

博士論文

論文題目 血小板製剤を用いた創傷治療に関する研究

氏 名 荒木 淳

目次

要旨.....	3
1. 背景.....	4
2. 方法.....	7
3. 結果.....	13
4. 考察.....	28
5. 結論.....	34
6. 引用文献.....	35
謝辞.....	41

要旨

血小板製剤は、その止血・凝固作用による止血剤や歯科治療における補填剤として用いられるほか、血小板の活性・破砕時に放出される PDGF, TGF- β , EGF といった生理活性物質が創傷治療や美容医療に用いられている。しかしその作製法、使用法などいまだ標準化がなされておらず、その効果もまちまちであるという問題がある。そこで本研究では、血小板製剤作成過程における、抗凝固剤の使用法、活性化の方法について最適化の検討を行った。その結果、抗凝固剤は ACD を用いるよりも EDTA を用いた方が血小板の収率が良く、活性時に生ずるフィブリンを除去することで液体として利用できる PDGF が増加することが明らかになった。またヒト線維芽細胞培養系において血小板製剤は濃度依存的に細胞増殖を促進した。しかし糖尿病マウス皮膚創傷治癒モデルを用いた検討では、血小板製剤の有効性は明らかではなかった。血小板の取り扱いが困難かつ複雑であるが、臨床での使用においても最適な作製法、使用法を十分に検討する必要がある。

背景

血小板製剤、特に多血小板血漿 (Platelet-rich plasma; PRP) は、血液を分離することによって得られる、血小板を多く含む血漿のことである。もともとは輸血学の中で、全血から赤血球と血漿を分離する場合の方法の 1 つとして、その製造法が開発された (1)。当初は DIC などにおける血小板輸血や外科手術中の止血に利用されてきた経緯がある (2)。一方、近年では血小板が活性化あるいは破砕された際に、その α 顆粒から、Platelet-derived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Epidermal growth factor (EGF) などの様々な生理活性物質が血漿中に放出されることが明らかになり、創傷治癒や組織再生への応用に再び注目が集まっている (3, 4)。これらの成長因子は皮下組織の損傷において創傷治癒の早期に放出され (5)、組織修復および再生過程において組織幹細胞の増殖や血管新生を促すという重要な役割を担っていると考えられている (6-8)。

自己由来の PRP は細胞治療よりも安全であると考えられ、再生医療研究を目的としても用いられる (9, 10)。臨床では 1998 年に歯科領域において創傷治癒促進や組織修復に用いられて以来 (11)、心臓外科 (12)、眼科 (13)、口腔・顎顔面外科 (14)、整形外科 (15)、形成外科 (16, 17)、スポーツ医学 (18)、美容医療 (19, 20) などその用途は多岐にわたる。使用の際には静脈より採取した全血から 1 回目の遠心にて PRP を分離し、2 回目の遠心で濃縮する。1 回目は血小板が血球層に落ち込まな

いよう弱く、2 回目は血小板を底に落とすために強く遠心を行う。本研究では 2 回遠心後上清を除去し体積を減らすことによって濃縮された PRP を Platelet-Concentrated Plasma (PCP) とし、1 回目の遠心後の通常の PRP と区別した。

PRP の使用用途が多岐にわたるにも拘らず、その臨床的な効果はまちまちであるばかりか (21)、効果がないとする報告すらある (22)。最近のレビュー論文においても、腱損傷や変形性膝関節症などの整形外科的疾患に対して多く用いられているが、採取される血液量は 9-55 mL、PRP の血小板濃度は $1.29-1000 \times 10^6 / \text{mL}$ と、その範囲は非常に大きい (23)。PRP 製造のための機器は多く販売されているが、その製造法は標準化されておらず、科学的根拠も少ない。例えば遠心条件と PRP の血小板や成長因子の収率に関してこれまで詳細に調べられていない。PRP 作成においては血液（フィブリン）の凝固と血小板の凝集を制御するために抗凝固剤を用いるという複雑さがあるのが、よくデザインされた研究計画を立てにくい理由の一つとなっている。また、個人および採取時の健康状態により全血内の血球量、すなわち血液の比重が異なることも、その最適な製造法を標準化することを難しくしている (24, 25)。

本研究の第一の目的は、ヒト PRP の製造プロトコールを最適化することである。一般的な器材や遠心機を用いて、血漿中の血小板の収率や濃度を最大にする方法を

調べた。プロトコルの効率は血小板数と PDGF-BB 濃度を測定することで評価した。また、もう一つの目的として、PRP を活性化した際に生ずるゲル化を防ぐことによって注射などへの汎用性を高めるべく、凝固しない血小板由来成長因子濃縮液 Platelet-derived Factor Concentrates (PFC) の製造プロトコルを作成し、ヒト線維芽細胞培養系における効果、および糖尿病マウスの皮膚創傷治癒モデルにおける効果を評価した。

方法

血漿および血清の採取および調整

本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理承認を受けて行われた（受付番号:2859）。事前にインフォームドコンセントを得た健常者ボランティア 9 名（男性 5 名、女性 4 名、年齢 29-49 歳）より静脈血を採取した。採取された血液は、1 mg/mL の ethylene di-amine tetra-acetic acid disodium (EDTA; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) あるいは acid citrate dextrose solution (ACD; Terumo) を全血 10 に対し 1.5 の割合で用いて抗凝固処理とした。コニカルチューブ (15 mL; BD Falcon) に 7.5 mL ずつ分け、20 °C で 10 分間、各遠心条件 (30, 50, 70, 90, 120, 150, 190, 230, 270, 320, 370, 430, 620, 840, 1010, 1600, 2330 g) で遠心機 (Kubota 5900; Kubota Co.) を用いて遠心した。血漿層を分離し、量を測定し、血球計数器 (XS-1000i; Sysmex Co.) を用いて血球数（血小板数および白血球数）を分析した。

得られた血漿 (PRP) は再び、20°C で 10 分間、より強い遠心条件 (1010, 1390, 1830, 2330 g) で遠心し血小板をチューブの底にスピンドウンした。2 回目の遠心後、検体を下部 3 分の 1 あるいは 10 分の 1 の PCP と上清の platelet-poor plasma (PPP) に分け、それぞれの血球数を測定した。検体を 500 単位のトロンビン (Thrombin oral/topical 5000 units-BENESIS®; Benesis Corp.) にて活性凝固し、2330 g にて 10 分間遠心した上清の PDGF-BB 濃度を後述の方法で測定した。全血の検体も同様

にトロンビンで活性化した後 2330 g で 10 分間遠心し上清の PDGF-BB 濃度を測定した。

フィブリノーゲンを除去するために、2 回目の遠心後の検体の上清をすべて除去し同量の phosphate-buffered saline (PBS) にて置換して血小板のペレットを再懸濁した。その後トロンビンで活性化し、2330g で 10 分間遠心した上清の PDGF-BB 濃度を測定した。それぞれの血小板製剤の製造法を図 1 にまとめた。

