



Title	新規開発した in vivo モデルによる根尖孔外バイオフィルムと根尖病巣に関する研究
Author(s)	呉本, 勝隆
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34375
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

新規開発した *in vivo* モデルによる
根尖孔外バイオフィルムと根尖病巣に関する研究

大阪大学大学院 歯学研究科
分子病態口腔科学専攻 (歯科保存学教室)
(指導教官：林 美加子教授)
呉本 勝隆

本論文の要旨の一部は、

第 137 回日本歯科保存学会（平成 24 年 11 月，広島）、The 9th
World Endodontic Congress (May 2013, Tokyo, JAPAN) において発表し
た。

緒言

近年、根尖性歯周炎の難治化には、根尖孔外に形成されたバイオフィルムが関与することが明らかとなった¹⁻⁴⁾。バイオフィルム内の細菌は、宿主の免疫反応や抗生物質に対し抵抗性を示すため⁵⁾、バイオフィルム感染症である齲蝕や歯周病の治療には主にバイオフィルムの機械的除去が行われている。しかし、根尖孔外バイオフィルムは根管内からの機械的除去が不可能であるため、対応の第一選択は外科的歯内療法（歯根端切除術）となる。

現在、根尖孔外など、機械的除去が困難なバイオフィルムに対して新たな治療法や抑制法の開発を目指した研究が行われている^{6, 7)}。Asahi ら⁸⁾は、細菌の細胞間コミュニケーションであるクオラムセンシングに関与するアシルホモセリンラク톤の類似化合物の 3 種が、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に対して阻害効果を示すことを報告した。また、Maezono ら⁹⁾はマクロライド系抗菌剤のアジスロマイシンが、浮遊系の *P. gingivalis* の最小発育阻止濃度以下で *P. gingivalis* バイオフィルムを抑制することを報告した。これら *in vitro* で得られた結果を臨床応用するためには、動物実験

での抗バイオフィルム効果の検討が必要である。そのために、*in vivo*における根尖孔外バイオフィルムモデルの開発が必要であると考えた。

これまで、動物を用いて実験的に根尖性歯周炎を惹起させた研究は数多く報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。しかし、根尖性歯周炎を惹起させ、さらに根尖孔外にバイオフィルムを形成させた実験モデルの報告は未だ存在しない。そのため、根尖孔外バイオフィルムは、その形成メカニズムや難治化との関連、および根尖病巣に及ぼす影響については未だ明らかになっていない。

従来、根尖病巣による根尖周囲の歯槽骨の変化は、ほとんどがエックス線写真または組織学的切片によって評価されてきた¹⁵⁻¹⁸⁾。しかし、三次元的な構造を二次元的に分析することは、正確性、客観性に欠けることは明らかである。近年、実験動物用の高分解能を持つ *micro-Computed Tomography* (以下、マイクロ CT と略す) が開発され、これによって同一の個体を経時的かつ三次元的に評価することが可能となった。

そこで本研究では、ラットを用いた根尖孔外バイオフィルムモデルを開発し、根尖孔外バイオフィルムを形成する細菌の同定、定量

を行うとともに、根尖孔外バイオフィルムが根尖病巣に及ぼす影響を、マイクロ CT を用いて経時的三次元計測にて検討した。

材料および方法

本研究は大阪大学大学院歯学研究科および工学研究科の動物実験委員会の審査、承認の後行われた (承認番号 : 22-003-2, 23-2-1)。

1. ラットにおける根尖孔外バイオフィルムモデルの開発

図 1. に本研究の実験デザインを示した。実験には 5 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) 24 匹を用いた。実験的根尖病巣の形成は、Kawahara ら¹⁹⁾の方法に準じて行った。実験動物にペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) (ネンブタール[®], 大日本製薬, 大阪) とカルプロフェン (3 mg/kg) (リマダイル[®]注射液, ファイザー, 東京) の腹腔内注射による全身麻酔を施し、下顎両側第一臼歯に対して、電気エンジン (VIVA MATE G5, NSK, 栃木) に装着した #1/2 ラウンドバー (Dentsply, Switzerland) を用いて咬合面近心小窩より露髄させた。同歯の髓腔を開放状態で 4 週間放置することにより、実験的に根尖性歯周炎を惹起した。その後、ガッタパーチャポイント (以下、GP と略す) (アクセサリーポイント FS, Pearl Dent Co, Ltd, Vietnam) を下顎右側第一臼歯の近心根に、根尖孔を越えた位置まで

挿入し、被験歯とした。GP が根尖孔から 1 mm 越えることを想定し、GP はあらかじめ全長 5 mm の長さに切断し、近心頬側咬頭を基準点として挿入した。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。露髄 6 および 8 週後に組織学的観察、微細形態学的観察および遺伝子学的分析によって根尖孔外バイオフィルムを検索した。

1) 組織学的観察

露髄 6 および 8 週後のラットにペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬) を腹腔内に過剰投与することにより屠殺した (各期間 4 匹)。下顎第一臼歯を含む下顎骨を摘出し、軟組織を除去したうえで、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカライテスク, 京都) で 12 時間浸漬固定 (4°C) 後、15% グリセリン (和光純薬, 大阪) を添加した 10% エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (同仁化学研究所, 熊本) 溶液中で約 14 日間 4°C にて低温脱灰を施した。脱灰終了後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、OCT コンパウンド (Sakura Finetechnical, 東京) に包埋した。凍結ブロック中の試料を、クリオスタット (CM3050S, Leica,

Germany) を用いて薄切し、厚さ 8 μm の連続凍結切片を作製した。得られた切片は染色時まで -80°C にて保存した。

細菌バイオフィルムを観察するため、切片に Taylor の Brown – Brenn 染色²⁰⁾を施した。すなわち、切片を 1 時間乾燥し、30 分水洗した後、ハリスのヘマトキシリン (武藤化学, 東京) に 10 分間反応させ、水洗後、0.1% 塩酸・70% アルコール (武藤化学) で分別した。水洗後、0.1% 飽和炭酸リチウム液 (武藤化学) を反応させ、5 分間水洗した。その後クリスタルバイオレット液 (武藤化学) を 2 分間反応させ、2% ヨウ素溶液 (武藤化学) で 1 分間媒染し、水洗後、乾燥した。次いで、切片をエーテル・アセトン (和光純薬) 液に浸漬して脱色し、塩基性フクシン液 (武藤化学) を 3 分間反応させた後水洗した。アセトン・ピクリン酸 (和光純薬) 溶液で処理した後、キシレン (和光純薬) で透徹し、標本封入剤 (SUPER mount M480, ファルマ, 東京) で封入した後、光学顕微鏡 (ECLIPSE Ni-U, Nikon, 東京) 下の観察に供した。

2) 微細形態学的観察

露髄 6 および 8 週後のラットにペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬) を腹腔内に過剰投与することにより屠殺し (各期間 4 匹)、下顎両側第一臼歯をスプーンエキスカベータ (10-506, YDM, 東京) を用いて抜去した。得られた抜去歯試料を、生理食塩水と 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄後、Asahi ら²¹⁾の方法に準じて調整した。すなわち、ハーフカルノフスキー溶液 (2% パラホルムアルデヒド・2.5% グルタルアルデヒド) (pH 7.4) にて 30 分間浸漬固定し、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) により 3 回洗浄した。続いて、上昇エタノール系列 (50 – 100%) で脱水し、*t*-ブタノール (ナカライテスク) で置換した後、凍結乾燥装置 (JFD 310, 日本電子, 東京) を用いて乾燥し、プラズママルチコーター (PMC 5000, メイワフォーシス, 大阪) にて白金蒸着を施した。調整した試料は、走査型電子顕微鏡 (以下、SEM と略す) (JSM 6390 LV, 日本電子) 観察に供した。

3) 遺伝子学的分析

露髄 6 および 8 週後のラットにペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®], 大日本製薬) を腹腔内に過剰投与することにより屠殺し (各期間 4 匹)、下顎両側第一臼歯を抜去した。抜去後、被験歯からは根尖孔外の GP と、根尖から 1 mm 歯冠側部までのセメント質表層をスプーンエキスカベータ (10-506, YDM) にて全周搔把し採取した。対照歯においては根尖から 1 mm 歯冠側部までのセメント質表層を全周搔把し採取した。採取したものを根尖孔外試料とし、InstaGene matrix (Bio-Rad, USA) を使用して遺伝子を抽出した。

dTNP 混合液 (3.2 μ l)、10 $\times$ 緩衝液 (2 μ l)、25 mM MgCl₂ (2 μ l)、Taq ポリメラーゼ (0.2 μ l) (TaKaRa LA Taq[®], タカラバイオ, 滋賀)、16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマー (63f : CAGGCCTAACACATGCAAGTC, 1387r : GGGCGGWGTGTACAAGGC)²²⁾ (各 1 μ l)、および抽出 DNA 液 (5 μ l) に滅菌蒸留水を加えて全量 20 μ l の PCR 反応溶液とし、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) にて、initial denature 95°C で 2 分間、denature 95°C で 0.5 分間、annealing 56°C で 1 分間、extension 72°C で 1 分間、final extension 72°C で 60 分間、サイクル

