

-大学院歯学独立研究科-
第 129 回 大学院 研究科 発表会 プログラム

大学院学生等が、これまでの研究成果を発表します。
どなたでも聴講できますので、多数の参加をお待ちしております (聴講申込不要)

場 所：実習館 2 階 総合歯科医学研究所セミナー室

日 時：2025 年 12 月 17 日 (水) 15 時 55 分 開会

-2025 年 12 月 17 日 (水) -

No.	発表区分・予定時間	演題名・発表者	審査委員
	15:55	開会挨拶 平岡研究科長	-
1	[大学院] 16:00~16:30 司会:影山 教授	「顎矯正手術前後における骨格性下顎前突者の口唇閉鎖調節能力 (Voluntary lip closure control ability in patients with skeletal mandibular protrusion before and after orthognathic surgery)」 張 璐瑶 硬組織疾患制御再建学 臨床病態評価学	主査:大須賀教授 副査:北川教授 :谷山准教授
2	[大学院] 16:30~17:00 司会:吉成 教授	「実験的歯周炎による SAA を介したアテローム性動脈硬化悪化の機序 の解明」 大谷 有希 健康増進口腔科学 口腔健康分析学	主査:中村浩彰 教授 副査:大須賀教授 :平岡 特任教授
3	[大学院] 17:00~17:30 司会:吉田 教授	「銀イオンの口腔内細菌および口腔内試料への抗菌効果の解析」 根津 英之 健康増進口腔科学 口腔健康分析学	主査:吉成教授 副査:山下教授 :栗原教授
4	[大学院] 17:30~18:00 司会:吉田 教授	「ヒト常在細菌抗原に対する IgG4 関連疾患血清の特異的反応性の解析」 植野 裕司 健康増進口腔科学 口腔健康分析学	主査:平賀教授 副査:平岡 特任教授 :栗原教授

発表内容の要旨(課程博士)

Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No.	ID#G 2210	入学年 Entrance Year	2022 年 Year
(ふりがな)	ちょう ろよう		
氏名 Name in Full	張 璐瑶		
専攻分野 Major Field	硬組織疾患制御再建学講座		
主指導教員 Chief Academic Advisor	影山 徹		
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation			
顎矯正手術前後における骨格性下顎前突者の口唇閉鎖調節能力 Voluntary lip closure control ability in patients with skeletal mandibular protrusion before and after orthognathic surgery			
発表要旨 / Abstract			
<p>1. 目的</p> <p>口唇は様々な口腔機能を営む中で顎顔面領域において重要な組織であり、口唇閉鎖機能は咀嚼、嚥下、発音、表情による感情の表出に重要な役割を担っている。不正咬合者と口唇閉鎖力の関連は、様々な研究で示されてきた。しかし、顎矯正手術の前後における最大口唇閉鎖力と随意的な口唇機能力の変化はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、多方位口唇閉鎖力測定装置を用いて、ビジュアルフィードバックによる口唇閉鎖の調節能力を方向別に評価できるシステムにより、骨格性下顎前突者の術前後における口唇閉鎖調節能力を個性正常咬合者と比較し、顎矯正手術後における形態改善後の口唇の調整能力を明らかにすることとした。</p> <p>2. 方法</p> <p>松本歯科大学病院矯正歯科に来院し、外科的矯正治療の適応と診断された骨格性下顎前突者 24 名(女性,平均年齢 20.0±6.2 歳)について調査を実施した。骨格性下顎前突者は、下顎偏位を伴わない者(以下,下顎前突非偏位群)16 名,下顎偏位を伴う者(下顎骨正中(Me)が顔面正中から 4mm 以上偏位:以下,下顎前突偏位群)8 名に分類した。対象として、個性正常咬合者 22 名(女性,22.7±3.3 歳)を松本歯科大学病院のスタッフから募った(以下,正常咬合群)。データの採取は手術直前と術後 6 か月時に行なった。口唇閉鎖力の測定には多方位口唇閉鎖力測定装置を用い、被験者自身の発揮する口唇閉鎖力の大きさを多方位口唇力測定装置に視覚的に見ることができるようビジュアルフィードバック用のサブディスプレイを設置した。最初に、最大口唇閉鎖力の測定を上下 2 方向と斜め 4 方向(左上方向,左下方,向右上方向,右下方向)の 6 方向それぞれを測定した。次に、口唇閉鎖調節能力の測定としてディスプレイ上に最大口唇閉鎖力の 50%の値を目標として表示し、自らの発揮する口唇閉鎖力を目標に一致するように調節することを指示した。この際、被験者にはサブディスプレイ上に表示された目標に 6 秒間維持することを指示し、その測定を連続で 3 回行い、正確率を算出し、各群間で統計処理を行った。</p> <p>3. 結果及び考察</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 術後における下顎前突偏位群の最大口唇閉鎖力は術前と比較し、上唇三方向が正常咬合群に近づく傾向を示したものの、有意差を認めなかった。 ● 下顎前突偏位群の口唇閉鎖調節能力は、術前より大きくなり正常に近づく傾向を示しものの、有意差を認めなかった。 ● 下顎前突非偏位群の最大口唇閉鎖力はすべての方向で術前より術後に有意に高い値を示した。 ● 下顎前突非偏位群の口唇閉鎖調節能力は、術前と比較し、全方向で有意に増加した。 <p>4. 結論</p> <p>本研究結果より、口唇閉鎖の調節能力は外科的矯正治療により、増加する傾向を示した。骨格性下顎前突者における顎矯正手術による骨格系の形態改善は、口唇運動にも機能面での改善を認めることが明らかとなった。</p>			

