

-大学院歯学独立研究科-
第 113 回 中間 発表会 プログラム
第 97 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：2021 年 3 月 24 日 (水) 17 時 25 分 開会

-2021 年 3 月 24 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:各務 教授	「Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering」 (骨再生治療を目的とした皮質骨由来間葉系間質細胞によるスフェロイドの凍結保存) 董 宏偉 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生・再生工学専攻	主査:平賀教授 副査:大須賀教授 :中道講師
2	[中間] 18:00~18:30 司会:増田 教授	「口唇トレーニング前後における口腔周囲筋の筋疲労の評価」 山田 紗織 顎口腔機能制御学講座 咀嚼機能解析学専攻	主査:大須賀教授 副査:靱島教授 :倉澤教授
3	[中間] 18:30~19:00 司会:増田 教授	「カスタマイズしたセンサーを用いて外耳道のひずみで咀嚼回数をカウントする新しい方法」 吉野 旭宏 顎口腔機能制御学講座 咀嚼機能解析学専攻	主査:金銅教授 副査:山本教授 :正村准教授
4	[大学院] 19:00~19:30 長谷川 教授	「Contribution of transglutaminases and their substrate proteins to the formation of cornified cell envelope in oral mucosal epithelium」 (口腔粘膜上皮における角質化細胞エンベロープの形成へのトランスグルタミナーゼと基質タンパク質の寄与) RITA RANI ROY 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織疾患病態解析学専攻	主査:各務教授 副査:中村教授 :小出准教授
5	[大学院] 19:30~20:00 芳澤 教授	「皮質骨由来細胞によるティッシュエンジニアリングの併用は移植歯周囲への骨形成を促進する」 松村奈穂美 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生・再生工学専攻	主査:平賀教授 副査:小林教授 :吉成教授

※1 はオンラインにて行う。

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 1712	入 学 年 Entrance Year	2017 年 Year
(ふりがな)	とう		こうい
氏 名 Name in Full	董		宏偉
専 攻 分 野 Major Field	硬組織発生・再生工学		
主 指 導 教 員 Chief Academic Advisor	各務 秀明		
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			
Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering (骨再生治療を目的とした皮質骨由来間葉系間質細胞によるスフェロイドの凍結保存)			
発表要旨 / Abstract			
<p>目的: マウス皮質骨由来間葉系間質細胞 (compact bone-derived mesenchymal stromal cells : CBDCs) から形成された自発的スフェロイドは、優れた幹細胞性や、高い骨分化能を有する。この細胞を再生医療に応用するためには凍結保存方法の確立が望まれるが、これまで自発的スフェロイドの凍結保存方法については十分な検討が行われていなかった。本研究では、このCBDCsから形成された自発的スフェロイドを用いて、凍結保存と解凍が幹細胞性や骨分化能、および in vivo における骨形成能に与える影響について検討した。</p> <p>材料と方法: 3週令雄 C57BL/6J マウスを麻酔薬の過量投与によって安楽死させた後、大腿骨および脛骨を取り出し、細切してコラゲナーゼにて処理を行った。得られた細胞を基礎培地 (α-MEM+10%牛胎児血清+bFGF) にて平面培養を行い、CBDCsを得た。2継代目の細胞をスフェロイド形成用の低接着性シャーレに播種することで、自発的スフェロイドを得た。24時間後にスフェロイドを回収し、5, 10, 15, 20%のジメチルスルホキシド (DMSO) とともに緩徐凍結法にて-80℃まで冷却し、その後液体窒素中で保管した。解凍後、CCK-8 および CK-17 (いずれも同仁化学研究所) を用いて、生存細胞数と細胞障害の程度を測定した。次に凍結保護剤による凍結前のスフェロイド (非凍結群) と凍結解凍後のスフェロイド (凍結群) の体性幹細胞マーカー、多能性幹細胞マーカー、および骨分化マーカーの発現を比較した。