に往診して治療を行うことが多く、治療法は可能な限り簡便であることが望ましい。PRP は専用キットや一般的な遠心機を使用して容易に作製可能であることから近年注目を浴び、多くの作製方法が発案された。しかしその結果、得られた PRP の血液学的特性は様々で、有効成分である含有成長因子の量もばらつきが見られた。それでも作製方法や取扱法の簡便さゆえ、作製および適用方法の標準化の検討やシステムチックな投与試験を実施しないまま臨床応用の普及が進んでしまったことから投与効果も不明瞭になってしまい、「治療効果が実感できない治療法」と受け取られるようになってしまった。本研究では筋挫傷をとまなう重度の創傷治療に対して有用な PRP 療法を確立することを目標に定め、まず用いられる PRP の品質を安定させることを第 1 の課題とした。特に、PRP に含まれる成長因子の中でも組織修復の起点として重要な PDGF-BB および組織修復促進効果が高い TGF- $\beta$ 1 に着目し、これらの濃度を安定的に高濃度にするような PRP 作製法および活性化方法を確立し標準化することができた。

一方、このような高濃度の成長因子を含む PRP を骨格筋組織に適用することにより筋肥大効果や有害事象が発生する可能性が考えられたため、活性化 PRP を健常筋に投与して筋組織所見や筋再生に関わるマーカー遺伝子発現量の確認を行った。その結果、組織所見については懸念された所見は認められず、PRP は健常な骨格筋形態をさらに変容させるほどの力価を有しないことが明らかとなった。一方、投与部の筋組織で筋線維の分化に関連する遺



伝子発現量が増強されたことから、骨格筋損傷に対して PRP を投与することで創傷治癒が促進される可能性が考えられた。

このため骨格筋損傷モデルを用いて損傷筋に対する PRP 投与試験を実施したところ、PDGF-BB および TGF- $\beta$ 1 の効果により細胞の活性が高まり、組織修復過程は促進された。ところが組織中の成長因子濃度は極めて短時間で減少していたことから、PRP の直接的な単回投与による効果は持続的でない可能性があったため、効果を持続させるための適用法を模索する必要があった。そこで実際の症例では、カルシウム自己血清添加法による活性化によりゲル状になった PRP を適用する方法や、2 回凍結融解法による活性化を行って得られた成長因子に富んだ上清をゼラチンハイドロゲルに含浸させ損傷部に貼付することによって患部に成長因子を長期間にわたって曝露させる投与法を試行したところ、症状が長期化していた創傷において上皮化や創収縮が促進された。

このようにゲル状の PRP やゼラチンハイドロゲルを用いた PRP 療法は、重症の創傷治療において効果的であった。しかし組織内に留置され残存している間は生体にとっては異物であり、結果的に組織修復の妨げとなる可能性は否定できない。組織修復の速度と足場の消失（分解）速度のバランスは常に考慮すべき重要なファクターである。足場素材としては現在、アルギン酸ゲルやシルクエラスチンといった新素材も注目されている。特にシルクエラスチンは自身の組織内投与によって生じる炎症反応を極力抑えることができるうえ、コラ

ーゲンとの親和性に非常に優れているため組織への吸収も早い。PRP と併用することにより組織修復効果の相乗作用が期待できるため、新しい創傷治療法として注目されている。

本研究により、ウマ PRP 投与により創傷治癒が促進され、有害事象も生じないことから、創傷治療に対して簡便、安全かつ有用なウマ PRP 療法を確立することができた。現在ヒト医療における PRP 療法は創傷治療のみならず、変形性関節症や骨軟骨症に対する有効性が次々に報告されている。また、血小板膜に含まれているタンパク（12-HHT）がケラチノサイトの遊走性を促進させるため、PRP は角膜潰瘍治療薬としても注目されている。ウマ臨床ではこれらの疾患に対する PRP 療法の明確な有用性の報告はいまだ多くないが、現在 JRA ではウマの滑膜炎や角膜損傷に対する有用な PRP 療法について調査研究が進められている。

ところで、ヒト医療において多くの PRP 療法の有効性が報告される中で、治療に用いられている PRP の特性は依然として多種多様である。近年最も調査されているのはヒトの関節疾患に対する PRP 療法であるが、骨軟骨症に対する PRP 療法では適正血小板濃度の存在が回顧的調査により示唆されている。こういったことは骨や軟骨に対してだけでなく、腱、靭帯、角膜、そして筋肉といった組織損傷に対する PRP 療法でも考えられ、組織別に適正濃度が異なる可能性も考えられる。我々が追加的に実施した実験では、PRP 中の血小板濃度を今回使用された濃度の 3 倍に濃縮して同様に筋損傷モデルに投与を行ったが組織修復の程度は本研究の結果と変わらなかった。血小板濃度が高濃度で、含有成長因子濃度が

