

<抄録>8. Platelet-Rich Plasmaの基礎的実験について第1報 血小板の濃縮

著者名(日)	川田 丈司, 越智 守生, 広瀬 由紀人, 八島 明弘, 加々見 寛行, 國安 宏哉, 坂口 邦彦
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	179-180
発行年	2002-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008713/

【考察】これらの結果から、GFP-IP₃R3融合タンパクが細胞内膜上に発現していることが示された。このことは、GFP-IP₃R3融合タンパクが機能的なIP₃Rとして働く可

能性を示唆しており、IP₃Rの局在とシグナル応答との関係の解明に役立つと期待される。

7. *P. gingivalis* 菌体のプロテオーム解析のための2D電気泳動について

○鎌口 有秀, 馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

【目的】歯周病の主要原因細菌の1つである*P. gingivalis*のゲノムの全シーケンスの解析はほぼ終了しており、ポストゲノム解析が可能になりつつある。ポストゲノム解析の1つであるプロテオーム解析を行う場合、目的物質を可溶化後、2D電気泳動し、各スポットを質量分析装置で解析するが、質量分析装置がない場合は2D電気泳動後、プロテインシーケンサーを用いて解析する。後者の場合ゲルをCBBにてスポットが検出できる程度のタンパク質量が必要となる。今回はプロテインシーケンサー使用を前提とした*P. gingivalis*の2D電気泳動の為の可溶化条件について検討した。

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277の菌体およびタンパク質の可溶化にCHAPS, 2-ME, DTT, Urea, Thio Urea, Tris等を用いた。また、protease阻害剤としてTLCKを用いた。1次元目のIEFはImmobiline Dry Strip使用してIPGphorを用いて行った。2次元目は

12.5%ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。

【結果および考察】*P. gingivalis*は1%から4%のCHAPSのみでも菌体は完全に溶解した。しかし、これらを試料とした場合、2D電気泳動パターンは良好でなかった。この原因の1つとしてproteaseの影響も考えられたため、CHAPS溶液にTLCKを添加した。TLCKを0.2mM, 0.5mM添加した場合はCHAPSで菌体は容易に溶解したが、2D電気泳動パターンは良好でなかった。ついで、TLCKを50mM添加した場合、菌体はCHAPSで殆ど溶解しなかった。菌体を溶解させるため加熱後、Ureaを添加しソニケーションした。この結果菌体は大部分溶解した。この可溶化物を超遠心後試料とした。2D電気泳動パターンは比較的良好的な結果が得られた。〔会員外共同研究者：中山浩次（長崎大・歯）中野みよ、太田美智男（名大・医）渡辺俊弘、大山徹（東京農大・生化）〕

8. Platelet-Rich Plasmaの基礎的実験について第1報 血小板の濃縮

○川田 丈司, 越智 守生, 広瀬由紀人, 八島 明弘, 加々見寛行, 國安 宏哉, 坂口 邦彦
(北海道医療大学歯学部歯科補綴学第2講座)

【目的】顎骨に欠損が生じている部位に補綴処置を施す場合、自家骨や骨補填材を骨の補填および骨の再生目的で使用している。しかし、自家骨移植は外科的侵襲や疼痛が大きく、また人工材料であるの骨補填材は高価で、生体適合性は自家骨より劣る。一方、自己血から採取するPlatelet-Rich Plasma(以下PRP)は、TGF- β , PDGF, IGFなどの成長因子が含まれているため、近年は骨再生療法の応用に対してもその有効性が報告されている。今回、臨床で用いられている血小板濃縮法をイヌとウサギに応用して、採取したPRP中の血小板濃縮率を検討した。さらに血小板濃縮法の改良を試み、PRPに含まれる血小板の濃縮の向上を検討した。

【方法】体重約3kgの日本白色種ウサギ雄7羽、体重約

10kgビーグル犬雄3頭、体重約70kg男性3名を被験体とした。採血後、遠心分離装置を用いて、1回目の遠心分離を低速(2400回転)で10分、2回目を高速(3600回転)で15分行った。血小板成分の乏しい分画(PPP)である上澄みはシリンジにて吸引除去し、その残りをPRP(多血小板血漿)とし、その中に含まれる血小板数を測定し、全血の血小板数と比較した。ウサギにおいては、さらに、1.採血時間の短縮、2.遠心分離後の血小板を採取するための採取位置の改良、3.血小板採取用の針の加工、について改良を加えた。