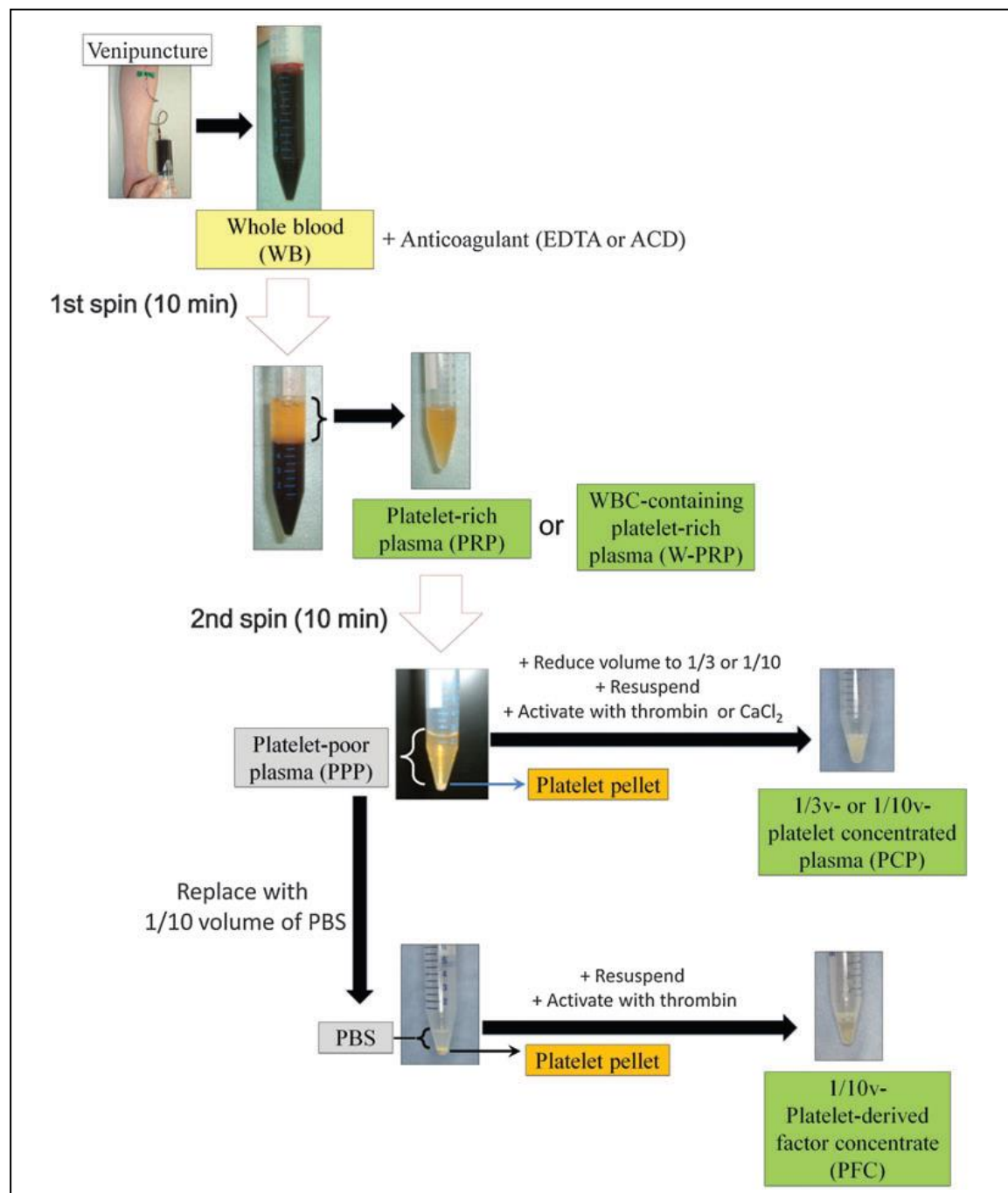


図 1. 血小板製剤製造法のフローチャート

静脈穿刺より得られた全血を抗凝固処理しコニカルチューブに移し 10 分間弱遠心して血漿層（PRP）と血球層を分離する。PRP を再度 10 分間強遠心して血小板をスピンドアウンする。PPP を一部破棄して高濃度の血小板濃縮液 PCP を作成する。PPP をすべて除去して PBS で置換するとフィブリノーゲンが除去され、トロンビンによる活性化にても凝固しない血小板成長因子濃縮液 PFC が作成できる。

PDGF-BB の定量解析

活性化された血小板から放出される PDGF, EGF, TGF- β などのいくつかの成長因子の中でも、PDGF は血漿に含まれず血小板活性化の指標として適していると考え、PDGF-BB を測定することを選択した。anti-human enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine; R&D Systems) を用いて ELISA を行い、マイクロプレートリーダー (Model 550; Bio-Rad Laboratories) を用いて吸光度を測定し、検量線を作成して蛋白濃度 (ng/mL) を測定した。PCP, PFC など高濃度の場合は適宜希釈して測定した。

血漿中フィブリノーゲンの定量解析

血漿中に含まれるフィブリノーゲンの濃度 (mg/dL) は、自動血液凝固分析装置 HemosIL[®] Fibrinogen-C XL (ACL TOP; Instrumentation Laboratory) を用いて測定した。

ヒト皮膚線維芽細胞採取および培養方法

ヒト皮膚はフェイスリフト手術で本来切除破棄するものを使用した。その際、東京大学病院における倫理委員会の審査、了承を得た様式を用いて、事前に患者からのインフォームドコンセントを得た。採取した皮膚片より、**explant** 法により得られた細胞を、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地として初代培養し、凍結保存し、適宜解凍して第 1-3 継代の細胞を増殖実験

に使用した。増殖実験では 6-well プレートに 2×10^4 個/well の濃度で細胞を播種した。その際 FBS を含まない DMEM に、凍結解凍した 1/10v-PFC（体積を 10 分の 1 に減らした PFC）を 2, 1% 添加し、培地のみ（Medium）および FBS を 10% 含む DMEM で培養したものと比較した。細胞培養開始後 5 日目の状態を、顕微鏡を用いて写真撮影した。

Flow cytometry

増殖細胞を検出するために、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込みアッセイを行った。BrdU ラベリングは、BrdU Flow Kits (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて、前項の各 well に 10 μ M の濃度で 4 時間行った。解析は MACSQuant Analyzer（ミルテニーバイオテク株式会社）を用い、コントロール抗体を用いた場合に陽性率が 0% になるようにゲートを設定した。

マウス皮膚創傷治癒モデル

本動物実験は、東京大学が医学系研究科動物実験委員会の承認を受けて行われた（承認番号：医-P13-129）。糖尿病マウス（BKS.Cg- + *Lepr^{db}* / + *Lepr^{db}* / Jcl、日生材）の背部皮膚に ϕ 8mm の円形皮膚全層欠損潰瘍を作成し、周囲にシリコンリングを貼付し、6-0 ナイロン糸にて縫合固定した。PBS（コントロール）、トロンビン活

性をしていない PCP (PCP-T(-))、トロンビン活性をしていない PFC (PFC-T(-))、およびトロンビン活性を行った PFC (PFC-T(+)) の 4 剤を、それぞれ 29G 針付注射針にて 0.2 mL ずつ潰瘍周囲に注射投与した。また、外用投与を目的として、コラーゲン使用人工真皮（インテグラ真皮欠損用グラフト、Integra LifeSciences Corporation）に各製剤を含浸させたものを用いて、同様に作成した皮膚潰瘍を被覆した。製剤投与後はフィルム材でドレッシングを行い、数日置きに写真撮影し、創傷の治癒過程の評価を行った。

統計学的分析

データは平均±標準誤差で表示した。2 グループ間の比較では unpaired Students' t テストを用いた。2 グループ以上の比較には Kruskal-Wallis テストにおいて有意差があるものについて Bonferroni 補正を伴う Mann-Whitney U テストを用いた。 $P<0.05$ (両側検定) をもって統計学的有意差ありとした。

結果

初回遠心後に回収された血液成分

全血を、EDTA にて抗凝固処理し、15 mL のコニカルチューブに 7.5 mL ずつ分注し、30 - 2330 g までの様々な重力条件で 10 分間遠心したところ、遠心力が大きくなるほど、得られた血漿量は増加した。血漿量の平均値は、30 g では 1.22 ± 0.268 mL (全血の $16.27\% \pm 3.58\%$) であり、2330 g では 3.57 ± 0.231 mL (全血の $47.56\% \pm 3.08\%$) であった (図 2A)。

血小板の回収率は、30 - 190 g まで遠心力に応じて増加し、190 - 320 g でピークを迎え、320 - 2330 g では次第に低下していった (図 2B 左上)。やや個体間のばらつきがあるものの、全血の検体を 10 分間する場合の最適な遠心力の条件は、230 - 270 g であると示唆された (図 2B 右)。このプロトコールにて全血の検体にある血小板の 80% 以上を回収できた。この PRP は白血球を少量 (全血の 4.1% - 5.8%) 含み、WBC-poor PRP といえるものであった。