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No. (ふりがな)	ID#G 2205	入学年 Entrance Year	2022 年 Year
氏名 Name in Full	おおたに ゆうき 大谷 有希		
専攻分野 Major Field	口腔健康分析学		
主指導教員 Chief Academic Advisor	吉成伸夫		
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation			
実験的歯周炎による SAA を介したアテローム性動脈硬化悪化の機序の解明。 Elucidation of the mechanism of atherosclerotic progression mediated by SAA in experimental periodontitis.			
発表要旨 / Abstract			
<p><目的></p> <p>歯周病は歯周組織の慢性炎症性疾患である。多くの研究より心臓血管疾患、糖尿病、関節リウマチ、アルツハイマー病などの全身疾患のリスク因子として報告されている。この中で、歯周病と動脈硬化症との関連に関して、既知の交絡因子とは独立しているが、因果関係はまだ不明であると報告されている。</p> <p>我々の先行研究では、C57BL/6 マウスと ApoE^(-/-)マウスに IL-6 を投与することで、両マウス共に Serum Amyloid A (SAA) の mRNA レベル、血清タンパク質レベルが増加し、IL-6 を投与した ApoE^(-/-)マウスは大動脈脂肪沈着量が有意に増加した。さらに、SAA 処理を受けた血管内皮細胞(Human Aortic Endothelial Cells: HAECs)では、接着分子(VCAM-1、MCP1、ICAM-1)と Toll 様受容体 2 (TLR2) の mRNA 発現が増加した。さらに、TLR2 は免疫組織化学染色より大動脈近位部で観察された。このことから IL-6 が肝細胞に SAA を産生させ、SAA が血管にアテローム沈着を誘導するマクロファージ接着因子を発現させるルートを発見した。</p> <p>本研究では、歯周病による慢性炎症から動脈硬化症への影響を調べるため、高脂肪食で飼育した ApoE^(-/-)マウスに臼歯結紮で実験的歯周炎マウスを作製し、実験的歯周炎下での IL-6、SAA の上昇、血中の HDL と LDL コレステロール値、アテローム性動脈硬化症の進行、増大への影響程度を観察、検討した。</p> <p><材料・方法></p> <p>C57BL/6 マウス、ApoE^(-/-)マウスを 17 週齢時に①コントロール群、②絹糸結紮による実験的歯周炎群、③ <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P.g.</i>)菌投与による実験的歯周炎群、④絹糸結紮と <i>P.g.</i>菌投与を併用した実験的歯周炎群の 4 群に分けた。絹糸結紮群は、上顎両側第 2 臼歯に 7-0 絹糸を結紮し、5 週間飼育した。<i>P.g.</i>菌投与は <i>P.g.</i> ATCC33277 株 1×10⁹ CFU/μl をゾンデによる胃内投与で週 3 回、5 週間施行した。5 週後の 22 週齢時に動物を安楽死させ、上顎両側第 2 臼歯周囲の歯槽骨吸収量、血液中の IL-6 と SAA タンパク質量、HDL、LDL コレステロール、ApoE^(-/-)マウスにおける大動脈の脂肪沈着率を測定した。統計解析は平均値に対応のない t 検定を使用した。</p> <p><結果></p> <p>歯槽骨吸収量は実験的歯周炎群で有意に増加し、結紮+ <i>P.g.</i>群、結紮群、<i>P.g.</i>群、コントロール群の順で多かった。ApoE^(-/-)マウスにおいて、血液中 IL-6 量はコントロール群と比較して、結紮群で高い傾向が見られた(p=0.096)。SAA タンパク質量は、ApoE^(-/-)マウスが C57BL/6 マウスより有意に高かった(p=0.03)。また、C57BL/6、ApoE^(-/-)マウス内においてコントロール群と比較して、結紮群では SAA タンパク質量が高い傾向がみられた(p=0.089) (p=0.075)。大動脈の脂肪沈着率は ApoE^(-/-)マウスではコントロール群と比較して、結紮群で大動脈脂肪沈着率が高い傾向が見られた(p=0.067)。さらに、結紮+ <i>P.g.</i>群では大動脈脂肪沈着率が有意に高かった(p=0.007)。</p> <p><結論></p> <p>IL-6 と SAA 量は ApoE^(-/-)マウスでは結紮による実験的歯周炎において増加する傾向が見られた。このことから実験的歯周炎により血中 IL-6 が上昇した結果、SAA も上昇したことが示唆される。さらに、大動脈脂肪沈着率は結紮群と結紮+ <i>P.g.</i>群で増加する傾向が見られた。よって、結紮による実験的歯周炎は動脈硬化を悪化させる可能性がある。</p>			

