

原 著

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

内山裕貴¹⁾ 都築 直^{1), 2)} 徐 鍾筆^{1), 2)} 山田一孝¹⁾ 羽田真悟¹⁾
眞鍋弘行³⁾ 田畑泰彦⁴⁾ 佐々木直樹^{1)†}

- 1) 帯広畜産大学臨床獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)
2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1112 岐阜市柳戸1-1)
3) ㈲エムエイチ (〒080-2471 帯広市西21条南4-12-12)
4) 京都大学再生医科学研究所生体組織工学研究部門 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)

(2012年7月30日受付・2013年2月15日受理)

要 約

自家血液から作製された多血小板血漿 (Platelet rich plasma, 以下PRP) は、アルギン酸ゲル剤として患部に塗布することで蹄底潰瘍への良好な治癒効果が認められた。しかし、効果を持続させるという点で不十分な方法であった。そこで本研究では、徐放剤としてゼラチンマイクロスフィア (以下GM) を用いた新しい塗布剤を作製し、治療効果を検討した。PRP含浸GM混合アルギン酸ゲル処置群 (PRP群, n = 10) とアルギン酸ゲルのみ処置群 (対照群, n = 9) を比較した。蹄底潰瘍面積の欠損割合は、PRP群で処置後1, 2及び3週目で約45%, 17%及び5%と推移し、対照群と比較して有意な角質再生効果がみられた。また、PRP群では処置後2週目に圧痛が消失したが、対照群では痛みは継続していた。以上のことから、PRP含浸GM混合アルギン酸ゲルは乳牛の蹄底潰瘍に有効であることが明らかとなった。——キーワード：ゼラチンマイクロスフィア, 多血小板血漿, 蹄底潰瘍。

----- 日獣会誌 66, 305～309 (2013)

蹄底潰瘍罹患牛は重度の跛行と泌乳量の減少を示し、経済的損失がきわめて大きいとされている [1]。乳牛の蹄底潰瘍は、真皮に角質の欠損が生じて潰瘍化し出血を伴うものであり、蹄底蹄球接合部の軸側よりに好発する [2]。その治癒には長時間を要するため、新しい治療法の開発が望まれている。

近年、血小板には transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), platelet derived growth factor (PDGF) などの成長因子が含まれていることが報告されている [3]。この血小板を高濃度に濃縮した多血小板血漿 (以下PRP) は、種々の動物において腱、筋肉、骨及び軟骨などの再生に用いられており [4]、牛の滑液嚢胞の治療に効果があるという報告もなされている [5]。またPRPは自己血由来であるため、副作用も少なく安全に使用可能であり、アルギン酸ゲルとカルシウムを混合すること

でゲル化することが可能となる。乳牛の蹄底潰瘍にPRP混合アルギン酸ゲルを用いたところ蹄底再生効果が認められた [6]。一方、PRPに含まれる成長因子は半減期が短いため [7]、臨床応用のためには適切なドロックデリバリーシステム (以下DDS) が有効とされている [8]。ゼラチンマイクロスフィアは、各種成長因子を1～2週間かけて徐放化させ、半減期を延長させる作用をもっているため [9]、さまざまな応用法が期待されている。最近、実験的に作成した蹄底欠損に対するPRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲルによる著明な再生効果も確認されている [10]。

本研究では、乳牛の蹄底潰瘍に対してPRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲルを処置し、その蹄底再生効果を検討した。

† 連絡責任者：佐々木直樹 (帯広畜産大学臨床獣医研究部門大動物外科学研究室)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎・FAX 0155-49-5378 E-mail : naoki@obihiro.ac.jp

材料及び方法

供試牛は十勝地域の同一のタイストール飼育牧場において飼養されている蹄底潰瘍罹患牛19頭（平均年齢 5.92 ± 2.18 歳，産次数 3.62 ± 1.50 ）であった。そのうち10頭をPRP群（平均年齢 5.43 ± 2.7 歳，産次数 3.43 ± 1.9 ）とし，9蹄を対照群（平均年齢 6.5 ± 1.38 歳，産次数 3.83 ± 0.98 ）とした。