数 30 の条件でターゲット DNA の増幅を行った。

PCR 産物をアガロース – RE (ナカライテスク) にエチジウムブロマイド (和光純薬) を含有させ作製した 1% アガロースゲル上にて電気泳動後、分子量約 1300 bp に相当するバンドを 16S rRNA の配列が正しく増殖された PCR 産物と判断した。

2. ラットにおける根尖孔外バイオフィルム細菌の同定・定量

前述の 1. 項と同一の方法で 5 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 30 匹の下顎両側第一臼歯に根尖性歯周炎を惹起させ、露髄 4 週後に下顎右側第一臼歯の近心根に、全長 5 mm の長さに切断した GP を、近心頬側咬頭を基準点として根尖孔を越えた位置まで挿入し、これを被験歯とした。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。

1) 根管内・根尖孔外バイオフィルム形成細菌の同定

露髄 6 および 8 週間後に、前述の 1. 3) 項と同一の方法で被験歯と対照歯から根尖孔外試料を採取した (各期間 5 匹)。また、被験歯と対照歯の根管内を #30 H ファイル (MANI, 栃木) にて全周フ

アイリングすることで得られた削片を根管内試料とした（各期間 5 匹）。採取した根尖孔外試料と根管内試料は輸送培地（ANA ポート，阪大微研，大阪）に浸漬した。輸送培地に浸漬した試料を十分に攪拌した後、Noiri ら²³⁾の方法に準じて直接分離培養および増菌培養を行った。すなわち、直接分離培養では、試料を 5% 羊血液添加コロンビア寒天培地に滴下してコンラージ棒で塗抹し、35℃ で 14–48 時間、5% CO₂ 条件下、あるいは 37℃ で 1–5 日間連続嫌気培養した。増菌培養では、試料を臨床用チオグリコレート培地に播種し、35℃ で 1–7 日間培養した。菌の発育が認められたら、5% 羊血液添加 Trypticase Soy Agar、5% 羊血液添加コロンビア CAN 寒天培地、マッコンキー寒天培地、および 5% 羊血液添加コロンビア寒天培地に再度分離培養した。直接分離および増菌培養で得られた異なる集落について、グラム染色性、形態、発育性、および生化学的性状により細菌種を同定した。尚、生化学的性状試験には API シリーズ (BIOMERIEUX, France) および RaP ID シリーズ (アムコ，東京) を使用した。

2) リアルタイム PCR による根尖孔外細菌の定量

露髄 6、8、12、16 および 20 週後に、前述の 1.3) 項と同一の方法で被験歯と対照歯から根尖孔外試料を採取し (各期間 4 匹)、InstaGene matrix (Bio-Rad) を使用し遺伝子を抽出した。

Power SYBR® Green PCR Master Mix (10 µl) (Applied Biosystems)、16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマー (357f : CTCCTACGGGAGGCAGCAG, 907r : CCGTCAATTCMTTTRAGT-TT)²⁴⁾ (各 0.5 µl)、および抽出 DNA 液 (1 µl) に滅菌蒸留水を加えて全量 20 µl の PCR 反応溶液とし、ABI 7500 Fast system (Applied Biosystems) により initial denature 95°C で 3 分間、denature 95°C で 15 秒間、annealing 65°C で 1 分間、extension 72°C で 1 分間、サイクル数 30 の条件でターゲット DNA の増幅を行った。増幅中の蛍光シグナルの検出は各サイクルの終了後に行った。更に増幅終了後、60°C から 95°C へ温度を上昇させ、この間 0.5°C の間隔で蛍光シグナルを検出して融解曲線を作製し、増幅産物の特異性を確認した。検量線を作成するための標準試料には *Enterococcus faecalis* SS497 を用いた。データは 7500 System SDS Software Version 2.0.2 (Applied Biosystems) を用いて解析した。

3. マイクロ CT による根尖病巣体積の経時的三次元計測

前述の 1. 項と同一の方法で 5 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 6 匹の下顎第一臼歯に根尖性歯周炎を惹起させ、露髄 4 週後に下顎右側第一臼歯の近心根に、全長 5 mm の長さに切断した GP を、近心頬側咬頭を基準点として根尖孔を越えた位置まで挿入し、これを被験歯とした。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。露髄 1、2、3、4、6、8、12、16 および 20 週後の各時点において、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による麻酔後、マイクロ CT (R_mCT 2, RIGAKU, 東京) にて顎骨の撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 160 μ A、スライス幅 20 μ m に設定し、画像解析ソフトは TRI 3D – BON (RATOK, 東京) を使用した。撮影によって得られたデータに対して、X 軸は近心根の根尖部透過像の起始点を通り、Y 軸は頬側根と舌側根の中心を通り、Z 軸は近心根と遠心根の中心を通るように、各軸を設定した (図 2)。Y 軸より近心かつ X 軸より根尖側に含まれる透過像を根尖病巣とした。

骨密度 (以下、BMD と略す) が既知のファントムを用いて、CT 値を BMD 値に変換する検量線を作製し、各試料の BMD 画像を作製

した。判別分析法により硬組織抽出の閾値を設定し、2 値化画像から病巣部位の面積を計測した。全てのスライスの病巣面積を計測することで病巣体積を算出し、被験歯と対照歯の病巣体積を比較検討した。

また被験歯においては、露髄 4 週後に GP を挿入した後、根尖孔外の GP の長さを、前述の画像解析ソフトを用いて計測した。

4. 統計学的解析

前述の 2.2) および 3. 項において、被験歯と対照歯における細菌量・病巣体積の統計学的有意差の検定は Student's *t* test を用いて、危険率 5% で評価した。また、各期間の細菌量の差については、一元配置分散分析を用いて危険率 5% にて統計学的有意差を検討した。

結果

1. ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルの開発

1) 組織学的観察

図 3. に露髄 8 週後の被験歯と対照歯の根尖孔付近の **Brown – Brenn** 染色像を示した。全ての被験歯で根尖孔外にグラム陰性菌を中心としたバイオフィーム形成が観察されたが、全ての対照歯において炎症性細胞浸潤は認めるものの根尖孔外にバイオフィームは観察されなかった。露髄 6 週後の試料においても、同様に被験歯においてのみ根尖孔外バイオフィームが観察された。

2) 微細形態学的観察

図 4. に露髄 6 週後の被験歯と対照歯の **SEM** 像を示した。全ての試料において、被験歯では根尖孔外の **GP** 表面、根尖付近セメント質にまばらに細菌バイオフィーム様構造が観察された一方、対照歯では根尖孔外に細菌は観察されなかった。露髄 8 週後の試料においても、同様に被験歯では根尖孔外の **GP** 表面や根尖付近セメント質にバイオフィーム様構造が観察されたが、対照歯では観察されな

かった。

3) 遺伝子学的分析

図 5. にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。被験歯では露髄 6 および 8 週後の全ての根尖孔外試料において 1300 ベースペア付近に明瞭なバンドがみられた。一方、対照歯では露髄 6 および 8 週後の全ての根尖孔外試料においてバンドは検出されなかった。

2. ラットにおける根尖孔外バイオフィルム細菌の同定・定量

1) 根管内・根尖孔外バイオフィルム形成細菌の同定

表 1. に、被験歯において根管内・根尖孔外から検出された細菌種および属を示し、表 2. に対照歯において検出された細菌種および属を示した。根管内では 20 試料中全ての試料から細菌が検出され、根尖孔外では 20 試料中 19 試料から細菌が検出された。根管内 20 試料中 15 試料から *Proteus mirabilis* が、14 試料から *Escherichia coli* が、13 試料から *Enterococcus avium* と *Enterococcus gallinarum* が検出された。被験歯の根尖孔外 10 試料中 8 試料から *Enterococcus avium* が、7 試料から *Escherichia coli* が、6 試料から

Klebsiella pneumoniae、*Morganella morganii* および *Proteus mirabilis* が、5 試料から *Enterococcus gallinarum* と *Streptococcus agalactiae* が検出された。対照歯の根尖孔外からは、細菌の検出された 9 試料中 5 試料から *Enterococcus gallinarum* と *Klebsiella pneumoniae* が検出された。

2) リアルタイム PCR による根尖孔外細菌の定量

図 6. に各期間における根尖孔外に存在する細菌量を示した。全ての期間において被験歯の細菌量は対照歯に比べ有意に多く検出された ($p < 0.05$)。また、被験歯の細菌量は、露髄 20 週後まで経時的な増加傾向を示した。

3. マイクロ CT による根尖病巣体積の経時的三次元計測

図 7. に露髄 4 週後の被験歯における、根尖孔外の GP の長さを計測した際の画像の一例を示した。GP の長さの平均は 0.996 mm、標準偏差は 0.0779 mm であった。GP は想定した深さ (根尖孔を越えて 1 mm) まで均一に挿入されていることが確認された。

