

【原 著】 産業動物

多血小板血漿 (Platelet-rich Plasma : PRP) 作製のための 最適な遠心分離方法の検討

山手 智行 松尾 拓見

北海道農業共済組合みなみ統括センター 道南北部家畜診療所
(〒049-4514 久遠郡せたな町北檜山区豊岡86-7)

要 約

近年、ヒトや馬において多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma : PRP) を患部に移植し、創傷治癒の促進を図る方法が試みられている。しかし牛においては作製法、使用法などの標準化がなされていない。そこで、臨床現場における牛PRP作製法を最適化することを目的とし、一般的な器材や遠心分離機を用いて、血漿中の血小板の収率を最大にする方法を調査した。PRPの作製方法にはダブルスピンを採用し、遠心力および遠心分離時間を増減させた6種類の条件で遠心分離法を検討した。その結果1回目の遠心分離効果が低い遠心条件において、血小板濃縮率が有意に増加した。重回帰分析の結果より1回目の遠心分離効果が血小板濃縮率に影響することが確認された。遠心分離機の遠心力はスイングローターの半径や角度によって異なることから、回転数や遠心時間のみでなく、遠心分離効果による検討が必要であり、遠心分離1回目に、血漿を血球境界面よりどの程度残して採取するかで、血小板濃縮率が変化する可能性がある。

キーワード：牛血漿、遠心分離効果、多血小板血漿 (PRP)、ダブルスピニング法

-----北獣会誌 66, 405~410 (2022)

多血小板血漿 (Platelet-rich plasma : PRP) とは、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。元々は成分輸血をする場合に、全血から赤血球と血漿を分離する方法のひとつとして製造法が開発され^[1]、ヒト医療において播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation : 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^[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、血小板内部の α 顆粒から、Platelet-derived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Epidermal growth factor (EGF) などの成長因子が血漿中に放出されることが明らかになった^[3]。さらに血液凝固反応の過程で生じるフィブリン網が、遊走してきた骨芽細胞や線維芽細胞などの間葉系細胞の足場となり、創傷治癒が促進されることが報告されており^[4]、組織再生への応用に注目が集まっている。これらの成長因子は皮下組織が損傷した場合に創

傷治癒過程の早期に放出され^[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]。

ヒトや馬においてPRPの使用用途は多岐にわたっており、牛においても泌乳期病^[7]、生殖器病^[8,9]および運動器病^[10]などでPRP療法が行われている。PRP調製時に血小板を最大限に回収するための最適な遠心分離方法に関する研究は医療分野において数多くあるが^[11-13]、牛における報告は見当たらない。また、その臨床効果にはばらつきがあり^[14]、効果がないとする報告もある^[15]。理由として個体差や採血時の健康状態により血液内の血球比重量が異なり、最適な製造法の標準化が難しいことがあげられる^[16]。そこで本研究では、牛PRPの製造プロトコルを最適化することを目的とし、家畜診療所に設備されている一般的な器材や遠心分離機を用いて、血漿中の血小板濃縮率を最大にする遠心分離方法および濃縮率に影響を及ぼす要因を調査した。

連絡責任者：山手 智行 北海道農業共済組合みなみ統括センター 道南北部家畜診療所
〒049-4514 久遠郡せたな町北檜山区豊岡86-7
TEL : 0137-84-5042 FAX : 0137-84-4398 E-mail : tomoyuki_yamate_hh@nosai-do.or.jp

材料および方法

採血を行った供試牛は、本研究の主旨、方法に畜主の理解が得られた、本家畜診療所管内のホルスタイン種乳牛5頭とした。供試牛からの採血は1～2週間間隔で累積合計10回行い、1回の採血量は100 mlとし、各試験群に分注し供試した。PRP調製方法を考察するにあたり、遠心分離機にはインバータ・ヘマトクリット遠心分離機(3220型：久保田製作所、東京)を用いた。遠心分離機のスイングローターの半径(回転中心からバケットの遠心端までの距離)は11.8 cmで、各回転数における遠心力は、使用した遠心分離機の取扱説明書に記載されている遠心力の計算式より算出した。

遠心力($\times G$) = $11.18 \times (\text{回転数 } N(\text{rpm}) / 1000)^2 \times \text{回転半径 } R(\text{cm})$