白血球に関しては、遠心力が大きくなるほど回収率は低下し、そのパーセンテージは、30 g では $25.3\% \pm 12.8\%$ であり、620 g では $0.875\% \pm 0.66\%$ であった (図 2B 左下)。840 g 以上では PRP に白血球は含まれず、ほとんどすべてが血球層に落ちてしまったようであった。

白血球と血小板の回収率データをそれぞれ x 軸 (白血球) と y 軸 (血小板) にプ

ロットした（図 2C）。我々のプロトコールでは白血球を含有する PRP（W-PRP; 考察に詳述）を作成するには、全血を 70 g で 10 分間遠心するのが最適であり、その場合の白血球と血小板の含有率はそれぞれ、10% - 35%（白血球）、60 - 80%（血小板）であった（図 2C の赤丸）。

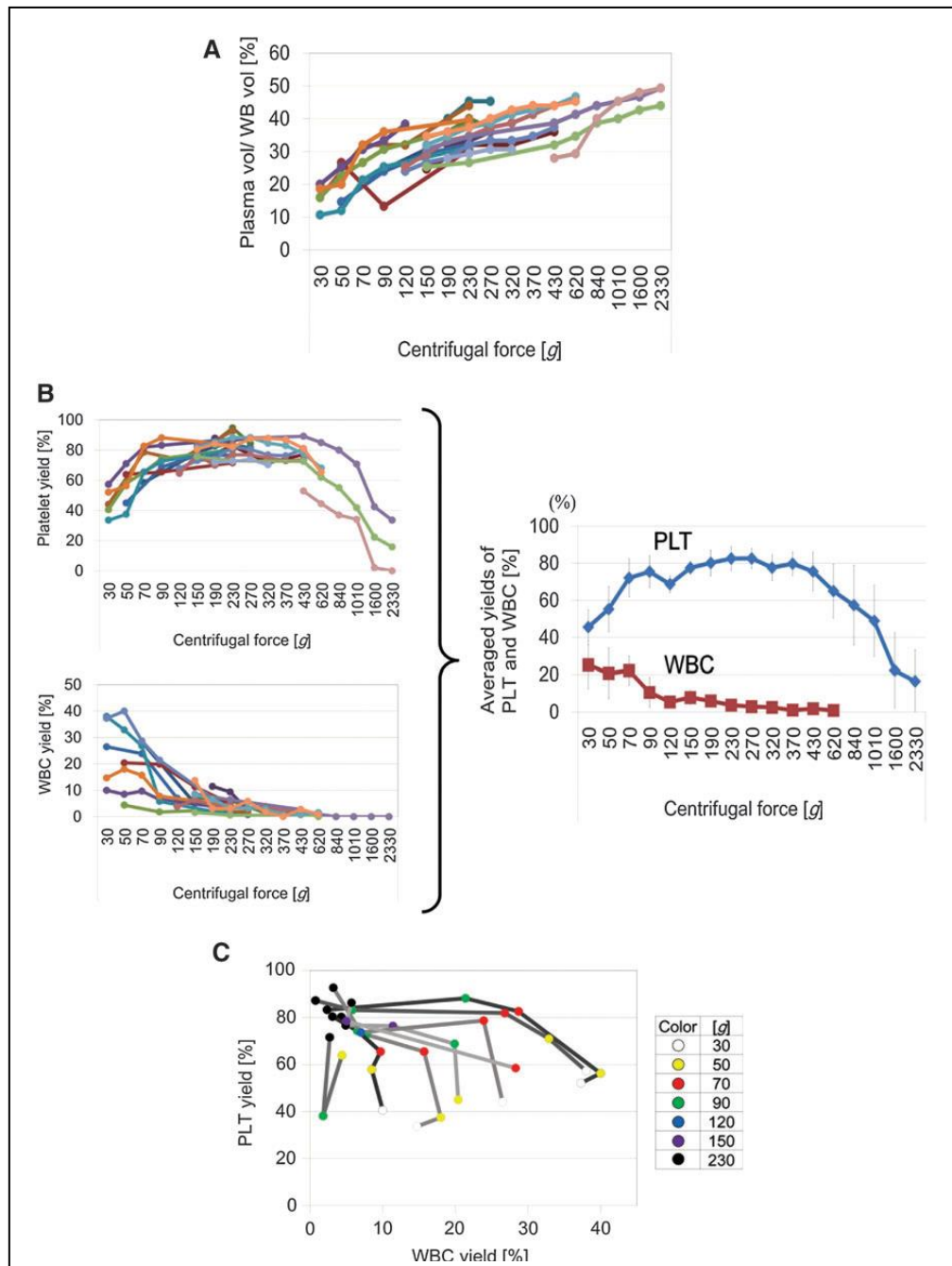


図 2. PRP および W-PRP を作成するための遠心条件

全血を様々な遠心力で 10 分間遠心して血漿を分離した。(A) 血漿量は遠心力に応じて増加し、2330 g で全血の 50%を示した (n=10)。(B) 血小板 (PLT) の回収率は 190 から 320 g でピークとなり (n=15)、一方白血球 (WBC) は遠心力が大きくなるほど回収率は減少した (n=16)。右図は血小板 (青)、白血球 (赤) それぞれの平均±標準誤差を示す。(C) 各遠心力における血小板と白血球の回収率の 2 次元データ (x 軸：白血球、y 軸：血小板)。血小板は比較的一貫性が見られたが、白血球は個体間のばらつきが大きかった。各遠心条件 (30-230 g) を異なる色で表示した。A-C において同ラインは同一検体を示す。

2 回遠心後に回収された血液成分

1 回目の遠心で得られた PRP を再度強遠心して血小板をスピンドウンし、上清を除去して体積を減らすことで、濃縮し、PCP を精製することができた。2 回目の遠心では、遠心力が大きくなるほどより多くの血小板を落とすことができ、PRP の血小板量に対する回収率は、10 分間の遠心だと、1010 g で $69.0\% \pm 10.5\%$ 、1390 g で $84.9\% \pm 8.39\%$ 、1830 g で $87.8\% \pm 6.85\%$ 、2330 g で $91.2\% \pm 6.05\%$ であった（図 3A）。このように 2 回目の遠心はより強い遠心力で行うことが推奨された。

2 回目の遠心後、異なる量の上清（PPP）を除去することによって 2 種類の PCP を作成した。すなわち、3 分の 2 の PPP を除去することによって体積が 3 分の 1 になった PCP（以下 1/3v-PCP）と、10 分の 9 の PPP を除去することによって体積が 10 分の 1 になった PCP（以下 1/10v-PCP）である。全血（WB）、PRP、1/3v-PCP、1/10v-PCP の血小板濃度（ $\times 10^4 / \mu\text{L}$ ）はそれぞれ、24.5 - 4.79、62.7 - 14.8、189.6 - 37.3、466.7 - 5.27 であり、PRP に比べて 1/10v-PCP は 7.4 倍であった（図 3B）。

抗凝固剤 EDTA および ACD の、PRP および PCP の血小板回収率に対する影響

PRP 作成時の抗凝固剤としての EDTA と ACD の影響を調べるために、それぞれで抗凝固処理した全血を 10 分間 230 g で遠心した後の PRP の血小板回収率を比較した。PRP と 1/10v-PCP の精製において、抗凝固剤として ACD を用いたときよりも EDTA

を用いたときの方が、有意に血小板回収率が高かった（図 3C）。EDTA の方がより強く血小板の凝集を防ぎ、血小板製剤製造中のロスを防ぐことで、血小板および血小板由来の成長因子を最大限に利用するのに適していた。