図 8. に各期間における根尖病巣体積を示した。被験歯、対照歯と

もに根尖病巣体積は露髄 4 週後にピークを迎え、その後わずかに減少傾向を示した。被験歯に GP を挿入した後では、露髄 6 週間には有意差はなかったものの、露髄 8 週間から 20 週間まで被験歯の根尖病巣体積は対照歯に比べ有意に大きかった ($p < 0.05$)。

考察

臨床的に難治性根尖性歯周炎と診断された歯の過剰根管充填材表面に細菌バイオフィーム形成が観察されていることや²⁾、*in vitro* において、*Enterococcus faecalis* などの細菌が GP 上にバイオフィームを形成することが報告されている²⁵⁾。これらのことから、根尖孔外バイオフィームは、GP を足場として根管内で形成されたバイオフィームが根尖孔外まで成長していくことで形成されると推察される。

動物で実験的に根尖病巣を形成させ、組織学的にその病巣を観察した報告は多くみられる。今までに、実験的根尖病巣の形成に用いられた実験動物には、ラット^{10, 12, 14)}、ネコ²⁶⁾、イヌ^{11, 27)}、サル^{13, 28)}などがみられ、一般にはラットが使用されることが多い。ラットの臼歯は解剖学的構造がヒトのものに類似しており、遺伝的背景が明らかで、個体差がほとんどない。また、多数の個体を得ることや多数の個体を短期間に一度に実験に使用することが容易である。そのため、均一な実験的根尖病巣の形成にはラットが最も適していると思われる。よって本実験では、ラットに実験的に根尖病巣を形成させた後、GP を根尖孔外まで挿入することによって根尖孔外バイオフィ

ィルムの形成を試みた。組織学的観察、微細形態学的観察ならびに遺伝子学的分析の結果より、露髄 6 週後以降に本手法により根尖孔外にバイオフィルムが形成されることが明らかとなり、ラットにおける根尖孔外バイオフィルムモデルが確立されたと考えられる。さらに、マイクロ CT を用いた根尖孔外 GP の計測によって、本手法で想定した長さまで GP を均一に挿入できることが明らかとなった。また、Brown – Brenn 染色において、根尖孔外バイオフィルムの大部分はグラム陰性菌によって形成されており、これはヒトの根尖孔外バイオフィルムにおける傾向と一致していた^{29, 30)}。

根尖孔外まで挿入された GP は、それ自体が異物として免疫応答を起こすため^{31, 32)}、理想的には GP を挿入せずに根尖孔外バイオフィルムを形成することが望ましい。しかし、予備実験において GP を挿入しない状態で根尖孔外バイオフィルムの形成を試みたが、露髄 20 週後においても根尖孔外にバイオフィルムを形成しなかった (データ示さず)。そのため、GP の挿入無しでは根尖孔外バイオフィルムを形成することが不可能か、あるいは形成できたとしても長期間を要するため、実験モデルとしては不適當または成立しないと考えられる。よって、実験モデルとしては、根尖孔外の GP 自体の影響

は受けるものの本手法が適切であると考えられる。また、GP の根尖孔外への挿入によって容易に根尖孔外バイオフィームが形成されたことから、臨床の現場において、根尖孔外を越えて挿入された GP は時として根尖孔外バイオフィーム形成の足場となる可能性があることが示唆される。本研究では GP を 1 本挿入しているのみで、根管充填は行っておらず、死腔が十分あったため、よりバイオフィーム形成が起こり易い状況であったと考えられる。臨床的に緊密な根管充填が行われておらず、かつ過剰根管充填されてしまった場合、根尖孔外バイオフィームが形成される可能性は極めて高くなると考えられる。従って、エックス線的にこのような状態を示す像がみられた症例では、根尖孔外バイオフィームの存在を念頭において治療を行う必要があるだろう。

ヒトの難治性根尖性歯周炎罹患歯の根管内細菌を同定した研究は数多く報告されており³³⁻³⁵⁾、これらの報告の多くでは、*E. faecalis* が高頻度で検出されている。ラットを用いた本実験においても、ヒトの根管内と同様に培養法では *Enterococcus* が高頻度で検出された(表 1, 2)。被験歯と対照歯から検出された細菌種は、根管内と根尖孔外で同様の傾向を示した。これは、根管内で形成されたバイオフ

ィルムが根尖孔外へ向かって伸展して根尖孔外バイオフィルムが形成されることの一つの状況証拠となる。本研究において、ヒトの根管内から一般的に検出される *Fusobacterium*、*Campylobacter*、*Bacteroides endodontalis* が検出されなかったが、これは過去にラットの根管内の細菌叢を検索した報告³⁶⁾と一致している。しかし、ラットの細菌叢の好気性菌と嫌気性菌の割合はヒトのものに類似している³⁶⁾ことから、ヒトの根尖孔外バイオフィルムもラットの場合と同様の機序で形成されると推察される。

本研究では、リアルタイム PCR によって根尖孔外に存在する細菌量を計測した。図 6. より、被験歯では根尖孔外の細菌量は各期間で有意差はないものの増加傾向を示したことから、根尖孔外バイオフィルムは経時的に成長していくと推察された。培養法における対照歯の根尖孔外試料からの検出菌や、リアルタイム PCR において対照歯で認められたわずかな細菌遺伝子は、根尖孔外試料採取時に生じる根管内からのコンタミネーションであると思われる。

エックス線 CT は 1972 年に G. Hounsfield ら³⁷⁾によって開発され、医療診断に応用されることにより、医学界に革新的な進歩をもたらした。その後、エックス線 CT の画像技術は工業界の非破壊検

査にも応用され、創薬等の研究に応用可能な実験動物用のエックス線マイクロ CT の開発が熱望されていた。しかし、実験動物の CT 撮影を従来の CT 装置で行う場合、ヒトの医療用 CT では小動物を撮影するには解像度が不足し¹⁹⁾、工業用 CT では長時間の撮影での動物への被曝の影響が大きい上、サンプルを回転して撮影するシステムであるため生きた動物の撮影に適していなかった。近年、わずか 17 秒のエックス線撮影で 512 枚の CT 画像を得ることができる高解像度 (最小 10 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) の実験動物用マイクロエックス線 CT 装置である R_mCT 2 (RIGAKU) が開発された。この装置では、1 撮影 (17 秒撮影) での被曝量は 10 mGy 以下であるため、小動物の骨組織の変化を生きたまま経時的かつ三次元的に計測することが可能となった。本実験では、このマイクロ CT 装置を用いて根尖病巣の体積を経時的に三次元計測した。以前にも Kawahara ら¹⁹⁾が、ヒトの医療用 CT 装置 (Light Speed Qx/i, GE, USA) を使用しラットの根尖病巣を撮影したが、本装置ではヒトの医療用 CT 装置の 100 倍以上の分解能を有している。また、本実験では撮影時に BMD 値が既知のヒドロキシアパタイト製ファントムを使用し、硬組織の閾値を設定しているため、より正確で客観性のある結果が導かれた。

図 8. より、ラットの根尖病巣の体積は露髄 4 週後以降にわずかに縮小傾向を認めたが、これは Wistar 系ラットにおいて根尖病巣を二次元的に計測した過去の報告と一致している^{38, 39)}。図 6. において、被験歯の根尖孔外の細菌量は増加傾向を認めるものの、図 8. における被験歯の根尖病巣体積は露髄 8 週後から停滞状態となっている。これは、根尖病巣の主たる原因はあくまで根管内の細菌であり、根管内の細菌に比べ圧倒的に少ない根尖孔外の細菌が多少増加したところで、根尖病巣体積には大きく反映されないものと推察される。ラットの実験的根尖性歯周炎では、露髄 4 週後までが病巣の拡大期とされ、それ以降、病巣は安定化していくと考えられている^{40, 41)}。病巣の拡大期では炎症性細胞浸潤は増加していくが、それ以降では炎症性細胞浸潤は減少していくことや⁴²⁾、病巣拡大期では T リンパ球の中で CD4 陽性 T リンパ球が優勢になり、それ以降では CD8 陽性 T リンパ球が優勢となっていくことが報告されている⁴³⁾。根尖周囲に存在する細菌は根尖周囲の炎症反応を惹起する^{44, 45)}ことから、根尖孔外バイオフィルムが存在すると、バイオフィルム内の細菌量に関わらず根尖周囲で持続的な炎症反応が生じ、病巣拡大期から安定期への移行に影響を及ぼす可能性があり、その結果、被験歯と対

照歯との間で病巣体積に有意な差が生じたと推察される。

歯科の領域において、バイオフィルムに対する局所免疫反応について *in vitro* と *in vivo* の両面で研究が行われている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。しかし、*in vivo* における根尖孔外バイオフィルムモデルはこれまで存在しなかったため、根尖孔外バイオフィルムに対しての宿主免疫反応を調べた研究は未だ存在しない。本研究により開発したモデルを用いることで、根尖孔外バイオフィルムが免疫反応に及ぼす影響を検討することが可能となる。図 8. で認められた病巣体積の変化についても、今後、免疫細胞の変化を検索することによって、より詳細なメカニズムが明らかになると推察される。

