

# インプラント ジャーナル

ゼニス出版

特集

顎骨増生に求められるPRPとは  
- 目で見るPRPのメカニズム -

渡辺 孝夫

2002 11 秋号 別刷 2002年10月1日発行

## 特集：目で見るPRPのメカニズム

# 顎骨増生に求められる PRPとは？

渡辺 孝夫 日本歯科先端技術研究所／千葉県市川市開業

PRP(多血小板血漿)とは、本来血液検査中に必要があるって血液を分離する過程でできる血小板を多く含む血漿をさす。これは血液検査の時に使われる一般的な名称で、検査室では正確な定義のないまま昔から用いられている。特に、血小板の数や性質を調べるときによく用いられる。したがって、その採取方法は、検査の目的により様々で、一定の規格された方法はない。血小板数を求めるだけの診断目的であれば、通常、検査室でおこなわれているシングルスピンで十分である。しかし、これら検査のために精製されるPRPと、我々歯科医師が期待する、成長因子としてのPRPを混同してはならない。

血小板中の成長因子を利用して、骨や軟組織の創傷治癒を増強するためのPRPとなると、少なくとも1ml中に100万個以上の血小板が含まれている血漿が5ml必要となる。これだけの濃縮度を有したPRPを損傷部位に集め、その場で血小板内の非活性型成長因子を活

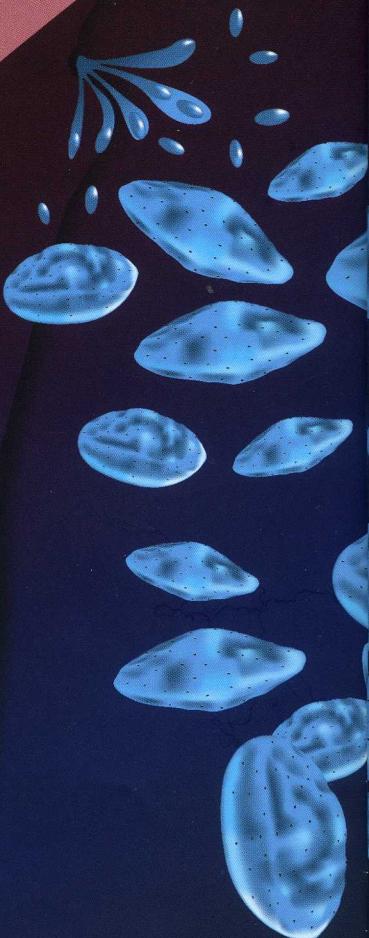
性化して成長因子を放出させることで、はじめて創傷治癒作用が発揮されるといわれる。このあたりを踏まえてシステム（採血量や血小板抽出効率など）を選択する必要がある。

有効な量の非活性型成長因子を含む血小板を集めるには、ダブルスピンが必要である。1回目のスピン(hard spin)で赤血球と血漿（血小板、白血球、凝固因子を含む）に分ける。2回目のスピン(soft spin)で血漿中の血小板を分離して集めるわけだが、白血球と少量の残存赤血球も含まれる。これをPRPと称する。ここで得られたPRPが、有効な量の非活性型成長因子を含む脱顆粒をしていない多血小板血漿であり、シングルスピンでは、到底我々が求めるPRPは得られない。

本稿では我々がその成長因子としての有用性が期待できるPRPの基本的なメカニズムを示し、その精製法や操作法について検証する。



巨核球 megakaryocyte



# 血小板の產生

血小板はヒトでは1ml中15万から30万、平均20万前後あるといわれる。骨髄の最大巨大細胞である巨核球(megakaryocyte)が発生由来細胞である。巨核球は分化が進むと血小板分離膜で多数の小区画に分割され、細胞質の一部が分離して血小板になる。1個の巨核球から約2000個の血小板が生まれるとされている。