発表内容の要旨(課程博士)

Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学 籍 番 号 Student ID No.	ID#G 2105	入 学 年 Entrance Year	2021	年 Year
(ふりがな)	ねづ ひでゆき			
氏 名 Name in Full	根津 英之			
専 攻 分 野 Major Field	口腔健康分析学			
主 指 導 教 員 Chief Academic Advisor	吉田 明弘 教授			
発 表 会 区 分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation				
銀イオンの口腔内細菌および口腔内試料への抗菌効果の解析				
発表要旨 / Abstract				
<p>【目的】 銀イオンは抗菌作用をもつ金属イオンであるが、口腔細菌や口腔内試料に対する抗菌作用の報告は少ない。今回我々は、各種口腔細菌、ヒト歯肉縁上プラーク細菌およびヒト唾液細菌への銀イオンによる抗菌効果を解析した。更に唾液細菌叢の銀イオン感受性菌の同定を試みた。</p> <p>【材料・方法】 松本歯科大学微生物学講座に保存されている口腔細菌標準株、および5名の被験者より採取したヒト歯肉縁上プラーク細菌と唾液細菌(松本歯科大学研究等倫理審査委員会承認 許可番号 0377号)を各種濃度の銀イオンを含む Brain Heart Infusion (BHI) 培地【<i>Porphyromonas gingivalis</i>のみ GAM(Gifu Anaerobic Medium)培地】で、24時間嫌気培養を行い、最小発育阻止濃度(MIC)を解析した。次に採集したヒト唾液細菌を MIC (4.0 ppm)の銀イオンの有無で培養し、次世代シーケンスを用いた細菌叢解析を行った。</p> <p>【結果】 口腔細菌標準株に対して銀イオンの MIC は 2.0-4.0 ppm の範囲であった。ヒト歯肉縁上プラーク細菌および唾液細菌の MIC は全て 4.0 ppm であった。<i>Porphyromonas gingivalis</i> は ATCC33277 株で 32.0 ppm、硫化水素産生能減弱株である Δ PG0343 株(methionine γ-lyase 遺伝子欠損株)で 20.0 ppm であった。MIC(4.0 ppm)の銀イオンを含む培地を用いた細菌叢解析で銀イオンによる有意な抗菌効果を認めたものは、<i>Veillonella</i> 属、<i>Aggregatibacter</i> 属、<i>Fusobacterium</i> 属、<i>Campylobacter</i> 属、<i>Kingella</i> 属、<i>Gemella</i> 属であった(Wilcoxon の符号付順位検定 $p < 0.05$)。</p> <p>【結論・考察】 銀イオンには口腔レンサ球菌に対して MIC=2.0 ppm から 4.0 ppm の範囲で、歯肉縁上プラーク細菌や唾液細菌に対しては MIC=4.0 ppm で発育抑制効果があることが明らかになった。<i>P. gingivalis</i> は硫化水素を産生することが知られている。硫化水素は銀イオンと硫化銀を形成することから、<i>P. gingivalis</i> は銀イオンに対する耐性があると考えられ、硫化水素を産生しない口腔レンサ球菌、一般細菌と比較して高い MIC を示した。硫化水素を産生する <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 株は硫化水素産生能減弱株である Δ PG0343 株と比較し高い MIC を示し、この結果から硫化水素と銀イオンが結合することにより、<i>P. gingivalis</i> への直接の作用が阻害されている可能性が示唆された。また細菌叢解析の結果から、銀イオンに感受性がある特定の細菌属が同定され、一部の細菌の銀イオン耐性には硫化水素の産生性が関与することが明らかになった。</p>				

