

-大学院歯学独立研究科-

第 120 回 大 学 院 研 究 科 発 表 会 プ ロ グ ラ ム
第 134 回 中 間 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：2024 年 9 月 25 日（水）17 時 25 分 開会

—2024年9月25日（水）—

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	「エストロゲン欠乏ラット脛骨の骨形成作用に及ぼす半導体レーザーの作用 Effects of Diode Laser irradiation on bone formation in tibiae of estrogen deficient rats」 古川 敏子 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織機能解析学	主査:増田教授 副査:中村浩彰教授 :小林教授
2	[中間] 18:00～18:30 司会:村上 教授	「Plasma Rich Growth Factors(PRGF®) と白血球を含むPlatelet-Rich Plasma (PRP) の培養歯肉上皮細胞における細胞増殖および創面閉鎖の比較検討」 渡邊 遊理 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織疾患病態解析学	主査:芳澤教授 副査:吉成教授 :小林教授
3	[中間] 18:30～19:00 司会:荒 教授	「マクロファージ様細胞に対するハーブの抗炎症作用の検討」 中島 大明 硬組織疾患制御再建学講座 遺伝子工学・分子創薬学	主査:十川教授 副査:山賀教授 :石田講師

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 2106	入学年 Entrance Year	4年 Year
(ふりがな) Name in Full	ふるかわ としこ 古川 敏子		
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			
エストロゲン欠乏ラット脛骨の骨形成作用に及ぼす半導体レーザーの作用 Effects of Diode Laser irradiation on bone formation in tibiae of estrogen deficient rats			
発表要旨 / Abstract			
<p>『背景と目的』</p> <p>レーザーの作用には高エネルギーによって組織の蒸散や切開を目的とする使用方法(High reactive Level of Laser Therapy: HLLT)と弱エネルギー照射によって細胞や組織の機能を活性化させる使用方法(Low reactive Level of Laser Therapy: LLLT)がある。この LLLT はこれまでに疼痛緩和や術後の治癒促進効果を期待したレーザー照射方法として臨床に多く応用してきた。特に、半導体レーザーは波長特性から、組織の深部まで到達する深部到達型のレーザーとして、標的となる組織が深部にある場合に使用してきた。我々はこれまでに組織深部に存在する骨組織に着目して、半導体レーザーが骨代謝に及ぼす影響を調べてきた結果、LLLT 作用として骨形成誘導作用があることを報告してきた。これらの結果は、今後歯科治療において歯周病治療、抜歯やインプラント治療における半導体レーザーの骨再生療法への有用性を示すものである。一方、超高齢社会に突入した我が国での歯科治療において、骨粗鬆症患者の骨再生療法を行う機会が増加することは明白である。しかしながら、これまでにレーザーの LLLT 作用が骨粗鬆症の骨代謝に及ぼす影響を調べている研究は少ない。そこで本研究では、骨粗鬆症モデルラット(OVX ラット)を用いて、脛骨に骨欠損を作成し、治癒過程における骨形成作用に対する半導体レーザーの LLLT 作用を形態学的に調べた結果、正常ラットと同様に骨形成を促進することを確かめたので報告する。</p> <p>『材料と方法』</p> <p>本研究は松本歯科大学と明海大学との共同研究であり、実験動物の取り扱いはすべて明海大学で、動物倫理委員会(A-2310)の許可を得て行った。10 週齢の雌 SD ラット 10 匹に対して卵巣摘出を行い OVX 群とした。一方、10 匹に対して擬手術を行い Sham 群とした。手術後、1週間後に OVX、Sham 群の脛骨に直径 1mm のデンタルルバーにて骨欠損を作成し、その後24時間後からそれぞれ5匹の動物に対して皮膚の上からレーザーを照射し、レーザー照射群とした(Sham Laser 群、OVX Laser 群)。残りの5匹に対してはレーザー非照射群とした(Sham Cont 群、OVX Cont 群)。使用したレーザーは Lumix 2(DENTALSTIM 社)で、照射条件は 950nm, 250mW, 94.4mW/cm² で行った。レーザー照射は毎日照射し、7 日間行った。</p>			

その後屠殺して脛骨を摘出し、デンタル X 線写真、 μ CT (ScanXmate-RX)撮影を行い、Amira software (Thermo Fisher Scientific) を用いて新生骨の 3D 解析を行った。さらにこれらの骨組織を 10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、K-CX(ファルマ社)にて脱灰しパラフィン包埋して切片を作成した。これらの切片に対して形態学的な観察をするためにヘマトキシリニーエオジン (H E) 染色を行った。