また、7日間骨分化誘導培地にて分化誘導後、骨分化マーカーの発現を調べた。次に非凍結群および凍結群のスフェロイドと、これらを骨分化誘導後の細胞とをそれぞれ β-TCP ブロック (オスフェリオン, オリパステルモバイオマテリアル) へ播種し、SCID マウスの背部皮下へ埋入した。4週後に摘出・固定し、μCT にて撮影後、脱灰、包埋、薄切して Hematoxylin-eosin にて染色し、組織学的検討を行った。</p> <p>結果: 解凍後の細胞生存率は 5%DMSO の群で最も高く、細胞障害の程度もこの群が最も低かった。この条件で凍結したスフェロイドについて、体性幹細胞マーカーである CD29, CD44, CD105, Sca1, 多能性幹細胞マーカーである SSEA1, Sox2, Oct4, Nanog, KLF4 および骨分化能のマーカーである OCN, OPN, Col1A1, BSA, Osterix の発現を比較したところ、非凍結群と凍結群で有意差は認められなかった。骨分化誘導後、非凍結群と凍結群の ALP 活性はそれぞれ 1.28 ± 0.19 と 1.46 ± 0.39 で、有意差は認められなかった。また、骨分化マーカーである BSP, Osterix, DMP1 の発現も、非凍結群と凍結群の間で有意差は認められなかった。SCID マウスへ移植後4週のサンプルを解析したところ、凍結群では非凍結群と同程度の骨組織の再生が認められ、さらに、骨分化誘導を行わない場合でも、分化誘導を行った自発的スフェロイドと同程度の骨形成がみられた。</p> <p>結論: CBDCs による自発的スフェロイドを調製し、凍結保護剤である DMSO の濃度の最適化を試みたところ、5%で最も高い生存率が得られた。この条件で凍結保存を行った自発的スフェロイドでは幹細胞性、骨分化能、および骨形成能が維持されており、凍結保存を行っていない自発的スフェロイドと同程度であった。適切な凍結保存方法を選択することで、CBDCs による自発的スフェロイドは利便性の高い骨再生用の細胞源となることが示唆された。</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 1810	入学年 Entrance Year	2018	年	3年
氏名 Name in Full	山田 紗織				
専攻分野 Major Field	咀嚼機能解析学				
主指導教員 Chief Academic Advisor	増田 裕次				
発表会区分 Type of Meeting	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">中間発表会</div> ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 <small>Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society</small>				
演題名 / Title of Presentation					
口唇トレーニング前後における口腔周囲筋の筋疲労の評価					
発表要旨 / Abstract					
<p>【目的】 口唇機能は哺乳、捕食、咀嚼、嚥下、発音、表情による感情の表出などの口腔機能を営む上で重要である。口腔機能を維持・向上させるためのトレーニングの必要性があると考えられるが、効率よく行うトレーニングがないのが現状である。口唇が発揮する力を方向別に可視化できるようにした装置を作製し、ビジュアルフィードバックを用いて口唇閉鎖運動を行うシステムを開発した。このシステムによる口唇トレーニングが、口唇機能や顎下部形態に影響を及ぼすためには、口腔周囲の筋疲労を起こして、筋の活性化を引き起こすことが必要であると考えられる。本研究では、期待されるトレーニング効果を知るために、トレーニング時間が筋疲労に及ぼす影響を調べることを目的とした。</p> <p>【方法】 被験者は健常成人（男性12人、女性6人）とした。右側の上唇部、下唇部および顎下部に電極間距離10mmで脳波用血電極をテープで貼付し、上唇部、下唇部の口輪筋および舌骨上筋群の表面筋電図を記録した。ビジュアルフィードバックを用いた口唇トレーニングには多方位口唇閉鎖力測定装置とモニターを用いた。モニター上にランダムな方向に現れる的に、その方向の口唇閉鎖力を維持するように口唇に力を入れ、0.2秒維持されると到達音とともに的は消え、新たな的が表示される。この口唇トレーニングを120秒間行った場合と60秒間行った場合で直後の疲労を調べた。筋疲労を確認するために、口唇トレーニング前後で、20秒間の最大口唇閉鎖運動中に右側上下唇部口輪筋および右側舌骨上筋群から表面筋電図を記録し、そのうち、活動開始から2秒間を高速フーリエ変換により周波数分析を行い、中間周波数を算出した。