高い PRP を使用する治療法が必ずしも良い結果をもたらさない可能性もあり、このことについて今後さらなる検討が必要である。

さらにヒト医療で問題視されているのは、自家の PRP を使用する場合、常に良質の PRP 療法を提供できない可能性である。特に全身状態が悪化した患者からの自家 PRP 作製には倫理上の問題があるだけでなく、投薬や血液性状の変化の影響で PRP 中の血小板や成長因子が濃縮できないケースが報告されている。こういった場合における他家 PRP による治療について議論があるが、近年の再生医療技術の進歩によりヒト iPS 細胞由来血小板作製法が研究されており、ユニバーサルドナー由来の特殊な iPS 細胞由来血小板を活用した成長因子製剤の開発が実現されれば、自家や他家といった問題は解消されるだろう。さらに PRP の特性の不安定さに起因した PRP 療法の問題は製剤化によって解消される。ウマにおいて多くの研究者が iPS 細胞作製を試みており、同様の成長因子製剤開発の可能性もある。とは言え、多種の疾患に対する PRP 療法の有効性がウマ PRP を使用した適切な投与試験によって証明されなければニーズは拡大しない。今後、本研究で標準化された方法により作製および活性化され、含有されている成長因子量が予測可能なウマ PRP が治療や研究に積極的に用いられることで、多くの有益なエビデンスが集積されることを期待している。

## 謝 辞

本研究を円滑に遂行するにあたり多大なるご助力をいただきました日本中央競馬会 競走馬総合研究所の皆様および JRA 獣医職の方々に心より感謝いたします。また、筋サンプルの組織学的解析や遺伝子発現定量解析に御協力いただきました山口大学農学部 生物機能科学科 宮田浩文教授並びに研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に当たりまして、東京大学 農学生命科学研究科の西村亮平教授、桑原正貴教授、堀正敏教授、山内啓太郎准教授および関澤信一准教授におかれましては、多くの御指導および御意見を頂戴いたしましたことに対し深謝いたします。特に山内啓太郎准教授におかれましては、本研究に関連する技術協力や多くの御指導を頂戴いたしましたことに対し重ねて深謝いたします。

最後に、学生時代より多くのご指導ご鞭撻を頂いた上、自分を獣医師にさせていただいた故澤崎徹先生に、格別の感謝を申し上げたいと思います。

## 参考文献

- 1) Stashak TS, Theoret CL. Equine wound management. 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2008.
- 2) Caron JP. Management of superficial wounds. In: Auer JA, editor. Equine Surgery. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1992. p. 232.
- 3) Iacopetti I, Perazzi A, Ferrari V, Busetto R. Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: A case report. *J Equine Vet Sci.* 2012;32:123–8.
- 4) DeRossi R, Coelho AC, Mello GS, Frazílio FO, Leal CR, Facco GG, *et al.* Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras.* 2009 Jul–Aug;24(4):276–81.
- 5) Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig.* 2019 Jul 18;6:19.
- 6) Torres-Torrillas M, Rubio M, Damia E, Cuervo B, Del Romero A, Peláez P, *et al.* Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 25;20(12):3105.
- 7) 澤芳樹. 「再生医療の最前線」『医療と社会』、2018;28(1): 93–101.

- 8) Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, *et al.*  
Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor  
and Stem Cell Based Treatments. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(1):1–23.
- 9) Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.*  
2004 Apr;62(4):489–96.
- 10) Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, *et*  
*al.* Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006  
Jun;38(2):174–87.
- 11) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors  
and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008 Sep–Oct;16(5):585–  
601.
- 12) Satue K, Gardon JC, Munoz A. Interpretation of platelets in the horse. *J Hematol.*  
*Res.* 2017;4:19–25.
- 13) Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. *Equine Internal Medicine.* 3rd ed. St. Louis:  
Saunders Elsevier; 2010. p. 757.
- 14) Textor JA, Tablin F. Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of  
methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet Surg.* 2012  
Oct;41(7):784–94.

- 15) Textor JA, Norris JW, Tablin F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am J Vet Res.* 2011 Feb;72(2):271–8.
- 16) Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther.* 2012 Aug 8;14(4):219.
- 17) Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, *et al.* Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 2007 Feb;25(2):230–40.
- 18) Smith JJ, Ross MW, Smith RK. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2006;19(1):43–7.
- 19) Hwang YJ, Choi JY. Addition of mesenchymal stem cells to the scaffold of platelet-rich plasma is beneficial for the reduction of the consolidation period in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 May;68(5):1112–24.
- 20) Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Inchingolo AD, Dipalma G, *et al.* Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an useful aid in healing and regeneration of bone tissue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Sep;16(9):1222–6.

