

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10956

研究課題名(和文)無細胞多血小板血漿の検証と実験的検討

研究課題名(英文)Verification and Experimental Study of Acellular Platelet-rich Plasma

研究代表者

楠本 健司 (KUSUMOTO, Kenji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20161630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板血漿 (PRP) とは、血小板が濃縮された血漿液である。血小板を活性化すると血小板内から放出される多種多量のサイトカインを得ることができる。これを皮膚潰瘍やその他の再生医療としての臨床応用が始められている。しかし、このPRP療法は細胞治療に分類されるが、これを回避し、有効性を持つ無細胞PRPを調製できることを検証し、実際の実験検討を行う本研究をめざした。

検討の結果、活性化したゲル化PRPで、細胞成分をフィルターを用いて細胞成分を除去すると、しばしば目詰まりを生じ、常に無細胞PRPを得ることができなかった。ゲル化PRPを5倍希釈すると、フィルターを通し無細胞PRPを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Platelet-rich Plasma (PRP) is a plasma included many platelets. Activation of platelets leads to much amount of cytokines. Regenerative medicine applying these cytokines is started in clinical fields. This PRP therapy is classified into cell therapy, however, we have aimed to produce acellular PRP and study whether it is effective, differing from that PRP therapy is positioned at cell therapy.

In our studies, gelling and activated PRP cannot be flashed through the filters, at the point of gel condition. At the final stage, it is shown that five times dilution of gelled PRP can be smooth flashed.

研究分野：形成外科学、美容外科学、再生医療学

キーワード：多血小板血漿 無細胞 再生医療 皮膚潰瘍 創傷治癒 褥瘡

1. 研究開始当初の背景

多血小板血漿 (PRP; platelet-rich plasma) は、自己の血小板を濃縮し、血小板が活性化されて内包される顆粒から放出される多種多量の細胞増殖因子が細胞増殖や組織改善に寄与することを期待され、臨床的にも応用され始めている。しかし、この PRP の基礎的検討は極めて少ない現状である。また、PRP 療法は、血小板の細胞治療として評価され、再生医療等安全性確保法の対象である。この厳格な法の管理の下に PRP の臨床使用は、安全とされるが現実的に臨床使用できる施設や医師が極めて一部に限られることとなっている。

2. 研究の目的

PRP は、血小板を遠心分離により濃縮して活性化するか、活性化せずに局所に適用して、組織、細胞の再生に有用とされる。この有効性は、血小板の活性化により血小板内から放出される多種多様の細胞増殖因子 (サイトカイン) による効果を発揮する。しかし、この PRP は常に赤血球、白血球、血小板を含んでおり、細胞治療 (cell therapy) と見なされている。

今回、細胞治療と位置づけられている PRP 療法をさらに純化した細胞増殖因子 (サイトカイン) 療法とすべく、われわれが考案した新規の"フィルター法"により細胞成分を完全に除去した無細胞多血小板血漿 (acPRP; acellular PRP) の調製を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 活性化 PRP の調製: 全血を抗凝固剤 (ACD-A 液) を付加し、採血する。これを 2 回の遠心分離よりなる double spin 法を採用する。1 回目は低速回転を行い、buffy coat を含んだ上清を次のチューブへ移す。次いで 2 回目の高速回転での遠心分離を行い、PRP を得る。この PRP に活性化剤として 5% 0.5M CaCl₂ と自己トロンピンを加えることで活性化させて活性化 PRP (aPRP; activated PRP) を得る (Kakudo, et al. 2008, 楠本 2010, 楠本 2013, 他)。それぞれの PRP や計測誤差などを検討し、均一化に向かうこととした。

(2) フィルターの選択: フィルター法の目的は、無細胞化した PRP、つまり細胞成分を含有しない自己血小板由来の多種、高濃度の細胞増殖因子を得ることである。また、acPRP を得るために顆粒球、赤血球、血小板、フィブリンなどの凝集塊であるマイクロアグリゲート (170 μm 以上) とサイズのより小さいマイクロアグリゲート (170 μm 以下) 細菌 (200 μm 以上) 異物などを除去し、純化した acPRP を得ることを目指した。

(3) 無細胞の検証: われわれの PRP 調製法に従い得た PRP をさらに活性化した aPRP は、血小板、赤血球、白血球を含んでおり、活性化の結果粘稠 (ゲル化 PRP) でもある。これを完全にかつスムーズに無細胞化を行える

フィルターを選択することとした。

4. 研究成果

多血小板血漿 (PRP) は、血小板を濃縮した血漿液であるが、PRP 療法を進める上で、実際に有効性を発揮しているのは、多種の細胞成長因子である。これは、血小板を強制的に活性化させることで、血小板内の顆粒の中から多種多量の細胞増殖因子 (サイトカイン) が放出されることを応用している。実際には、PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, FGF-2 などである。これらのサイトカインを目的の細胞、組織部分に付与することで、細胞増殖、組織修復がなされる。