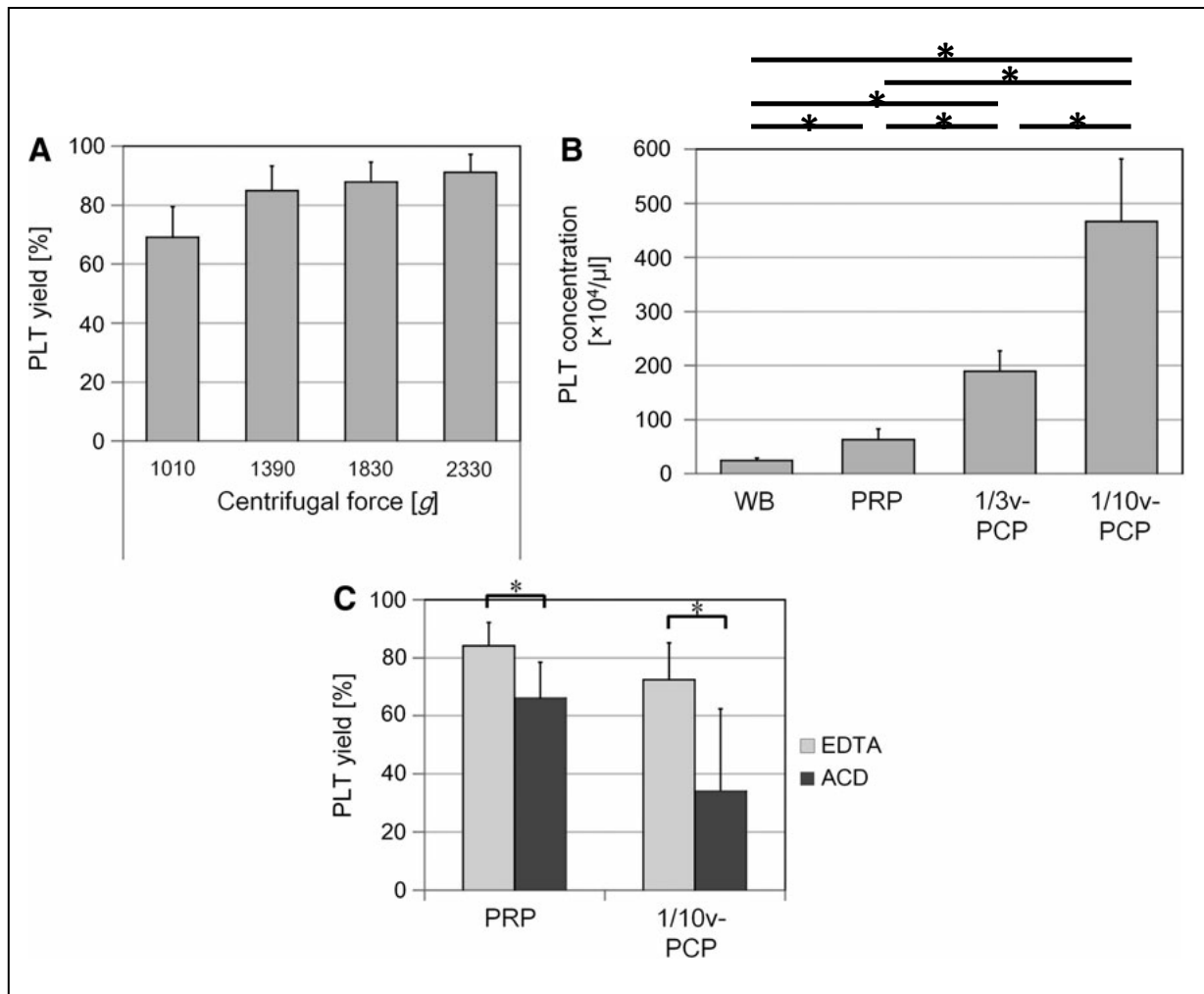


図 3. PRP を遠心した後の血小板量

全血を 230 g で 10 分間遠心した PRP を再度 10 分間強遠心して PCP を作成した。(A) 2 回目の遠心力が大きいほど PCP の血小板回収率 (%) は大きかった (n=5)。(B) 全血、PRP、1/3v-PCP、1/10v-PCP の血小板濃度 (n=11)。(C) 血小板製剤作成における 2 種類の抗凝固剤 either ethylene di-amine tetra-acetic acid (EDTA) および acid citrate dextrose (ACD) の比較検討。同プロトコールで作成された PRP と 1/10v-PCP において ACD よりも EDTA を用いた方が、血小板回収率 (%) が有意に高く、より抗凝固作用が強かった (n=10)。アスタリスク (*) は統計学的有意差 ($P < 0.05$) を示す。

トロンビンによる活性化前の PCP と PFC の血小板濃度と総量

2回遠心後に上清(PPP)を PRP の 10 分の 1 の量の PBS で置換することで 1/10v-PFC を作成した (図 1)。血小板活性化前の 1/10v-PCP および 1/10v-PFC の血小板濃度 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$) はそれぞれ、 427.3 ± 21.1 および 415 ± 50.1 であり、全血 (20.2 ± 2.26) や PRP (51.4 ± 7.15) と比較して高値であり、全血と PRP、PRP と 1/10v-PCP、PRP と 1/10v-PFC の間には統計学的有意差が見られた (図 4A)。

血小板回収率については、PCP が $74.8\% \pm 13.1\%$ 、PFC が $72.1\% \pm 10.4\%$ で同等であったが、PRP の $88.7\% \pm 6.2\%$ に比較して有意に低値であった (図 4B)。このことは 2 回の遠心の過程でいくらかの血小板が失われたり凝集したりすることはあるが、PPP を PBS で置換する過程ではそのようなことはない、ということを示した。それでも 1/10v-PFC は全血の 70% 以上の血小板を有していた。

トロンビンによる活性化後の PCP と PFC の PDGF-BB の濃度と総量

血小板活性化後の 1/10v-PFC の PDGF-BB の濃度 (ng/mL) は 157.9 ± 16.0 であり、全血の 3.05 ± 0.76 、PRP の 6.79 ± 1.33 、1/10v-PCP の 52.7 ± 20.8 よりもはるかに高値であり、全血と PRP、PRP と 1/10v-PCP、1/10v-PCP と 1/10v-PFC の間に統計学的有意差が見られた (図 4C)。興味深いことに、PFC は PCP と活性化前の血小板濃度は同等だったにも拘らず、活性化後の PDGF-BB 濃度は有意に高値であった。

PDGF-BB の総量を、その濃度 (ng/mL) に液体として測れる量を乗じて計算した。

全血、PRP、1/10v-PCP については活性化前の血小板回収率とよく相関して、その順に PDGF-BB 総量が低下したが、1/10v-PFC については非常に高値で、全血よりも高い値を示した。