遠心分離機の遠心力および遠心時間の設定には、牛でLange-Consiglioら^[7]、馬でFukudaら^[17]およびヒトで澤ら^[18]が報告したダブルスピン法による遠心分離法を参考に、総合的な遠心分離力である遠心分離効果(遠心力 \times 遠心時間)^[18]が同程度になるように設定した(表1)。

PRPの作製法は、血液抗凝固剤としてクエン酸デキストロース液(acid citrate dextrose solution: ACD)(ACD-A液: テルモ、東京)を使用し、血液量100 mlにつき、ACDが15 mlの割合になるように採血を行った。ACD入り全血を、電子線照射にて滅菌され、底部が円錐状に尖っているプラスチック製の試験管(ベッセルチューブ: ベッセル、北海道)に10 mlずつ分注した。遠心分離作業はすべて室温、無菌操作下で行った。まず遠心分離1回目で赤血球を沈降させ、上清を血球界面から2～5 mm程度残し、滅菌シリンジにて採取し、別の試験管に移した。次にこの試験管に対して遠心分離2回目を行い、血小板を沈降させた。この段階ではPRPとそれ以外の部分の肉眼的区別がつかないため、試験管の底部から1 mlの部分(PRPと規定し^[18])、滅菌シリンジで試験管の底部から1 mlまでを残すように、上部を慎重に吸い取り、残りをPRPとした。血小板は試験管の底部に沈降しているため、マイクロピペットを用いた。

表1. 遠心分離1回目および遠心分離2回目の詳細

	回転数 (rpm)	遠心力 (G. Force)	遠心時間 (sec)	遠心分離効果* ($\times 10^4 G \cdot \text{sec}$)	引用文献
遠心分離 1回目	900	106.86	30分 (1800秒)	19.23	7
	1700	381.26	7分 (420秒)	16.01	17
	2600	891.81	7分 (420秒)	37.46	18
遠心分離 2回目	3400	1525.04	10分 (600秒)	91.50	7、18
	3900	2006.56	7分 (420秒)	84.28	17

*遠心分離効果 (G. sec) = 遠心力 (G. Force) \times 遠心時間 (sec)
各回転数での遠心力は遠心機の取扱説明書より算出

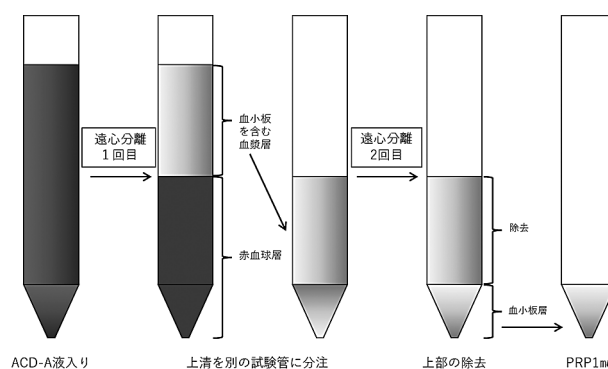


図1. 多血小板血漿 (PRP) 作製方法

ピペッティングにて血小板を均一化させ血小板数を測定した(図1)。血小板数の測定は遠心分離前の全血、遠心分離1回目および遠心分離2回目に行い、シーフロー電気抵抗検出法を用い、臨床検査センター(第一岸本臨床検査センター、北海道)に採血当日に外注した。

参考にしたダブルスピン法は、1回目の遠心分離効果が3種類、2回目の遠心分離効果が2種類報告されているため^[7,17,18]、その2回の遠心分離条件を組み合わせた6群に分類し各群を比較した(表2)。PRP中の血小板数は、末梢血中の血小板数に個体差があり直接比較できないため、血小板濃縮率について統計学的に検討した。統計学的有意差検定は統計解析ソフトEZR version 1.55^[19]を用いた。群間の比較には、Shapiro-Wilk検定にて正規性の検定、Bartlett検定にて等分散性の検定、一元配置分散分析を行った後、試験群1を対照群としてDunnnettの多重比較を行った。さらに血小板の収率に影響を与える遠心分離法を調査するために重回帰分析を行った。従属変数を最終的な血小板濃縮率とし、独立変数を1回目と2回目の遠心力、遠心時間、回転数、遠心分離効果の8項目とし、独立変数の選択には p 値に基づくステップワイズの変数減少法を行った。有効数字を小数点第2位までとし、各検定ともに危険率が5%未満となった要因を有意差あり、10%未満となった要因を傾向ありと判定した。