発表内容の要旨(課程博士)

Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No. (ふりがな)	ID#G 2202	入学年 Entrance Year	2022	年 Year
氏名 Name in Full	植野 裕司			
専攻分野 Major Field	健康増進口腔科学講座 口腔健康分析学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	吉田 明弘 教授			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation				
ヒト常在細菌抗原に対する IgG4 関連疾患血清の特異的反応性の解析				
発表要旨 / Abstract				
<p>【目的】 IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は、涙腺・唾液腺炎や自己免疫性膵炎をはじめとする全身性炎症性疾患であり、血中 IgG4 高値、IgG4 陽性形質細胞浸潤、自己抗体の存在を特徴とする自己免疫疾患と考えられている。本疾患は発症前に明らかな感染症症状を認めないことや、高齢での発症が多いことから、常在微生物との免疫応答が関与する可能性が指摘されている。そこで本研究では、IgG4-RD 患者血清中 IgG4 抗体が特異的に認識する常在細菌由来抗原の探索を目的とした。</p> <p>【方法】 複数の微生物抗原を対象に、IgG4-RD 患者 125 名および膵癌、慢性膵炎、IgG4 類似疾患、原発性硬化性胆管炎、原発性胆汁性胆管炎患者および健常者を含む 265 検体の血清を用いて、ELISA 法による IgG4 抗体との反応性を、群間比較解析および ROC 解析を用いて評価した。その結果、IgG4-RD 患者血清と特異的に反応する抗原を含む微生物画分として、細菌 α 由来のクルード画分 X を同定した。さらに、Western blot 法により健常者血清 2 検体および患者血清 2 検体を解析し、IgG4-RD 患者血清中の IgG4 抗体が特異的に反応するタンパク質分子の探索を行った。得られたバンドパターンから、IgG4-RD 群で特異的に認められる約 70 kDa 付近のバンドに着目した。続いて、Western blot で反応が確認された条件を用いて検体数を 56 検体に拡大し、スケールアップスタディを実施した。次に、クルード画分 X を SDS-PAGE により電気泳動し、70 kDa に相当する領域を含むバンドのみを切り出した。切り出したゲル片に対し、酵素消化後にナノ液体クロマトグラフィー結合タンデム質量分析 (nano LC-MS/MS) を用いて、候補タンパク質分子の同定を試みた。</p> <p>【結果】 ELISA 法による解析の結果、細菌 α 由来クルード画分 X は IgG4-RD 患者血清に特異的に反応し、他疾患群や健常者との間に有意差が認められた ($P < 0.001$)。Western blot 法による解析では、患者血清においてのみ 70 kDa 付近に特異的に反応するタンパク質バンドが検出され、本研究における解析ターゲットとして設定した。さらに、これらの条件を用いて検体数を 56 検体に拡大したスケールアップスタディを実施した結果、IgG4-RD 群において特異度 97% で 70 kDa 付近のバンドへの特異的反応性が再現された。以上の結果から、画分 X 中の 70 kDa 付近の特定タンパク質が IgG4-RD に特異的に認識される可能性が示唆された。</p> <p>次に、この 70 kDa 領域のタンパク質の同定を目的として、クルード画分 X を SDS-PAGE により電気泳動し、該当バンドを切り出して nano LC-MS/MS を実施した。その結果、画分 X 中に含まれる候補タンパク質分子が同定され、IgG4-RD 患者血清中 IgG4 抗体の主要な標的となり得る特異的抗原の存在が示唆された。</p> <p>【考察と結論】 本研究では、細菌 α 由来クルード画分 X に対する IgG4 抗体反応性が IgG4-RD に特異的であることが ELISA 法および Western blot 法の両方で確認された。特に、IgG4-RD 群で高頻度に認められた 70 kDa 付近の特異的バンドは、他疾患群でほとんど検出されず、画分 X 中に IgG4-RD 特異的抗原が存在する可能性が示唆された。さらに、質量分析により同領域から単一の候補タンパク質が抽出され、抗原実体の解明に向けた重要な手がかりが得られた。以上より、画分 X に含まれる 70 kDa タンパク質への免疫応答は IgG4-RD に特異的であることを反映しており、病因解明や新たな診断補助マーカーの開発へつながる可能性が示唆された。</p>				

