

## 多血小板血漿 (PRP) 精製過程における 遠心分離についての検討

浜田智弘 園田正人 林 由季 金 秀樹  
高田 訓 大野 敬 柴田由美子<sup>1</sup>

### Investigations into Centrifugal Separations for Preparation of Platelet Rich Plasma (PRP)

Tomohiro HAMADA, Masahito SONODA, Yuki HAYASHI, Hideki KON  
Satoshi TAKADA, Takashi OHNO and Yumiko SHIBATA<sup>1</sup>

Platelet rich plasma (PRP) has beneficial effects on wound healing and bone regeneration. Therefore, PRP is applied in various clinical treatments hereafter, for example, in oral implants and in bone grafts. But the method of centrifugal separation for preparation of PRP is not established, and it varies from each hospital. So, we investigated an efficient one.

We prepared PRP by centrifugal separations at various revolutions per minute and various spin times, and measured concentrations of platelets. Concentrations of platelets of PRP separated at higher revolutions with longer spin times are significantly lower than those separated at a moderate number of revolutions with moderate spin times. It is made clear that the most efficient centrifugal separation is at about 1000 rpm, 5 minutes. And it is suggested that a double spin technique is far more efficient than a single spin technique.

Key words : platelet rich plasma (PRP), centrifugal separation, revolutions per minute, spin time, double spin technique

### 緒 言

活性化した血小板は創傷治癒や骨造成能に関与する血小板由来成長因子 (platelet delivered growth factor: PDGF) やトランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ) などの成長因子を分泌する<sup>1,2)</sup>。したがって、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: PRP) は創傷治癒や骨新生を促進する効果があり、皮膚や粘膜などの軟組織移植<sup>3,4)</sup>さらにはインプラントや骨移植などの分野<sup>5-9)</sup>において臨床応用されて

いる。PRPが注目された最大の理由は自己血による精製が可能で、抗原性がなく感染の危険性が少ないことにある。

これまでにPRPを臨床応用した報告は数多くみられ<sup>3-9)</sup>、PRPの精製法についての報告も散見されるが<sup>10-12)</sup>、精製過程における遠心分離についての検討は少なく、回転数や回転時間等も施設ごとに全く異なっているのが現状である。そこでPRP精製における効果的な遠心分離法についての研究を行った。

受付：平成16年9月1日，受理：平成16年10月21日  
奥羽大学歯学部口腔外科学講座  
奥羽大学歯学部附属病院臨床検査室<sup>1</sup>

Department of Oral Surgery, Ohu University School of Dentistry  
Section of Clinical Laboratory, Ohu University Dental Hospital<sup>1</sup>

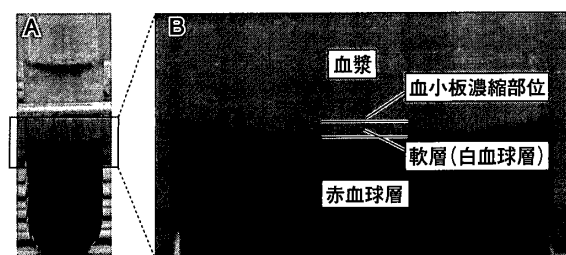


写真1 遠心分離後の血液

A：血漿成分（上部）と血球成分（下部）に分画する。

B：軟層のすぐ上に血小板が濃縮する。

## 材料および方法

### 1. 検体採取

採血の目的を説明して了解が得られた24歳から35歳までの健康な男女14名（男性11名，女性3名，平均年齢 $28.71 \pm 2.94$ 歳）より検体となる血液を採取した。採血は，21ゲージの注射針を用いて肘正中皮静脈より行い，採血後直ちにスピッツ内の抗凝固剤ヘパリンと混和した。なお，末血検査において異常値を示した検体については除外した。

### 2. 遠心分離および測定

検体の遠心分離にはロータ半径16cmの遠心分離機KUBOTA5910（久保田製作所，東京）を用いた。血液は遠心分離により血漿成分と血球成分に分画する。最下層の赤色に見られる赤血球層の上に，軟層と呼ばれる淡黄色で血漿よりやや不透明な薄い層が見られ，ここに白血球が濃縮している。血小板はこの軟層のすぐ上に最も濃縮することが知られている<sup>12)</sup>。そこで，本研究ではこの部位を遠心分離後の血小板濃度の測定部位とした（写真1）。血小板濃度の測定には多項目自動血球計数装置sysmex K-2000（シスメックス株式会社，兵庫）を用いた。