表 2. 各試験群の回転数および遠心時間

	供試牛頭数	検体数	遠心分離 1 回目		遠心分離 2 回目	
試験群 1	5	10	1,700回転	7分	3,400回転	10分
試験群 2	5	10	1,700回転	7分	3,900回転	7分
試験群 3	5	10	900回転	30分	3,400回転	10分
試験群 4	5	10	900回転	30分	3,900回転	7分
試験群 5	5	10	2,600回転	7分	3,400回転	10分
試験群 6	5	10	2,600回転	7分	3,900回転	7分

結 果

未経産を含む供試牛の産次数は0～7産（平均2.2産）、未経産を除いた乳検成績より採血を実施した月の標準乳量は20～45 kg（平均28 kg）および未経産を除く分娩後日数は10～86日（平均47.5日）であった。血小板数および血小板濃縮率は平均値±標準偏差で示した。各試験群の全血、遠心分離1回目および遠心分離2回目の血小板数を表3に示し、各試験群の血小板濃縮率を図2に記す。統計学的有意差検定結果より、試験群1は試験群6と比較して血小板濃縮率が有意に高く（ $p=0.03$ ）、試験群5より高い傾向を示した（ $p=0.06$ ）。重回帰分析の結果、モデル全体の評価を表すF検定の結果はF値=4.72（ $p<0.05$ ）、自由度調整済重相関係数の二乗（ R^2 ）は0.16となり、回帰係数推定値より得られた推定式を下記に記す。
 血小板濃縮率 = -0.03×1 回目の遠心分離効果（ $\times 10^4$ G. sec） + 3.98

考 察

PRPの創傷治癒促進作用を担う成長因子は、血小板凝集により血小板が脱顆粒を起こして血小板外へ放出される^[20]。また血小板への強い外力でも、血小板が破壊され成長因子が放出されてしまうため、PRP作製の遠心力はできるだけ抑えることが望ましい。PRP作製には冷却機能を有し、400 ml以上の採血ボトルを1度に遠心分離できる大容量冷却遠心分離機を用いる方が効果的かつ大量のPRP作製が可能である。しかし、一般の家畜診療所には冷却機能を有する大型遠心分離機が設置されている例は少ないと思われ、15 ml用チューブを4本装填可能なバケットを有するマイクロ遠心分離機が設置されている家畜診療所が大半と思われる。よって、少量の血液から少量のPRPを作製する方法が必要となるが、採取した血液が少量になれば含まれる血小板数も少ないため、効果的に濃縮しなければならない。

PRP調製方法は、遠心分離を1回だけ行うシングルスピンの法と、2回行うダブルスピンの法とに大別できる。

表 3. 全血および各試験群の血小板数 (平均値±標準偏差)

	血小板数 ($\times 10^8$ /ml)		
	全血	遠心分離 1 回目	遠心分離 2 回目
試験群 1	2.69±0.63	2.83±0.76	9.82±2.66
試験群 2	2.69±0.63	2.83±0.76	9.56±2.71
試験群 3	2.69±0.63	2.71±0.75	9.35±2.48
試験群 4	2.69±0.63	2.71±0.75	8.92±3.00
試験群 5	2.69±0.63	1.67±0.61	8.35±3.41
試験群 6	2.69±0.63	1.67±0.61	8.19±3.19

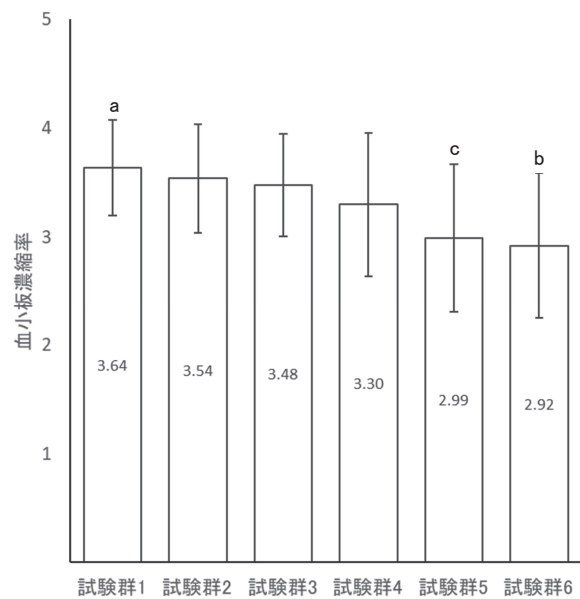


図 2. 血小板濃縮率の比較 (平均値±標準偏差)