『結果』

OVX ラット脛骨の海面骨の量は Sham 群のものに比べて著しく減少しており、骨粗鬆症が発症していることを確認できた。3D 解析の結果から、OVX 群と Sham 群において、両群とも骨欠損部での新生骨の量はレーザー照射群が非照射群に比較して有意に増加していた (Fig.1)。さらにレーザーによって誘導された新生骨量は OVX 群と Sham 群において有意差はなかった。H-E 切片では OVX 群と Sham 群共に骨欠損部に連続して骨髄中に woven bone の形成が認められた。さらに OVX 群も Sham 群も共にレーザー照射によって新生骨の形成が亢進していることが確認できた (Fig.2)。

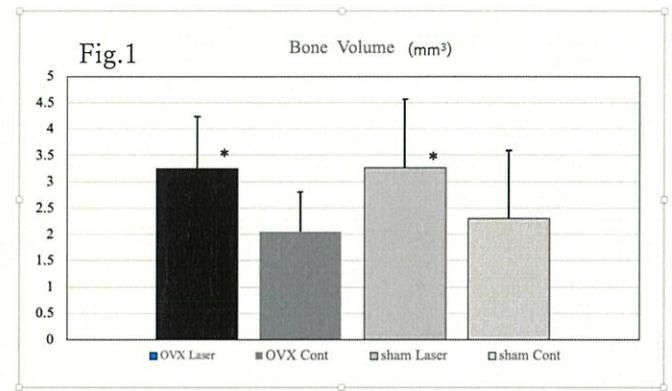
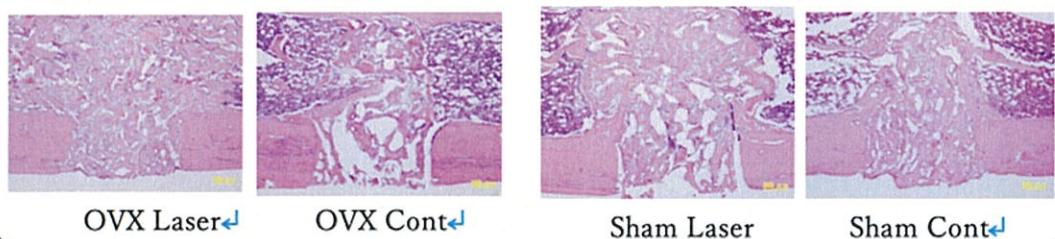


Fig.2



『考察』

今回の結果から、半導体レーザーの LLLT 作用によって、エストロゲンが欠乏している骨粗鬆症モデル動物の骨組織においても、正常な動物と同様に骨形成が誘導できることが明らかとなった。