誕生したばかりの血小板はふっくらとした丸みを帯び、突起構造物はすくない。

血小板

## 赤血球

赤血球の直径は約7.5μm。

## 血小板

# 血流中の血小板

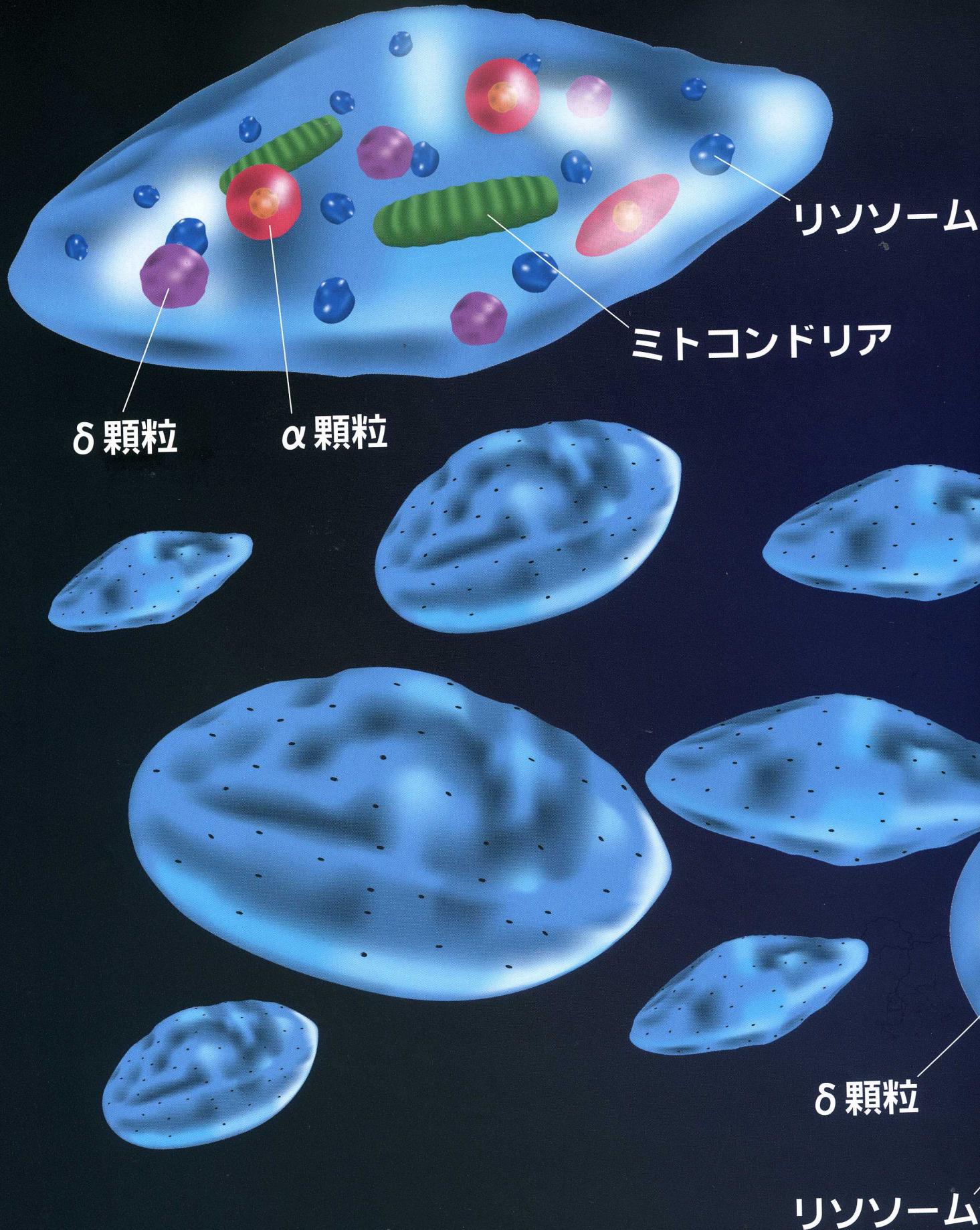


血液中の静止期血小板は円盤あるいは碁石上の外観を保つつつ血管内を流れるが、その表面には開放小管系(open canalicular system)の開口部が見られ、必ずしも平滑ではない。血小板の細胞膜は約10nmの厚さで基本的には他の細胞とほとんど変わらない。細胞膜の脂質二重層中には豊富な糖蛋白質(glycoprotein)が埋没あるいは貫通している。

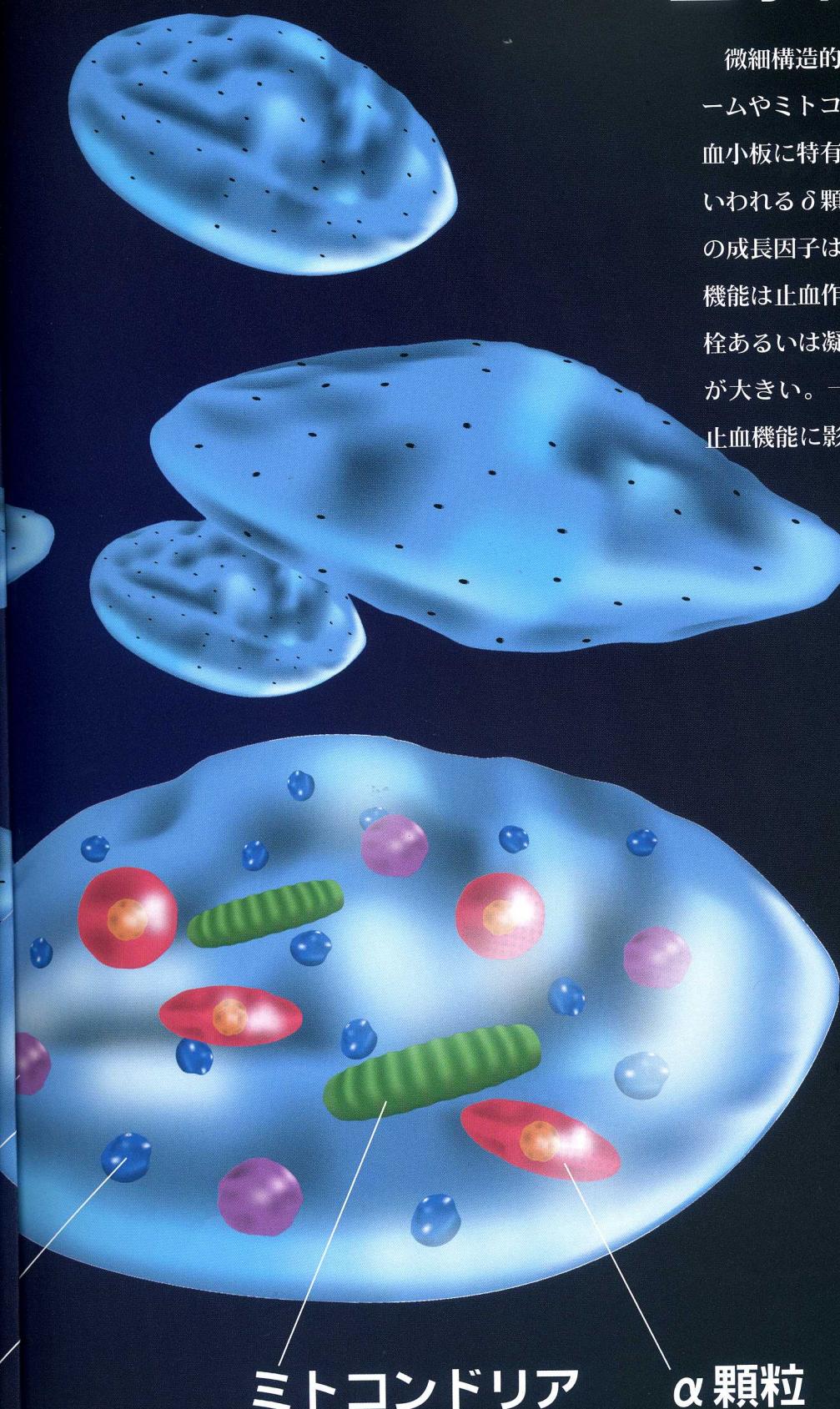
血小板寿命は約2週間であり、非刺激時(安静期)の直径は約2~5μmときわめて小さい。

