



Title	ラット感染根管治療モデルの開発
Author(s)	米田, 直道
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56117
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(米田直道)	
論文題名	ラット感染根管治療モデルの開発
論文内容の要旨	
<p>【研究目的】</p> <p>根尖性歯周炎の治療には根管内の細菌感染の除去を目的とした感染根管治療が行われている。しかし、その成功率は100%ではなく、通法の感染根管治療では治癒しない難治性の根尖性歯周炎が存在するため、今なお様々な新規治療薬・治療法の開発研究が行われている。根尖孔外のバイオフィルム形成がその難治化に関与していることが報告されており、我々のグループでは、ラットに根尖孔外バイオフィルムを実験的に形成することに成功し、その存在が根尖病変の拡大に関与することを明らかにした。また、バイオフィルム形成細菌の制御・抑制の研究も進んでおり、それらの新規治療薬・治療法の臨床導入のためには実験動物での評価が必要となるが、小動物における感染根管治療モデルの報告はこれまでに存在しない。近年、臨床に歯科用マイクロスコープや専用治療機器が導入されたことで歯内療法の治療成績は著しく向上した。この治療技術を駆使することで、今まで不可能であった小動物にも感染根管治療を確実に行うことができるであろうとの着想に至った。そこで本研究では、ラットにおいて感染根管治療モデルを開発することを目的とした。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>1. ラット歯根完成時期の評価</p> <p>根管治療に適した根尖閉鎖・根管狭窄状態である週齢を確認するために、4週齢雄性Wistar系ラットを用いて、14週齢まで1週ごとに下顎両側第一臼歯のマイクロCT撮影を行った。三次元画像解析ソフトを用いて、近心根の歯根長を計測することにより歯根の完成度を評価し、髄床底から1mm根尖側における根管幅径を計測することにより根管狭窄度を確認した。</p> <p>2. ラットの感染根管治療モデル</p> <p>上記1. 項の実験結果に基づき、10週齢雄性Wistar系ラットを用いて下記実験を行った。下顎両側第一臼歯の4根管全てに根尖性歯周炎を誘発させたモデルと4根管のうち1根管のみに根尖性歯周炎を誘発させたモデルを作製した。</p> <p>4根管感染根管治療モデルでは、咬合面にラウンドバーで露髓に至る窩洞を形成し、そのまま4週間口腔内細菌に曝露することにより根尖性歯周炎を誘発させた。</p> <p>1根管感染根管治療モデルでは、根管口での断髓後、近心根以外の根管口をMTAセメントにて覆髓し、近心根根管口を被覆しないようにフロアブルコンポジットレジンで歯冠修復を行い、4週間口腔内細菌に曝露することにより、近心根のみに根尖性歯周炎を誘発させた。</p> <p>露髓4週後、両モデルとも右側は感染根管治療を行う治療群とし、左側は未処置の対照群とした。感染根管治療はマイクロスコープ観察下でラバーダム防湿を施して行った。ラウンドバーにて髓腔開拓後、根尖性歯周炎を生じている歯根の根管口を明示した。髓床底および根管上部の感染歯質の除去にはマイクロエキスカベータを使用した。近・遠心根は各20号まで、頬側根および舌側根は各15号まで電気的根管長測定器を使用しながら手用K-ファイルにて根管拡大し、2.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて10秒間根管洗浄後、各拡大号数のガッタパーチャポイントを用いて单一ポイント法にて根管充填を行い、フロアブルコンポジットレジンにて歯冠修復を行った。4根管感染根管治療モデルの評価は2.1-3) 項で行い、1根管感染根管治療モデルの評価は2.2) 項にて行った。</p> <p>1) 根尖病変体積の計測</p> <p>露髓後4, 5, 6, 7, 8, 10, 12週にマイクロCT撮影を行った。各時点において得られたデータにおいて三次元画像解析ソフトを用いて根尖病変体積を計測し、根尖病変全体および近心根のみ、遠心根のみの根尖病変体積をそれぞれ算出した。治療群と対照群における根尖病変体積の統計学的有意差の検定はWelch's t-testを用いて、危険率5%で評価した。</p>	

2) 細菌量の定量

感染根管治療直後の下顎第一臼歯を抜歯し、根分岐部で近心根を切断した。近心根のみを液体窒素にて凍結後粉碎後、DNA抽出を行った。その後16S rRNAを対象とするユニバーサルプライマーを用いてリアルタイムPCRを行い、濃度既知の*Enterococcus faecalis*菌液により作製した検量線を用いて近心根由来の細菌の定量解析を行った。各群間の統計学的有意差の検定はSteel-Dwass testを用いて、危険率5%で評価した。

