

論文の内容の要旨

論文題目 血小板製剤を用いた創傷治療に関する研究

荒木 淳

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。近年では血小板が活性化あるいは破碎された際に、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。

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が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。

本研究の第一の目的は、ヒト PRP の製造プロトコ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。本研究では、全血を 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。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およびマウス皮膚潰瘍治癒過程における効果を評価した。

全血を、EDTA にて抗凝固処理し、様々な重力条件で 10 分間遠心すると、遠心力が大きくなるほど、得られた血漿量は増加した。血小板の回収率に関して、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 であった。このプロトコルにて全血の検体にある血小板の 80% 以上を回収できた。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た。我々のプロトコルでは白血球を含有する PRP 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った。

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 PCP を作成した。PRP に比べて体積を 1/10 にした PCP は血小板濃度が 7.4 倍であった。2 回遠心後に上清 (PPP) を除去し PBS で置換することでトロンビン活性にても凝固しない PFC を作成した。PFC の血小板回収率については PCP とは有意差がなかったが、PRP に比較して有意に低値であった。

血小板活性化後の PFC の PDGF-BB の濃度 (ng/mL) は、全血、PRP および PCP よりもはるかに高値であった。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。

PFC を培地に加えると、濃度依存的にヒト線維芽細胞の増殖を促進した。BrdU 取り込みアッセイにおいても、PFC の増殖促進効果が同様に認められた。10%FBS 含有 DMEM と比較して、1%PFC 含有 DMEM は増殖促進効果が大きかった。

糖尿病マウスの背部皮膚に ϕ 8mm の円形皮膚全層欠損潰瘍を作成し、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では、治癒過程に明らかな相違はみられなかった。また、コラーゲン使用人工真皮に各製剤を含浸させたものを用いて、外用投与するモデルにおいても治癒過程に明らかな相違はみられなかった。

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。しかしながら、プロトコルを統一するため、我々は PRP を作成するには 230-270 g、W-PRP を作成するには 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。

血小板製剤作成過程において血小板の喪失が若干見られ、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。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。

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ため凝固形成がみられなかった。意外なことに、PCP と PFC で血小板濃度が同等だったにもかかわらず、PDGF-BB 濃度は PFC が PCP の 3 倍近くとはるかに高値であった。さらに、PFC の血小板量は全血の 70% であったにもかかわらず、液体部分の PDGF-BB 総量を計算すると PFC の方が全血よりもはるかに高値を示した。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。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や注入剤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ことを難しくしている。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。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。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。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、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ものの、マウス創傷治癒モデルで明確な効果が示されなかったように、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。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見るのに極めて重要であり、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。