PRP精製のための採血の際は、16Gサイズの採血針の使用が推奨される。これ以上細いと、血小板への物理的な刺激となる恐れがある。また、採血管や試験管の再使用は、洗浄剤などの残留物が付着していることがあり、これらも血小板への刺激となる可能性があるので使用を避けた方がよい。

開放小管系 (open canalicular system)  
の開口部



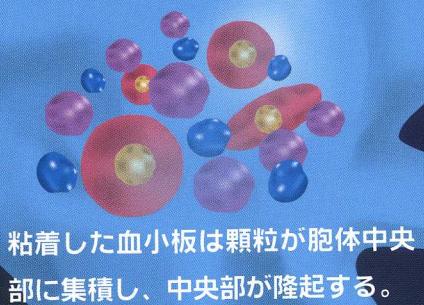
# 血小板の微細構造



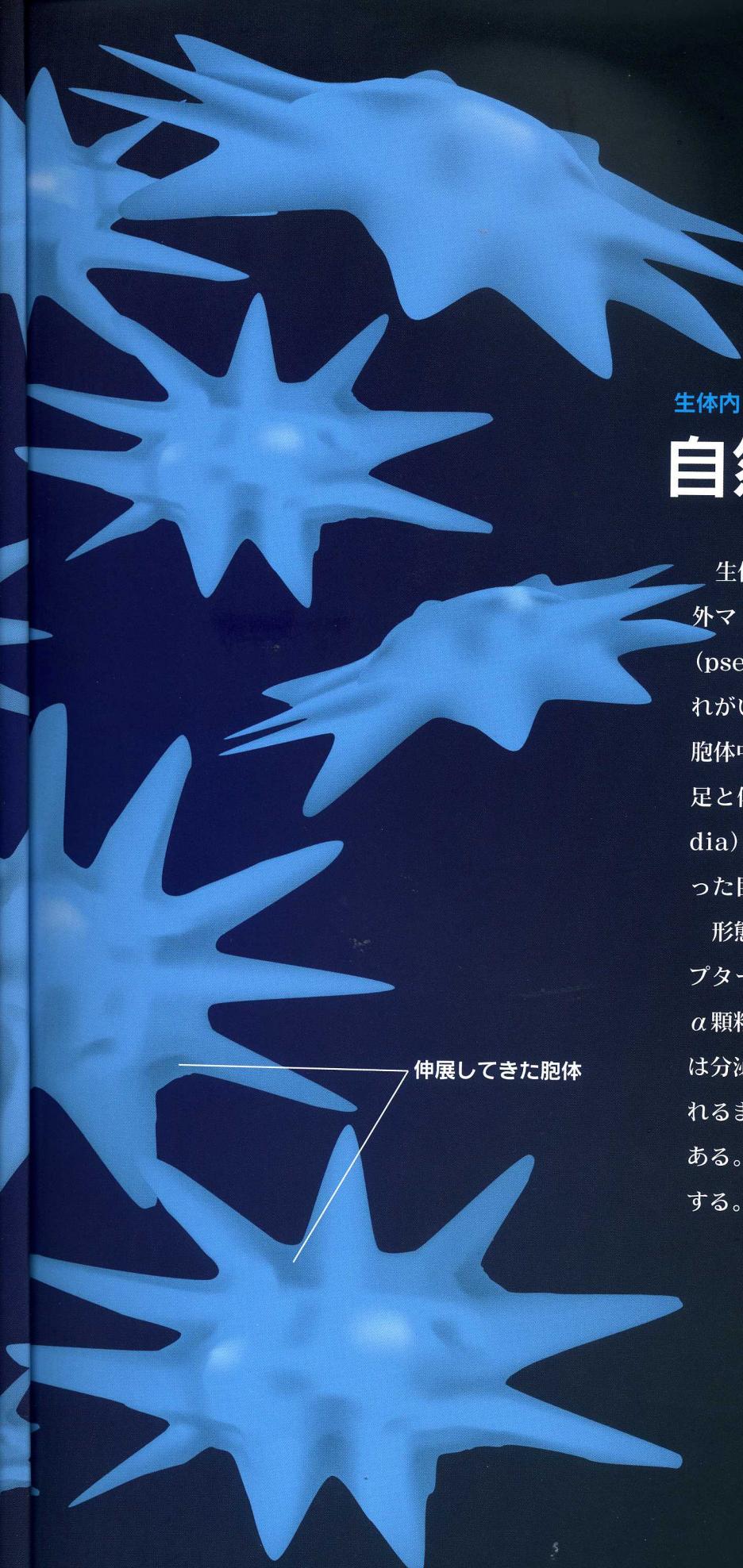
微細構造的には核構造物がない。小胞体、リソソームやミトコンドリアなどの細胞質の基本構造物と血小板に特有の $\alpha$ 顆粒とdensebody(濃染顆粒)といわれる $\delta$ 顆粒がみられる。創傷治癒に関する多くの成長因子は $\alpha$ 顆粒や $\delta$ 顆粒に含まれる。その主な機能は止血作用である。フィブリン網を形成し、血栓あるいは凝血をつくる。血小板数はヒトにより差が大きい。一般に1ml中に5万以下であるときは、止血機能に影響がでるといわれる。