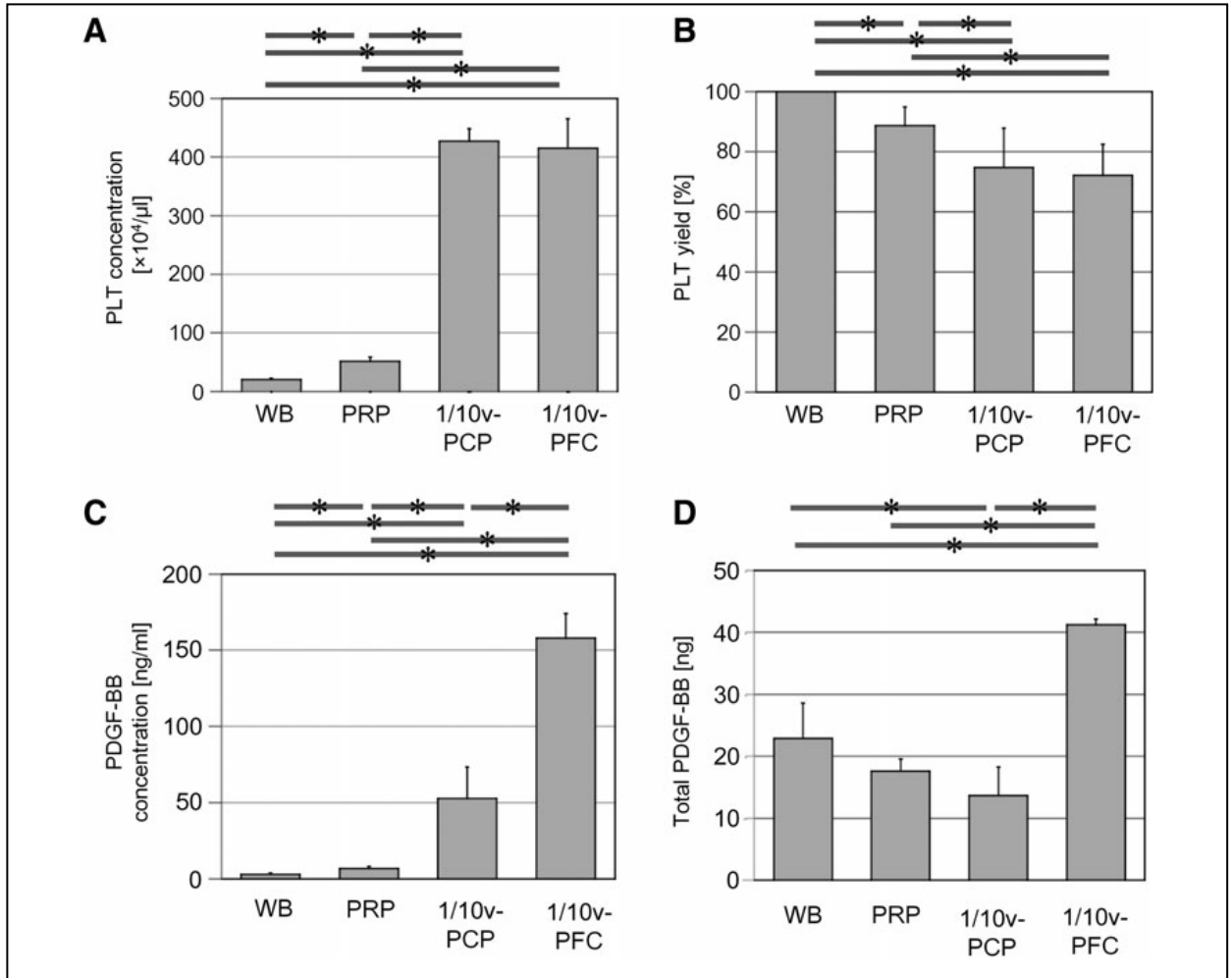


図 4. 同一の検体から得られた全血、PRP、1/10v-PCP、1/10v-PFC の血小板と PDGF-BB の濃度と総量 (n=6)

血小板数はトロンビンによる活性化前に、PDGF-BB 蛋白量は活性化後に測定された。

(A) 血小板濃度。1/10v-PCP および 1/10v-PFC の血小板濃度は PRP と比較して有意に高値であった。(B) 血小板回収率 (n=6)。(C) PDGF-BB の濃度 (n=6)。それぞれの製剤で異なり、1/10v-PFC で最高値 (全血の約 50 倍) であった。(D) PDGF-BB の総量 (n=6)。1/10v-PFC の総蛋白量は全血を活性化したものよりもはるかに高値であった。アスタリスク (*) は統計学的有意差 ($P<0.05$) を示す。

抗凝固剤 EDTA および ACD の、PDGF-BB 濃度への影響

EDTA および ACD を抗凝固剤として 1/10v-PCP および 1/10v-PFC を作成し PDGF-BB 濃度を比較した。抗凝固剤として EDTA を用いた場合の PDGF-BB 濃度 (ng/mL) は、全血が 4.30 ± 2.75 、1/10 v -PCP が 64.9 ± 3.00 、1/10v-PFC が 166.5 ± 41.1 であった。一方 ACD を用いた場合、全血が 3.37 ± 2.11 、1/10 v -PCP が 68.5 ± 5.14 、1/10v-PFC が 52.8 ± 2.79 であった(図 5A)。1/10v-PFC において PDGF-BB 濃度は ACD よりも EDTA を用いた方が有意に高値であった。PPP を PBS で置換する際、EDTA を用いたものは血小板のペレットがピペッティングにより容易に攪拌されたが、ACD の方は沈殿物が残った。これは ACD が EDTA よりも抗凝固作用が弱く不十分であり血小板が完全に回収されなかったためか、別の理由としては ACD により pH が低くなり、細胞内シグナルによる血小板の顆粒放出が抑制されたことなどが考えられた。

PCP および PFC における、フィブリノーゲンの定量解析

PPP を PBS で置換することによるフィブリノーゲン除去の効果を明らかにするため、1/10v-PCP および 1/10v-PFC のフィブリノーゲンを定量解析したところ、それぞれ 240.3 ± 16.4 mg/dL および 37.0 ± 5.2 mg/dL であり (n=3)、すべてではないにしても、ほとんどのフィブリノーゲンが除去されていたことが示された (図 5B)。

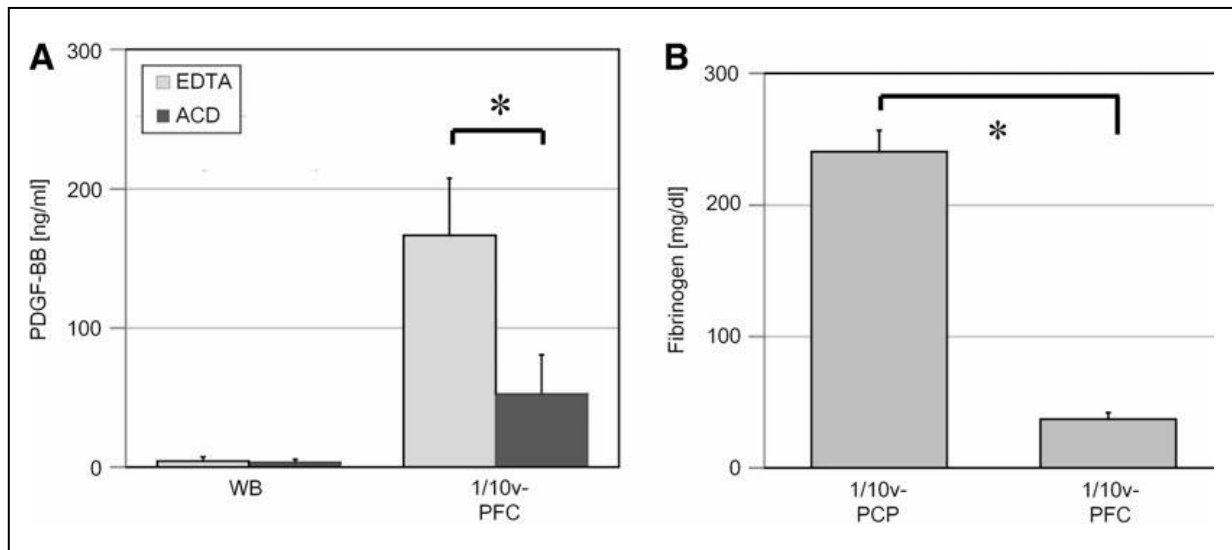


図 5. PFC の PDGF-BB とフィブリノーゲンの測定

2 回遠心後、上清 (PPP) を PBS で置換することで PFC を作成した。(A) 抗凝固剤として EDTA および ACD を用いた場合の全血と 1/10v-PFC の PDGF-BB 濃度 (ng/mL) の比較 (n=10)。EDTA は ACD よりも高い血小板抑制効果を示した。(B) 1/10v-PCP と 1/10v-PFC のフィブリノーゲン濃度の比較 (n=3)。血漿置換によりフィブリノーゲンは著明に減少した。アスタリスク (*) は統計学的有意差 ($P<0.05$) を示す。

PFC がヒト線維芽細胞の増殖に及ぼす影響

PFC は濃度依存的にヒト線維芽細胞の増殖を促進した (図 6A)。BrdU 取り込みアッセイでの陽性率は、PFC 2%が 4.67 %、PFC 1%が 2.22 %、培地のみ (Medium) が 0.37 %、FBS 10 %が 0.65 %であり、PFC の増殖促進効果が同様に認められた (図 6B)。