活性化 PRP のフィルター濾過、活性化 PRP 溶解液、遠心活性化 PRP、対照として活性化 PRP の 3 者、さらに溶解条件での検討を行い、実際の PRP 療法に寄与できるかの検討を進めた。ゲル化がなされた PRP では、細目のフィルターでは目詰まりした。さらにゲル化 PRP の 5 倍希釈以上では、フィルター使用で、対照と同等のサイトカインを回収することが可能であり、フィルターによる"無細胞 PRP" が有効に使用できる簡便法に発展できる可能性が示唆された。実際の臨床では、再生医療法の対象とならない無細胞 PRP が応用できる可能性を導いたと言える。

今年度の検討によって、フィルター使用の簡便性と、再生医療法の現実的制約の対象とならない無細胞 PRP の検証ができたこととなり、広く臨床応用でき有効性も確保された無細胞 PRP の実現に寄与するものと考えられる。一方、溶解されより多量となった無細胞 PRP の使用に一部臨床応用での制限も生じることも想定され、今後も引き続きの検討も必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Hihara M, Notodihardjo PV, Matsui M, Tabata Y, Kusumoto K: Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 11:1941-1948, 2017. (査読有り)

(2) 楠本健司: 自己多血小板血漿 (PRP) による皮膚再生. Derma 262:1-4, 2017. (査読無し)

(3) Kakudo N, Morimoto N, Kusumoto K, et al. Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules murine subcutis. J Tissue Eng Regen Med 1:1-8, 2016. (査読有り)

(4)Morimoto N, Kakudo N, Ogura T, Hara T, Matsui M, Yamamoto M, Tabata Y, Kusumoto K.: Easy-to-Use preservation and application of platelet-rich plasma in combination wound therapy with a gelatin sheet and freeze-dried platelet-rich plasma: a case report. *Eplasty* 16:e22,2016. (査読 有り)

(5)Hara T, Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Lai F, Kusumoto K.: Platelet-rich plasma stimulates human dermal fibroblast proliferation via a Ras dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J of Artificial Organs* 19:372-377,2016. (査読 有り)

(6)楠本健司、福田智、三宅ヨシカズ: シワ治療と肌質改善のための他血漿場血漿 (PRP) 療法 *Derma* 238:65-70,2015. (査読 無し)

(7)Morimoto N, Kakudo N, Kusumoto K et al. Exploratory clinical trial of combination wound therapy with a gelatin sheet and platelet-rich plasma in patients with chronic ulcers: study protocol. *BMJ open* 5:1-6,2015. (査読 有り)

〔学会発表〕(計 22 件)

(1)楠本健司 自己多血小板血漿 (PRP) 療法による若返り 第 17 回日本抗加齢医学会総会学術集会 2017 年

(2)楠本健司 自己多血小板血漿 (PRP) による皮膚再生 第 116 回日本皮膚科学総会・学術集会 (招待講演) 2017 年

(3)楠本健司 多血小板血漿 (PRP): 総説 第 35 回日本美容皮膚科学総会・学術集会 (招待講演) 2017 年

(4)楠本健司 多血小板血漿 (PRP) 療法について - その原理と慢性潰瘍、シワ治療を中心に - 第 35 回日本美容皮膚科学総会・学術集会 (招待講演) 2017 年

(5)Sharon Claudia Notodihardjo, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Toshihito Mitsui, Le Tien Minh, Kenji Kusumoto: Efficacy of gelatin hydrogel-impregnated human platelet lysates in wound healing. The 26th Research Council Meeting of Japan Society of Plastic and Reconstructive Surgery. 2017

(6)Sharon Claudia Notodihardjo, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Toshihito Mitsui, Tien Minh Le, Kenji Kusumoto.

Efficacy of the Concentrated Platelet Lysate-Impregnated Gelatin Hydrogel. The 9th Congress of Japanese Society for PRP Therapy 2017.

(7)来 方えん, 覚道奈津子, 森本尚樹, 竹谷 茂, 原 朋也, 尾川武史, 楠本健司: Analysis of Cell Cycle and DNA Synthesis of Human Adipose Stem Cells Treated with Platelet Rich Plasma. The 9th Congress of Japanese Society for PRP Therapy. 2017.

〔図書〕(計 5 件)

(1)楠本健司: 再生医療の応用; 外科系医師が知っておくべき創傷治療のすべて 南江堂 7 ページ 2017 年

(2)楠本健司: 多血小板血漿 (PRP) 療法 南江堂 8 ページ 2016 年

(3)楠本健司: 創傷治療の歴史 克誠堂 3 ページ 2015 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://kmu-prs.adiva.jp>
<http://www.kmu.ac.jp/faculty/medical/category3/unit13.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
楠本 健司 (KUSUMOTO, Kenji)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20161630

(2)研究分担者
森本 尚樹 (MORIMOTO, Naoki)
関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40378641

(3)研究分担者

覚道 奈津子 (KAKUDO, Natsuko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号： 00509490

(4)研究分担者 (27年度のみ)

光井 俊人 (MITSUI, Toshihito)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号： 40449830

以上。