-大学院歯学独立研究科-
第 129 回 大学院 研究科 発表会 プログラム

大学院学生等が、これまでの研究成果を発表します。
どなたでも聴講できますので、多数の参加をお待ちしております (聴講申込不要)

場 所：実習館 2 階 総合歯科医学研究所セミナー室

日 時：2025 年 12 月 18 日 (木) 17 時 25 分 開会

—2025 年 12 月 18 日 (木) —

No.	発表区分・予定時間	演題名・発表者	審査委員
	17:25	開会挨拶 平岡研究科長	—
1	[大学院] 17:30~18:00 司会:宇田川 教授	「インプラント埋入荷重と埋入トルク値の関係 (Effect of insertion load on insertion torque value)」 薛 博元 硬組織疾患制御再建学 硬組織機能解析学	主査:栗原教授 副査:吉成教授 :洞澤准教授
2	[大学院] 18:00~18:30 司会:芳澤 教授	「間葉系幹細胞スフェロイドが移植歯の歯周組織再生に及ぼす影響」 文 竹 硬組織疾患制御再建学 硬組織発生・再生工学	主査:山下教授 副査:小林教授 :田口教授
3	[大学院] 18:30~19:00 司会:栗原 教授	「生体吸収性ポリ-L-乳(PLLA) プレーットの生体内微小環境への影響の 解析 (Analysis of the effects of PLLA plates on the in vivo microenvironment)」 小口 直人 硬組織疾患制御再建学 硬組織疾患病態解析学	主査:芳澤教授 副査:石田講師 :川原一郎 教授

発表内容の要旨 (課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No.	ID#G 2419	入学年 Entrance Year	2024 年 Year
(ふりがな)	せつ はくげん		
氏名 Name in Full	薛 博元		
専攻分野 Major Field	硬組織機能解析学		
主指導教員 Chief Academic Advisor	宇田川 信之教授		
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation			
インプラント埋入荷重と埋入トルク値の関係 Effect of insertion load on insertion torque value			
発表要旨 / Abstract			
<p>『背景と目的』</p> <p>本研究の目的は、さまざまなインプラントデザインにおいて、埋入トルクおよび埋入時間を評価することにより、埋入荷重がインプラント初期固定に及ぼす影響を検討することである。</p> <p>『材料と方法』</p> <p>シリンダー型インプラント Standard (S) 1 種、ハイブリッドインプラント Tapered effect (TE) および Bone level (BL) 2 種、コンカルインプラント Bone level tapered (BLT) 1 種の計 4 種類のインプラントデザインを用いた。上顎臼歯部を想定したポリウレタン製人工骨モデルを使用した。埋入トルク値 (insertion torque value: ITV) と埋入時間 (インプラント埋入開始からプラットフォームが骨面と一致するまでの時間) を、最小荷重条件および 5.0 ニュートン (N) の荷重条件の 2 条件下で記録した。トルク計を用いてトルク-時間曲線を取得し、ITV の平均値と標準偏差を算出した。データ解析には対応のある t 検定を用い、$p < 0.05$ とした。</p> <p>『結果』</p> <p>最小埋入荷重はデザインにより異なり、インプラント S では 2.5 N、インプラント TE および BL では 2.0 N、インプラント BLT では 1.0 N であった。最小荷重条件における埋入トルクは、インプラント S で 8.68 N cm、TE で 6.64 N cm、BL で 12.29 N cm、BLT で 29.52 N cm であった。5.0 N 荷重下では、それぞれ 8.12, 7.82, 14.89, および 30.53 N cm であった。埋入時間は、1.0 N から 5.0 N への荷重増加により最大 12.52%短縮し、BLT インプラントにおいて有意差が認められた。</p>			