$\alpha$ 顆粒は血小板に最も多く含まれる顆粒で、直径0.3~0.5μmの球状体であるが、時に橢円形や棒状のものが観察される。本顆粒には $\beta$ -トロンボグロブリン、血小板由来凝固因子(PF-4)、血小板由来成長因子(PDGF)や、TGF(形質転換成長因子)- $\beta$ が存在する。

また血小板全体に含まれる成長因子は、現在4群7個(PDGFa<sub>a</sub>、PDGF<sub>bb</sub>、PDGF<sub>ab</sub>、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、VEGF、EGF)が確認されている。



粘着した血小板は顆粒が胞体中央部に集積し、中央部が隆起する。



生体内（PRPではない状態）の血小板における

## 自然の粘着と凝集

生体内を浮遊する血小板はコラーゲンなどの細胞外マトリックスに接触することで形態変化し、偽足（pseudopodiaまたはfilopodia）が伸張する。これがいわゆる粘着である。粘着した血小板は顆粒が胞体中央部に集積し、中央部が隆起する。やがて偽足と偽足の間を水搔きのように胞体（lamellipodia）が伸展し、最終的には中央部がやや盛り上がった目玉焼き状の形態を示すようになる。

形態変化した血小板は、チロシンキナーゼ型レセプターなどを通して細胞内ヘシグナルが伝達され、 $\alpha$ 顆粒や $\delta$ 顆粒を刺激する。これら刺激された顆粒は分泌されるために細胞表面へ移動するが、分泌されるまで $\alpha$ 顆粒や $\delta$ 顆粒内の成長因子は非活性型である。膜より出ることで、活性型の成長因子に変化する。

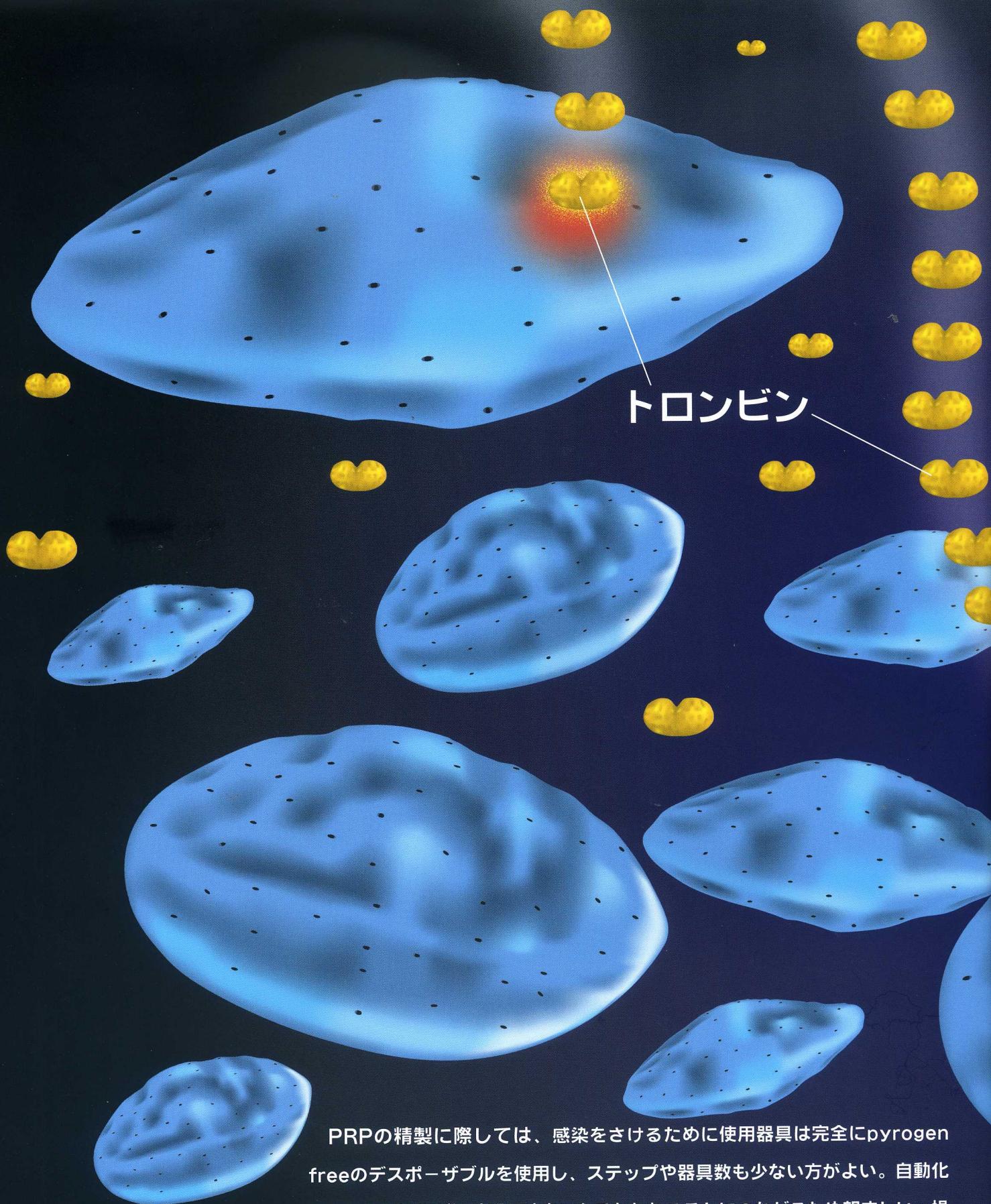
伸展してきた胞体

赤血球

血小板

赤血球

血小板



PRPの精製に際しては、感染をさけるために使用器具は完全にpyrogen freeのデスボーザブルを使用し、ステップや器具数も少ない方がよい。自動化することは操作が短時間で確実におこなわれることにつながるため望ましい。操作時間が長いと、それだけで血小板は崩壊しやすく、操作時間内に成長因子を血漿中に放出してしまい、十分な成長因子を集めることが困難になる場合がある。

