

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	<a href="https://doi.org/10.18910/56117">https://doi.org/10.18910/56117</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# ラット感染根管治療モデルの開発

大阪大学大学院 歯学研究科

口腔科学専攻 (歯科保存学教室)

(指導教員：林 美加子教授)

米田 直道

## 目次

緒言	2
材料および方法	5
1. マイクロ CT によるラット歯根完成時期の評価	
2. ラットにおける 4 根管感染根管治療モデル	
3. ラットにおける 1 根管感染根管治療モデル	
4. ラットにおける感染根管治療モデルの評価	
1) 根尖病変体積の経時的三次元計測	
2) 細菌量の定量	
3) 組織学的観察	
5. 統計学的解析	
結果	12
1. マイクロ CT によるラット歯根完成時期の評価	
2. ラットにおける感染根管治療モデル	
1) 根尖病変体積の経時的三次元計測	
2) 細菌量の定量	
3) 組織学的観察	
考察	15
結論	22
謝辞	23
文献	24
図表	32

## 緒言

感染根管治療は歯髄腔および根管内の感染源の除去を目的として行われ、感染歯質の機械的除去と根管に残存細菌の化学的除去が日常臨床において併用されている。これは、無菌マウスの歯を露髄させても根尖性歯周炎は生じなかったことから、根尖性歯周炎の原因が歯髄腔や根管内の細菌感染であるという科学的根拠に基づいている<sup>1)</sup>。一方、初回感染根管治療の成功率の平均値は73.1% (66.1 - 80.0%) であり、抜髄成功率の平均値である82.5% (74.0 - 91.0%) より低い<sup>2)</sup>。根管内に細菌感染が生じると、感染根管治療を行っても複雑な解剖学的形態のために根管内のバイオフィームは完全に除去できないことが理由の一つである。さらに、根管だけでなく根尖孔外にバイオフィームが形成されることもある<sup>3-5)</sup>。根尖孔外バイオフィームは、歯根破折、穿孔、側枝等<sup>6,7)</sup>と並んで根管治療の成功率を下げる原因の一つであり、根尖性歯周炎の難治化を引き起こすことが報告されている<sup>8)</sup>。

近年、歯科用マイクロスコープ、コーンビーム Computed Tomography (以下 CT と略す)、マイクロエクスカベータ等の最新機器・機材が歯科臨床に導入され、穿孔や破折歯の診断能力<sup>9)</sup>、根管内の破折ファイルの除去率<sup>10)</sup>、ならびに歯根端切除術の成功率<sup>11)</sup>が大幅に向上し、従来の治療法では抜歯せざるを得なかった歯が保存可能になってきた。しかしながら、なおも難治性の根尖性歯周炎は根絶することができないため、新規治療法や治療薬の開発研究が必要不可欠である。

Noiri らは、難治性根尖性歯周炎罹患抜去歯の根尖部セメント質および過剰根管充填材の表面にバイオフィルムが存在することを明らかにし、根尖性歯周炎の難治化に根尖孔外バイオフィルムの関与を示唆した<sup>12)</sup>。Kuremoto らは、*in vivo* でラットの歯に根尖孔外バイオフィルムを形成させ、根尖孔外バイオフィルムが根尖病変体積に与える影響を高分解能マイクロ CT を用いて明らかにした<sup>13)</sup>。バイオフィルム形成細菌に対する制御・抑制のアプローチとして、Asahi らは、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トンに着目し、その類似化合物の 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<sup>14)</sup>。また、Maazono らはマクロライド系抗菌剤のアジスロマイシンが、*P. gingivalis* の浮遊細胞に対する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<sup>15)</sup>。

このように、根尖性歯周炎を治癒に導くために病因の解明や薬剤による病態制御などが検討されてきたが、薬剤をヒトへ臨床導入するためには、まず実験動物モデルによる評価系を確立する必要がある。辺縁性歯周炎においては、小動物を用いて種々の方法でその病態を再現し、さらに様々な手技・手法で治療する実験モデルが報告され、新規治療薬・治療法が開発されてきた<sup>16-19)</sup>。一方、根尖性歯周炎においては小動物を用いた病態モデルは多数存在するが<sup>20-22)</sup>、治療法や治療薬の開発に係る実験モデルは報告されていない。これは、小動物の歯が極めて小さく、根管治療が困難であること、また、比較的根管治療が容易な単根歯が常生歯である切歯しかなく、感染根管治療の対象が臼歯の

みであることにより、小動物が根尖性歯周炎の治療モデルに不適切であったためである。その結果、世界的にみても小動物の感染根管治療に成功した報告はないのが現状である。しかし、近年、歯内療法領域において歯科用マイクロスコープやマイクロエクスキャタの臨床への導入等、歯内療法の治療機器に技術革新が生じ、正確な診断と精密な根管処置が可能となったため、小動物でも感染根管治療は可能であると考えた。一方、高解像度マイクロ CT によって小動物の根尖病変の正確な三次元解析が可能となり、治療後の評価精度も向上した。

そこで本研究では、マイクロスコープ観察下で最新治療機器を用いてラットに感染根管治療を行い、根尖病変をマイクロ CT により経時的かつ三次元的に解析し、病変の術後経過を評価することにより、小動物の感染根管治療モデルの開発を試みた。

## 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: 26-016-0, 26-1-0)

### 1. マイクロ CT によるラット歯根完成時期の評価

感染根管治療を確実にを行うためには、ラット歯根が完成していることが必要である。そこで、マイクロ CT 撮影を行いラット歯根の形成過程を経時的に観察・測定することにより、本研究に用いるラットの週齢の検討を行った。