ラットにおける根管治療モデルは以前に報告されている⁴⁹⁾。しかし、そのモデルでは下顎第一臼歯 4 根管中 2 根管のみ根管治療を行っており、残りの 2 根管については未処置のままであり、完全なモデルではない。より優れた根管治療モデルとして、4 根管全てを処置するモデルの開発が必要である。現在、臨床の間ではマイクロエンドドンティクスが普及し、それに伴って様々な顕微鏡治療用の器具が開発されている。これらを応用することによって、動物の根管治療の術式が確立されれば、今後、本研究の方法で根尖孔外バイ

オフィルムを形成した後に根管治療を行うことで、根尖孔外バイオフィルムと難治性根尖性歯周炎との関連を明らかにできると推察される。

本研究で開発したラットにおける根尖孔外バイオフィルムモデルは、これまでに *in vitro* で報告されている抗バイオフィルム剤^{6,7)}の結果を臨床に応用するための重要な礎となる。また、このモデルを用いることによって、根尖孔外バイオフィルムの形成メカニズムや、根尖孔外バイオフィルムによって根尖周囲における免疫応答がどのように変化するのかを解明することが可能となり、根尖孔外バイオフィルムに対する治療法の新たな緒が得られるものと考えられる。

結論

本研究では、ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルの開発を試みた。そして、根尖孔外バイオフィームの根尖病巣に及ぼす影響を検討し、以下のような結論を得た。

1. ラットにおいて、4 週間の露髄によって実験的根尖病巣を形成させた後、GP を根尖孔外まで挿入することによって、露髄 6 週後から根尖孔外バイオフィームが形成できることが明らかとなった。
2. 根尖孔外バイオフィームは、根尖孔外に挿入された GP とともに根尖病巣の進展に関与することが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を実施する機会を与えて頂き、御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科恵比須繁之教授(現大阪大学理事・副学長)ならびに大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)林 美加子教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始変わらぬ御指導を賜りました野杵由一郎博士に心から感謝致します。また、本研究の遂行に際し、様々な御指導と御協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻中野貴由教授ならびに石本卓也博士に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究に対し様々な御支援を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)の諸先生方に深く感謝致します。

文献

- 1) Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L (2002) Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod 28: 304-310.
- 2) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S (2002) Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. J Endod 28: 679-683.
- 3) Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC (2002) EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod 28: 815-818.
- 4) Nair PN (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Biol Med 15: 348-381.
- 5) Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358: 135-138.
- 6) Kagan S, Jabbour A, Sionov E, Alquntar AA, Steinberg D, Srebnik M, Nir-Paz R, Weiss A, Polacheck I (2013) Anti-Candida albicans biofilm effect of novel heterocyclic compounds. J Antimicrob Chemother: Epub ahead of print.

- 7) Ma H, Darmawan ET, Zhang M, Zhang L, Bryers JD (2013) Development of a poly(ether urethane) system for the controlled release of two novel anti-biofilm agents based on gallium or zinc and its efficacy to prevent bacterial biofilm formation. *J Control Release* 172: 1035-1044.
- 8) Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S (2010) Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontal Res* 45: 255-261.
- 9) Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Asakami H, Ebisu S (2011) Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5887-5892.
- 10) Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20:340-349.
- 11) Torneck CD, Tulananda N (1969) Reaction of alveolar bone and cementum to experimental abscess formation in the dog. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 28:404-416.
- 12) Tagger M, Massler M (1975) Periapical tissue reactions after pulp

exposure in rat molars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 39:304-317.

13) Walton RE, Ardjmand K (1992) Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. J Endod 18: 216-227.

14) Liu L, Peng B (2013) The expression of macrophage migration inhibitory factor is correlated with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in induced rat periapical lesions. J Endod 39: 984-989.

15) Yu SM, Stashenko P (1987) Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. J Endod 13: 535-540.

16) Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y (1994) Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. J Endod 20: 13-17.

17) Xiong H, Wei L, Hu Y, Zhang C, Peng B. (2010) Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. Int Endod J 43: 485-491.

18) Tanaka T, Ozeki N, Kawai R, Imaizumi I, Nakata K, Nakamura H (2013) Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase-8 and -17 in development of rat periradicular lesion. J Endod 39: 638-642.

19) Kawahara T, Murakami S, Noiri Y, Ehara A, Takemura N, Furukawa S,

Ebisu S (2004) Effects of cyclosporin-A-induced immunosuppression on periapical lesions in rats. J Dent Res 83: 683-687.

20) Taylor RD (1966) Modification of the Brown and Brenn gram stain for the differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. Am J Clin Pathol 46:472-474.

21) Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S (2012) Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. J Appl Microbiol 112: 404-411.

22) Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64: 795-799.

23) Noiri Y, Kawakami Y, Katsumoto T, Noguchi N, Asahi Y, Yamaguchi M, Ebisu S (2006) Effects of Er: YAG Laser Irradiation on Residual Bacteria in the Root Canal around the Root Apex. Jpn J Conserv Dent 49: 537-544.

24) Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian

malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 22: 9047-9051.

25) Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S (2004) Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 112: 523-529.

26) Torabinejad M, Kiger RD (1980) Experimentally induced alterations in periapical tissues of the cat. *J Dent Res* 59: 87-96.

27) Silva LA, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA (2012) Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 38: 360-366.

28) Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 89: 475-484.

29) Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S (2005) Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 71: 8738-8743.

30) Wang J, Chen W, Jiang Y, Liang J (2013) Imaging of extraradicular biofilm using combined scanning electron microscopy and

stereomicroscopy. *Microsc Res Tech* 76: 979-983.

31) Hatsuya H (1978) Mouse peritoneal macrophage reaction to gutta percha in vivo and in vitro. *Jpn J Exp Med* 48: 167-176.

32) Ricucci D, Langeland K (1998) Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J* 31: 394-409.

33) Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 86-93.

34) Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, et al. (2003) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36: 1-11.

35) Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 19: 71-76.

36) Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P (1994) Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral*

Microbiol Immunol 9: 129-135.

37) Hounsfield GN (1973) Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. Br J Radiol 46: 1016-1022.

38) Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y (1994) Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. J Endod 20: 13-17.

39) Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H (1996) Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. J Endod 22: 418-421.

40) Stashenko P, Yu SM (1989) T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. J Dent Res 68: 830-834.

41) Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Kobayashi C, Suda H (1994) Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. J Endod 20: 27-31.

42) Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H (2008) The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. J Endod 34: 1072-1076.

43) Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H (1996) Kinetics of

macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. J Endod 22: 311-316.

44) Ricucci D, Pascon EA, Ford TR, Langeland K (2006) Epithelium and bacteria in periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101: 239-249.

45) Ricucci D, Siqueira JF Jr (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod 36: 1277-1288.

46) Bainbridge B, Verma RK, Eastman C, Yehia B, Rivera M, et al. (2010) Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. Infect Immun 78: 4560-4569.

47) Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, et al. (2011) The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss J Immunol 186: 869-877.

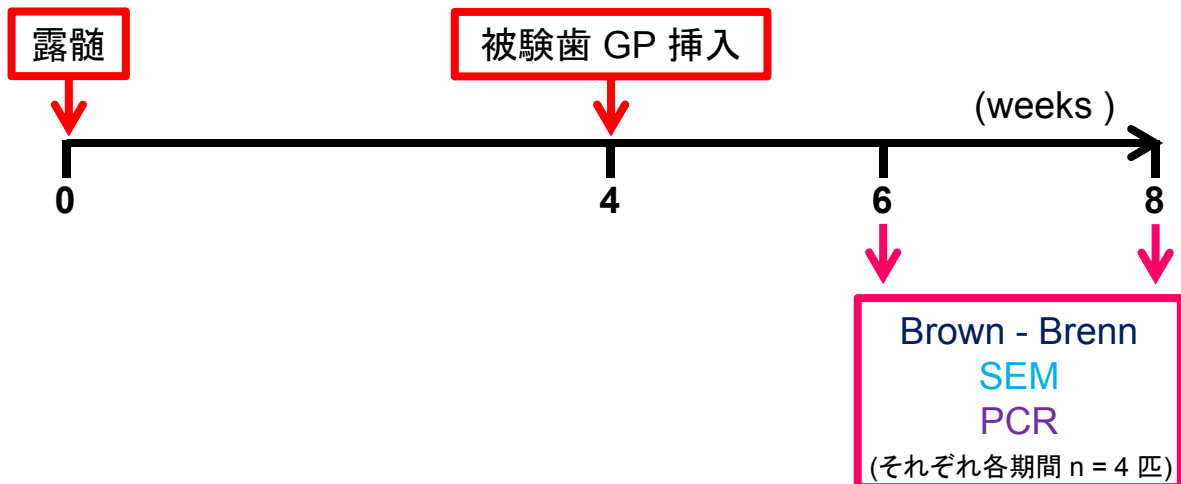
48) Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, et al.

