

一般演題口演

O-01~11



O-01

間葉系幹細胞抽出物は歯根膜線維芽細胞の増殖を促進する

彭 一豪

キーワード：間葉系幹細胞、歯根膜線維芽細胞、細胞増殖

【目的】近年、間葉系幹細胞（MSC）を用いた歯周組織再生治療が広く研究されている。しかし、その再生メカニズムについては完全に解明されていない。本研究では、歯根膜由来細胞におけるMSC抽出物の細胞増殖への影響を検討した。

【材料と方法】不死化ヒト骨髄間葉系幹細胞（UET13、理研バイオリソースセンターより入手）、ヒト歯根膜線維芽細胞（Lonzaより購入）を培養し実験に使用した。凍結溶解のサイクルによって細胞から抽出物を回収し、BCA法を用いてタンパク量を測定した。細胞増殖の検討にはWST-8法を用いた。タンパクの抽出はアセトン沈殿を用いて行った。

【結果と考察】UET13抽出物（UET13-ext）はタンパク濃度依存的に歯根膜線維芽細胞の増殖を促進した。UET13-extを65℃にて処理した後、歯根膜線維芽細胞に作用させたところ、UET13-extによる細胞増殖活性が消失した。さらに、タンパク合成阻害剤を作用させたUET13より回収した抽出物においても、歯根膜線維芽細胞の増殖活性が観察されなかった。また、アセトン沈殿を用いてUET13-extより回収したタンパク成分で歯根膜線維芽細胞を処理すると、タンパク濃度依存的に歯根膜線維芽細胞の増殖が亢進した。以上の結果よりUET13-extは含まれるタンパク成分を介して歯根膜線維芽細胞の増殖を促進する事が示された。本研究は間葉系幹細胞抽出物が歯根膜線維芽細胞の増殖を促進することを示し、この結果は間葉系幹細胞による歯周組織再生メカニズムの一部を説明するかもしれない。

【結論】間葉系幹細胞抽出物はタンパク成分を介して歯根膜線維芽細胞の増殖を促進する。

O-03

歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した抗炎症作用

林 千華子

キーワード：歯肉幹細胞、エクソソーム、miRNA、ERストレス

【目的】歯肉幹細胞（GMSCs）は採取が容易であり、他組織由来MSCと比較しエクソソーム分泌量が多いという特性を有する。我々はGMSCをTNF- α 処理することでGMSC由来エクソソームの抗炎症作用が増強し、同時にmiR-1260b発現が亢進することを確認した。Database検索でmiR-1260bの標的上位遺伝子としてERストレス制御遺伝子ATF6 β が抽出された。歯周炎組織では歯肉炎組織と比較しERストレス応答遺伝子の発現が高いと報告されている。そこで、エクソソーム由来miR-1260bが、ATF6 β の制御により歯周組織の炎症反応に影響を及ぼすとの仮説を立て、検証を行った。

【材料及び方法】絹糸結紮マウス歯周炎モデルにおけるERストレス関連遺伝子発現を検証した（免疫化学染色、qRT-PCR）。また、ヒトGMSCと培養上清から回収したエクソソーム及びヒト初代歯根膜細胞（PDLcs）を用いて以下の実験を行った。①Tunicamycin刺激誘導性ERストレスによるmiR-1260bの発現変動（qRT-PCR）、②PDLcsにおけるmiR-1260b導入によるERストレス関連遺伝子の発現変動（qRT-PCR、western blot）

【結果及び考察】マウス歯周炎組織において、ATF6 β の発現が誘導されることを確認した。また、PDLcsにおいてmiR-1260b導入により、ATF6 β の発現が抑制された。以上の結果より、GMSCsのTNF- α 処理により誘導されるmiR-1260bがERストレスの抑制を介して歯周組織における炎症反応を制御する可能性が示唆された。

O-02

定量解析を目的とした歯根膜からの細胞単離法の開発

岩下 瑞穂

キーワード：歯根膜、Plap-1、細胞単離、フローサイトメトリー

【目的】歯根膜には骨芽細胞・セメント芽細胞に分化することのできる幹細胞・前駆細胞が含まれ、同上細胞は歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかし、これらの細胞を単離し、定量的に解析する手法は未だ定まっておらず、特異的な単離がなされているか否かを評価することも困難である。そこで本研究では、我々の研究室で開発した歯根膜特異的分子Plap-1陽性細胞をGFP標識するノックインマウスを用いて、マウス歯根膜由来細胞を高効率に単離する方法を確立することを目的とした。