### 3. 遠心分離法の検討

#### 1) 回転数，回転時間についての検討

血小板濃縮に適した回転数について検討するため，毎分700，1000，1500，2000，3000，3500回転にて3分間の遠心分離を行い血小板濃度を測定し，血小板が遠心分離前の何倍に濃縮されたか（血小板濃縮倍率）を比較した。なお，700回転より低い回転数では分画が不完全であり，軟層や測定部位の判別が困難であったため測定をしなかつ

た。

次に血小板濃縮に適した回転時間について検討するため，毎分700，1000，2000回転にて，それぞれ3，5，10，15分間の遠心分離による血小板濃縮倍率を比較した。

#### 2) 2回遠心分離法についての検討

現在報告されているPRP精製の遠心分離法には1回遠心分離法と2回遠心分離法がある。2回遠心分離法とは遠心分離後，一部を採取し，さらに遠心分離する方法である。本研究では血漿から軟層までを採取し，2回目の遠心分離を行うこととした。完全に軟層までを採取するため，軟層直下の赤血球層も少量採取した。また，2回目の遠心分離後における血小板濃度の測定部位も軟層の直上とした。

2回遠心分離法の有効性について検討するため，1回遠心分離法と2回遠心分離法の血小板濃縮倍率を比較した。さらに，2回遠心分離法における2回目の遠心分離についても，毎分700，1000，2000回転にて，それぞれ3，5，10分間の遠心分離による血小板濃縮倍率を比較した。

### 4. 統計

統計ソフトstatcel（オーエムエス，埼玉）を使用し，有意差検定には一元配置分散分析法（One-factor ANOVA）および多重比較検定法（Fisher's PLSD）を用いた。また1回遠心分離法と2回遠心分離法の血小板濃縮倍率の比較検定にはt検定法（Paired t-test）を用いた。さらに，2回遠心分離法における2回目の遠心分離についての検討には二元配置分散分析法（Two-factor ANOVA）および一元配置分散分析法を用いた。なお，統計学的数値は，平均値±標準偏差で表示し，各検定の有意水準は5%とした。

## 結果

### 1. 回転数による血小板濃縮の差異

各回転数（毎分700，1000，1500，2000，3000，3500回転）にて3分間遠心分離後の血小板濃縮倍率を比較した（図1）。毎分700回転の平均濃縮倍率は $3.36 \pm 0.53$ 倍であり，1000回転では $3.38 \pm 0.37$ 倍であったが，1500回転では $2.53 \pm 0.19$ 倍と有意に低くなり（ $p < 0.01$ ），さらに高回転にする

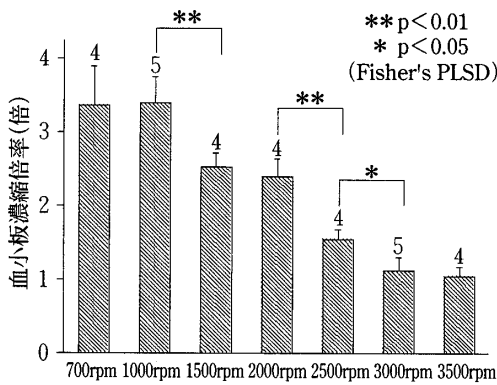


図1 各回転数3分間遠心分離後の血小板濃縮倍率  
グラフ上部に各標本数 (n 数) を表記した。

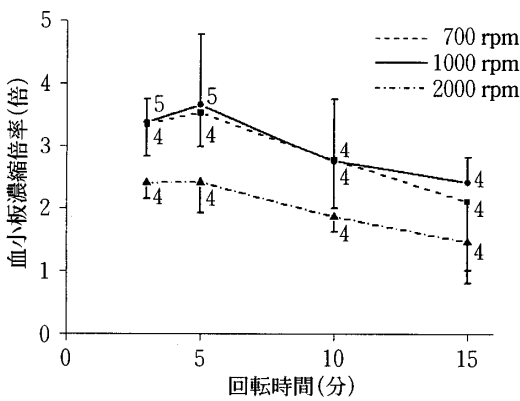


図2 回転時間による血小板濃縮倍率の差異  
各ポイントの右側に標本数 (n 数) を表記した。すべての回転数において5分間遠心分離した後の血小板濃縮倍率と15分間遠心分離した後の血小板濃縮倍率との間に有意な差を認めた (Fisher's PLSD,  $p < 0.05$ )。