処置前に罹患牛より20mlの採血を行い，ACD溶液（BDバキュティナ採血管，日本ベクトン・ディッキンソン株，東京）入りのシリンジを用いてプレイン採血管（ベノジェット真空採血管，テルモ株，東京）に分注した。血液を1,500rpm，10℃の条件下で10分間遠心分離した後，上清及びパフィコートの上下0.5mlの部分を吸引した。これらをファルコンチューブ（labcon15ml遠沈管，Labcom，U.S.A.）に移し混和した後，ふたたび遠心分離（3,000rpm，10℃，15分間）を行った。遠心分離終了後，マイクロピペットを用いて上清を捨て，パフィコートの上下0.5mlずつを吸引し，多血小板血漿（platelet rich plasma，以下PRP）を作製した。次に，牛骨アルカリ処置ゼラチン（等電点5.0，新田ゼラチン株，大阪）を用い，等電点5.0，含水率95.0%の乾燥ゼラチンマイクロスフィアを作製した [11]。

ゼラチンマイクロスフィア10mgに1mlのPRPを含浸させ，PRP含浸ゼラチンマイクロスフィアを得た。その後，アルギン酸ナトリウム（アルギン酸ナトリウム，

株キミカ，東京）の粉末を5%となるように約60℃の蒸留水に溶解し，ペースト状としたアルギン酸ペースト約0.6mlにPRP含浸ゼラチンマイクロスフィアを混和し，十分に混合した。さらに10%の塩化カルシウム水溶液を約0.1ml滴下しゲル化させた。

供試牛を柵場内保定後，肢を挙上して削蹄後，蹄の潰瘍部周辺を洗浄した。その後，欠損部にPRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲルを塗布し，プラスチック性フィルム（ディスポーザブル長手袋DX，



図1 PRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲル
罹患部にPRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲル（矢印）を塗布した。