【材料と方法】*Plap-1-GFP-CreER*および野生型マウスから上顎を採取し、歯肉を除去後、臼歯を抜去した。得られた抜去歯をそのまま、もしくは歯根面から採取した歯根膜を30分間酵素処理し、細胞単離を行った。酵素はCollagenase type IIおよびLiberase TM、Liberase THを用いた。単離した細胞中のGFP陽性細胞数および死細胞数をフローサイトメーターにて計測した。酵素処理後の歯牙を組織学的に解析した。

【結果と考察】抜去歯を1.0～4.0 WU/ml Liberase TMにて酵素処理することにより、生細胞率を低下させることなく、高効率なPlap-1陽性細胞の単離が可能であった。同酵素処理後の歯牙は歯根膜やセメント質が消失し、歯髄が残存していたことから、主に歯根膜およびセメント質から細胞が単離できていることが示唆された。

【結論】Plap-1発現を指標に歯根膜由来細胞を高効率に単離する手法を開発した。同手法を用いた今後の解析により歯根膜に含まれる細胞構成の理解が深まるものと期待される。

O-04

ヒト歯肉上皮細胞における米糠由来ペプチドによる抗酸化作用の検証

峯尾 修平

キーワード：抗酸化ストレス、食物由来ペプチド、歯肉上皮細胞

【目的】食物由来ペプチドには口腔細菌に対する抗菌作用や、破骨細胞分化抑制による抗菌周炎効果が示唆されている。しかしながら、生体防御の最前線に位置する歯肉上皮細胞における食品由来ペプチドの作用は不明である。本研究の目的は、歯周炎の発症・進行にも関与する抗酸化ストレス応答に注目し、歯肉上皮細胞における食物由来ペプチドの作用について検討することである。

【材料と方法】米糠と米胚乳、トウモロコシ、大豆の4種から等電点電気泳動にて精製された各20分画を食物由来ペプチドとして供した。まず、各種食物由来ペプチド分画（0.5mg/mL）単独もしくは既知の抗酸化誘導物質Sulforaphane（SFN, 5 μ M）との共刺激を行い、ルシフェラーゼアッセイにて抗酸化ストレス応答活性化のスクリーニングを実施した。有意なルシフェラーゼ活性を認めたペプチド分画においては、ヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22を用いて、抗酸化ストレス応答関連遺伝子発現およびタンパク産生についてPCR法およびWestern Blotting法にて解析した。さらにペプチド誘導性の抗酸化能を評価するために活性酸素種Reactive Oxygen Species（ROS）の抑制能を検討した。

【結果および考察】SFNと米糠ペプチド分画のいくつかの共刺激においては、SFN単独刺激に比較して有意なルシフェラーゼ活性上昇を認めた。Ca9-22における同様の共刺激では主要な抗酸化関連因子Heme oxygenase-1（HO-1）の有意な発現上昇が遺伝子レベルとタンパクレベルで確認された。またROS産生の有意な低下も確認された。以上の結果より、いくつかの米糠ペプチド分画にはSFN誘導性抗酸化ストレス応答における相乗効果があることが示唆された。

O-05

Identification of microRNA regulating NF- κ B pathway in macrophage

李 榮智

Keywords: microRNA, inflammation, macrophage**Background, objective:** We previously detected abnormally dysregulated micro (mi) RNAs in the adipose tissue of mice fed a high fat diet (HFD) by microarray analysis. Here, we aimed to elucidate the role of dysregulated miRNAs that were not completely characterized.**Materials and methods:** First, qPCR was performed to verify the results of the microarray analysis. LPS-stimulated RAW264.7 cells were used to confirm the changes of these miRNAs under inflammatory conditions. Then, miRNA mimic was transfected into RAW264.7 cells to identify the potential targets, and mRNA and protein levels of these target molecules were measured. In addition, expression of inflammatory markers was evaluated in RAW264.7 cells treated with or without miRNA mimic followed by LPS stimulation.**Results:** Selected miRNA was significantly down-regulated in HFD-fed mice compared with normal diet fed mice, and in RAW264.7 cells stimulated with LPS compared with those without LPS stimulation. mRNA levels of several putative targets were lowered after the transfection of miRNA mimic, but only one putative target molecule exhibited reduction at protein level. Moreover, this selected miRNA appeared to regulate inflammation.**Conclusion:** The predicted gene was found to play an important role on NF- κ B signaling pathway by subsequent analysis. miRNA mimic transfection into macrophages resulted in reduced expression of target genes as well as altered TNF- α expression. Thus, it is suggested that this miRNA might play a key role in regulating inflammation in adipose and, also, in periodontal tissues.