- a b : 異なるアルファベットの群間には有意差あり ($p=0.03$)
- a c : 異なるアルファベットの群間には傾向あり ($p=0.06$)

Anitua^[21]の方法に代表されるシングルスピン法は、1回の遠心分離で血球層と血漿層の境界付近に血小板を集め、上部の血小板を含んでいない血漿層を取り除き、血小板を多く含む血漿層をPRPとして回収する方法である。調整手順は簡便であるが、PRP収率にばらつきを生じ、血小板濃縮の調整が難しいという欠点がある。一方、Landesbergら^[22]の方法に代表されるダブルスピン

法は、遠心分離を2回に分け、遠心分離1回目で血球成分を分離除去し、遠心分離2回目で血小板成分を沈殿させ、PRPを調整する方法である。調整方法は複雑になるが、PRP回収時に沈殿した血小板層が確認でき、濃縮率もコントロール可能なため、シングルスピンプ法と比較して信頼性が高くなる。

今回1.5 mlのACDが含まれる血液10 mlから1 mlのPRP作製法について、遠心力および遠心分離時間を増減させた6種類の条件でダブルスピンプ法を検討した。その結果、試験群1が試験群6と比較して血小板濃縮率が有意に高いことが確認された。試験群1は本試験において1回目の遠心分離効果が低く、2回目の遠心分離効果は高い遠心法である。血液を血漿と血球に分離する遠心分離1回目において、遠心分離効果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。今回の結果より、1回目の遠心分離効果を試験群5および6のように $37.46 \times 10^4 \text{ G} \cdot \text{sec}$ まで高めると、血漿の最上層と最も血球に近い最下層では血小板数の濃度差が大きくなるため、血漿を血球境界面よりどの程度残して採取するかによって、遠心分離1回目の血小板数が大きく変化する可能性があり、PRP作製の標準化を困難にする可能性がある。また血小板を試験管に底部に沈殿させる遠心分離2回目では、遠心分離効果を $91.50 \times 10^4 \text{ G} \cdot \text{sec}$ まで高めた方が血小板をより沈殿させる可能性が示唆された。

また重回帰分析の結果より、血小板濃縮率に影響する要因は回転数や遠心時間ではなく、1回目の遠心分離効果が影響することが確認された。PRP作製時に使用する遠心分離機の遠心力は、スイングローターの半径や角度によって異なることを考慮すると、回転数や遠心時間のみでなく遠心分離効果による検討が必要である。

今回は遠心分離機の遠心力や遠心分離時間の検討を行ったが、PRP作製において最適な血液分離方法は全血量、ヘマトクリット値、採血後の経過時間、冷却の有無、容器の大きさや形状、抗凝固剤の量や種類など多くの因子に規定される^[16]。また臨床的な検討課題としては、PRP濃度、PRP注入量、成長因子活性およびゲル化など、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まだ残されている。しかし、高濃度の血小板数を作製することは治療効果を診るのに極めて重要である^[23]。今回は成長因子濃度の測定は行っていないが、今回作製したPRPは過去の報告^[7-9,17,18]と比較しても十分な血小板数であったこと、血小板数と成長因子濃度は比例する^[24]ことから、本研究で作製した

PRPには良好な創傷治癒促進作用が期待できると思われる。また、今回は供試牛から100 ml採血し、試験管に10 mlずつ分注、試験管の底部から1 mlの部分をPRPと規定したので、一度の採血で10 mlのPRPを作製できた。牛のPRP療法を局所に適応した報告では、1回の投与量として乳房内注入に5 ml^[7]、子宮内注入に10 ml^[8]、卵巣内接種に5 ml^[9]、蹄への塗布に1 ml^[10]のPRPが使用されている。本研究で行ったPRP作製方法を牛の診療に応用する場合、1回の局所療法としての使用量としては、十分量のPRPが作製できると考えられる。さらに、PRP 1 mlより作製可能であり、大容量遠心分離機を用いた医療で使われている全身投与療法を念頭に置く治療法と比較して、牛では低侵襲・低コストに局所療法のPRPの作製が可能であり、幼若牛にも応用可能と考えられる。