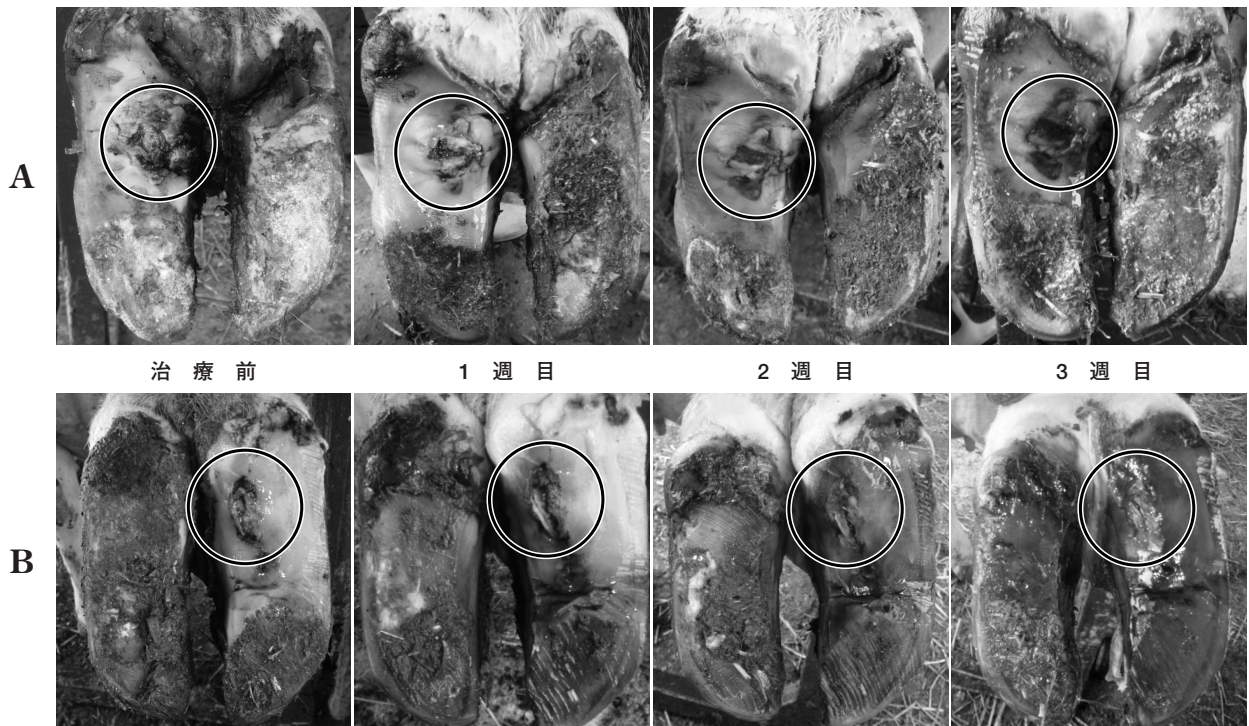


図2 各週の病変部の写真。左から順に治療前，1週目，2週目並びに3週目の様子
A：PRP群 B：対照群 ○は潰瘍部位を示す。

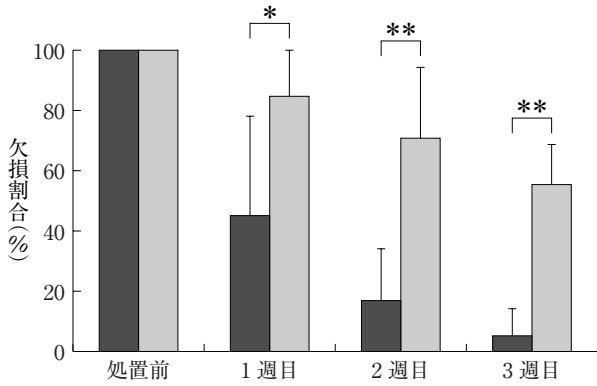


図3 欠損割合のグラフ

■ : PRP群 (N = 10)
 □ : 対照群 (N = 9)
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

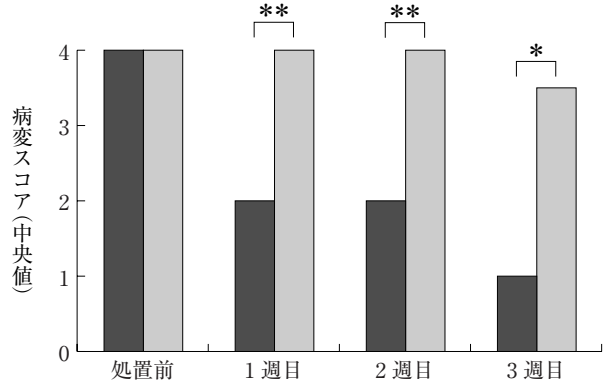


図4 病変スコアのグラフ

■ : PRP群 (N = 10)
 □ : 対照群 (N = 9)
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

フジタ製薬(株, 東京)を巻き, その上に自着性包帯(coban, 住友スリーエム(株), 東京)を装着した(図1). 対照群はアルギン酸ゲルのみを塗布し, その後の処置はPRP群と同様に行った. 1週間おきに蹄底潰瘍を評価後, プラスチック製フィルムと自着性包帯の巻き直しのみを行った(図2).

評価には塗布後1週目, 2週目並びに3週目における蹄の欠損割合, 病変スコア並びに圧痛スコアを用いた. 欠損割合は最初の病変部の面積を100%として, 各週ごとの欠損部面積を測定し, 欠損割合(%)を算出した. 病変スコアはスコア1(蹄底硬化), 2(痂皮形成), 3(び爛)並びに4(潰瘍)の4段階で評価した. 病変の判定は病変全体がそのスコアに達したときの値を採用した. 圧痛スコアは病変部を指で圧迫したときの反応で評価し, スコア1(無反応), 2(肢端のみを動かして反応する軽度圧痛), 3(肢全体を動かして反応する中等度圧痛)並びに4(激しい体動を示す重度の圧痛)の4段階とした. 数値は中央値(最小値, 最大値)で示し, 統計解析はマン・ホイットニー検定を用いて, 危険率5%未満を有意差ありとした.