(2011) Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 10: 497-506.

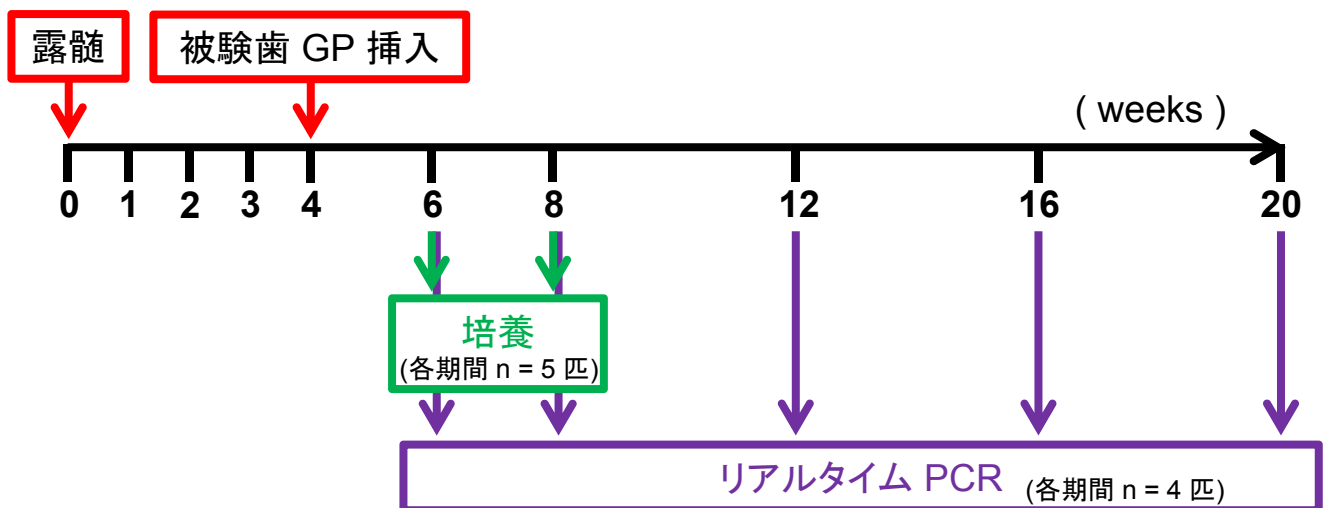
49) Martinez ZR, Naruishi K, Yamashiro K, Myokai F, Yamada T, et al.

(2007) Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *J Endod* 33: 936-943.

1. ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルの開発



2. ラットにおける根尖孔外バイオフィーム細菌の同定・定量



3. マイクロ CT による根尖病巣体積の経時的三次元計測

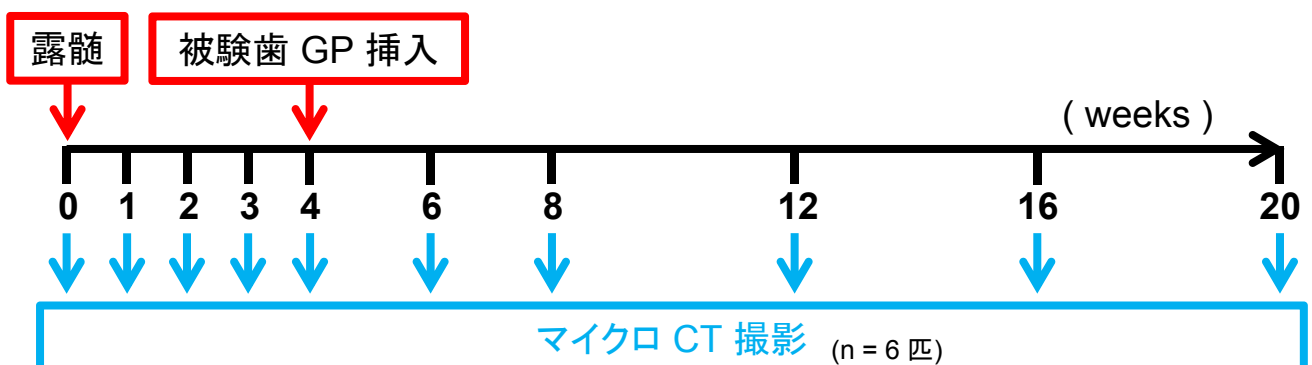


図 1. 本研究の実験デザイン

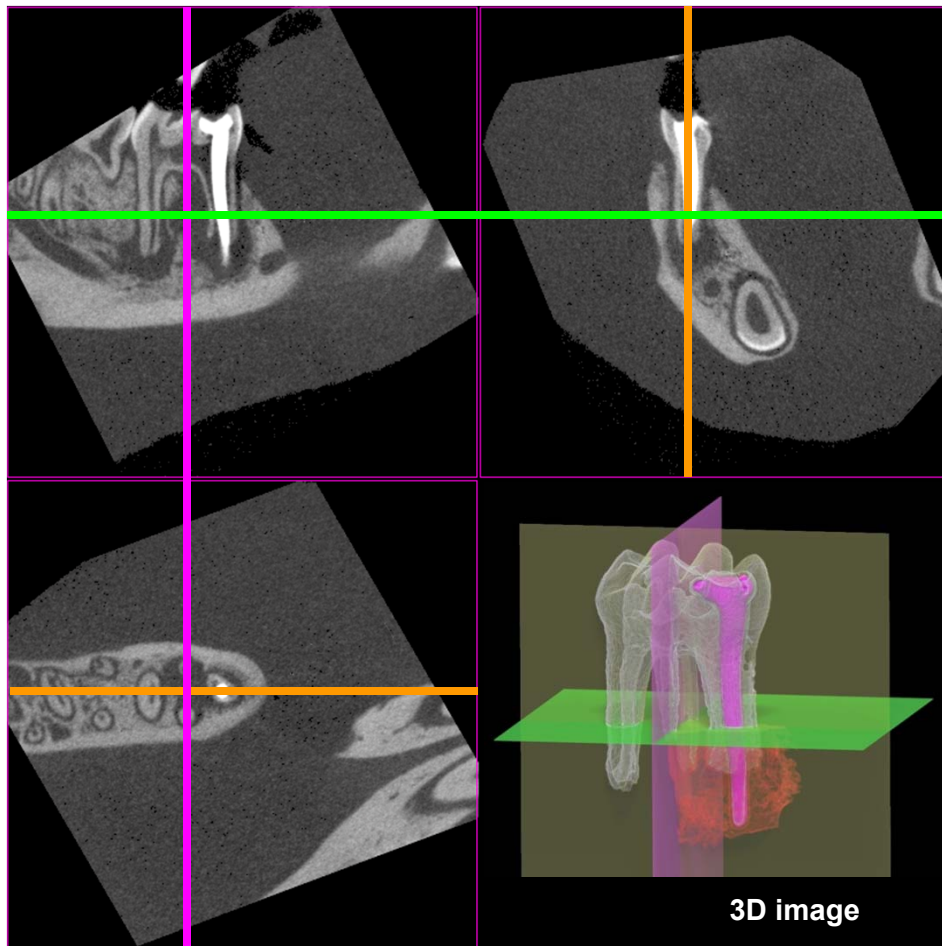


図 2. マイクロ CT 解析における軸設定

X 軸：近心根の根尖部透過像の起始点を通る

Y 軸：頬側根と舌側根の中心を通る

Z 軸：近心根と遠心根の中心を通る

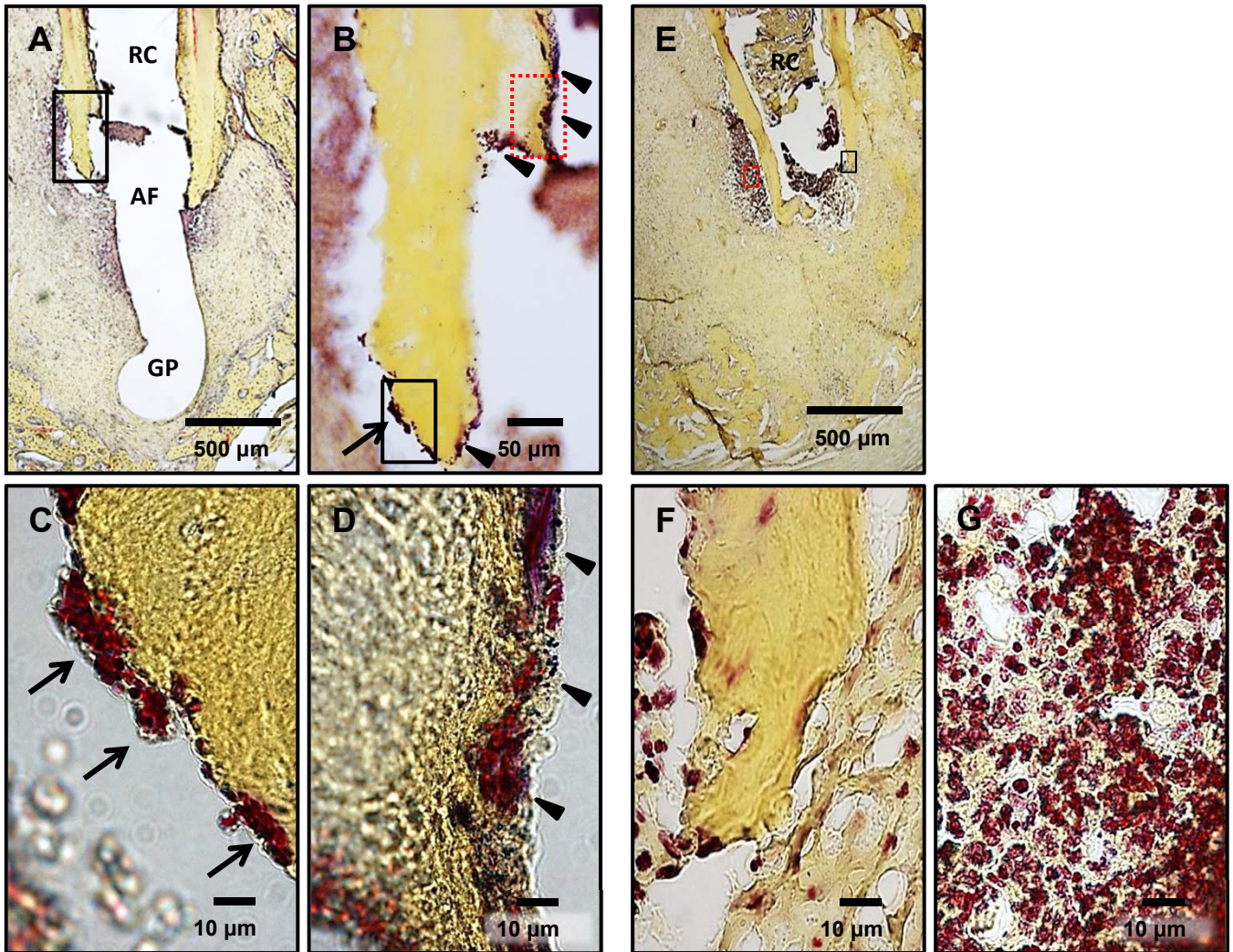


図 3. 露髄 8 週後の被験歯および対照歯の根尖付近の Brown – Brenn 染色像

- A 被験歯の近心根の根尖付近の弱拡大像 (観察倍率 : x 40)
- B A の実線で囲まれた領域の拡大像 (観察倍率 : x 200)
根管内から根尖孔外にかけて、連続的に赤く染色されたバイオフィルム (矢印, 矢頭) が観察された。
- C B の実線で囲まれた領域の拡大像 (観察倍率 : x 1000)
根尖孔外にグラム陰性菌から成るバイオフィルム (矢印) が観察された。
- D B の点線で囲まれた領域の拡大像 (観察倍率 : x 1000)
グラム陽性・陰性菌から成るバイオフィルム (矢頭) が観察された。
- E 対照歯の近心根の根尖付近の弱拡大像 (観察倍率 : x 40)
- F E の実線で囲まれた領域の拡大像 (観察倍率 : x 1000)
根尖孔外にバイオフィルムは観察されなかった。
- G E の点線で囲まれた領域の拡大像 (観察倍率 : x 1000)
根尖病巣内には炎症性の細胞浸潤が観察された。

矢印 : 根尖孔外バイオフィルム, 矢頭 : 根管内バイオフィルム,
AF : 根尖孔, GP : ガッタパーチャポイント, RC : 根管

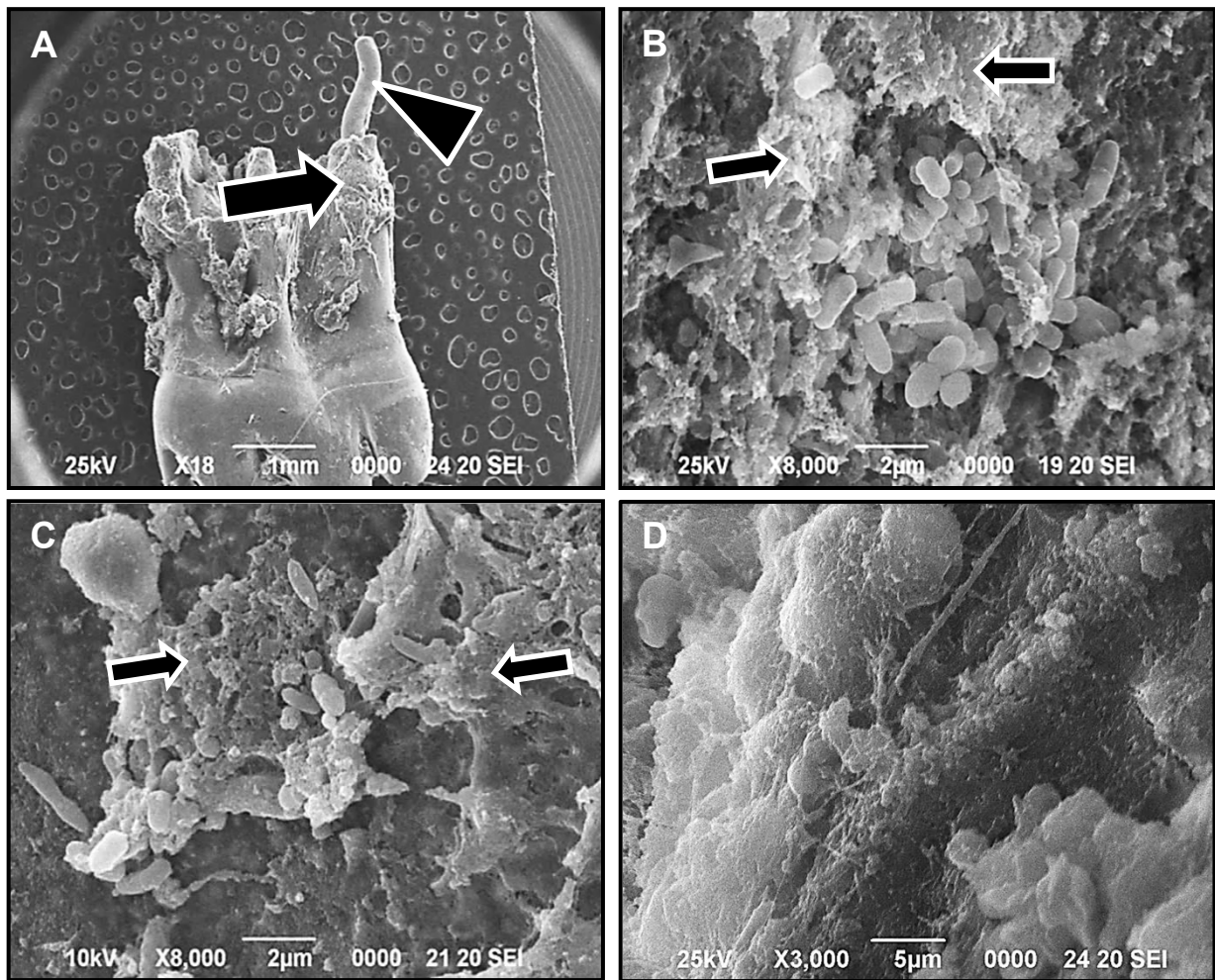


図 4. 露髄 6 週後の被験歯および対照歯の根尖付近の SEM 像

- A 露髄 6 週後の被験歯の全体像 (観察倍率 : x 18)
近心根に GP が根尖孔外まで挿入されている。
- B A の矢頭で指し示された領域の拡大像 (観察倍率 : x 8000)
根尖孔外の GP 表面に、細胞外マトリックス (矢印) に囲まれた短桿状菌・球菌から成るバイオフィルムが観察された。
- C A の矢印で指し示された領域の拡大像 (観察倍率 : x 8000)
根尖付近のセメント質表面には細胞外マトリックス (矢印) と桿菌から成るバイオフィルムが観察された。
- D 露髄 6 週後の対照歯の根尖付近セメント質 (観察倍率 : x 8000)
根尖孔外に細菌は観察されなかった。