と、濃縮倍率がより低くなった。このことから血小板濃縮には、毎分700回転や1000回転程度の低回転による遠心分離が適していると考えられる。

## 2. 回転時間による血小板濃縮の差異

毎分700, 1000, 2000回転において、それぞれ3, 5, 10, 15分間遠心分離した後の血小板濃縮倍率を比較した (図2)。すべての回転数において5分間遠心分離後の濃縮倍率が最も高く、10分、15分と時間が長くなるにつれ濃縮倍率が低くなる傾向がみられた。すべての回転数において5分間遠心分離した後の血小板濃縮倍率と15分間遠心分離した後の血小板濃縮倍率との間に有意な差を認めた ( $p < 0.05$ )。なお、毎分1000回転にて5分間遠心分離した後の濃縮倍率が最も高く、平均 $3.66 \pm 1.11$ 倍であった。以上より血小板濃縮のための

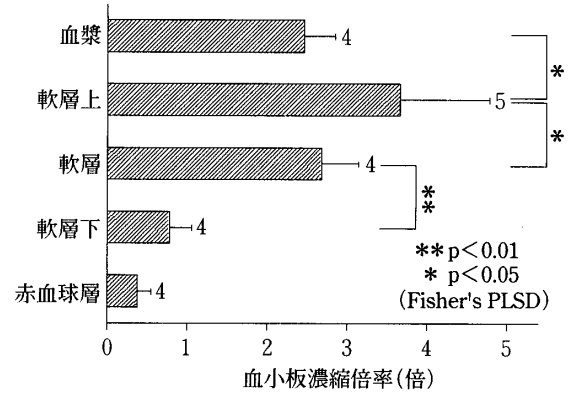


図3 遠心分離後の各層における血小板濃縮倍率

遠心分離には、毎分1000回転5分間程度が最も適していると考えられる。

## 3. 1回遠心分離法と2回遠心分離法

毎分1000回転で5分間遠心分離した後の各層における血小板濃縮倍率を示す (図3)。血漿、軟層の直上、軟層、軟層の直下、赤血球層の平均濃縮倍率はそれぞれ $2.46 \pm 0.39$ 倍、 $3.66 \pm 1.11$ 倍、 $2.68 \pm 0.46$ 倍、 $0.78 \pm 0.27$ 倍、 $0.38 \pm 0.17$ 倍であった。軟層の直上に最も血小板が濃縮されていたが、血漿や軟層にも高濃度の血小板が存在した。そこで2回遠心分離法では、1回目の遠心分離後、血漿から軟層まで (軟層直下である赤血球層の一部は含めた) を採取し2回目の遠心分離を行うこととした。

1回遠心分離法 (毎分1000回転, 5分間) および2回遠心分離法の平均濃縮倍率を示す (図4A)。なお、2回遠心分離法における2回目の遠心分離も毎分1000回転, 5分間とした。平均濃縮倍率はそれぞれ $3.66 \pm 1.11$ 倍、 $4.49 \pm 0.67$ 倍であり、統計学的有意な差は認めなかった ( $p = 0.84$ )。しかし、5検体すべてを個別にみると (図4B)、1回遠心分離法で濃縮倍率が5.10倍であり、2回目の遠心分離後も濃縮倍率が不変であった1検体を除き、他のすべての検体では2回遠心分離法で1回遠心分離法よりも高い濃縮倍率が得られた。特に1回遠心分離法で濃縮倍率が3倍以下であった検体が2回遠心分離法を行うことにより濃縮倍率が高くなる傾向がうかがえた。

