

O-1-8-86

低濃度NaFの多血小板血漿の品質に及ぼす影響： 血小板中のミトコンドリア活性を中心に

○笠原 朋似¹⁾, 辻野 哲弘¹⁾, 川端 秀男¹⁾, 渡辺 泰典¹⁾,
西山 晃司¹⁾, 北村 豊¹⁾, 奥寺 元¹⁾, 川瀬 知之²⁾

¹⁾ 東京形成歯科研究会, ²⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科薬理学分野

Inhibitory effects of NaF on mitochondrial energy generation in human platelets in vitro

○KASAHARA T¹⁾, TSUJINO T¹⁾, KAWABATA H¹⁾,
WATANABE T¹⁾, NISHIYAMA K¹⁾, KITAMURA Y¹⁾,
OKUDERA H¹⁾, KAWASE T²⁾

¹⁾ Tokyo Plastic Dental Society, ²⁾ Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences Division of Oral Bioengineering

I 目的: フッ化物は水酸アパタイトの化学的強化に優れ、う蝕予防に頻用されてきた。一方で細胞毒性も懸念されることから、これまで線維芽細胞などの有核細胞でその遺伝毒性が主に検討されてきたが、血小板などの血液細胞は無核であるがゆえに、同様な研究の対象とはされてこなかった。しかし、NaFの持つ解糖系阻害効果を考慮すると、血小板のエネルギー産生系が標的とされ、PRPの治療効果にも悪影響があるのではないかという疑問を持つに至った。そこで、in vitroで低濃度のNaFがヒト血小板のミトコンドリア活性に及ぼす影響について検討した。

II 材料および方法: 15名の健康な非喫煙男性(28-63歳)から調製したPRPを、NaF(0.5または1.0 mM)で最大3日間処理した。血小板機能は、凝集と接着活性を基に評価し、血小板エネルギー代謝は、細胞内ATPレベル、細胞外乳酸レベル、および呼吸活性を基に評価した。ミトコンドリア膜電位(Em)と活性酸素種(ROS)の局在は、細胞化学的方法により可視化した。

III 結果: 血小板数は、NaF(1.0mM)により時間依存性に減少し、凝集能と接着能はNaF(0.5-1.0mM)により濃度および時間依存性に阻害された。また、NaF(1.0mM)によってミトコンドリア膜電位(Em)の低下とROS産生の増加が生じ、酸素消費量が低下した。さらに、ATPレベルは、NaF(0.5-1.0mM)により濃度依存性に低下した。一方、細胞外乳酸レベルはNaF(1.0mM)により時間依存性に増加した。

IV 考察および結論: 従来よりNaFは解糖系のenolaseを阻害して細胞死に至らしめるという機序が広く受容されてきたが、ヒト血小板においては低濃度のNaFがミトコンドリアに直接作用してATP産生を低下させ細胞死に至る可能性が示唆された。PRP治療において、血小板は生きた状態で投与されることでより忠実に創傷治癒を再現できることから、PRP治療部位が塗布されたフッ化物に暴露されないよう慎重に処置する必要がある。

(倫理審査委員会番号15000140承認 承認番号2019-0423号)

O-1-8-87

無構造ナノレベル超平滑チタン表面を使用した血中チタン接着タンパク質探索を基点としたオッセオインテグレーション機構解明

○秋葉 陽介, 秋葉 奈美, 江口 香里, Ochoa Escate Dagny
新潟大学医歯学総合研究科生体歯科補綴学分野

Elucidation of the osseointegration mechanism based on the search for titanium adhesive proteins in blood using an unstructured nano-level ultra-smooth titanium surface

○AKIBA Y, AKIBA N, EGUCHI K,
OCHOA ESCATE D

Division of Bio-Prosthetics, Faculty of Dentistry & Graduate School of Medical and Dental sciences, Niigata University

I 目的: オッセオインテグレーションは骨とチタンの間に有機層を介した間接的な結合であることは知られているが、その結合機構や有機層については不明な点が多い。インプラント埋入の際にチタン表面は窩洞内の血液に接触し、血液中のチタン接着タンパク質が、それに続く細胞接着に影響を与えていると考えられる。既存の血中チタン接着タンパク質探索研究は、機械研磨表面を使用しており、チタン非接着タンパク質の機械的嵌合を許容するため十分な探索が行われていない。本研究は機会的嵌合が不可能な無構造ナノレベル超平滑チタン表面を用いて血中チタン接着タンパク質群を同定し、これを基点にオッセオインテグレーション機構を解明しようとする研究である。

II 材料および方法: 実験動物にラットを使用し採取した血液や骨髄由来細胞を用いて実験を行った。表面粗さ0.6nmの無構造超平滑チタン表面を作製し、ラット血液を播種、洗浄し、骨髄由来細胞の接着促進を確認した。チタン表面に接着したチタン接着タンパク質群を回収し、回収タンパク質を質量分析した。得られた蛋白質群に対してタンパク質データベースから、機能解析を実施した。実際に機能検証を行う候補タンパク質を選択し、細胞接着促進、石灰化促進、オッセオインテグレーション促進の各作用について確認を行った。

III 結果: ラット血液を播種、洗浄した超平滑チタン表面から、タンパク質を回収し、質量分析を実施したところ、326種類のチタン接着タンパク質と考えられる解析候補タンパク質群が得られた。STRINGを用いたプロテオーム解析により細胞接着に関連するタンパク質群を選別し、さらに解析可能候補タンパク質(X)(論文投稿中)を選別した。タンパク質Xのリコンビナントタンパク質を超平滑チタン表面に播種、洗浄し、骨髄由来細胞を播種し、細胞接着促進機能を確認したところ、各フィブロネクチン、アルブミン、PBS播種表面と比較してタンパク質Xのみ有意に細胞接着を促進した。タンパク質Xは石灰化促進作用を示さなかった。ラットインプラント埋入モデルにおいて、タンパク質Xはインプラント周囲骨形成を促進した。

IV 考察および結論: 無構造超平滑基板によってラット血液中より同定されたチタン接着タンパク質Xは骨形成促進作用を持たないが、細胞接着促進機能を持ち、オッセオインテグレーション促進可能なことが示された。

(動物実験委員会承認 承認番号SA00990号)