</p> <p>【結果】 30分間のインターバルで疲労の蓄積があるかどうかを調べたところ、トレーニング前の中間周波数に有意な相違は認められなかった。1回目の2分間の口唇トレーニング前後の比較では、上唇部、下唇部口輪筋および舌骨上筋群筋電図の中間周波数に有意な低下が認められ、疲労していることが明らかとなった。2回目に2分間、3回目に2分間、2回目に1分間、3回目に1分間の口唇トレーニング前後でも、上唇部および下唇部口輪筋筋電図の中間周波数に有意な低下が認められたが、舌骨上筋群では、1分間のトレーニングでは有意な変化は認められなかった。</p> <p>2回目、3回目に関わらず、2分間の口唇トレーニングの結果を合わせて、舌骨上筋群の筋電図を解析するとトレーニング前後で中間周波数に有意な低下が認められた。一方、2回目、3回目に関わらず、1分間の口唇トレーニングの結果を合わせても、舌骨上筋群筋電図の中間周波数に口唇トレーニング前後で有意な変化は認められなかった。</p> <p>【考察】 口唇トレーニングによって口唇機能の向上には、1分間のトレーニングでも有効である可能性を示すが、顎下部の引き締め効果を期待するには、2分間の口唇トレーニングが必要であることが示唆された。</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# G1809	入学年 Entrance Year	2018	年	3年
氏名 Name in Full	吉野 旭宏				
専攻分野 Major Field	顎口腔機能制御学 咀嚼機能解析学				
主指導教員 Chief Academic Advisor	増田 裕次				
発表会区分 Type of Meeting	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">中間発表会</div> ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 <small>Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society</small>				
演題名 / Title of Presentation					
カスタマイズしたセンサーを用いて外耳道のひずみで咀嚼回数をカウントする新しい方法					
発表要旨 / Abstract					
<p>【目的】 外耳道のひずみで咀嚼回数をカウントする方法を開発した。しかし、既成の耳栓を利用したセンサーでは、測定できない被験者もいた。そこで、本研究では、外耳道の型を取り、カスタマイズしたイヤホン型のセンサーを作製し、咀嚼回数の測定の可能性を検討した。</p> <p>【方法】 被験者は健康成人（男性7人、女性7人）とした。外耳道のひずみ変化を感知するために、パテタイプのシリコン印象材で外耳道の印象を取り、この印象材を3Dスキャン後、CADでイヤホン型を構築した。そのデータをもとに3Dプリンタでラバーライクの素材を用いて作製し、気圧計を内蔵したイヤホン型のカスタマイズされたセンサーを作製した。イヤホン型のサイズとして実寸の100%、110%、120%の3種類を作製した。リンゴ（一片：5g）およびグミキャンディー（1個：3.4g）を左右それぞれ偏側で咀嚼させた。記録した圧変化の波形から咀嚼回数識別計数表示装置を用いて計数した。咀嚼側咬筋から記録した筋電図から咬筋バーストの数をカウントした。外耳道の圧変化からカウントした回数が、筋電図を用いてカウントした回数の50%未満の場合測定不能と知た。測定可能な場合には、それぞれの咀嚼回数の一致度をBland-Altman分析にて解析した。</p> <p>【結果】 被験者ごとに、食品を嚥下するまでの咀嚼回数は異なった。食品ではリンゴ咀嚼よりもグミキャンディー咀嚼の方が、咀嚼回数が多かった。測定不能となった記録は男性では認められなかったが、女性においては認められた。外耳道波形を測定した側と同側で咀嚼した場合に多く見られ、100%、110%、120%および既製品では反対側咀嚼で、7人中それぞれ2人、0人、2人1人、同側咀嚼で3人、1人、2人、3人であった。110%を用いたときが測定不能となった記録は最も少なかった。Bland-Altmanプロットでの95%一致限界は男性の方が女性よりも小さい値を示し、リンゴ咀嚼の方が、グミキャンディー咀嚼よりも小さい値を示した。いずれの食品においても記録外耳道とは反対側での咀嚼の時間が小さく、110%を用いた時間が最も小さかった。</p> <p>【考察】 イヤホン型のカスタマイズされたセンサーを作製する際には、110%のサイズのものが有効である可能性が見出された。</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 1811	入学年 Entrance Year	2018	年 3rd Year
(ふりがな)	リタ ラニ ロイ			
氏名 Name in Full	Rita Rani Roy			
専攻分野 Major Field	硬組織疾患病態解析			