## 4. 2回目の遠心分離についての検討

1回目の遠心分離は毎分1000回転, 5分間とし、2回目の遠心分離を毎分700, 1000, 2000回転に

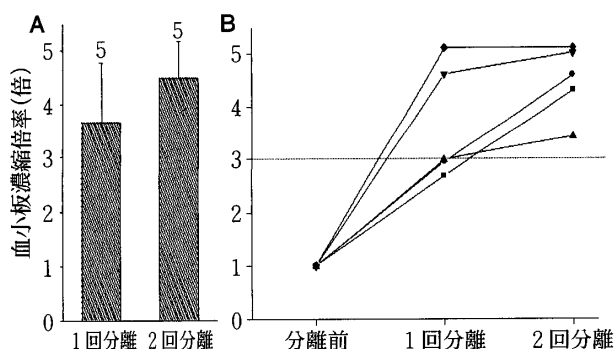


図4 1回遠心分離法と2回遠心分離法の比較

A: 1回遠心分離法および2回遠心分離法の血小板濃縮倍率。

B: 2回遠心分離法を行うことにより濃縮倍率が高くなる傾向がうかがえた。

表1 2回目の遠心分離についての検討

	3 min	5 min	10min
700rpm	3.90±1.07 (n=4)	4.18±0.77 (n=4)	3.83±0.56 (n=4)
1000rpm	4.38±0.59 (n=4)	4.49±0.45 (n=5)	4.13±0.43 (n=4)
2000rpm	3.74±0.88 (n=4)	3.49±0.72 (n=4)	2.76±1.00 (n=4)

て、それぞれ3, 5, 10分間行い、血小板濃縮倍率を比較した(表1)。各群間に有意な差は認めなかった( $p=0.091$ )。しかし、毎分1000回転、5分間の群の濃縮倍率が最も高く、それより高回転、長時間になると濃縮倍率が低くなる傾向が認められた。

## 考 察

採血を行う際、血小板凝集を防止するため、21ゲージより細い注射針を用いないこと、駆血帯を強く締めすぎないこと、強い陰圧をかけないことに留意し<sup>13)</sup>、採血後は直ちにヘパリンと混和した。また、採血から測定までの時間は3時間以内とした。なお、ピペットや分注用試験管は接触因子の活性化を防ぐため、ガラス製のものを用いず、非活性化材質であるポリプロピレン製のものとした<sup>14)</sup>。この結果、全104検体において測定前に血小板凝集が起こることはなかった。また、PRPは使用直前に血小板の活性化をおこなう。そのため精製過程では可及的に血小板の活性化を防ぐことが望ましい<sup>10)</sup>。血小板は低温で活性化されるため<sup>13)</sup>、本研究では、採取した血液の保存、遠心分離、および測定は室温にて行った。しかし今回、

成長因子の定量等を行っていないため、この効果は不明である。

本研究の結果から、安定して高い血小板濃縮倍率を得るためには、ロータ半径16cmの遠心分離機において毎分1000回転、すなわち遠心力 $180 \times g$  (重力加速度,  $9.81 \text{ m/s}^2$ )で5分間程度の遠心分離を行い、血漿から軟層まで(軟層直下である赤血球層の一部を含める)を採取し、さらに同程度の遠心分離を行う2回遠心分離法が適していると考えられる。

しかし、最近報告されているPRP精製法<sup>11,12)</sup>では、毎分2000~4000回転で7~15分間の遠心分離による2回遠心分離法が多い。毎分2000~4000回転は遠心分離機のロータ半径の違いを加味しても我々の方法に比べ数倍強い遠心力をかけてことになる。これらの方法における1回目の遠心分離では、高い血小板濃縮倍率は得られず、血球成分(赤血球, 白血球)を除去することに主眼を置いている。したがって1回目の遠心分離後、血漿のみ(軟層, 赤血球層を含めない)を採取し、2回目の遠心分離で高い血小板濃縮倍率のPRPと少血小板血漿(platelet poor plasma: PPP)に分画させる。このような方法でも、我々の方法と同程度の血小板濃縮倍率が得られるようである。しかし、高回転、長時間の強い遠心効果により血小板が破壊される可能性も高い<sup>11)</sup>。また、1回目の遠心分離後、血球層を含めず血漿のみを採取するのは手技的に困難であり熟練を要す。さらに、血球層において境界から下へ数mmまでの部位に新鮮で幼若な血小板が大量に存在するという報告<sup>10,15)</sup>もあることから、我々の方法がよりPRP精製に適していると考えられる。