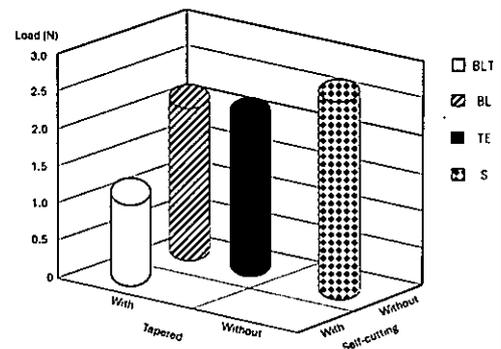


Figure 1 各インプラント最低埋入荷重

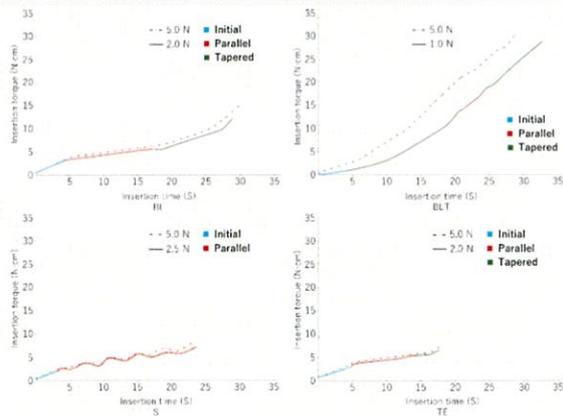


Figure 2 各インプラントのトルク時間曲線

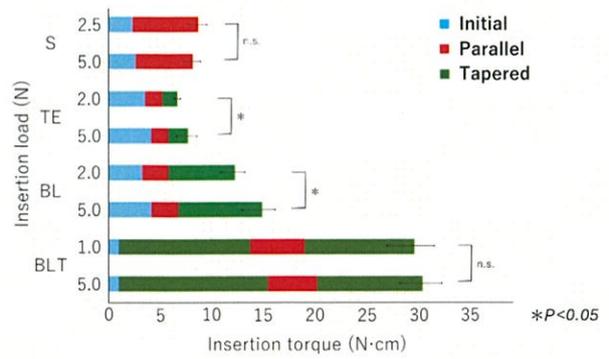


Figure 3 最低埋入荷重と 5.0N 荷重の各インプラント埋入トルク値

『考察』

インプラント埋入荷重は適正を外れると締結不良や損傷を招く重要因子だが研究は乏しく術者経験に依存する。本研究は人工骨と ITV 解析でハイブリッドやコンカルなどデザイン別の荷重感受性と最小荷重の存在を初めて示し、将来の体系的トレーニングとロボットによる精密荷重制御の必要性を提起した。

『結論』

ハイブリッドインプラントは荷重変動に対してより鋭敏である。インプラントデザインに基づいて埋入荷重を最適化することで、臨床成績の向上が期待される。埋入荷重は、インプラント初期固定において重要でありながら、しばしば見落とされている因子である。