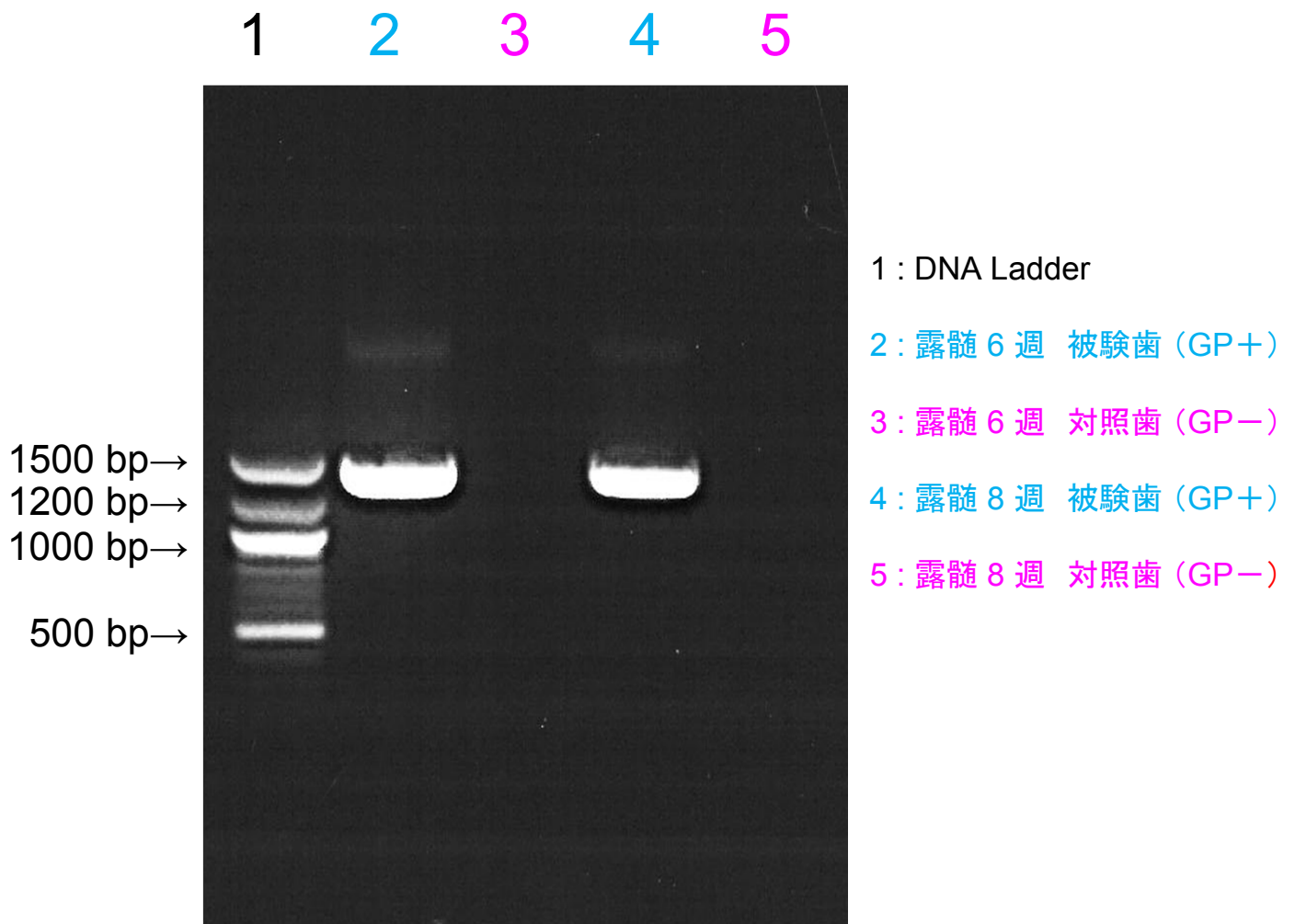


図 5. 露髄 6 および 8 週後の根尖孔外バイオフィルム細菌の遺伝子発現

露髄 6 および 8 週後の全ての試料において、被験菌では 1300 bp 付近に明瞭なバンドがみられたが、対照菌ではバンドは検出されなかった。

表 1. 被験歯の根尖孔外および根管内より検出された細菌種および属

細菌種および属	根尖孔外試料				根管内試料			
	6 w		8 w		6 w		8 w	
	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)
<i>Actinomyces</i> sp.		0%		0%		0%	1	20%
<i>Bacteroides distasonis</i>	2	40%	1	20%		0%		0%
<i>Bacteroides fragilis</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1	20%	1	20%	1	20%		0%
<i>Bacteroides uniformis</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Enterococcus avium</i>	4	80%	4	80%	5	100%	2	40%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	20%	2	40%	1	20%	2	40%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	40%	3	60%	4	80%	2	40%
<i>Enterococcus</i> sp.		0%		0%		0%	3	60%
<i>Escherichia coli</i>	4	80%	3	60%	4	80%	4	80%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	80%	2	40%	4	80%	1	20%
<i>Leuconostoc</i> spp.		0%		0%		0%		0%
<i>Micrococcus</i> sp.		0%		0%		0%		0%
<i>Morganella morganii</i>	4	80%	2	40%	4	80%	2	40%
<i>Peptostreptococcus micros</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	1	20%		0%	1	20%		0%
<i>Proteus mirabilis</i>	4	80%	2	40%	4	80%	4	80%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	60%	2	40%	2	40%		0%
<i>Streptococcus bovis</i>		0%	2	40%		0%	3	60%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>		0%		0%		0%		0%
α - <i>Streptococcus</i>		0%		0%		0%	1	20%
Coagulase negative <i>Staphylococci</i>	1	20%		0%	1	20%		0%
<i>Veillonella parvula</i>		0%		0%		0%	1	20%
嫌気性グラム陰性桿菌	1	20%		0%		0%		0%
嫌気性グラム陽性球菌		0%		0%		0%		0%
嫌気性グラム陽性桿菌		0%		0%		0%		0%
好気性グラム陽性桿菌	2	40%		0%	2	40%		0%
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌	2	40%		0%	1	20%		0%

各期間 n = 5 匹

被験歯において、根尖孔外からは**グラム陽性菌**が 8 菌種、**グラム陰性菌**が 8 菌種検出された。
 根管内からは**グラム陽性菌**が 11 菌種、**グラム陰性菌**が 7 菌種検出された。

表 2. 対照歯の根尖孔外および根管内より検出された細菌種および属

細菌種および属	根尖孔外試料				根管内試料			
	6 w		8 w		6 w		8 w	
	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)	検出試料数	検出頻度 (%)
<i>Actinomyces</i> sp.		0%		0%		0%	1	20%
<i>Bacteroides distasonis</i>	2	40%		0%	4	80%		0%
<i>Bacteroides fragilis</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1	20%		0%		0%	1	20%
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	20%		0%		0%		0%
<i>Enterococcus avium</i>	1	20%	2	40%	4	80%	2	40%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	20%		0%	2	40%	2	40%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	3	60%	2	40%	3	60%	4	80%
<i>Enterococcus</i> sp.	1	20%	1	20%		0%	2	40%
<i>Escherichia coli</i>	4	80%		0%	4	80%	2	40%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	80%	1	20%	4	80%	2	40%
<i>Leuconostoc</i> spp.		0%		0%		0%	2	40%
<i>Micrococcus</i> sp.		0%		0%		0%		0%
<i>Morganella morganii</i>	3	60%		0%	4	80%	4	80%
<i>Peptostreptococcus micros</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>		0%		0%		0%		0%
<i>Proteus mirabilis</i>	3	60%		0%	5	100%	2	40%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	60%		0%	1	20%		0%
<i>Streptococcus bovis</i>		0%	1	20%		0%	3	60%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>		0%		0%		0%		0%
α - <i>Streptococcus</i>		0%		0%		0%	1	20%
Coagulase negative <i>Staphylococci</i>		0%		0%	2	40%		0%
<i>Veillonella parvula</i>		0%		0%		0%		0%
嫌気性グラム陰性桿菌		0%		0%		0%		0%
嫌気性グラム陽性球菌	1	20%		0%		0%		0%
嫌気性グラム陽性桿菌		0%		0%	1	20%		0%
好気性グラム陽性桿菌	2	40%		0%	3	60%		0%
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌	1	20%		0%	2	40%		0%

各期間 n = 5 匹

対照歯において、根尖孔外からは**グラム陽性菌**が 8 菌種、**グラム陰性菌**が 8 菌種検出された。
 根管内からは**グラム陽性菌**が 12 菌種、**グラム陰性菌**が 7 菌種検出された。