成 績

治療前の蹄底潰瘍面積はPRP群では $5.00 \pm 3.64\text{cm}^2$ であり, 対照群では $7.56 \pm 4.50\text{cm}^2$ であった. 対照群における1週目, 2週目並びに3週目の欠損面積(欠損割合)は $5.70 \pm 4.79\text{cm}^2$ ($84.7 \pm 15.6\%$), $4.44 \pm 4.70\text{cm}^2$ ($70.8 \pm 23.5\%$)並びに $2.20 \pm 1.47\text{cm}^2$ ($55.4 \pm 13.3\%$)であった. 一方, PRP群における1週目, 2週目並びに3週目の欠損面積(欠損割合)は $1.14 \pm 1.34\text{cm}^2$ ($45.1 \pm 33\%$), $0.26 \pm 0.37\text{cm}^2$ ($16.9 \pm 17.2\%$)並びに $0.02 \pm 0.04\text{cm}^2$ ($5.2 \pm 9.0\%$)であり(図3), PRP群の欠損割合は対照群の欠損割合と比較して塗布後全週において有意に低値を示した(1

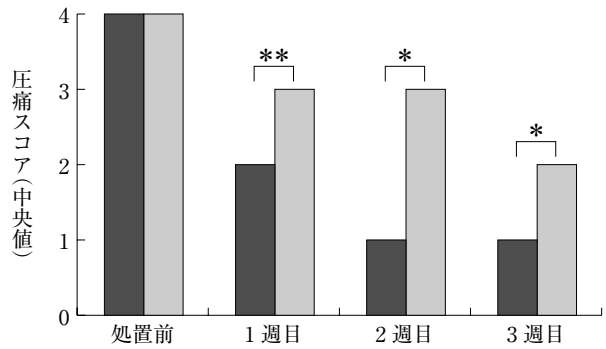


図5 圧痛スコアのグラフ

■ : PRP群 (N = 10)
 □ : 対照群 (N = 9)
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

週目, 2週目, 3週目: $P < 0.05, 0.01, 0.01$). 次に, PRP群における病変スコアの中央値(最小値, 最大値)は1週目, 2週目及び3週目において2(1,3), 2(1,2)及び1(1)であった. 同様に, 対照群の病変スコアは1週目, 2週目及び3週目において4(3,4), 4(2,4)及び3.5(1,4)であった(図4). PRP群の病変スコアは対照群と比較して塗布後全週において有意に低値を示し(1週目, 2週目, 3週目: $P < 0.01, 0.01, 0.05$), 病変部の修復が認められた.

PRP群における圧痛スコアの中央値(最小値, 最大値)は1週目, 2週目及び3週目において2(1,3), 1(1)及び1(1)であった. 同様に, 対照群における圧痛スコアは1週目, 2週目及び3週目において3(3,4), 3(1,3)及び2(1,3)であった(図5). PRP群の圧痛スコアは塗布後全週において有意に低値を示し(1週目, 2週目, 3週目: $P < 0.01, 0.05, 0.05$), 病変部の圧痛は減少した.