10%FBS 含有 DMEM と比較して、1%PFC 含有 DMEM は線維芽細胞増殖促進効果が大きかった。

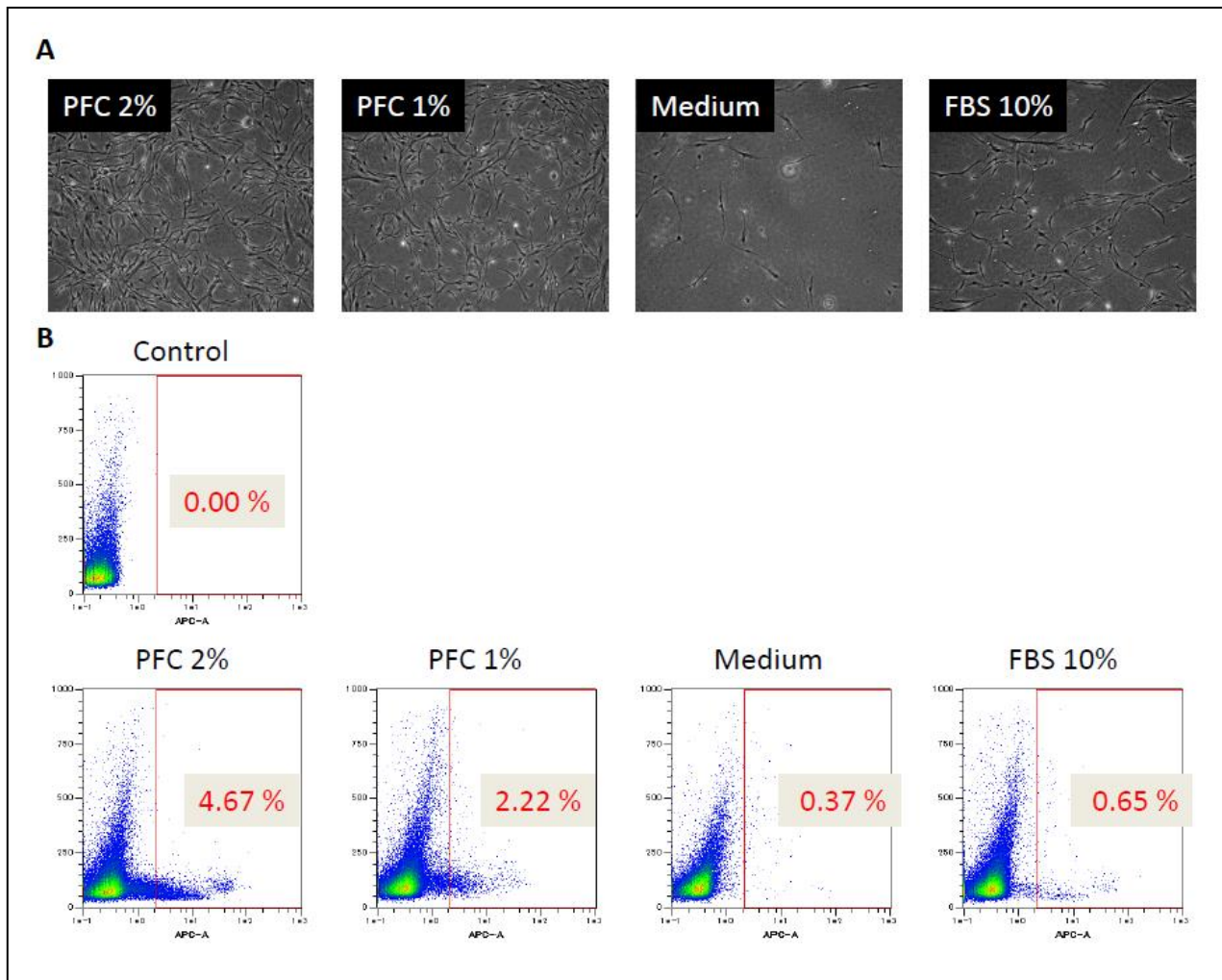


図 6. PFC を用いた細胞増殖実験

(A) 培地に PFC を 2%、1% 添加したもの、培地のみ (Medium)、FBS を 10% 添加したもので 5 日間培養した後の光学顕微鏡像。(B) BrdU 取り込みアッセイ。BrdU 陽性細胞の割合は、PFC 2%、PFC 1%、FBS 10%、Medium の順に高かった。

マウス皮膚創傷治癒モデル

PBS（コントロール）、トロンビン活性をしていない PCP（PCP-T(-)）、トロンビン活性をしていない PFC（PFC-T(-)）、およびトロンビン活性を行った PFC（PFC-T(+)）の 4 剤を、潰瘍周囲に注射するモデルで、創傷治癒過程に肉眼的に明らかな差はみられなかった（図 7A）。また、それらの製剤をコラーゲン使用人工真皮に含浸させ外用投与するモデルにおいても、創傷治癒過程に肉眼的に明らかな差はみられなかった（図 7B）。