医学領域に関しては、2014年11月に「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」および「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が施行されており、PRP療法を含めた再生医療の安全性確保や細胞培養加工のルール等が定められた。獣医学領域においても日本獣医再生医療学会と日本獣医再生・細胞療法学会のガイドライン作成委員会が策定した「犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針」も発表されており、再生医療を用いた治療ならびに臨床研究を科学的および倫理的に適正に実施する必要がある。獣医学領域におけるPRP療法は上記指針範囲からは除外されているが、産業動物領域における実際の臨床使用においては、血液を介する感染症およびブリーオン病等の感染予防観点からも、PRP作製は患畜の自己血液からの作製および移植が推奨される。

最後に、本研究でのPRP作製方法は特別な装置や技術を必要とせず、数本の滅菌試験管とシリンジなどで作製が可能でありコストも低い。PRPが簡単に作製できれば一次診療においても応用範囲が拡大できると思われる。今後の牛における臨床使用の一助になることを期待する。なお、本研究に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

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 plasmaphere-

- sis 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 Cranio-Maxill 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] 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)
- [7] Lange-Consiglio A, Spelta C, Garlappi R, Luini M, Cremonesi F: Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis; first clinical application, *J Dairy Sci*, 97, 6223-6230 (2014)
- [8] Lange-Consiglio A, Cazzaniga N, Garlappi R, Spelta C, Pollera C, Perrini C, Cremonesi F: Platelet concentrate in bovine reproduction; effects on *in vitro* embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows, *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 65 (2015)
- [9] Cremonesi F, Bonfanti S, Idda A, Anna LC: Improvement of embryo recovery in Holstein cows treated by intra-ovarian platelet rich plasma before superovulation, *Vet Sci*, 7, 16 (2020)
- [10] 内山裕貴、都築直、徐鍾筆、山田一孝、羽田真悟、眞鍋弘行、田畑泰彦、佐々木直樹: 乳牛の蹄底潰瘍に対する多血小板血漿含浸ゼラチンマイクロスフィアの効果、*日獣会誌*、66、305-309 (2013)
- [11] Jo CH, Roh YH, Kim JE, Shin S, Yoon KS: Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation, *J Oral Implantol*, 39, 525-532 (2013)
- [12] Perez AG, Lichy R, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH: Prediction and modulation of platelet recovery by discontinuous centrifugation of whole blood for the preparation of pure platelet-rich plasma, *Biores Open Access*, 2, 307-314 (2013)
- [13] Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero W, Santana MH: Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma, *ISRN Hematol*, 176060 (2014)
- [14] Freymiller EG, Aghaloo TL: Platelet-rich plasma; ready or not?, *J Oral Maxill Surg*, 62, 484-488 (2004)
- [15] Coombes BK, Bisset L, Vicenzino B: Efficacy and safety of corticosteroid injections and other injections for management of tendinopathy; a systematic review of randomized controlled trials, *Lancet*, 376, 1751-1767 (2010)
- [16] Ehrenfest DMD, 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)
- [17] 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- β 1 in equine platelet-rich plasma, *J Vet Med Sci*, 82, 1472-1479 (2020)
- [18] 澤裕一郎、渡邊悟朗、原禎幸、丸山誠二、桜田聡彦、溝越俊二: 少量の自己血からのPRP作製法に関する検討、*日口腔インプラント会誌*、15、59-65 (2002)
- [19] Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transpl*, 48, 452-458 (2013)
- [20] Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R: Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates, *Vox Sang*, 85, 283-289 (2003)
- [21] Anitua E: Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future

-
- sites for implants, *Int J Oral Maxill Impl*, 14, 529-535 (1999)
- [22] Landesberg R, Roy M, Glickman RS: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation, *J Oral Maxill Surg*, 58, 297-300 (2000)
- [23] 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 Me*, 18, 176-185 (2012)
- [24] 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)