O-07

歯石刺激後のマウスマクロファージにより産生されたサイトカインが破骨細胞分化に与える影響

前 めぐみ

キーワード: 歯石, NLRP3 インフラマソーム, マクロファージ, IL-1 β , 破骨細胞**【目的】**結晶粒子がマクロファージ等に取込まれると細胞質中のNLRP3 インフラマソームを介してIL-1 β が成熟型へ転換されることが知られている。我々は、これまでにマクロファージを歯石で刺激するとNLRP3 インフラマソームを介して成熟型IL-1 β が産生されることを示した。IL-1 β には破骨細胞形成促進作用があるため、本研究では、歯石で刺激後のマウスマクロファージが産生するサイトカインの破骨細胞分化に与える影響について検討した。**【材料と方法】**野生型, NLRP3欠損型マウス由来マクロファージをそれぞれ歯石粒子で刺激し、その培養上清中のIL-1 β 濃度をELISA法で測定した。さらにそれら培養上清をRANKLで前処理したマウスマクロファージ様細胞RAW-Dおよびマウス骨髄マクロファージ培養液に添加し、培養後に形成される3核以上のTRAP陽性細胞数を破骨細胞として計測した。**【結果と考察】**歯石で刺激後の野生型マウスマクロファージ培養上清にはIL-1 β が検出されたが、NLRP3欠損型マウスマクロファージ培養上清には検出されなかった。マウス骨髄マクロファージにこれらの培養上清を添加すると破骨細胞の形成は増加し、野生型マウスマクロファージ培養上清でより顕著であった。一方、RAW-D細胞にこれらの培養上清を添加すると、いずれも破骨細胞の形成を著しく抑制した。これらの結果から歯石刺激後のマクロファージ培養上清には破骨細胞形成に促進的に作用するIL-1 β と、逆に抑制的に作用するサイトカインの両方が含まれていたと考えられる。抑制性サイトカインは、今後同定していく予定である。

会員外共同研究者：筑波隆幸教授

O-06

骨補填材を用いてGBRを行ったインプラント周囲組織に対する炎症の影響 - イヌ実験的インプラント周囲炎モデル -

佐藤 諒

キーワード: 骨補填材, インプラント周囲炎**【目的】**インプラント治療では、様々な骨補填材を用いたGuided bone regeneration (GBR) がしばしば行われる。インプラント周囲炎に関する研究が多数報告されているが、GBRに用いた骨補填材によって、周囲組織への炎症の影響に差があるかどうかは不明である。本研究では、イヌ実験的インプラント周囲炎モデルを使用し、GBRを行ったインプラント周囲組織への炎症の影響を組織学的に評価した。**【材料および方法】**オスの1歳齢のビーグル成犬6頭を用いた。下顎両側第2, 3, 4前小臼歯を抜歯し、3ヶ月の治癒後、実験群ではインプラント埋入予定部位に骨欠損(近遠心3mm×頬舌2mm×深さ3mm)を作製した。骨欠損作製後、中央にインプラントを埋入し、周囲骨欠損部に自家骨顆粒または異種骨顆粒を補填、吸収性メンブレンで被覆し縫合閉鎖した。対照群では骨欠損を作製せずに埋入した。3ヶ月の治癒後、2次手術を行いヒーリングアパットメントを装着した。その後3-0絹糸を結紮し、実験的インプラント周囲炎を惹起した。4週後に標本を採取し、非脱灰研磨切片を作製しトルイジンブルー染色を行い組織学的評価を行なった。**【結果】**2次手術までは臨床的に異常所見は認めなかった。インプラント周囲炎惹起後4週では、歯肉の発赤腫脹及びデンタルエックス線上で軽度の骨吸収を認めた。Implant shoulderから骨欠損底部までの距離、骨欠損面積、新生骨面積、Bone-to-implant contact (BIC) では、自家骨群、異種骨群、対照群の間に有意な差を認めなかった。**【結論】**本実験モデルにおいて自家骨と異種骨を用いてGBRを行ったインプラント周囲組織は、炎症が惹起されると同程度の骨吸収をきたすことが示唆された。