『結論』

エストロゲン欠乏ラットの脛骨の骨欠損部において、半導体レーザーは LLLT 効果として骨形成を誘導することが明らかとなった。

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 2111	入学年 Entrance Year	2021	年 Year
(ふりがな)	わたなべ ゆうり			
氏名 Name in Full	渡邊 遊理			
専攻分野 Major Field	硬組織疾患病態解析学			
主指導教員 Chief Academic Advisor	村上 聰			
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				
Plasma Rich Growth Factors (PRGF®) と白血球を含む Platelet-Rich Plasma (PRP) の 培養歯肉上皮細胞における細胞増殖および創面閉鎖の比較検討				
発表要旨 / Abstract				
<p>【背景】多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma ; PRP) とは自己血を遠心分離して得られる血小板を豊富に含んだ血漿の一部である。PRP は組織欠損部に投与することで、血小板由来の成長因子が高濃度で局所に作用し、組織再生や創傷治癒を促進させることから、褥瘡や熱傷の治療などに用いられている。近年、PRP の作成法を改良した BTI 社製のキットによる多血小板血漿の適応が認可された (ENDORET PRGF システム)。このシステムにより、従来の PRP より赤血球、白血球および血小板を明確に相分離することが可能となったとされ、白血球分画を除く多血小板血漿 (Plasma Rich Growth Factors; PRGF) を獲得することができるようになり、歯科臨床における歯槽骨再生だけではなく、創傷治癒の観点から歯科臨床でも盛んに応用されるようになってきている。しかしながら、PRGF の歯肉上皮細胞に対する作用、特に白血球を多く含む PRP との違いについては不明な点も多い。本研究の目的は、白血球を多く含む PRP と比較して、PRGF が歯肉上皮細胞の増殖と創傷治癒に及ぼす影響を細胞培養実験にて明らかにすることである。(松本歯科大学倫理審査認証: 許可番号 第 0363 号)</p> <p>【材料と方法】 PRGF と PRP はドナー3人の血液から作成した。ポジティブコントロールとして成長因子を含むウシ脳下垂体抽出物 (BPE) 含有の完全培地を、ネガティブコントロールとして BPE を除いた培地を用いた。セルブロック法と血球計算盤を使用して PRGF と PRP に含まれる血小板、白血球の有無と量を評価した。PRGF および PRP 下で歯肉上皮細胞を培養し、WST-1 による歯肉上皮細胞の増殖、セルカルチャーチャインサートを用いた創面閉鎖率を計測した。また、細胞増殖抑制に係る TNF-α、細胞接着に関与する Integrinβ4 の mRNA 発現を定量的に比較した。</p> <p>【結果と考察】 PRGF では含まれる白血球濃度は PRP よりも低い傾向を示し、細胞増殖において PRGF は PRP よりも 1, 2 日目には有意に高値であった。創面閉鎖率は PRGF と PRP ともに対照群と有意な差はみられなかった。定量的 RT-PCR の結果でも PRGF と PRP は対照群に比し TNF-α および Integrinβ4 とともに mRNA 発現量に有意な差は示さなかった。白血球の乏しい PRGF が白血球を多く含む PRP と比較して in vitro での歯肉上皮細胞の 1~2 日目の増殖を促進したことは、白血球由来の IL-1β が PRGF では PRP と比べて優位に少ないことが報告されており、PRGF では IL-1β により誘導されるアポトーシスや細胞周期抑制が生じないと考えられた。また、PRGF と PRP ともに歯肉上皮細胞の TNF-α と Integrinβ4 の mRNA 発現量には差がみられなかったことから、歯肉上皮細胞による創の閉鎖に必要な細胞の伸展、細胞骨格の変化に係る遺伝子発現の変動に大きく関与する可能性は低いと考えられた。</p> <p>【結論】 PRGF は PRP と比べ歯肉上皮組織の増殖をより促すことで、歯周組織の創傷治癒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-2114	入学年 Entrance Year	2021 年 Year
(ふりがな) 氏名 Name in Full	なかじま ひろあき 中島 大明		
専攻分野 Major Field	硬組織疾患制御学分野 遺伝子工学・分子創薬学		
主旨導教員 Chief Academic Advisor	荒 敏昭		
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation	松本歯科大学学会 The Matsumoto Dental University Society	
演題名 / Title of Presentation			
マクロファージ様細胞に対するハーブの抗炎症作用の検討			
発表要旨 / Abstract			
<p>【背景】 歯周病・炎症に対し生薬がどのような効果を及ぼすかというテーマのもと、これまでに漢方薬および生薬(生姜と乾姜)がヒト歯肉線維芽細胞およびマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に対して抗炎症作用を示すことを報告した。今回は漢方薬以外のハーブの抗炎症作用を検討することを目的として、RAW264.7 細胞に対するクマザサ、月桂樹、イチョウ葉、黒ウコン、ビルベリーの作用を検討した。</p>			
<p>【方法】 ハーブは常磐植物化学研究所から無償供与されたものを使用した。クマザサエキスは水に溶解し、イチョウ葉エキス、月桂樹エキス、ビルベリーエキス、黒ウコンエキスは 50%エタノールに溶解した。RAW264.7 細胞は 10%FCS 添加 D-MEM で培養した。一酸化窒素(NO)の産生量に対するハーブの影響を検討するために、細胞を 96 穴プレートに播き、<i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS (PgLPS) で 1 時間刺激した後にハーブを含む培地で 24 時間刺激した。培養上清を回収し、同時に生細胞数を測定した。生細胞数は WST-8 (Dojindo) を使用して測定した。一酸化窒素(NO)の産生量は Griess 法で測定した。誘導型 NO 合成酵素(iNOS) および NF-κB (p65 およびリン酸化 p65) の発現量を通法に従ってウェスタンプロット法で検討した。</p>			
<p>【結果】 まず細胞毒性について調べたところ 100 μg/mL までは細胞の生存に影響が見られなかった。NO 産生量に対するハーブの影響を調べたところ、月桂樹と黒ウコンは LPS 刺激による NO 産生量を低下させたが、それ以外のハーブは影響が弱いあるいは見られなかった。月桂樹および黒ウコンは LPS 刺激によって誘導される NOS の発現量を低下させた。NOS の発現は NF-κB によって誘導されるため p65 のリン酸化を調べたところ、月桂樹は p65 のリン酸化を抑制した。</p>			
<p>【考察】 今回の結果から、月桂樹および黒ウコンが NO 産生量を NF-κB だけではなく酸化ストレスによっても発現が誘導されるため、今後は酸化ストレスに対する月桂樹および黒ウコンの作用を検討する予定である。</p>			