## PRP血小板への刺激

PRP血小板の活性化にはトロンビンとCaイオンを用いる方法を推奨する。トロンビンとCaイオンによる clotting メカニズムは膜上のレセプターを通して血小板を活性化させ、成長因子の放出をほどよく刺激する。



使用直前まで、血小板が成長因子を、非活性型のままで貯留させておくために、抗凝固剤を使用することが必要である。血小板の代謝を阻害せず、かつ、生きた状態で分離できるようにするという条件がつく。クエン酸（citrate dextrose - A, ACD - A）はこの目的に合致した材料である。これは血小板のviabilityも維持する。Citrate phosphate dextrose (CDC) も同様の作用をもつが、血小板のviabilityは10%ほど低下する。このような抗凝固剤下で血小板は安定した状態を約8時間維持できる。したがって、この時間以内であれば、細菌感染もなく活性化直前の状態でいつでも使用できる（完成されたPRP精製システムを使った場合と仮定して）。

ただし、PRPとPPPの分離は、採血直後におこない、直ちに別々に保管しておく必要がある。PRPとPPPは一旦、分離しても、そのままにしておくと浸潤して、元に戻ってしまうからである。



## トロンビン刺激による 血小板の活性化

精製したPRP中の血小板がトロンビンによって  
刺激を受けると、偽足を出しながら球状に変形する。  
さらに時間が経過すると偽足を絡め合って相互に凝  
集を始める。顆粒は中心化した後、開放小管系と融  
合して、開放小管系を拡張させる。