主指導教員 Chief Academic Advisor	長谷川 博雅			
発表会区分 Type of Meeting	中間発表会 Midterm Meeting	大学院研究科発表会 Graduate school research meeting presentation	松本歯科大学学会 The Matsumoto Dental University Society	
演題名 / Title of Presentation				
Contribution of transglutaminases and their substrate proteins to the formation of cornified cell envelope in oral mucosal epithelium (口腔粘膜上皮における角質化細胞エンベロープの形成へのトランスグルタミナーゼと基質タンパク質の寄与)				
発表要旨 / Abstract				
<p>Cornified envelope (CE) formation is crucial for the final differentiation of keratinized epithelium; however, CE formation in the oral epithelium remains unclear. The aim of this study was to clarify the differences in the distribution and expression of CE-related proteins and genes between keratinized and non-keratinized oral epitheliums. We immunohistochemically investigated the distribution pattern of transglutaminase 1 (TG1), transglutaminase 3 (TG3), and their substrate proteins involucrin (IVL), loricrin (LOR) and small proline rich proteins (SPRs) in 19 keratinized oral epithelium samples and 14 non-keratinized oral epithelium samples obtained from archived specimens. <i>TG1</i> and <i>TG3</i> mRNA levels were investigated in both types of epithelium by real time RT-PCR using paraffin-embedded specimens. All data were statistically analyzed to identify the factors involved in CE formation. As a result, we demonstrated that 11 localization patterns namely, the localization of TG1, TG3, and IVL in the cytoplasm of the superficial layer and on membranes of the upper spinous layer; IVL on membranes of the lower spinous layer; LOR in the cytoplasm of the upper spinous layer; SRR1b in the cytoplasm of the lower spinous layer; and SPR3 in the cytoplasm of the superficial and lower spinous layers showed statistically significant differences between keratinized oral epithelium and non-keratinized oral epithelium. These factors clearly drove the separation of the two groups during cluster analysis. TG1 mRNA levels in keratinized oral epithelium were significantly higher than those in non-keratinized oral epithelium. In conclusion, the characteristic distribution of TGs and their substrates and the mRNA levels of TG1 can regulate CE formation in keratinized oral epithelium, together with the contribution of TG3 first reported in this paper.</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 1713	入学年 Entrance Year	2017 年 Year