3) 病理組織学的観察

露髓12週後にラットを屠殺し、摘出した顎骨を10%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後、10%ギ酸・クエン酸による脱灰、パラフィンへの包埋を行った。その後、厚さ7μmの薄切切片を作製し、Hematoxylin-Eosin染色およびBrown-Brenn染色を施して近心根根管内外の細菌と根尖周囲組織の状態を光学顕微鏡にて観察した。

【結果】

1. ラット歯根完成時期の評価

4週齢の時点で1.7mmであった近心根の歯根長は8週齢まで一定の割合で増加し2.6mmとなり、その後も微増し14週齢で2.8mmに達した。また、齧床底から1mm根尖側の位置での根管幅径は4週齢で0.66mmであったが12週齢まで減少し0.37mmに達した。この結果よりWistar系ラット下顎第一臼歯の歯根完成時期は8週齢以降であることが確認されたが、根尖閉鎖および根管狭窄程度を考慮し、以下の実験においては10週齢のラットを用いることとした。

2. 感染根管治療モデルの評価

1) 根尖病変体積の計測

4根管感染根管治療モデルにおいて、露髓12週後における治療群の近心根の根尖病変体積は、露髓4週後の体積の23%にまで縮小した。対照群においても48%まで縮小した。治療群の近心根根尖病変体積は対照群と比較して、露髓6週後以降有意に低い値となった($p<0.05$)。一方、治療群の遠心根の根尖病変体積は対照群と比較して、どの時点においても有意な差は認められなかった。1根管感染根管治療モデルにおいても治療群と対照群の根尖病変の体積に有意な差は認められなかった。

2) 細菌量の定量

治療群の近心根の細菌量 (0.8×10^7 cells) は対照群 (3.2×10^7 cells) と比較して有意に減少した ($p<0.05$)。また、治療群と健全歯 (0.2×10^7 cells) との間には有意な差は認められなかった。

3) 病理組織学的観察

治療群の近心根の根尖病変内は露髓12週後においてリンパ球浸潤の程度は低く、線維化およびセメント質添加が亢進しており、根尖部歯周組織の治癒像が確認された。また、Brown-Brenn染色像において、根尖付近の根管内に細菌の残存が認められたが、根尖孔外には細菌は観察されなかった。

【考察および結論】

マイクロスコープを用いた歯内療法の技術を導入することにより、近遠心径が約3mmであるラットの歯においても歯根に存在する細菌を減少させることができた。感染根管治療の結果、根管内細菌の残存は認められたが、近心根においては歯根膜腔の拡大程度、すなわち臨床的な根管治療の評価では成功と判定できる程度まで根尖病変体積の縮小を認めたため、感染根管治療は成功したと考えられる。また、ラバーダム防湿の適用により無菌的操作および防湿下での接着操作が達成できたことも根尖病変縮小に寄与したと考えられる。

ラット下顎第一臼歯遠心根の断面は扁平で内湾壁が非常に薄くなってしまっており根管拡大および根管充填が困難な形態である一方、近心根の断面は正円に近い。遠心根の根尖病変体積は対照群と比較して有意な差が認められなかったが、近心根では有意に減少したことから、感染根管治療モデルの評価は近心根のみで行うことが妥当と判断した。そのため、4根管の感染根管治療を行った上で、近心根の病変のみを三次元的に評価する方法が感染根管治療モデルとして最適であると考えられる。

本研究で開発したラットにおける感染根管治療モデルを用いることにより、新規治療法や治療薬を臨床応用するための動物実験が可能となった。また、本実験モデルを用いてラットにおける根尖孔外バイオフィルムモデルを改良することにより、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し、根尖孔外バイオフィルムによる難治性根尖性歯周炎の治療法の開発研究がさらに進むものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏名 (米田直道)	氏名	
論文審査担当者	(職)		
	主査	教授	林 美加子
	副査	教授	村上 伸也
	副査	准教授	中田 匡宣
	副査	准教授	野村 良太

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットにマイクロスコープ観察下で感染根管治療を行い、根尖病変に対する術後経過をマイクロ CT 画像により経時的かつ三次元的に評価することで、小動物の感染根管治療モデルの開発を試みたものである。

その結果、ラットに感染根管治療を施すことで根尖病変を縮小させることに成功し、特に近心根の病変を用いて同部位の治癒過程を評価することが有用であることを示した。

以上の研究成果は、根尖性歯周炎の病態解析および新規治療薬・治療法の評価に応用可能な重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位に値するものと認められる。