- 21) Marukawa E, Oshina H, Iino G, Morita K, Omura K. Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011 Jun;39(4):278–83.
- 22) Mei-Dan O, Lippi G, Sanchez M, Andia I, Maffulli N. Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? *Phys Sportsmed.* 2010 Dec;38(4):127–35.
- 23) Gosens T, Peerbooms JC, van Laar W, den Ouden BL. Ongoing positive effect of platelet-rich plasma versus corticosteroid injection in lateral epicondylitis: a double-blind randomized controlled trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2011 Jun;39(6):1200–8.
- 24) Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res.* 2010 Feb;28(2):211–7.
- 25) Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc.* 2008 May 15;232(10):1515–20.



- 26) Brossi PM, Moreira JJ, Machado TS, Baccarin RY. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res*. 2015 Apr 22;11:98.
- 27) Dahlgren LA. Regenerative medicine therapies for equine wound management. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2018 Dec;34(3):605–620.
- 28) Tambella AM, Martin S, Cantalamessa A, Serri E, Attili AR. Platelet-rich plasma and other hemocomponents in veterinary regenerative medicine. *Wounds*. 2018 Nov;30(11):329–336.
- 29) Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL. Comparison of hematologic values and transforming growth factor- $\beta$  and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res*. 2004 Jul;65(7):924–30.
- 30) Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P, *et al*. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med*. 2017 Sep;14(3):2060–2070.

- 31) Vasconcelos E, Figueiredo AC, Seghatchian J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfus Apher Sci.* 2003 Aug;29(1):13–6.
- 32) Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009 Jun;37(6):1135–42.
- 33) Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author’s perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 Oct–Dec;7(4):189–97.
- 34) Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158–67.
- 35) Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraud L, *et al.* DEPA classification: a proposal for standardizing PRP use and retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016 Feb 4;2(1):e000060.
- 36) Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2011 Oct;39(10):2135–40.

- 37) Yoshida R, Murray MM. Peripheral blood mononuclear cells enhance the anabolic effects of platelet-rich plasma on anterior cruciate ligament fibroblasts. *J Orthop Res.* 2013 Jan;31(1):29–34.
- 38) King W, van der Weegen W, Van Drumpt R, Soons H, Toler K, Woodell-May J. White blood cell concentration correlates with increased concentrations of IL-1ra and improvement in WOMAC pain scores in an open-label safety study of autologous protein solution. *J Exp Orthop.* 2016 Dec;3(1):9.
- 39) Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier, LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med.* 2014 Jan;42(1):42–9.
- 40) Kisiday JD, McIlwraith CW, Rodkey WG, Frisbie DD, Steadman JR. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. *Cartilage.* 2012 Jul;3(3):245–54.
- 41) Sano K, Takai Y, Yamanishi J, Nishizuka Y. A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. *J Biol Chem.* 1983 Feb 10;258(3):2010–3.

- 42) Sonker A, Dubey A. Determining the effect of preparation and storage: An effort to streamline platelet components as a source of growth factors for clinical application. *Transfus Med Hemother*. 2015 May;42(3):174–80.
- 43) Zimmermann R, Arnord D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, *et al*. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2003 Nov;85(4):283–9.
- 44) Hauschild G, Geburek F, Gosheger G, Eveslage M, Serrano D, Streitbürger A, *et al*, Mischke R. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Vet Res*. 2017 Jan 5;13(1):7.
- 45) Shin HS, Woo HM, Kang BJ. Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet-rich plasma. *BMC Vet Res*. 2017 Jun 26;13(1):198.
- 46) Borrione P, Fagnani F, Di Gianfrancesco A, Mancini A, Pigozzi F, Pitsiladis Y. The role of platelet-rich plasma in muscle healing. *Curr Sports Med Rep*. 2017 Nov/Dec;16(6):459–463.
- 47) Giles BM, Underwood TT, Benhadji KA, Nelson DK, Grobeck LM, Lin B, *et al*. Analytical characterization of an enzyme-linked immunosorbent assay for the

- measurement of transforming growth factor  $\beta$ 1 in human plasma. *J Appl Lab Med.* 2018;3:200–212.
- 48) Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo.* 2009 Sep–Oct;23(5):779–96.
- 49) A Hamid MS, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J, Lee LP. Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries. *Am J Sports Med.* 2014 Oct;42(10):2410–8.
- 50) Kawai M, Aida H, Hiraga A, Miyata H. Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses. *Equine Vet J.* 2013 Jul;45(4):512–7.
- 51) Yamano S, Eto D, Kasashima Y, Hiraga A, Sugiura T, Miyata H. Evaluation of developmental changes in the coexpression of myosin heavy chains and metabolic properties of equine skeletal muscle fibers. *Am J Vet Res.* 2005 Mar;66(3):401–5.
- 52) Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006 Jul 1;20(13):1692–708.
- 53) Delos D, Leineweber MJ, Chaudhury S, Alzoobae S, Gao Y, Rodeo SA. The effect of platelet-rich plasma on muscle contusion healing in a rat model. *Am J Sports Med.* 2014 Sep;42(9):2067–74.