O-08

rhFGF-2製剤と脱タンパクウシ骨ミネラルを併用した歯周組織再生療法: 術後2年の臨床成績

青木 栄人

キーワード: 歯周組織再生療法, rhFGF-2, 脱タンパクウシ骨ミネラル**【目的】**本研究の目的は、垂直性骨欠損に対してrhFGF-2製剤単独と脱タンパクウシ骨ミネラル (DBBM) を併用した歯周組織再生療法の効果に関するランダム化比較試験の術後2年の評価を行うことである。**【材料と方法】**歯周基本治療後に、深さ3mm以上の垂直性骨欠損を有する者を対象とした。rhFGF-2製剤+DBBM (実験群), rhFGF-2製剤単独 (対照群) をランダムに割り当てた。術後2年までの歯周パラメーターとエックス線画像上での骨欠損改善率 (RBF), 口腔関連QOLの評価を行なった。本研究は、本学倫理審査委員会の承認 (No.747) を受け、インフォームドコンセントを得て行なった。**【結果と考察】**実験群, 対照群あわせて38部位を解析対象とした。術後2年で両群ともにベースライン時と比較して、臨床的アタッチメントレベル (CAL) およびプロービングポケットデプスに有意な改善が認められた。CALゲインは実験群で 3.4 ± 1.3 mm, 対照群で 3.1 ± 1.5 mmであり、群間に有意差は認められなかった。RBFは実験群で56%, 対照群で41%であり、実験群で有意に高い値が認められた。口腔関連QOLは基本治療終了後と比較し術後2年で両群ともに改善傾向を示したが、各タイムポイントにおける群間差は認められなかった。**【結論】**rhFGF-2製剤を用いた垂直性骨欠損への歯周組織再生療法は、DBBM併用の有無に関わらず、術後2年でCAL改善程度は同等であったが、併用療法は有意に高いRBFを示した。どちらの方法でも、臨床および口腔関連QOLの良好な結果が、少なくとも2年間は持続することが示唆された。

O-09

糖尿病による歯科用インプラントのオッセオインテグレーションの低下

齋藤 夏実

キーワード：糖尿病，インプラント，酸化ストレス

【背景・目的】糖尿病モデルラットの口腔内にインプラント埋入を行い、高血糖状態がオッセオインテグレーションに及ぼす影響について検討することを目的とした。

【材料と方法】雄性6週齢のWistarラットの上顎左右第一臼歯抜歯4週後に、実験群は糖尿病モデル誘発のためにストレプトゾトシンを投与し、対照群を非投与とした。抜歯8週後に、70%硫酸で表面処理を行なったチタン円柱を埋入した。4週後に研磨標本にてBone-implant-contact (BIC) を測定し、小型卓上試験機 (EZ-SX, 島津製作所) を用いてインプラント体へのプッシュアウトテストを行った。さらに骨代謝マーカー、酸化ストレスマーカーのmRNA発現をリアルタイムPCR法にて定量した。また骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を、通常グルコース濃度と高グルコース濃度の石灰化誘導培地にて培養し、骨代謝マーカーのmRNA発現の定量、アリザリンレッド染色を行った。増殖培地での活性酸素種 (ROS) の発現定量を行った。

【結果】実験群においてBICは有意に減少し、プッシュアウトテストでは有意に低い荷重でインテグレーションの破壊が生じた。mRNA発現においてはAlp, Runx2, Col1などの骨代謝マーカーは有意に低下し、酸化ストレスマーカーは有意に上昇していた。

またMC3T3-E1は、高グルコース条件下で骨代謝マーカーの有意な低下を示し、石灰物量の有意な減少を生じた。高グルコース条件下ではROSの有意な増加を認めた。

【考察・結論】糖尿病モデルラットにおいて酸化ストレスマーカーの上昇を伴うインプラントのオッセオインテグレーションの阻害と、*in vitro*における高グルコース培養による骨代謝低下とROS発現増加から、高血糖に起因した酸化ストレスによりオッセオインテグレーションが阻害される可能性が示唆された。