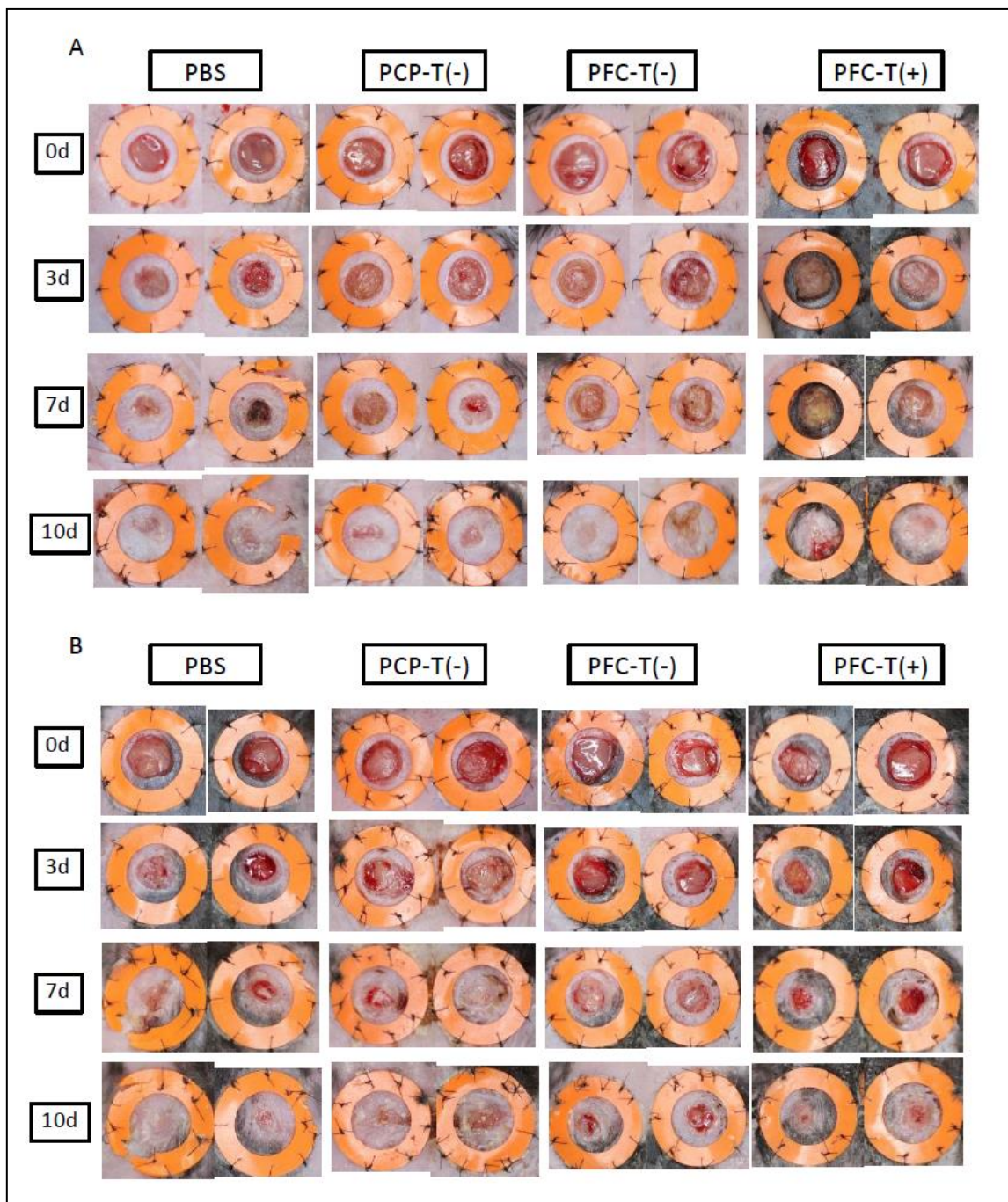


図 7. 血小板製剤を用いたマウス皮膚創傷治癒実験

PBS (コントロール)、トロンビン活性をしていない PCP (PCP-T(-))、トロンビン活性をしていない PFC (PFC-T(-))、およびトロンビン活性を行った PFC (PFC-T(+)) の 4 剤を、潰瘍周囲に注射投与するモデル (A) においても、コラーゲン使用人工真皮に含浸させ外用投与するモデル (B) においても、明らかな相違は見られなかった。

考察

血液成分の比重には違いがあり、血球系だと赤血球が 1.095 でもっとも大きく、次いで白血球が 1.063-1.085、血小板は 1.032 ともっとも小さい。また、全血の比重は男性が 1.055-1.060、女性が 1.050-1.056 と血球量や血漿蛋白量により男性がやや大きく、血漿は 1.025-1.029、血清は 1.024-1.028 とされている (26)。それぞれの成分は遠心によってある程度分けることができるけれども、比重がオーバーラップすることもあるため (27)、混在させず完全に分離するというのは不可能である。採取した血液の血小板を 100%利用するのには、全血を用いるのがよいと考えられるが、本研究で総 PDGF-BB 量の一部が失われてしまうという点で、全血の利用には制限があることが明らかになった。これはおそらく、凝固により形成されるフィブリンゲルに PDGF などの蛋白が一部トラップされてしまったことによると考えられた。

PRP や PCP、PFC などの血小板製剤の精製法を最適化するために、備品は研究室においてもっとも平易なもの (15-mL および 1.5-mL コニカルチューブ) を用い、遠心時間は臨床において現実的な 10 分間を選択した。全血を血漿と血球に分離する初回遠心において、遠心力を大きくするほど回収できる血漿量は多くなるが、血小板は凝集して血球層に落ち込んでしまう。血液成分の数や組成には個人差があり、血液の比重も異なるため、本研究で行った血小板の回収率を最大にする最適遠心重力条件にもサンプルによるばらつきがあった。このことは同一人物においても採血時

の健康状態などが最適遠心条件に影響し、言うなれば最適なプロトコールはケースバイケースであることを示唆した。しかしながら、プロトコールを統一するため、我々は PRP を作成するのには 230-270 g、W-PRP を作成するのには 70 g で 10 分間遠心するのが最適だと結論づけた。最適な血液分離プロトコールは容器の大きさや形状、遠心重力や時間、抗凝固剤の量や種類など多くの因子に規定される。30 年以上も前に Slicher と Harker らは、抗凝固剤として ACD を用い 250-450 mL のプラスチックバッグで血小板を約 86%回収できたと報告した (28)。彼らは初回遠心を 1000 g で 9 分間行って PRP を分離し、それを濃縮するために 2 回目の遠心を 3000 g で 20 分間行った。

PRP に白血球が含まれると成長因子のプロファイルが変化するため、白血球を多く含む PRP は、その治療効果はまだはっきりとはしていないものの、白血球含有 PRP (W-PRP)、leukocyte (あるいは WBC) -rich (あるいは poor) PRP などと呼ばれ、また別の治療製剤として扱われ、使用されている (24, 29, 30)。全血を遠心すると白血球は赤血球層の上にできる buffy coat と呼ばれる白色層に濃縮され、血小板はその直上に濃縮される。W-PRP はこの buffy coat を含むが、血小板の回収率と得られる血漿量は PRP よりも少ない。

PRP は全血を初回遠心することにより分離される。我々のデータでは、PRP の量 (2.63 ± 0.32 mL) は全血 (7.5 mL) の約 3 分の 1 であり、血小板濃度は 2 から 3 倍

であった（図 3B）。血小板の活性化（凝集）を防ぎつつ、2 回目の強遠心を行い PPP の量を減らすことにより、PCP を精製した。PCP の血小板濃度はその減量に依存し 1/10v-PCP の血小板濃度は PRP の約 7 倍であり、全血の 20 倍近くであった。

製剤作成過程において血小板の喪失が若干見られ（図 3A, 4B）、初回遠心以外の喪失は主に血小板凝集によるものだと考えられた。血小板の凝集や活性化は、結果として血小板カウント数の減少や血小板由来成長因子の放出につながる（16）。活性化されていない血小板を最大限に回収し、高濃度の PFC を作成するために、作成過程中に血小板をできるだけ凝集させないことが重要となる。さらに、血液凝固（フィブリン重合）を制御することは容易ではない。フィブリンゲル形成は血漿の溶液として使える部分を減らし、PRP や PCP の精製法を標準化することを困難にする。このように、血液凝固と血小板凝集を防ぐという抗凝固剤の役割は、製剤精製過程において極めて重要である（31）。

臨床的に主に用いられる抗凝固剤は、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、ACD、EDTA の 5 種類があり、ヘパリン以外はカルシウムをキレートする薬剤である。ACD はクエン酸とデキストランの混合であり、市販の PRP 作成機器で通常用いられている。デキストロースには赤血球保護作用があり、ACD は輸血に用いる血液の保存によく使われる。EDTA は ACD よりも強いキレート剤であり（31）、一般的な血球測定のための抗凝固剤として用いられる。予備実験を行った後、我々は本研

究での血小板製剤作成に用いる抗凝固剤として ACD と EDTA を選択した。結果として ACD よりも EDTA を用いた方が PRP や 1/10v-PCP の血小板回収率は高く (図 3C)、1/10v-PFC の PDGF-BB 濃度は濃かった (図 5A)。このことは EDTA の方が明らかに血液凝固と血小板凝集を抑制する作用が強いことを示した。

血小板がトロンビンによって活性化される際、PDGF や EGF、TGF- β などの血小板由来の因子が凝集した血小板から放出される。PRP や PCP においてはフィブリンゲルが形成され、その結果血漿の液体成分は減った。PFC においては PBS で血漿を置換することでフィブリノーゲンがほとんど除去された (図 5B) ため凝固形成がみられなかった。意外なことに、1/10v-PCP と 1/10v-PFC で血小板濃度が同等だった (図 4A) にもかかわらず、PDGF-BB 濃度は 1/10v-PFC が 1/10v-PCP の 3 倍近くとはるかに高値であった (図 4C)。さらに驚くべきことに、1/10v-PFC の血小板量は全血の 70% であった (図 4B) にもかかわらず、液体部分の PDGF-BB 総量を計算すると 1/10v-PFC の方が全血よりもはるかに高値を示した (図 4D)。PRP と PCP の PDGF-BB 総量は全血よりもやや低く、各製剤の血小板量を反映していた (図 4B, D)。これらのことは、全血、PRP および PCP では血小板からの PDGF-BB の放出が不完全であったことを示唆した。トロンビンによる活性の際にフィブリノーゲンが存在しフィブリンゲルを形成することが、PDGF-BB の部分的喪失の理由であり、血小板が内在する PDGF をすべて放出する前にフィブリンゲルにトラップされてしまったと解釈