- 54) Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol.* 2010 Jan;87(1):59–67.
- 55) Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J Biol Chem.* 2013 Jan 18;288(3):1489–99.
- 56) Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, *et al.* Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: a molecular analysis of the early phases of the regeneration process in an experimental animal model. *PloS One.* 2014 Jul 23;9(7):e102993.
- 57) Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, *et al.* Platelets strongly induce hepatocyte proliferation with IGF-1 and HGF in vitro. *J Surg Res.* 2008 Apr;145(2):279–86.
- 58) Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011 Sep;138(17):3639–46.

- 59) Hamilton B, Tol JL, Almusa E, Boukarroum S, Eirale C, Farooq A, *et al.* Platelet-rich plasma does not enhance return to play in hamstring injuries: a randomised controlled trial. *Br J Sports Med.* 2015 Jul;49(14):943–50.
- 60) Kunze KN, Hannon CP, Fialkoff JD, Frank RM, Cole BJ. Platelet-rich plasma for muscle injuries: A systematic review of the basic science literature. *World J Orthop.* 2019 Jul 18;10(7):278–291.
- 61) Politi PK, Havaki S, Manta P, Lyritis G. Bupivacaine-induced regeneration of rat soleus muscle: ultrastructural and immunohistochemical aspects. *Ultrastruct Pathol.* 2006 Nov-Dec;30(6):461–9.
- 62) Lagrota-Candido J, Canella I, Pinheiro DF, Santos-Silva LP, Ferreira RS, Guimarães-Joca FJ, *et al.* Characteristic pattern of skeletal muscle remodelling in different mouse strains. *Int J Exp Pathol.* 2010 Dec;91(6):522–9.
- 63) Akiyama C, Kobayashi S, Nonaka I. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol.* 1992;83(6):584–9.
- 64) Otrócka-Domagala I, Paździor-Czapula K, Gesek M. Dexamethasone-induced impairment of post-injury skeletal muscle regeneration. *BMC Vet Res.* 2019 Feb 11;15(1):56.

- 65) Nishino I. ABC in muscle pathology. *Rinsho Shinkeigaku*. 2011 Sep;51(9):669–76.  
[Japanese].
- 66) Fukuda K, Kuroda T, Tamura N, Mita H, Kasashima Y. Optimal activation methods for maximizing the concentrations of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- $\beta$ 1 in equine platelet-rich plasma. *J Vet Med Sci*. 2020 Oct 20;82(10):1472-1479.
- 67) Tsai WC, Yu TY, Chang GJ, Lin LP, Lin MS, Pang JS. Platelet-rich plasma releasate promotes regeneration and decreases inflammation and apoptosis of injured skeletal muscle. *Am J Sports Med*. 2018 Jul;46(8):1980–1986.
- 68) Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, *et al*. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor  $\beta$ 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials*. 2016 May;87:147–156.
- 69) Guardiola O, Andolfi G, Tirone M, Iavarone F, Brunelli S, Minchiotti G. Induction of acute skeletal muscle regeneration by cardiotoxin injection. *J Vis Exp*. 2017 Jan 1;(119):54515.
- 70) Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. *Blood*. 1984 Aug;64(2):458–69.



- 71) Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB. Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest.* 1990 Dec;86(6):1976–84.
- 72) Textor JA, Willits NH, Tablin F. Synovial fluid growth factor and cytokine concentrations after intra-articular injection of a platelet-rich product in horses. *Vet J.* 2013 Oct;198(1):217–23.
- 73) Yamanouchi K, Hosoyama T, Murakami Y, Nakano S, Nishihara M. Satellite cell differentiation in goat skeletal muscle single fiber culture. *J Reprod Dev.* 2009 Jun;55(3):252–5.
- 74) Soeta C, Yamanouchi K, Hasegawa T, Ishida N, Mukoyama H, Tojo H, *et al.* Isolation of satellite cells from equine skeletal muscle. *J Equine Sci.* 1998; 9(3):97–100.
- 75) Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003 Jun;74(3):244–55.

- 76) Pereira RCDF, De La Côte FD, Brass KE, da Silva Azevedo M, Gallio M, Cantarelli C, *et al.* Evaluation of three methods of platelet-rich plasma for treatment of equine distal limb skin wounds. *J Equine Vet Sci.* 2019 Jan;72:1–7.
- 77) Kurita J, Miyamoto M, Ishii Y, Aoyama J, Takagi G, Naito Z, *et al.* Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel. *Ann Thorac Surg.* 2011 Sep;92(3):837–44; discussion 844.
- 78) Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty.* 2011;11:e38. Epub 2011 Sep 15.