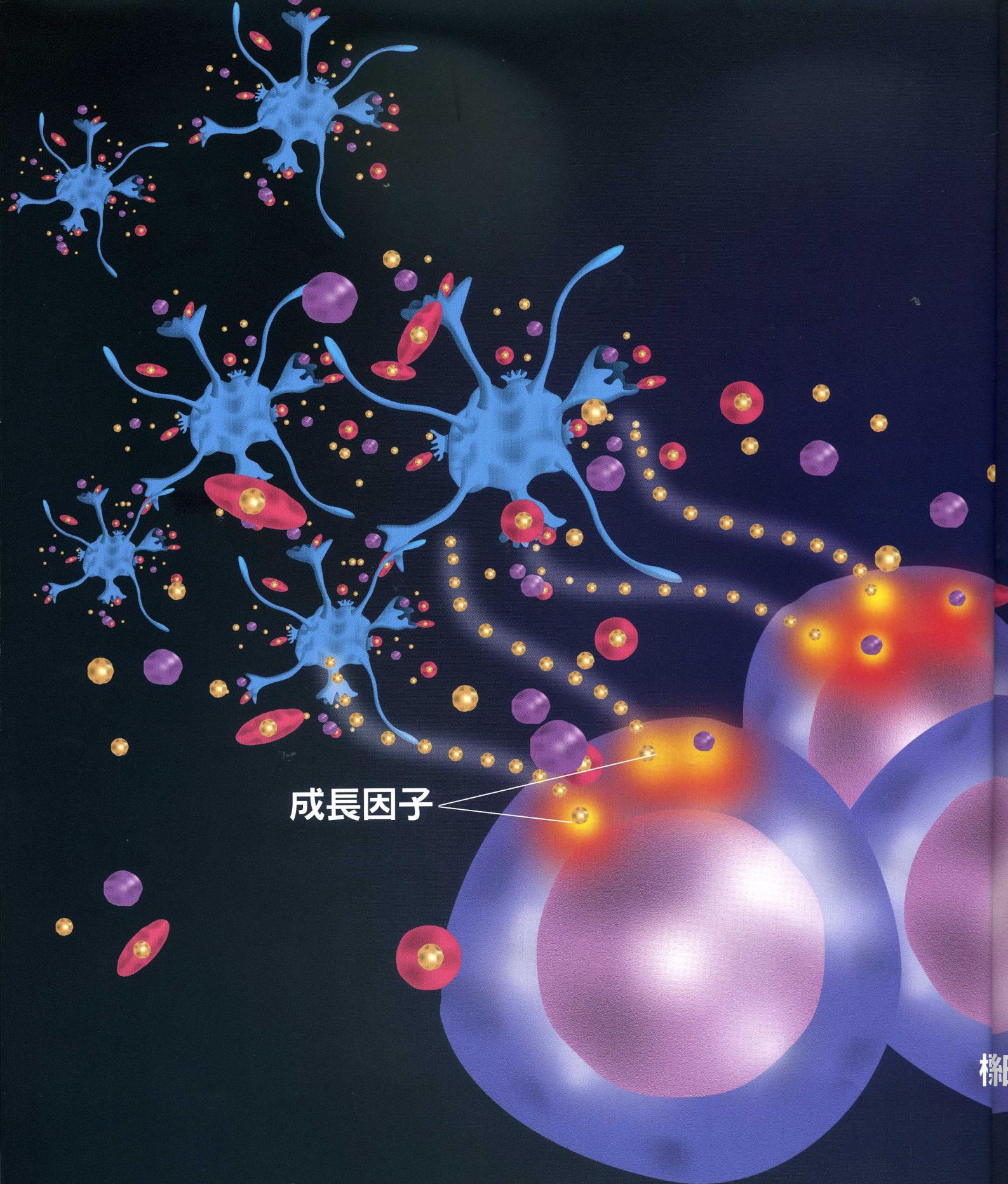
δ顆粒

成長因

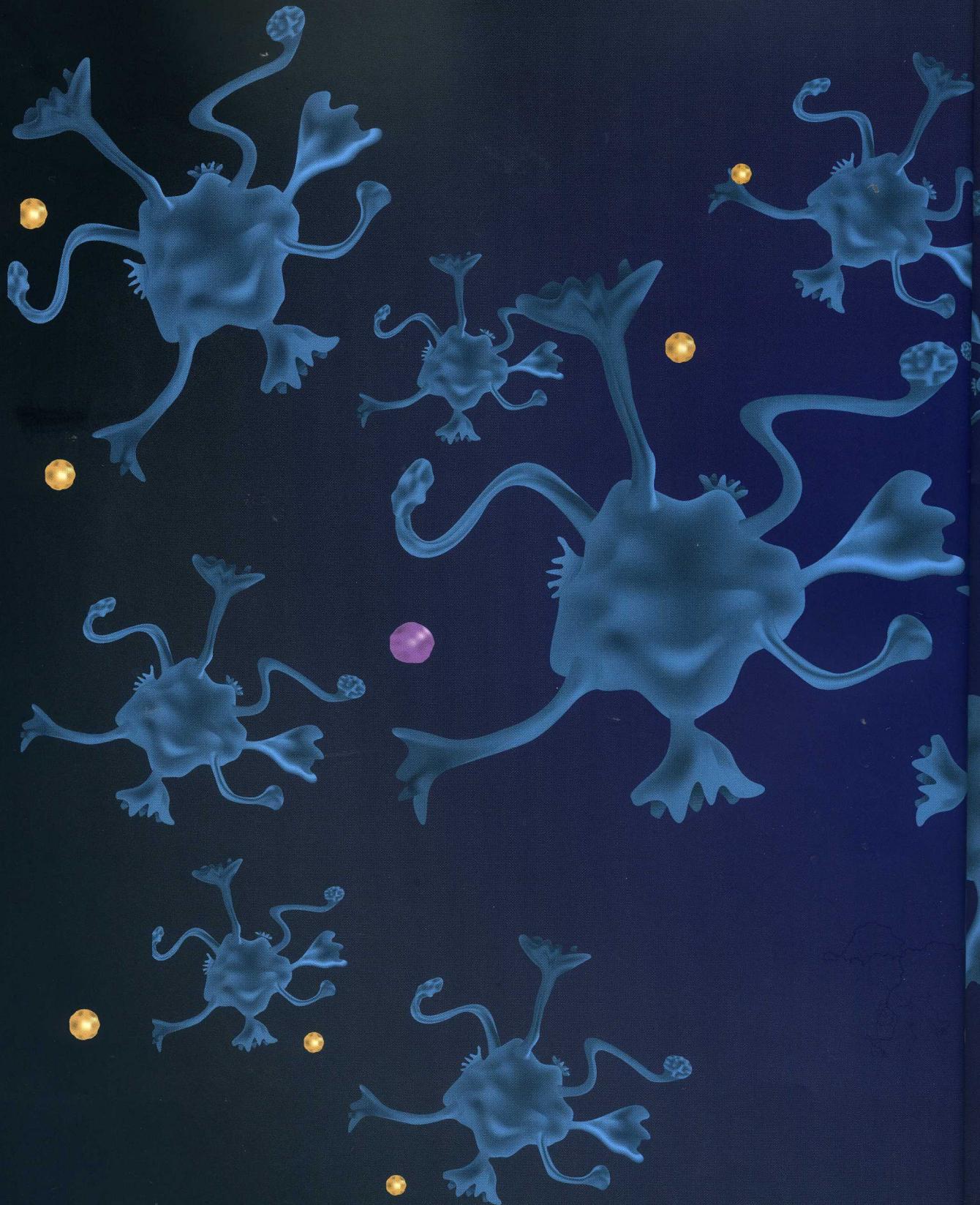
# 顆粒(成長因子)の放出

刺激を受けた血小板は、最初の10分で貯留されていた全成長因子量の70%を放出し、1時間以内にはほぼ全量、100%が放出される。その後、死滅するまでの約8日間は、追加的にわずかな成長因子が合成される。したがって、血小板への刺激（凝血：clotting）は使用する直前におこなうのが最も効果的で、刺激後から使用までがあまり遅れないようにすることが重要である。

