

[Q & A (質問と回答)] ③

回答者 : 川瀬 知之 (新潟大学大学院医歯学研究科 准教授)

※以下、Q & A内の添付ファイル (資料) は運営上、公開することが困難なためご容赦下さい。

Q

ここでもう一つ教えて欲しいのですが、PLT だけでなく、WBC の表記もありますが、これについては、どのように触れていけば良いでしょうか。

A

いいご質問です。

話をシンプルにするために、WBC のデータを学会発表から削除するののもひとつの考え方です。あるいは、発表に要する時間や考察をどこまで広げるかなど総合的に考えて、最終的なシナリオを仕上げる段階で取捨選択してもよろしいかと思えます。

では、なぜ WBC のデータを入れたかと言うことですが、これには幾つかの理由があります。

1) まず、Choukroun が A-PRF のコンセプトとして白血球の含有量を増やしたということを検証するため (本来は従来の PRF と比較するべきであるが)

2) (その代わりに) PRGF や CGF と比較して、A-PRF が相対的により多数の白血球を含んでいることを検証するため

3) 炎症性サイトカインのデータとの相関性を大まかに知るため

4) 将来的には、臨床のデータと関連させて、白血球の多少と再生効果の関係を推し量るため

どちらかと言えば、将来的研究の展開のための布石です。

では、(含めると仮定して)発表に際してどのように触れるべきかという問題に話を戻しますと、比重分画では血小板と白血球がほぼオーバーラップしてくると言う現実を考慮して、「Buffy coat などの血小板分画にも白血球も多く含まれていると考えられるので、これを確認するために白血球もカウントしてみました。ここで注目すべきは、PRGF にはほとんど白血球が含まれないと言うことで、これは開発者である Anitua のコンセプトを裏付ける結果となりました。」というような感じでさらりと流してはいかがかと思えます。

以上、ご検討ください。

Q

物性試験の写真確認させていただきました。想像以上に伸びるのですね。大変興味深いです。

またいろいろ教えて下さい。実験等でお忙しいところを申し訳ありません。

発表の質問ですが、

『方法』で

採血は 7 人に 2 週間で 3 回。

血小板濃縮液はすべて一度凍結融解処理した物を血球数のカウントや濃度測定を行っているということでしょう。

うか。

また PRP、PRGF はゲル化前の段階まで進めた状態で凍結処理し、その後融解してゲル化、A-PRF、CGF は凍結融解処理後にすべて調製、という形でもよしかったでしょうか。

A

すみません、また言葉が少し足りませんでした。

採血は 2 週間ごとに集合して実施しました。3 回集まったことになります。

採血と同時に血球数をカウントし、PRP/PRGF を調製した直後に再度カウントしました。その後、各サンプルは凍結保存しました。なお、増殖因子の測定に際して、血小板の活性化やゲル化はいつさい行っていません。凍結融解で増殖因子は十分放出されるという知見のもと、とくに何もしませんでした。

一方、A-PRF/CGF は調製後に凍結保存しました。しかし、これでは血球数のデータがないのでおかしいというクレームがつき、これに対応するために、再度ほぼ同じドナーたちから採血し、血球数をカウントしながら A-PRF/CGF を調製しました。

要するに、血球数はいったん凍結するとカウントできなくなりますので調製直後(凍結前)にカウントしますが、増殖因子の定量はある程度サンプル数がそろってからでないとなかなか不経済なので凍結保存するということです。

だいたいこんなところですが、ご理解いただけましたでしょうか？

Q

PRP、PRGF と A-PRF、CGF は区別せずに説明して良いでしょうか。

それとも A-PRF、CGF には『ホモジネート』して、と言う言葉が必要でしょうか。

A

時間との兼ね合いもありますし、イントロで PRP 等の特徴説明をしているか(現状ではほとんどしていなかったように思います)によりますが、基本的に PRP/PRGF と A-PRF/CGF の 2 グループにわけて簡単に説明していただけませんか？

A-PRF/CGF は先行論文等で extract という言葉も使用していましたので、「ホモジネートののち遠心した得た上清」がわかるようにしておいたほうがよいと思います。また、PRP/PRGF ではホモジネートはしていませんから、その違いを示す意味でもスライドに書き込むか、簡単に言及してもらったほうがよいように思います。

Q

確かにサンプリングについてこの辺を把握していないと発表の時困りますね。

PRP/PRGF は採血直後に全血の血球数の濃度測定。その後遠心分離して各調製材を冷凍保存しサンプルがまとまってから ELISA による成長因子の測定。

CGF/PRF は採血直後に遠心分離、赤血球と分離したものを冷凍保存してサンプルがまとまってから ELISA による成長因子の測定。

CGF/PRF の血球数の濃度測定は、先日 6 月 8 日に皆さん集まった時にやったやり方で、全血から遠心分離後の赤血球成分のところの血球数濃度を参考に CGF/PRF に含まれていると思われる血球数を判定する、と言う解釈でよろしいでしょうか。

血球数の濃度は、PRP/PRGF は信用できるけど、CGF/PRF の血球数濃度は実際とは違うのではないかと、ただこの引き算法の測定が標準化してきてしまっているのではないかと、この度の論文ではこの方法を採用して

いる、ということですね。

A

そうですね、そういう解釈でいいと思います。

昨日、ちょっと思い立って、PRP 調製する際に RBC 分画をよく混和して PLT 等がどれくらい含まれているか測定してみました。驚くべきことに、細胞密度としては、全血より少し低いくらいでした。もちろん、PRP の PLT は 5-8 倍くらいに濃縮できました。RBC と PLT に結合ドメインはないようですが、RBC が変形するので、それらに囲い込まれるようにして相当量の PLT が RBC 分画に持ち込まれているようですね。

当然似たようなことが CGF などの調製で起こり得ると思います。フィブリンがあるかないかで、そこに付着する PLT も出てきますが。ここらへん、一度整理して、論文としてまとめておく必要があるように感じました。だから、「引き算法」なんてナンセンスなんですよ!!