(ふりがな)	まつむら	なほみ	
氏名 Name in Full	松村 奈穂美		
専攻分野 Major Field	硬組織疾患制御再建学 硬組織発生・再生工学		
主指導教員 Chief Academic Advisor	芳澤 享子		
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			
皮質骨由来細胞によるティッシュエンジニアリングの併用は移植歯周囲への骨形成を促進する			
発表要旨 / Abstract			
<p>【目的】小児の永久歯の先天欠如に対する治療の選択肢として、歯の移植が行われている。しかしながら、骨幅の狭い歯槽骨への歯の移植は困難であるため、適応となる症例に限られる点が問題であった。近年、培養細胞、担体、生理活性物質等と組み合わせることで組織を再生させるティッシュエンジニアリングの手法が注目されている。そこで本研究では、ティッシュエンジニアリングの手法を歯の移植に併用することで移植歯周囲に骨を形成させ、骨が狭小な歯槽部への歯の移植を可能にする方法について検討を行った。</p> <p>【材料と方法】3 週齢雄性 C57BL/6J マウスを麻酔薬の過量投与により安楽死させた後、上顎第一、第二臼歯の抜去を行った。大腿骨と脛骨の両端を切断し、フラッシュアウトにて骨髓細胞を採取した後、密度勾配遠心法にて単核球(MNC)を採取した。次に皮質骨を細切し、コラゲナーゼにて酵素処理を行った後、皮質骨由来細胞(CBDC)を採取した。皮質骨由来細胞は、2 継代後にスフェロイド形成用ティッシュへ播種し、24 時間後にスフェロイドを回収した。スフェロイドは使用時まで凍結保存した。細胞の担体として、アテロコラーゲンスポンジを整形して用いた。CBDC 群(CBDC スフェロイド+アテロコラーゲンスポンジ+歯)、MNC 群(MNC+アテロコラーゲンスポンジ+歯)、Collagen 群(アテロコラーゲンスポンジ+歯)および Tooth 群(歯のみ)の 4 群を設定し、ペントバルビタールによる全身麻酔下で、それぞれを 6~8 週齢雄性 SCID マウス背部皮下へと移植した。4 週後に移植物を摘出し、中性ホルマリンにて固定後、μCT と分析用ソフトウェアを用いて新生骨の解析を行った。撮影後に摘出した標本を脱灰、脱水し、パラフィンに包埋した。薄切したサンプルは、H-E 染色、マッソントリクローム染色、TRAP 染色および SP7 に対する免疫染色により評価した。</p> <p>【結果】4 群とも骨形成が認められたが、新生骨量は CBDC 群が他の3群と比較して有意に多かった。4 群すべてにおいて根管中隔に新生骨が認められた。MNC 群、Collagen 群、Tooth 群では歯根外側への骨形成は僅かであったのに対し、CBDC 群では歯根外側に多くの骨形成を認め、一部の移植物では新生骨は歯冠周囲に及んでいた。骨密度(BV/TV)は各群間で有意差が見られなかったが、CBDC 群では Tooth 群、Collagen 群と比較して骨梁数(Tb.N)が少なく、骨梁間隙(Tb.Sp)、骨梁中心距離(Tb.Spac)は大きかったことから、CBDC 群における新生骨の骨梁構造は疎であると考えられた。HE 染色では、4群とも幼弱な骨形成が見られ、新生骨と歯根の間には歯根膜様の線維性組織が介在していた。しかしながら、根尖部付近ではセメント質の肥大と置換性骨吸収がみられた。マッソントリクローム染色では、4 群とも新生骨と歯根との間の線維は濃染する膠原線維であり、歯根膜様の構造が見られた。</p> <p>【考察】CBDC 群では、MNC 群、Collagen 群、Tooth 群と比較して新生骨量が有意に増加しており、新生骨は根幹中隔以外に歯根外側にも認められた。この結果から、CBDC スフェロイドによるティッシュエンジニアリングを併用することで、歯の移植と同時に骨増生が得られる可能性が示された。また、新生骨と歯根との間には歯根膜様の膠原線維が存在し、ティッシュエンジニアリングによる骨形成においても歯根膜は維持されることが示された。一方、歯根尖付近ではセメント質の過形成や置換性骨吸収も見られた事から、根尖部での骨性癒着や歯根吸収が起こる可能性には注意が必要と考えられた。本研究では異所性の移植モデルを用いているため、移植歯に対する機能負荷の影響について検討することはできなかった。今後は同所性の移植モデルを用いて、さらに機能負荷の影響や新生骨の長期予後についても検討を行う必要があると考えられた。</p>			