α 顆粒



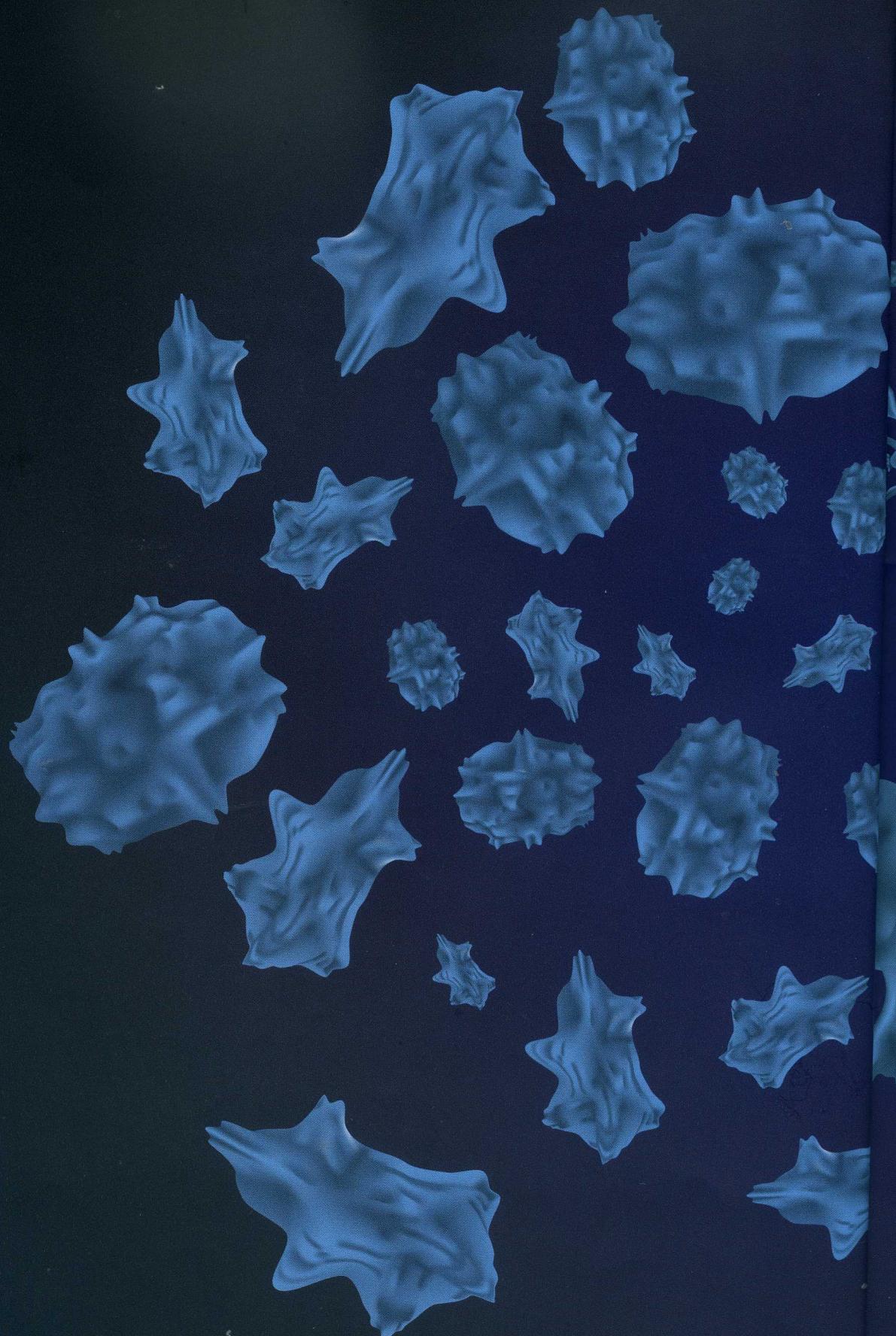
成長因子



## 顆粒放出後の血小板

顆粒を放出した後の血小板は、縮小し、多数の突起構造物を示すようになり、どんなに血小板数が多くても成長因子はほとんど残存しない。

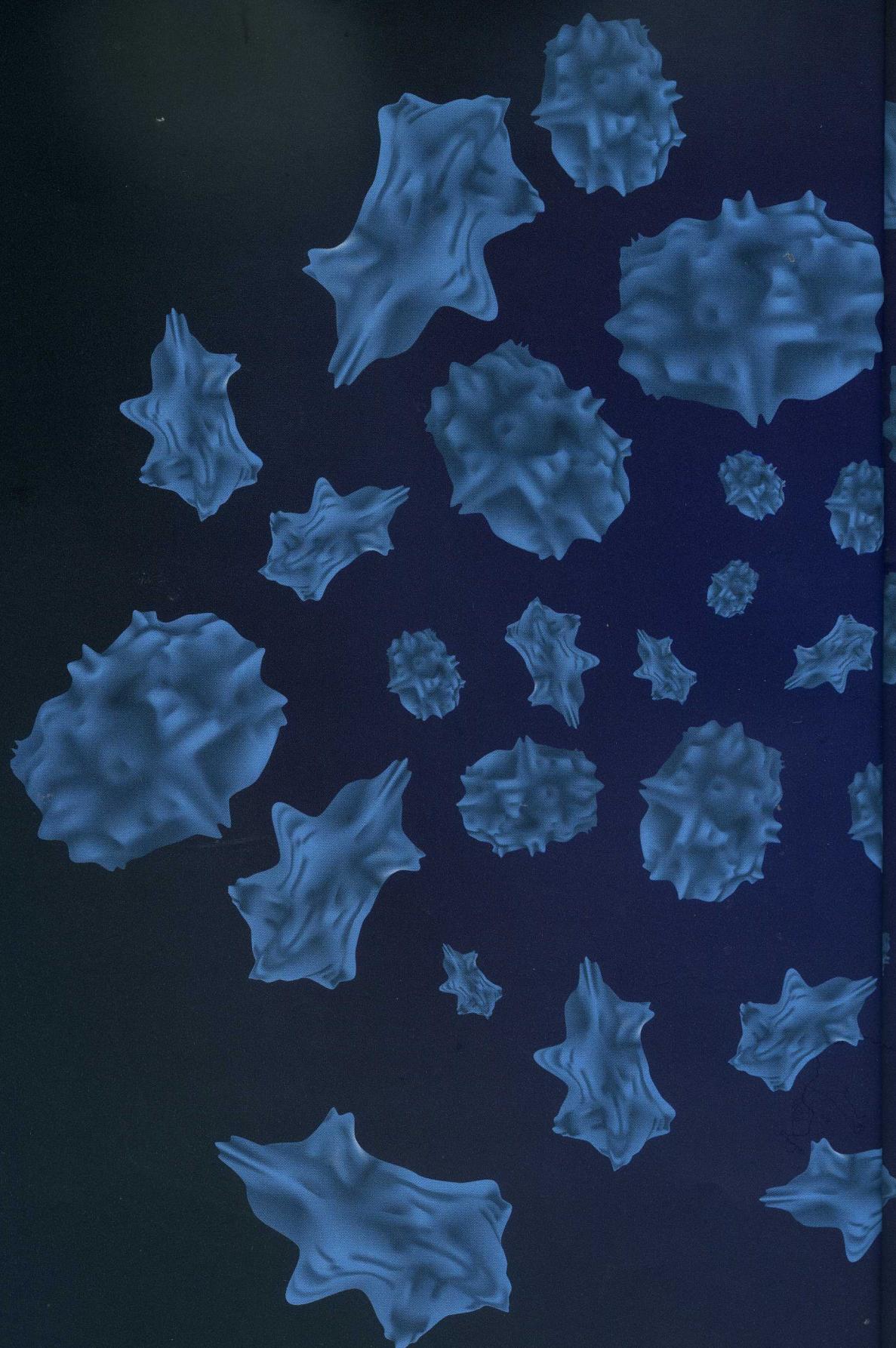
したがって、手術部位にできるだけ多くの活性型成長因子を作用させるためには、顆粒放出前の血小板を集め、手術部位にて始めて血小板を刺激し、その場所で顆粒を放出させ、活性型の成長因子を得ることが重要なポイントになる。