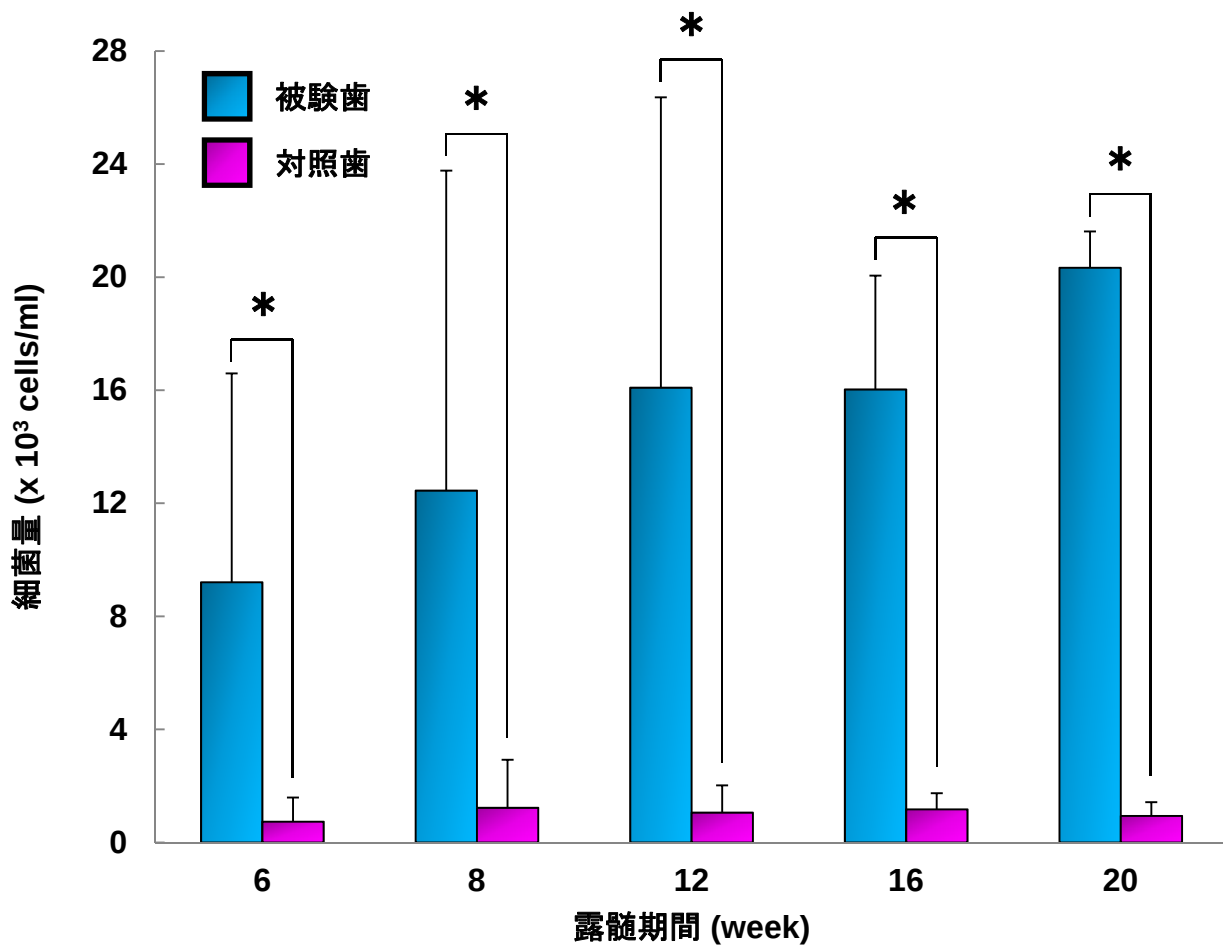


図 6. 根尖孔外細菌量の経時的変化

リアルタイム PCR によって各期間における根尖孔外細菌の定量を行った (各期間 $n = 4$)。グラフは平均値と標準偏差を示す。全ての期間において被験歯の細菌量は対照歯に比べ有意に多く検出された (Student's t test; $p < 0.05$)。被験歯と対照歯ともに、各期間での有意差はなかった (one-way analysis of variance; $p > 0.05$)。

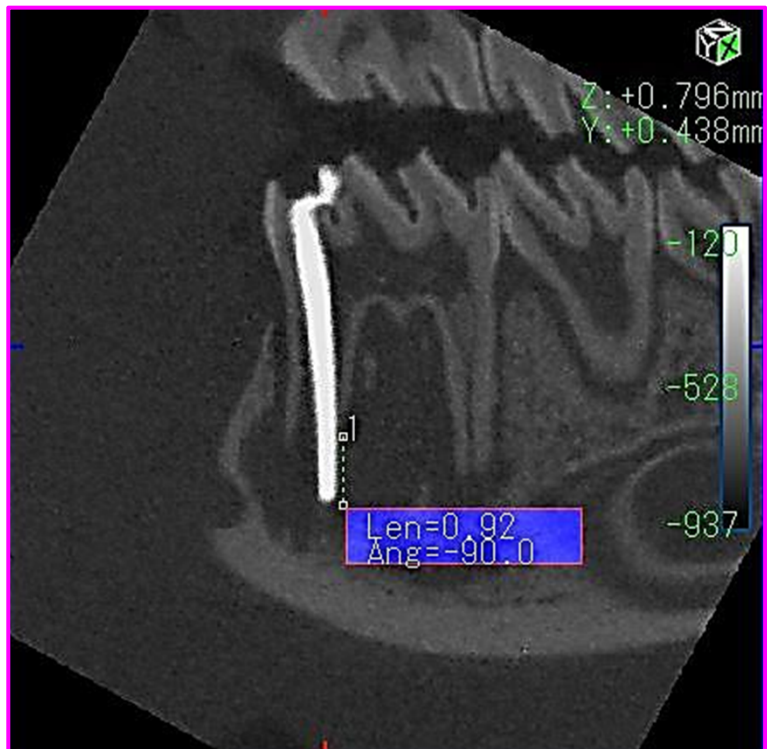


図 7. 根尖孔外 GP の計測

露髄 4 週後の被験歯における、根尖孔外の GP の長さを計測した ($n = 6$)。図は計測時の画像の一例を示す。根尖孔外 GP の長さの平均は 0.996 mm、標準偏差は 0.0779 mm であった。

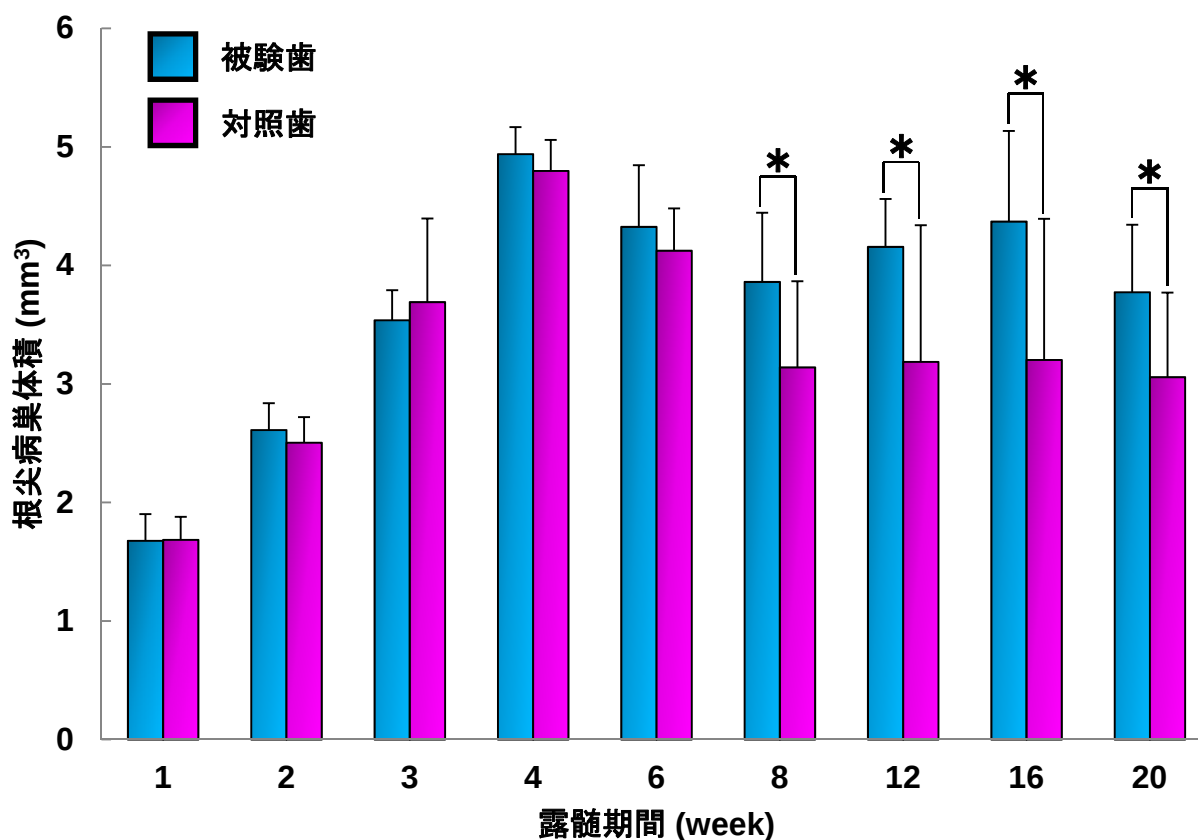


図 8. 根尖病巣体積の経時的変化

マイクロ CT を撮影することによって各期間における根尖病巣体積を経時的、三次元的に測定した ($n = 6$)。グラフは平均値と標準偏差を示す。露髄 8 週後から露髄 20 週後まで、被験歯の根尖病巣体積は対照歯に比べ有意に大きかった (Student's t test; $p < 0.05$)。