考 察

PRPに含まれる成長因子は, 半減期が非常に短いた

め、単回投与では効果が期待できず、複数回投与を行う必要がある。本研究で用いたゼラチンマイクロスフィアはそれ自体に潰瘍治癒効果はないが、生体分解性を有し、成長因子などの物質を保持し、徐々に放出することが可能であるため、半減期の短い物質であっても効果を持続させることができることが明らかとなっている [12]。本研究結果から、PRP群は対照群と比較して、欠損スコア、病変スコア及び圧痛スコアのいずれにおいても投与後全週にわたり有意に低下を示した。このことから、ゼラチンマイクロスフィアに保持されたPRPに含まれるTGF- β 1やPDGFなどの成長因子が長期間にわたって放出されることで、持続的な作用があったと考えられた [13]。

欠損割合並びに病変スコアの結果より、PRP群では欠損割合の低下に合わせて蹄底角質の良好な再生が生じ、蹄底硬化につながっていることが分かった。一方、対照群では欠損割合の低下がみられるものの、その治癒過程では痂皮形成までも達していなかった。この差が生じた要因として、PRP中に含まれるbFGF、TGF- β 1などの成長因子の効果が持続することによって、欠損組織の再生並びに硬化の促進が早まったためであると考えられる [10]。人では、皮膚の潰瘍に対してPRPが応用され、皮膚の再生が促進されることが報告されている [14]。本研究は蹄の欠損割合、病変スコアにおいてPRP群は対照群と比較して有意に低値を示した。これはPRPから放出される成長因子により蹄底真皮及び蹄底角質の再生が促進されたためと考えられた。また人の上顎炎患者に対してPRPの単回投与により疼痛を減少させることが報告されており [15]、これはPRPに含まれるTGF- β 1が炎症を抑制し [16]、疼痛を減少させる効果があるためと考えられている。本研究においてもPRP群は対照群と比較して圧痛スコアは有意に低値を示した。これはPRPにより蹄底角質の再生が促進されることで、疼痛を示す知覚部の保護が復元されて疼痛が減少したものと考えられた。

以前の研究において、PRPが蹄底潰瘍に効果があることが明らかとなったが、術後1週目から術後3週目にかけて欠損割合、病変スコア及び圧痛スコアにおける大きな変化はみられず、持続的な作用は認められなかった [6]。そこで新たに、ゼラチンマイクロスフィアを加えることで、人工的な蹄欠損モデルにおいて術後3週目までの長期間にわたる作用を実現した [10]。そこで今回われわれは臨床現場で蹄底潰瘍の牛に対してその有効性を確かめた。本実験結果より、PRP含浸ゼラチンマイクロスフィア混合アルギン酸ゲルが牛の蹄底潰瘍に対しても有効な結果が得られ、その効果は1週目を経過して2、3週目まで持続することが確認された。このPRPの持続的な治療効果は人工的蹄欠損モデルを用いた試験とも同

様の結果であり [10]、PRP混合アルギン酸ゲルにゼラチンマイクロスフィアを加えることは有効であると考えられた。

引用文献

- [1] Pavlenko A, Bergsten C, Ekesbo I, Kaart T, Aland A, Lidfors L : Influence of digital dermatitis and sole ulcer on dairy cow behaviour and milk production, *Animal*, 5, 1259-1269 (2011)
- [2] Lischer ChJ, Ossent P, Räber M, Geyer H : Suspensory structures and supporting tissues of the third phalanx of cows and their relevance to the development of typical sole ulcers (Rusterholz ulcers), *Vet Rec*, 151, 694-698 (2002)
- [3] Geng Z, Wang C, Zhou H : Effect of platelet-rich plasma on tendon healing, *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 25, 344-348 (2011)
- [4] Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR : Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation, *Tissue Eng Part C- Methods*, 15, 431-435 (2009)
- [5] 中村 善, 金城 肇, 進藤 亮 : 多血小板血漿 (PRP) 療法および全血を用いた滑液囊胞の治療, *家畜診療*, 59, 477-483 (2012)
- [6] 田邊貴史, 都築 直, 徐 鍾筆, 田畑泰彦, 石井三都夫, 山田一孝, 羽田真悟, 佐々木直樹 : 乳牛の蹄底潰瘍に対する多血小板血漿混合アルギン酸ゲルの蹄底再生効果, *日獣会誌*, 65, 345-349 (2012)
- [7] Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG : The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects, *Int Orthop*, 34, 589-597 (2010)
- [8] Kurita J, Miyamoto M, Ishii Y, Aoyama J, Takagi G, Naito Z, Tabata Y, Ochi M, Shimizu K : Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel, *Ann Thorac Surg*, 92, 837-844 (2011)
- [9] Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kawata M, Kubo T : Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres, *Tissue Eng*, 13, 147-158 (2007)
- [10] Tsuzuki N, Seo JP, Yamada K, Haneda S, Tabata Y, Sasaki N : Effect of compound of gelatin hydrogel microsphere incorporated with platelet-rich-plasma and alginate on sole defect in cattle, *J Vet Med Sci*, 74, 1041-1044 (2012)
- [11] Sasaki N, Minami T, Yamada K, Yamada H, Inoue Y, Kobayashi M, Tabata T : *In vivo* effects of intra-articular injection of gelatin hydrogen microspheres containing basic fibroblast growth factor on experimentally induced defects in third metacarpal bones of horses, *Am J Vet Res*, 69, 1555-1559 (2008)
- [12] Hayashi K, Tabata Y : Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions, *Acta Biomater*, 7, 2797-2803 (2011)