することもできた。

血小板製剤の臨床使用において、製剤に含まれるフィブリノーゲンの存在が時として血液凝固や血小板凝集を制御不能にさせる。フィブリンゲルは放出制御性の成長因子の担体 (32) や注入剤 (33) として用いられているけれども、ゲルの形成が最終的に使える製剤量が減らし、注入を不可能にするので、より多くの臨床現場で使用するのを難しくしている。本研究では、一般的な研究用備品を用いて、PRP、W-PRP、PCP および PFC を最適に作成する方法を確立した (図 1)。1/10v-PFC の PDGF-BB 濃度は全血の 50 倍以上でありこれまで報告されていた濃度の 5 倍近くであった (4)。本研究結果において、2 回目の強遠心後に PPP を PBS で置換することは、血漿中のフィブリノーゲンを除去するのに簡便で有効な方法であり、血小板がもつ成長因子を最大限利用するために極めて重要であった。

血小板由来の成長因子は創傷治癒の初期に、傷害や出血などで放出される。それらを組織へ注入することで実際の創傷がなくても創傷治癒過程を引き起こすことができると考えられている (5, 34)。また、PRP は組織に局在する幹細胞を活性化させ、局所の組織再生と血管新生を引き起こし、さらには骨髄幹細胞をリクルートさせるとされている (34)。本研究で PFC を培地に含有することでヒト線維芽細胞増殖促進効果が示されたように (図 6)、研究レベルでは PRP の使用法が吟味され、効果が確立されつつある (35) もの、マウス創傷治癒モデルにおいて明らかな有効性が示

されなかったように（図 7）、実際の臨床使用においては、どんな状況下で、どの血小板製剤を、どの濃度で、どれくらいの量を、どのように投与すれば最も効果を発揮できるのかという多くの疑問が残されている（36）。しかしながら高濃度の血小板由来の成長因子は治療効果をみるのに極めて重要であり（37）、我々のプロトコールは血小板製剤の標準化、ならびに基礎研究から応用分野におよぶトランスレーショナル・リサーチの一助になると期待される。

結論

血小板濃度、回収率および血小板由来の生理活性物質（特に **PDGF**）の濃度、回収率に着目して、血小板製剤製造法の最適化を行った。線維芽細胞増殖実験においては製剤の有効性が確認されたが、マウス皮膚潰瘍治癒モデルにおいては確認されず、今後の検討を通して、実臨床での適切な適応、使用法、投与法を解明していくことが期待される。

引用文献

1. Flatow FA Jr, Freireich EJ. The increased effectiveness of platelet concentrates prepared in acidified plasma. *Blood* 27: 449-459, 1966.
2. Boldt J, von Bormann B, Kling D, Jacobi M, Moosdorf R, Hempelmann G. Preoperative plasmapheresis in patients undergoing cardiac surgery procedures. *Anesthesiology* 72: 282-288, 1990.
3. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30: 97-102, 2002.
4. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 114: 1502-1508, 2004.
5. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, Matsumoto D, Shigeura T, Sato T, Suga H, Kato H, Nagase T, Gonda K, Koshima I, Takahashi K, Yoshimura K. Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair Regen* 15: 511-520, 2007.
6. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling

- and therapy. *Circ Res* 103: 1204-1219, 2008.
7. Mimeault M, Batra SK. Recent advances on skin-resident stem/progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies. *J Cell Mol Med* 14: 116-134, 2010.
 8. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24: 3095-3100, 2003.
 9. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91: 4-15, 2004.
 10. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 31: 3572-3579, 2010.
 11. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 638-646, 1998.
 12. Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG. Topical application of autologous blood products

- during surgical closure following a coronary artery bypass graft. *Eur J Cardiothorac Surg* 34: 360-364, 2008.
13. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 114: 1286-1293, 2007.
 14. Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 249-258, 2008.
 15. Savarino L, Cenni E, Tarabusi C, Dallari D, Stagni C, Cenacchi A, Fornasari PM, Giunti A, Baldini N. Evaluation of bone healing enhancement by lyophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76: 364-72, 2006.
 16. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 118: 147e-159e, 2006.
 17. Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns* 36: 4-8, 2010.
 18. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 37: 2259-2272, 2009.
 19. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 24: 227-234, 2006.

20. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 107: 229-237, 2001.
21. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 62: 484-488, 2004.
22. Coombes BK, Bisset L, Vicenzino B. Efficacy and safety of corticosteroid injections and other injections for management of tendinopathy: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 376: 1751-1767, 2010.
23. Cohn CS, Lockhart E, McCullough JJ. The use of autologous platelet-rich plasma in the orthopedic setting. *Transfusion* 2015 Feb 3. doi: 10.1111/trf.13005. [Epub ahead of print]
24. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 27: 158-167, 2009.
25. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 28: 4551-4560, 2007.
26. Plötner, R. Handbuch der gesamter Hämatologie, Band 11/2, zweiter Halbband, p.254, Urban & Schwanzenberg, München, Berlin, 1960.
27. Kurita M, Aiba-Kojima E, Shigeura T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Eto H, Kato H,

- Aoi N, Yoshimura K. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plast Reconstr Surg* 122: 438-448, 2008.
28. Slichter SJ, Harker LA. Preparation and storage of platelet concentrates. I. Factors influencing the harvest of viable platelets from whole blood. *Br J Haematol* 34: 395-402, 1976.
 29. Zimmermann R, Reske S, Metzler P, Schlegel A, Ringwald J, Eckstein R. Preparation of highly concentrated and white cell-poor platelet-rich plasma by plateletpheresis. *Vox Sang* 95: 20-25, 2008.
 30. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med* 39: 266-271, 2011.
 31. McShine RL, Sibinga S, Brozovic B. Differences between the effects of EDTA and citrate anticoagulants on platelet count and mean platelet volume. *Clin Lab Haematol* 12: 277-285, 1990.
 32. Catelas I, Dwyer JF, Helgerson S. Controlled release of bioactive transforming growth factor beta-1 from fibrin gels in vitro. *Tissue Eng Part C Methods* 14: 119-128, 2008.
 33. Hoben G, Schmidt VJ, Bannasch H, Horch RE. Tissue augmentation with fibrin sealant and cultured fibroblasts: a preliminary study. *Aesthetic Plast Surg* 35: 1009-1015, 2011.

34. Eto H, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. *Am J Pathol* 178: 2322-2332, 2011.
35. Gonzales VK, de Mulder EL, de Boer T, Hannink G, van Tienen TG, van Heerde WL, Buma P. Platelet-rich plasma can replace fetal bovine serum in human meniscus cell cultures. *Tissue Eng Part C Methods* 19: 892-899, 2013.
36. Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I, Bolibar I, Angel Expósito J, Rodriguez L, García J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 49: 44-56, 2009.
37. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, Doi K, Yatomi Y, Yoshimura K. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods* 18: 176-185, 2012.

謝辞

最初に、本研究において、東京大学医学部形成外科の吉村浩太郎先生には具体的な研究の立案から論文執筆に至るまでのご指導、ご鞭撻を頂きましたことを、光嶋勲先生には、指導教官として研究にご指導、ご支援を頂きましたことを深く御礼申し上げます。

研究室で共に仕事をしてまいりました東京大学医学部形成外科の井上啓太先生、菅浩隆先生、江藤ひとみ先生、青井則之先生、加藤晴之輔先生、土居健太郎先生、久野慎一郎先生、木下佳保里先生、峯田一秀先生、金山幸司先生には実際の実験において様々のご指導、ご協力を頂きました。更に、東京大学医学部附属病院検査部の矢富裕先生、常名政弘氏には輸血および血小板に関わる貴重なご指導、ご助言を頂きました。また、実験助手の佐藤綾子氏、稗田麻記子氏には実際の実験において多大なるご協力を頂きました。非常に多くの方々に支えられ、この研究を行うことができましたことを幸せに思います。この場をお借りして改めて皆様に心より感謝の意を表したいと思います。