本研究においては、血小板濃縮倍率のみを検討したため、PRPの精製量の検討は行っていない。しかし、我々の方法により採血量の1/10のPRPが精製可能であることを確認した( $n=3$ , 平均血小板濃縮倍率:  $4.28 \pm 0.69$ 倍)。これは過去の報告<sup>6,8,10~12)</sup>における精製量と同程度である。なお、この方法により精製したPRPを塩化カルシウム, アルギン酸ナトリウムさらに空気と混和することで活性化およびゲル化して<sup>5~9,12)</sup>、嚢胞摘出術およびサイナスリフトの2症例に適用した。2症例と

も、術後感染等の異常はなく良好な骨新生を得ている。

## 結 論

PRP精製には、ロータ半径16cmの遠心分離機で毎分1000回転（遠心力 $180\times g$ ）、5分間程度の遠心分離を行い、血漿から軟層まで（軟層直下である赤血球層の一部を含める）を採取し、さらに毎分1000回転、5分間程度の遠心分離を行う2回遠心分離法が適していることが示唆された。

本論文の要旨の一部は、第37回奥羽大学歯学会（2004年6月 郡山）において発表した。

## 文 献

- 1) Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altrick, B. W., Deuel, T. F. *et al.* : Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* **45** ; 319-326 1991.
- 2) Mohan, S. and Baylink, D. J. : Bone growth factors. *Clin Orthop* **263** ; 30-48 1991.
- 3) Buckley, R. C., Breazeale, E. E., Edmond, J. A. and Brzezienski, M. A. : A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *J Plast Reconstr Surg* **103** ; 202-206 1999.
- 4) Breuing, K., Andree, C., Helo, G., Slama, J. *et al.* : Growth factors in the repair of partial thickness porcine skin wounds. *J Plast Reconstr Surg* **100** ; 657-664 1997.
- 5) Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmle, S. R. *et al.* : Platelet-rich plasma : Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **85** ; 638-646 1998.
- 6) Whithman, D. H., Berry, R. L. and Green, D. M. : Platelet gel : An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* **55** ; 1294-1299 1997.
- 7) 澤 祐一郎, 川野 大, 福井克仁, 中山淳史ほか : 自己血からの多血小板血漿 (PRP : platelet rich plasma) を用いた上顎前歯部自家骨移植の1例. *日口外誌* **46** ; 372-374 2000.
- 8) 澤 祐一郎, 望月 誠 : PRPによる自家骨移植についての臨床的検討. *日口腔インプラント誌* **14** ; 279-286 2001.
- 9) 金 秀樹, 高田 訓, 渋谷洋子, 三枝由希ほか : 上顎歯槽骨過吸収に対しサイナスリフトとベニアグラフトにPRPを併用した一例. *奥羽大歯学誌* **30** ; 72-76 2003.
- 10) 山根 進, 小田 亮, 樋口勝規, 下御領良二ほか : 多血小板血漿 (PRP) の精製法についての検討. *日口腔インプラント誌* **16** ; 77-83 2002.
- 11) 澤 祐一郎, 渡邊悟朗, 原 禎幸, 丸山誠二ほか : 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誌* **15** ; 59-65 2001.
- 12) 伊藤輝夫, 加藤寿幸, 岩田哲也, 宇佐美貴直 : PRPの分離法と臨床的評価. *デンタルダイヤモンド* **26** ; 76-84 2001.
- 13) 井上克枝, 矢富 裕, 尾崎由基夫 : 血小板機能検査. *検査と技術* **28** ; 865-869 2000.
- 14) 安室洋子 : 凝固・線溶検査 2 : 検体の取り扱い. *検査と技術* **28** ; 830-831 2000.
- 15) Sonnleitner, D., Huemer, P. and Sullivan, D. Y. : A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques : A technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* **15** ; 879-882 2000.

著者への連絡先：浜田智弘，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔外科学講座  
Reprint requests : Tomohiro HAMADA, Department of Oral Surgery, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan