

Hydroxyapatite formed on/in agarose gel induces activation of blood coagulation and platelets aggregation

(ハイドロキシアパタイト/アガロースゲルは血液凝固と血小板凝集を活性化する)

鹿児島大学大学院歯学研究科

(指導教員 杉原一正教授)

申請者氏名 有村真一郎

口腔外科領域において、顎骨の欠損や非生理的吸収は臨床上重要な問題点である。現在のところ、顎骨再建の多くは自家骨移植や多種動物由来の材料により行われている。しかし、自家骨移植は採取時における二次的侵襲や採取量の制限などの問題点を抱えている。これらの問題点を解決するために、様々な生体材料が開発されてきた。本研究の目的は交互浸漬法により作製したハイドロキシアパタイト/アガロースゲル(以下, HA/agarose)の血液凝固、血小板活性に与える効果を検索し市販されている粒状ハイドロキシアパタイト(以下, 粒状アパタイト)との止血効果を比較することである。

(材料と方法)

今回使用した HA/agarose は 4° C の条件下で塩化カルシウム水溶液(200 mM, pH 7.4)とリン酸ナトリウム(120 mM, pH 7.4)にアガロースゲルを 2 時間ずつ浸漬させる作業を 1 サイクルとし、これを 12 サイクル行う交互浸漬法にて作製した。このように作製された HA/agarose と市販の粒状アパタイトについて次のような検討を加えた。

1. HA/agarose が内因系凝固時間 (APTT) と外因系凝固時間 (PT) に与える影響をそれぞれ Pathrontin と Thromborel を用いて粒状アパタイトと比較検討した。
2. 両材料が ADP 誘因性の血小板凝集に与える影響を比較検討した。
3. HA/agarose と血中の Vitronectin との結合を Western blotting 法にて検討した。
4. HA/agarose と粒状アパタイトの X 線回析を行い、それぞれの表面構造を SEM にて観察した。

(結果)

1. APTT において HA/agarose はコントロールを 100%とした場合に 55%と有意な凝固時間の短縮を示した。粒状アパタイトにおいては量が増すごとに APTT の延長が認められた。

2. HA/agarose はコントロールと比較して高い血小板凝集作用を認めたが、粒状アパタイトの血小板凝集作用はコントロールより低かった。
3. Western blotting 法にて HA/agarose に特異的な Vitronectin の吸着が認められた。
4. X 線回析にて HA/agarose と粒状アパタイトの両者にハイドロキシアパタイトの結晶を示す同様なピークを認めた。しかし、ピークの強さは粒状アパタイトの方が HA/agarose より非常に高かった。
SEM にて表面構造を観察したところ中倍像において HA/agarose では 20-50 μ m の粒子が、粒状アパタイトでは 50-100 μ m の粒子が認められた。さらに高倍像では HA/agarose においては 100-200nm の粒子が、粒状アパタイトでは 50-100nm のチューブ状の凝集塊が認められた。

(考察ならびに結論)

今回の研究により HA/agarose は著明に APTT を短縮させ、さらに ADP 誘因性の血小板凝集を促進させることが判明した。この結果から、HA/agarose は血小板による一次止血と、血液凝固因子による二次止血(血栓形成)を促進させることが示唆された。一方、粒状アパタイトは、量が増すごとに APTT は延長し、血小板凝集促進効果も示さなかった。さらに Western blotting 法による検索結果より HA/agarose には著明に Vitronectin が吸着されることが明らかとなった。Vitronectin は多機能をもつ糖タンパクで血漿や細胞外マトリックスに存在し、フィブリン塊中へ結合し血栓形成、血管新生、創傷治癒において、止血、線溶、細胞吸着や移動などを促進する役割を果たすといわれている。本研究結果は HA/agarose が Vitronectin を吸収することで血液凝固と同じく、創傷治癒も促進している可能性を示唆している。また X 線回析において、粒状アパタイトの結晶性は HA/agarose よりはるかに高いという結果が得られた。この結晶性の違いが APTT の短縮効果や Vitronectin の吸着効果の差につながっている可能性もある。SEM により 100-200nm の微粒子が HA/agarose の表面に観察されたが、この低結晶性微粒子構造がその止血効果に重要な役割を果たしている可能性も示唆された。

以上、HA/agarose は著しく APTT を短縮し ADP 誘因性の血小板凝集も促進させ、Vitronectin は HA/agarose に選択的に吸着された。また、HA/agarose 表面には直径 100-200nm の低結晶性微粒子構造が観察されたことにより、これらの構造が血液凝固の足場を提供し、凝固関連因子を吸着することで止血促進効果をもたらすものと思われた。