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No.	ID#G 2033	入学年 Entrance Year	2022	年 Year
(ふりがな)	うえん じゅ			
氏名 Name in Full	文竹			
専攻分野 Major Field	硬組織発生・再生工学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	芳澤 享子 教授			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation				
間葉系幹細胞スフェロイドが移植歯の歯周組織再生に及ぼす影響				
発表要旨 / Abstract				
<p>【緒言】 歯の移植は、良好な治癒が得られれば正常歯と同様に機能するため、歯の欠損に対する有用な治療法である。しかしながら歯移植の成功には十分な歯槽骨の再生が不可欠であるため、これまで歯の移植と骨再生療法の融合を検討してきた。同時にわれわれは、特殊な低接着性培養ディッシュを用いることで自発的なスフェロイド形成が見られ、得られたスフェロイドは高い幹細胞性と骨形成能を獲得することを報告してきた。そこで本研究では、独自に開発した自発的なスフェロイド形成技術を用いて、MSCs由来の自発的なスフェロイドの組織再生に着目し、よりすぐれた歯と歯周組織再生療法の実現を目指し、動物モデルによる基礎的研究を行った。</p> <p>【材料・方法】 3週齢の雄性C57BL/6Jマウス (SLC, Japan) から上顎第一臼歯および第二臼歯の抜歯を行った。マウス頭蓋骨由来MC3T3-E1細胞をスフェロイド形成用の培養ディッシュへ播種し、自発的なスフェロイドを形成させた。担体としてコラーゲン使用人工骨 (ボナーク, 東洋紡) を用いて、スフェロイドと歯 (スフェロイド群), 単層細胞と歯 (単層細胞群) を担体内の挿入し、6週齢雄C57BL/6Jマウス下顎角欠損モデルへ移植を行った。対照群として歯と担体(スキヤフォールド群), もしくは歯のみ (Control群) を同様に移植した。移植後1, 2, 4週に検体を採取し、動物用マイクロCTにて撮影と骨形態計測を行った。また、摘出した標本はRNAを抽出と組織標本を作製し、遺伝子発現レベルの定量と組織学的観察を行った。</p> <p>【結果】 移植1週目, スフェロイド群では新生骨形成が認められたが、新生骨の形成量はごくわずかであった。HE染色で観察した結果, 4群とも炎症細胞浸潤が認められ, 特に単層細胞群では炎症細胞浸潤が著しく増加した。2週目には, スフェロイド群で明瞭な新生骨形成が認められ, 特に骨形成マーカーであるOCNの発現は, ほかの3群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。Collagen Iの発現も, 単層細胞群およびControl群より有意に高かった ($p < 0.05$)。4週目には, 4群とも歯根周囲に新生骨が認められた。骨形成マーカーであるOPNの発現は, スフェロイド群がほかの3群と比較して有意に高かった。OCNの発現について2週目のスフェロイド群は他の群と比較して著しく発現が促進されており, これは2週目のマイクロCT所見と一致しました。さらに, 1, 2, 4週目のスフェロイド群では, 新生骨の骨体積 (BV), 骨表面積 (BS) がほかの3群と比較して有意に大きかった ($p < 0.05$)。</p> <p>【考察】 マウス頭蓋骨由来MC3T3-E1細胞によるスフェロイドを作成し, マウス歯根未完成歯とコラーゲン使用人工骨を用いた複合体をマウス下顎角欠損モデルへ移植し, 間葉系幹細胞スフェロイドによる移植歯の歯周組織再生への影響について検討を行った。4群すべてで移植歯の周囲に新生骨形成が認められたが, スフェロイド群では, 2週間後骨再生と骨形成マーカーであるOCNの発現は有意に大きかった。これらの結果から, 幹細胞由来自発的なスフェロイドは高い骨形成能を有し, 歯の移植における早期骨再生を促進する可能性が示唆された。</p>				

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学籍番号 Student ID No.	ID#G 2206	入学年 Entrance Year	2022	年 Year
(ふりがな)	おぐち なおと			
氏名 Name in Full	小口 直人			
専攻分野 Major Field	硬組織疾患制御再建学講座 硬組織病態解析学			
指導教員 Chief Academic Advisor	栗原 祐史			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society			
演題名 / Title of Presentation				
生体吸収性ポリ-L-乳酸(PLLA)プレートの生体内微小環境への影響の解析 (Analysis of the effects of PLLA plates on the in vivo microenvironment)				
発表要旨 / Abstract				
<p>1, 背景・目的</p> <p>近年, 生体吸収性ポリ-L-乳酸(以下, PLLA)は生体吸収性骨接合材料として頭頸部領域の手術に汎用されている. 特に顎矯正手術では, 抜釘術が不要となることで患者負担の軽減や手術回数による審美的影響も少なく, 多くの施設で導入されている. PLLA は一定期間後に加水分解により水と二酸化炭素へ分解されるため, 為害性が少ないとされている. 一方で, PLLA 分解産物の結晶成分が周囲組織を刺激することで異物反応や炎症反応を惹起する可能性が指摘されているが, 生体内の骨再生過程におけるこれらの影響については十分に解明されていない. そこで本研究では, 免疫正常 SD ラットの下顎角骨欠損モデル(松本歯科大学倫理審査委員会承認番号:440)を作製し, 骨再生過程における PLLA プレートの生体内微小環境に与える影響について検討を行った.</p> <p>2, 材料・方法</p> <p>8 週齢雄性 SD ラット 36 匹の片側の下顎角に内径 4.0mm の骨欠損を作製した. 次に骨欠損部を PLLA プレート(NEOFIX™, GUNZE MEDICAL LIMITED)で被覆する PLLA 群, チタンプレート(Universal, 日本ストライカー株式会社)で被覆する Ti 群, および骨欠損のみの Control 群を作製した. 炎症反応が阻害されることを考慮して術後の抗菌薬投与は行わず, 週 1 回の消毒にてラットを管理した. 術後 7 日, 28 日, 6 か月で骨欠損部を周囲組織と含めて切除し, サンプルとして回収した. 炎症性変化への影響については, H-E 染色および免疫染色による組織学的評価と RT-qPCR 法による炎症性マーカー(IL-6, IL-1β)の発現を比較検討した. また, 骨形成能への影響に対しては, 骨形成遺伝子(RUNX2, Sp7)の発現を RT-qPCR 法および免疫染色で解析するとともに Micro-CT による骨量解析を行った.</p> <p>3, 結果</p> <p>①炎症反応</p> <p>1, 臨床所見: 全てのラットの施術部位に感染は認めず, 経口摂取を含め, 術後の経過は良好であった. また, 飼育中の成長による体重変化は全ての群で差を認めなかった. サンプル回収の際には全ての群のいずれの日数においても, 施術部位の炎症所見に臨床的に明らかな差を認めなかった.</p> <p>2, 組織学的所見: H-E 染色において, 術後 7 日ではいずれの群も骨欠損部の軟組織に炎症性細胞浸潤が認められた. Ti 群および Control 群では, その後経時的に減少したが, PLLA 群では術後 6 か月まで継続していた. 免疫染色においても IL-1β および IL-6 の発現は, いずれの群においても術後 7 日で発現は亢進したが, Ti 群および Control 群ではその後経時的に減少し, PLLA 群では術後 6 か月まで継続していた.</p> <p>3, RT-qPCR 分析: IL-6, IL-1β は PLLA 群の術後 7 日で発現が顕著に亢進し, 術後 28 日でやや低下したが, 術後 6 か月で再度亢進していた. いずれの日数でも PLLA 群は他の群よりも有意差があり, 継続的な発現亢進を認めた.</p>				