【結果と考察】臨床で用いられている、血小板濃縮法を動物に応用した場合、ヒトでは平均濃縮率6.3倍だったのに対して、イヌでは平均濃縮率6.5倍、ウサギでは平均

濃縮率2.6倍だった。改良血小板濃縮法をウサギに対して応用した結果、血小板平均濃縮率は7.7倍に向上した。本

改良法は、PRPの採取に有効であった。

9. TGF- β 1はSmad2, PI3K-Aktを介して口腔扁平上皮癌細胞の運動性と基質分解酵素産生を促進する

○岡崎 有志, 奥村 一彦, 荒川 俊哉*, 細川洋一郎**, 田中 力延**, 木下 隆二, 金澤 正昭
(北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座・**北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座)

【目的】すでに我々は、口腔扁平上皮癌細胞でTGF- β 1のオートクリン, パラクリン作用により浸潤が促進され、これらは中和抗体で抑制されることを報告した。最近、頭頸部癌において、脂質キナーゼであるPI3Kの触媒蛋白質p110 α をコードするPIK3CA遺伝子の増幅や過剰発現がしばしば認められ、腫瘍増殖や転移に関与する癌遺伝子として重要であることが報告された。そこで、TGF- β 1による浸潤シグナルにPI3Kが関与するか否か検討した。

【方法】当講座で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株SAS-H1, IS-FOM, IT-GAを用いた。1)無血清下で癌細胞にrhTGF- β 1を作用させ24-48時間経過後の培養液を回収し、癌細胞が産生分泌する基質分解酵素をザイモグラフィで検討した。2)rhTGF- β 1を作用させた際に、癌細胞膜表層に結合して発現するMMP-9についてピオチン化標識細胞を用いて、ザイモグラフィで検討した。3)細胞遊走能の検討は、Boyden chamber法を用いた。4)PI3K阻害剤LY294002処理癌細胞の基質分解酵素産生、細胞遊走能について検討した。5)rhTGF- β 1処理癌細胞のリン酸化Smad2とリン酸化Aktについて、ウエス

タンブロットで検討した。

【結果と考察】1)rhTGF- β 1の濃度依存的に培養液中のMMP-9の産生分泌が促進された。LY294002の処理により濃度依存性にMMP-9の産生分泌が抑制された。2)rhTGF- β 1を作用させた際に、癌細胞表層にMMP-9が発現していた。この発現はMAPK阻害剤PD98059ではやや抑制されるが、PI3K阻害剤LY294002では完全に抑制された。3)細胞遊走能はrhTGF- β 1の濃度依存性に促進され、LY294002で完全に抑制された。4)rhTGF- β 1処理により、癌細胞のSmad2とAktのリン酸化についてウエスタンブロットで検討したところ、両者のリン酸化が刺激後30分で認められた。またこのリン酸化はLY294002処理で阻害された。これらの結果から、癌細胞はrhTGF- β 1刺激によりSmad2とAktのリン酸化を生じて、Aktへのシグナルは主に細胞運動性に働き、リン酸化Smad2はSmad4と結合して核移行し、MMP-9の転写レベルを上昇させて細胞膜表層および培養液中のMMP9を促進していることが示唆された。

10. 嚥下域における食塊のレオロジー的物性変化

○飯田 唯勝, 越野 寿, 横山 雄一, 服部 真幸, 松実 珠千, 石島 勉, 平井 敏博
(北海道医療大学歯学部歯科補綴学第1講座)

【目的】近年、高齢者のQOLの確保の観点から、咀嚼・嚥下の重要性が注目されている。咀嚼・嚥下は一連の摂食行動であるため、両者を統合した客観的な機能評価法の確立が必要となる。このことを目的として、われわれは、咀嚼して嚥下域に至った食塊のレオロジー的物性に着目し、検討を重ねている。

本研究では、種々の食品を咀嚼した後に嚥下域に至った食塊のレオロジー的物性の分析と、嚥下域に至る迄の咀嚼回数との関連を検討した。

【方法】まず、平井らの考案した「摂取可能食品質問表」

に採用されている試験食品35品目のうちクリープメータ物性試験システムで測定が可能であった31品目のデータをクリープメータ自動解析装置にてテクスチャー解析を行った。次に、顎口腔系機能に自覚的・他覚的に異常が認められない正常有歯顎者9名を被験者として、先の31品目を通常一口摂取量にて自由に咀嚼させた後に、嚥下直前で吐き出させ、試料を採取すると共に、咀嚼回数を計測した。採取した試料は、先の実験と同様に食塊の物性を解析した。さらに、良好な経過を辿っている全部床義歯装着者7名を被験者として、通常一口摂取量の