

O-13 CaCl₂添加による血小板の直接活性化がPRPの凝固を促す

Direct activation of platelets by addition of CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma

○中村雅之¹⁾, 山口貞博¹⁾, 磯邊和重¹⁾, 渡辺泰典¹⁾, 辻野哲弘¹⁾, 増木英郎¹⁾, 奥寺 元¹⁾, 川瀬知之²⁾
○M. Nakamura¹⁾, S. Yamaguchi¹⁾, K. Isobe¹⁾, T. Watanabe¹⁾, T. Tsujino¹⁾, H. Masuki¹⁾, H. Okudera¹⁾, T. Kawase²⁾

¹⁾ 一般社団法人東京形成歯科研究会

²⁾ 新潟大学大学院歯科薬理学分野

¹⁾ Tokyo Plastic Dental Society

²⁾ Division of Oral Bioengineering Graduate School of Medicine and Dentistry, Niigata University

I 目的: 液体の多血小板血漿 (PRP) は, 局所投与に先立って, ガラス容器中にてCaCl₂によりゲル化させることが一般的である. しかし, この過程において血小板がどの程度活性化されるのが増殖因子の徐放という観点から最適であるかということの科学的証拠は乏しい. 本研究では, この疑問を解明する第一段階として, 血小板がCaCl₂により直接活性化されるかどうかについて検討した.

II 材料および方法: PRPは抗凝固剤 (ACD-A) を含む新鮮な血液サンプルから調製した. 洗浄血小板のCaCl₂に対する応答活性は, 走査電顕 (SEM), flow-cytometer (FCM), digital holographic microscope (DHM) および免疫蛍光染色 (IF) にて評価した. 凝固活性はガラス時計皿中のPRPにて評価した.

III 結果: 洗浄血小板はPBS中で0.1%CaCl₂に反応して, 活性化血小板のマーカーであるCD62PとCD63の発現を亢

進させ, microparticlesとfibrinogenを放出した. 並行して, 血小板は凝集するものとポリスチレン培養皿に広い面積で接着するものが認められた. PRPとしての凝固テストにおいても, 血小板はCaCl₂に反応して速やかに凝集を開始しfibrinとともにひも状のマトリックスを形成した. しかし, このような変化はガラス時計皿中のPRPでのみ観察され, プラスチック培養皿中のPRPやガラス時計皿でも血小板を含まない血漿 (PPP) では速やかな凝固は認められなかった.

IV 考察および結論: これまで, CaCl₂添加によるPRP凝固において, 血小板は凝固系の活性を介して間接的に活性化されるものと理解されていたが, これらの結果から, CaCl₂により直接活性化される系があることも示唆された. (倫理審査委員会番号15000140承認 承認番号2297号)

O-14 Digital Holographic Microscopyによる活性化血小板の定量的形態評価法

Quantitative evaluation of morphological changes in activated platelets in vitro using digital holographic microscopy

○北村 豊¹⁾, 山口貞博¹⁾, 磯邊和重¹⁾, 渡辺泰典¹⁾, 中村雅之¹⁾, 増木英郎¹⁾, 奥寺 元¹⁾, 川瀬知之²⁾
○Y. Kitamura¹⁾, S. Yamaguchi¹⁾, K. Isobe¹⁾, T. Watanabe¹⁾, M. Nakamura¹⁾, H. Masuki¹⁾, H. Okudera¹⁾, T. Kawase²⁾

¹⁾ 一般社団法人東京形成歯科研究会

²⁾ 新潟大学大学院歯科薬理学分野

¹⁾ Tokyo Plastic Dental Society

²⁾ Division of Oral Bioengineering Graduate School of Medicine and Dentistry, Niigata University

I 目的: 1990年代後半から多血小板血漿 (PRP) などの血小板濃縮材料は広く再生治療に応用され成果を挙げている. 液体のPRPは局所投与に先立ちCa²⁺等の凝固因子によりゲル化されることが多いが, その際の血小板の活性化機構に関する細胞生理学的研究は乏しい. 本研究において, われわれはdigital holographic技術を応用した顕微鏡に着目し, その血小板形態変化の定量的評価における有用性を検討した.

II 材料および方法: 血液サンプルは抗凝固剤であるACD-Aの存在下, 非喫煙の健康な男性ドナー (28-68歳; N=9) から採取し, 遠心分離することによりPRPを調製した. 血小板は洗浄後, PBS中で0.1% CaCl₂により刺激した. 一定時間インキュベートののち固定し, CD62Pをマーカーとしてフローサイトメーター (FCM) による生化学的評価, SEMによる形態評価, およびDHMによる形態評価に供した.

III 結果: 凝固系の非存在下, CaCl₂刺激により血小板は

時間依存性に活性化し, あわせて偽足の形成や接着面積の拡大が認められた. DHMによる評価では凝集血小板をひとつの細胞塊と認識させて画像解析した結果, 2次元プロットからCaCl₂刺激により血小板の面積と厚みがともに増す結果, FCMの結果と同様に, 血小板集団がまとまって右上方にシフトするという現象を確認した.

IV 考察および結論: 本研究では, 多数のサンプルを一括して評価するために固定したが, 本来DHMは固定のみならず, 標識や染色などの操作を必要とせずに生細胞の3次元形状を評価できる. 血小板の活性化においても, その形態的变化を定量的に評価できることを確認した. PRPの品質評価の分野において, また広く血小板の臨床検査において, 従来の検査法では困難であった形態的变化を評価できるデバイスとして有望な存在となりうることを示唆された.

(倫理審査委員会番号15000140承認 承認番号2297号)