②骨形成への影響

1, 組織学的所見 : 免疫染色における RUNX2 の発現は PLLA 群と Ti 群では明らかな亢進を認めなかったが, Control 群では術後 6 か月で亢進を認めた.

2, マイクロCT 所見 : マイクロCT の三次元構築画像では全ての群で骨欠損部の周囲に新生骨様の不透過性の亢進を認め, 欠損部は閉鎖傾向にあった. 画像解析ソフト (TRI/3D-BON) で骨密度 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb, Th) および骨梁体積 (Star Volume 法: $V*tr$) を計測したところ, 各群に有意差は認めず, いずれの項目も全ての群で経時的に数値が上昇していた.

3, RT-qPCR 分析結果 : Control 群の術後 6 か月において, RUNX2 および Sp7 の発現が他群と比較し有意に亢進していた.

4, 考察・結論

PLLA プレートは非触媒的加水分解が生じ, その際に生体内での酵素の影響を受けずに分子量が均一かつ徐々に低下する. 分子量が臨界値を下回ると乳酸オリゴマーなどが溶出し, 分解 (塊状分解機構) が進行する. *in vitro* の研究では, PLLA に細胞の接着・伸展・増殖・分化を起こす生理活性機能は付与されていないことが報告されているが, 生体内では乳酸濃度の設定や複雑な微小環境の再現が困難であり, 詳細な解明に至っていない. そこで, 本研究ではラットの下顎角骨欠損モデルを作製し, PLLA プレートの生体への影響についての解析を試みた.

PLLA 群では移植初期から 6 か月まで炎症反応が持続していた. 術後 28 日では一時的に炎症反応は減少したが, 術後 6 か月では再度上昇した. このことは PLLA 表面の塊状分解に伴うプレートの亀裂やずれが生じる時期と近いと見られ, 初期の炎症反応の軽快後の PLLA 表面性状の変化が周囲組織を刺激し, さらなる炎症を惹起した可能性が示唆された. そのため同時期のプレートの表面性状については電顕レベルでの確認が必要と考える. しかしながら, 本研究が示した PLLA 群での持続的な炎症反応についてはこれまでに報告がなく, 今後長期的な変化についても解析することで, 臨床応用の妥当性がさらに評価できると考える.

一方, 炎症反応が強い環境では骨形成能は低下するとされている. 本研究では, Control 群での RUNX2 および Sp7 の mRNA 発現は他群と比較し, 術後 6 か月に亢進していた. これには, IL-1 β および IL-6 の発現亢進に伴う炎症反応が影響している可能性が示唆された. しかしながら, 術後 6 か月までの画像評価における骨形成には各群に有意差を認めなかったため, PLLA により増強される炎症反応は骨形成への影響が少ないと考えられた. 今後は炎症誘発因子の同定とともに, 長期的な分解過程における生体内での影響を解析する必要があると考えられる.