## 顆粒放出後の血小板

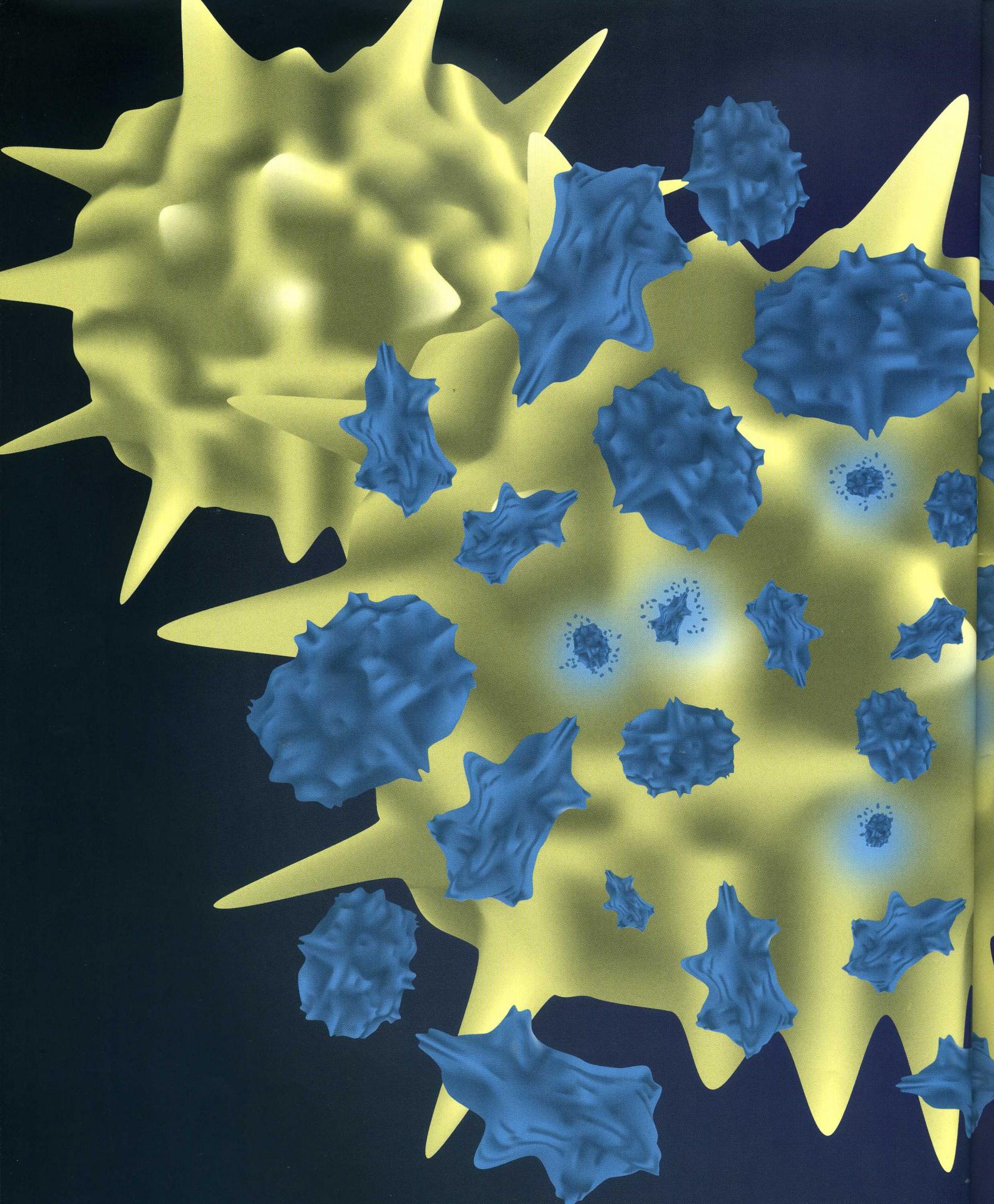
顆粒を放出した後の血小板は、縮小し、多数の突起構造物を示すようになり、どんなに血小板数が多くても成長因子はほとんど残存しない。

したがって、手術部位にできるだけ多くの活性型成長因子を作用させるためには、顆粒放出前の血小板を集め、手術部位にて始めて血小板を刺激し、その場所で顆粒を放出させ、活性型の成長因子を得ることが重要なポイントになる。



## 死滅前の血小板

顆粒を放出した後の血小板は、その後約8日間はわずかな成長因子を合成しながら生き続けるが、張りつめた風船が萎んだように縮小を続け、死滅への道をたどる。



# 血小板の死滅

縮小を続け、死滅への道をたどってきた血小板は、最終的にマクロファージなどの食細胞に貪食されその一生にピリオドを打つ。