(Journal of Biomedical Material Research: Part B - Applied Biomaterials 掲載予定)

報告番号	歯研第 135 号	氏名	有村 真一郎	
論文審査担当者	主査	杉原 一正		
	副査	植村 正憲	梶山 加綱	藤井 孝一

Hydroxyapatite formed on/in agarose induces activation of blood coagulation and platelets aggregation

(ハイドロキシアパタイト/アガロースゲルは血液凝固と血小板凝集を活性化
する)

口腔外科領域における顎骨再建の多くは自家骨移植や動物由来の人工材料により行われている。自家骨移植は骨採取時における二次的侵襲や採取量の制限などの問題があり、これを解決するために種々の生体材料が開発されてきた。本研究の目的は、骨充填用生体材料として開発されたハイドロキシアパタイト/アガロースゲル（以下、HA/agarose）の血液凝固、血小板活性に与える効果を検索し、市販されている粒状ハイドロキシアパタイト（以下、粒状アパタイト）との止血効果を比較することである。

（材料と方法）今回使用した HA/agarose は 4℃ の条件下で塩化カルシウム水溶液とリン酸ナトリウム水溶液にアガロースゲルを 2 時間ずつ浸漬する作業を 12 サイクル行う交互浸漬法にて作製した。この HA/agarose と市販の粒状アパタイトについて、① HA/agarose が内因系凝固時間 (APTT) と外因系凝固時間 (PT) に与える影響を pathromtin と thromborel を用いて測定し粒状アパタイトと比較検討した。② 両材料が ADP による血小板凝集に与える影響を比較検討した。③ HA/agarose と血中 vitronectin との結合を Western blotting 法を用いて検討した。④ HA/agarose と粒状アパタイトの X 線回折を行うとともに、それぞれの表面構造を SEM にて観察した。

（結果）① APTT において HA/agarose は対照群を 100% とした場合に 55% と有意な内因系凝固時間の短縮が認められた。一方、粒状アパタイトにおいてはその量が増すごとに内因系凝固時間の延長が認められた。② HA/agarose は ADP による血小板凝集を増強したが、粒状アパタイトは ADP による血小板凝集を増強しなかった。③ Western blotting 法にて HA/agarose に vitronectin の特異的吸着が認められた。④ X 線回折にて HA/agarose と粒状アパタイトの両者にハイドロキシアパタイトの結晶を示す同様なピークを認めた。ピークの強さは粒状アパタイトの方が HA/agarose よりも非常に高かった。SEM による表面構造の観察では、中倍像で HA/agarose では 20-50 μm の粒子が、粒状アパタイトでは 50-100 μm の粒子が観察された。高倍像では HA/agarose では 100-200nm の粒子が、粒状アパタイトでは 50-100nm のチューブ状構造物が観察された。

（考察ならびに結論）今回の研究より HA/agarose は著明に内因系凝固時間を短縮させ、ADP による血小板凝集を促進させることが明らかとなった。この結果より、HA/agarose は血小板による一次止血と血液凝固因子による二次止血（血栓形成）を促進することが示唆された。一方、粒状アパタイトは量が増すごとに内因系凝固時間は延長し血小板凝集促進効果も示さなかった。さらに、Western blotting 法による検索で HA/agarose は vitronectin に著明に吸着されることも明らかになった。また、X 線回折では粒状アパタイトの結晶性は HA/agarose よりはるかに高く、SEM による観察では HA/agarose の表面には 100-200nm の微粒子が観察されたことより、この低結晶性微粒子構造が内因性凝固時間の短縮や vitronectin の吸着効果の差に関連している可能性が示唆された。

以上、本論文は、HA/agarose が内因性凝固時間を短縮し、ADP による血小板凝集も促進し、vitronectin とともに特異的に吸着することを明らかにするとともに HA/agarose の低結晶性微粒子構造が血液凝固の足場を提供し、凝固関連因子を吸着することで止血促進効果をもたらす可能性を示唆している。

よって、本審査委員会は本論文が学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報 告 番 号	歯 研 第 135 号	氏 名 有 村 真一郎		
論文審査担当者	主 査	杉原 一正		
	副 査	植村 正憲	梶山 加綱	藤井 孝一
<p>審査委員会は、平成18年12月13日(水)に、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めると共に、これと関連する血液凝固機構、生体材料の種類と特徴、X線回折法、走査型電子顕微鏡の特徴などについても試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格をもつものと判断した。</p>				