O-11

矯正治療中の授乳期女性に対し過酸化水素水漂白剤不使用にて高出力パルス青色LED光照射器を用い歯牙変色改善を図った臨床報告

平野 絵美

キーワード：部分矯正，高出力パルス青色LED，過酸化水素水不使用，歯牙漂白，ブラークコントロールレコード

【目的】上顎右側側切歯挺出を目的とした矯正中の授乳期女性に対し、過酸化水素水不使用にて高出力パルス青色LED光照射によりホワイトニングを行い良好な経過を得たため報告する。

【方法】矯正治療中の授乳期40代女性に対し、文書による説明と同意取得の後、過酸化水素水を含まない歯面清掃研磨材（一般医療機器EXクリーナー）を塗布し歯面冷却機能付きの高出力パルス青色LED照射器（一般医療機器CoolBrightエックスリミット，ナノオブテック）（波長450nm，出力8,000mW/cm²，パルス幅20ms，パルス繰返し数13pps）により30分間歯面接触照射し、歯牙変色改善を図った。歯の明度は、シェードガイドを用いて視感比色で測定した。術前・中・後における疼痛・知覚過敏・熱感等の主観的評価ではVisual Analogue Scale相当の0～10段階の主観スコアのアンケートを実施した。

【結果】炎症所見、また疼痛、知覚過敏等の有害事象なく歯牙漂白効果が認められた。施術中ベインスコア4の熱感の訴えがあり照射方向の調整により熱感は消失した。

【考察】術前PCR0%であったがTEK装着された上顎右側側切歯ブラケット周囲において著明な変色を認め、本施術により患者の高い満足を得ることが出来た。従来、漂白剤主成分として過酸化水素水が使用されているが授乳期女性における使用の安全性は確立されておらず、過酸化水素水不使用の本漂白システムは有用であると考えられる。本ホワイトニング効果は歯牙自家蛍光物質の光化学反応により生成されたラジカル酸化によるものと推定している。今後さらなるデータの集積が必要であると考えられる。

O-10

歯周炎患者における急速矯正治療の有用性

田中 真喜

キーワード：歯周病，急速矯正治療

【目的】歯列不正を伴う歯周炎患者に対して矯正治療を適応する際、歯周炎の悪化および治療期間の長期化を避けることが望まれる。Wilcoらによって2001年に提唱された外科処置を併用した急速矯正治療 (periodontally accelerated osteogenic orthodontics: PAOO) は、矯正治療期間の短縮に加え、歯周組織再生療法を併用して骨と軟組織を増生しながら治療を進めることを可能にする。本報告では、演者らが歯周炎患者にPAOOを適応した治療結果を評価し、PAOOの有用性を検証する。

【材料と方法】平成17年11月から令和元年11月までに誠敬会クリニックにてPAOO治療を行った49名を被験者とした。歯周炎患者 (43.3 ± 8.9歳) は男性6名、女性31名、NP (20.8 ± 3.7歳) は男性4名、女性7名であった。歯周炎患者 (Stage I～IV) と健常者 (NP) 間における各種臨床データ、歯周組織の安定性および治療期間を比較・検討した。

【結果と考察】矯正治療の動的期間 (月) は、NP群: 10.4 ± 2.9, Stage I群9.7 ± 2.6, Stage II群11.0 ± 3.7, Stage III群9.9 ± 3.5, Stage IV群11.1 ± 5.0であり、各群間に有意差はなかった。

平均ポケット深さは、NP群, Stage I群およびStage II群において初診時と矯正治療終了時には有意な変化を認めなかったが、Stage III群およびStage IV群では平均ポケット深さが有意に減少した (P < 0.01)。

【結論】PAOOにより歯周炎の重症度に関わらず、健常者と同等に治療期間が短縮された。また、重度歯周炎患者では、歯周組織の改善が有意に認められたことから、PAOOは、歯周炎患者の歯周ポケットが4mm以下で維持され歯周組織の安定および歯列の改善を早期に図れる有用な治療方法であることが示唆された。