- [13] Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Noguchi T, Kanatani I, Ogawa O, Tabata Y : Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors, *Biomaterials*, 25, 4513-4520 (2004)
- [14] Sell SA, Ericksen JJ, Reis TW, Droste LR, Bhuiyan MB, Gater DR : A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers, *J Spinal Cord Med*, 34, 122-127 (2011)
- [15] Hechtman KS, Uribe JW, Botto-vanDemden A, Kiebzak GM : Platelet-rich plasma injection reduces pain in patients with recalcitrant epicondylitis, *Orthopedics*, 34, 92 (2011)
- [16] Boche D, Cunningham C, Docagne F, Scott H, Perry VH : TGF β 1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration, *Neurobiol Dis*, 22, 638-650 (2006)

Effects of Gelatin Hydrogel Microsphere Containing Platelet Rich Plasma Dairy Cows with Sole Ulcers

Hiroki UCHIYAMA¹⁾, Nao TSUZUKI^{1),2)}, Jongpil SEO^{1),2)}, Kazutaka YAMADA¹⁾,
Shingo HANEDA¹⁾, Hiroyuki MANABE³⁾, Yasuhiko TABATA⁴⁾
and Naoki SASAKI^{1)†}

- 1) *Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan*
- 2) *The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, Gifu, 501-1112, Japan*
- 3) *Emueich, 4-12-12 Minami, 21 Nishi, Obihiro, 080-2471, Japan*
- 4) *Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Kyoto University, Kyoto, 606-8507, Japan*

SUMMARY

It was demonstrated that platelet rich plasma (PRP), collected from patients could be an effective treatment method for sole ulcers with alginate gels containing PRP. However, this method was deficient in terms of its prolonged effect. We therefore used gelatin hydrogel microsphere (GM) as a controlled release material and investigated the effect of treatment for sole ulcers. This study compared a test group treated with alginate gel containing a GM-PRP mix (PRP group, n = 10) and another group treated with alginate gel alone (control group, n = 9). The percentage reduction in the size of the hoof defect in the PRP group was approximately 45%, 17%, 5% at 1, 2, 3 weeks after treatment respectively. Cornification was promoted more significantly in the PRP group at each week than it was in the control group. The pain from pressure in the PRP disappeared at 2 weeks after treatment, while in the control group it remained at 3 weeks after treatment. From these results, GM containing PRP could be an effective treatment method for sole ulcers in dairy cows.

—Key words : Gelatin Hydrogel Microsphere, platelet rich plasma, sole ulcer.

† *Correspondence to : Naoki SASAKI (Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)*

Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan TEL · FAX 0155-49-5378 E-mail : naoki@obihiro.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 305 ~ 309 (2013)