実験には 4 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) 4 匹を用いた。4 週齢から 1 週ごとに 14 週齢まで、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<sup>®</sup>, 大日本製薬, 大阪) とカルプロフェン (3 mg/kg) (リマダイル<sup>®</sup>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、マイクロ CT (R\_mCT2, RIGAKU, 東京) にて下顎第一臼歯の撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 160  $\mu$ A、スライス幅 20  $\mu$ m に設定し、画像解析ソフトウェアは Simple viewer (RIGAKU, 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 軸は髓床底を通り、Y 軸および Z 軸は近心根の中心軸を通るように設定した。髓床底から近心根根尖までの Y 軸の長さを計測し、その値を歯根長とした。また、髓床底から 1 mm 根尖側における近心根の根管の最大径を計測し、その値を根管径とした。

## 2. ラットにおける 4 根管感染根管治療モデル

図 1. に本研究の実験デザインを示した。実験には、10 週齢雄性 Wistar 系ラット（日本クレア，東京）9 匹を用い、ラットへの処置はすべてマイクロスコープ（Stemi DV4 SPOT, Carl Zeiss, Germany）観察下にて行った。実験的根尖病変の形成は、Kawahara らの方法<sup>23)</sup>に準じて行った。前述の 1. 項と同一の方法で、実験動物に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（VIVAMATE 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窩より露髄した。同歯の髄腔を開放状態で 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。また、被験歯の破折防止のために対合歯である上顎両側第一臼歯は露髄時に抜去した。その後、下顎右側第一臼歯を治療群として感染根管治療を行い、下顎左側第一臼歯は感染根管治療をせず対照群とした。

感染根管治療を行う際には、4×4cm に切り取ったラバーダムシート（Heraeus Kulzer, USA）およびラット用に作製したラバーダムクランプ（YDM, 東京）を用いて被験歯にラバーダム防湿を施した（図 2a, b）。さらに被験歯とラバーダムシートの間隙をフロアブルコンポジットレジン（MI FLOW, GC）で封鎖後、歯面を 70%エタノールで消毒することにより無菌的状态を確立した。#1/2 ラウンドバーにて咬合面から髄腔開放後、歯冠部壊死歯髄を除去し、髄床底部および根管口付近はマイクロエクスカベータ（OK マイクロエクスカ，背戸製作所）を用いて感染歯質の除去を行った。その後 #8 K-



ファイルを用いて根尖まで穿通し、電氣的根管長測定器 (RootZX, モリタ) で 1.0 値の位置を作業長として根管拡大を行った。近心根と遠心根の最終拡大号数は #20 とし、頬側根と舌側根は #15 とした。NiTi ロータリーファイル (Race, FKG, Switzerland) を用いて根管形成を行い、近心根と遠心根は 4%のテーパーを付与し、頬側根と舌側根は 2%のテーパーとした。2.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて根管洗浄を行い、滅菌ペーパーポイントを用いて根管乾燥後、各根の最終拡大号数およびテーパーのガッタパーチャポイント (SybronEndo, USA) とシーラー (RealSeal SE, SybronEndo, USA) を用いて単一ポイント法にて根管充填を行った。最後にボンディング (クリアフィル ボンド SE ONE, クラレノリタケデンタル, 東京) 処理後、フロアブルコンポジットレジン (MI FLOW) にて髓腔内を充填し、歯冠修復処置を完了した。

### 3. ラットにおける 1 根管感染根管治療モデル

ラット下顎第一臼歯の近心根のみに根尖性歯周炎を惹起させ、感染根管治療を行うモデルを作製した。実験には、10 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) 5 匹を用い、ラットへの処置はすべてマイクロスコープ (Stemi DV4 SPOT) 観察下で行った。実験的根尖病変の形成は、Kawahara らの方法<sup>23)</sup>に準じて行った。前述の 1. 項と同一の方法で、実験動物に腹腔内注射による全身麻酔を施し、前述 2. 項と同様に、ラバーダム防湿下にて咬合面より髓腔開拓を行った。歯冠部歯髓を除去し 4 根管とも根管口にて断髄した。近心根以外の 3 根の根管口には蒸留水にて練和した mineral trioxide aggregate

(以下 MTA と略す) セメント (Pro root MTA, Dentsply, USA) によって覆髓し、その上からボンディング (クリアフィル ボンド SE ONE) 処理後、フロアブルコンポジットレジン (MI FLOW) で歯冠修復を行った。その際、近心根の根管口は開放状態にした。また、被験歯の破折防止のために対合歯である上顎両側第一臼歯は抜去した。その後 4 週間放置し、近心根のみに実験的に根尖性歯周炎を惹起した。

露髓 4 週後に下顎右側第一臼歯を治療群として前述の 2. 項と同一の方法で近心根のみに感染根管治療を行い、下顎左側第一臼歯は処置をせず対照群とした。

#### 4. ラットにおける感染根管治療モデルの評価

##### 1) 根尖病変体積の経時的三次元計測

露髓 4、5、6、7、8、10、12 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 にて下顎第一臼歯を含む顎骨の撮影を前述の 1. 項と同一の撮影条件で行った。画像解析ソフトウェアは TRI 3D - BON (RATOK, 東京) を使用した。得られたデータに対して、X 軸は下顎第一臼歯近遠心のセメントエナメル境を通り、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。ZX 平面にて歯根全周が歯槽骨に囲まれる平面より根尖側の透過像を根尖部透過像とした。

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値化画像から根尖部透過像部位の面積を計測した。各々のスライスの根尖部透過像面積を計測し、全てを重ね合わせることで根尖部透過像体積を算出した。さらに、同一週齢の健全歯の歯根膜腔の体積も算出し、根尖部透過像体積から歯根膜腔体積を減じたものを根尖病変体積とし、治療群と対照群の根尖病変体積を比較検討した。

## 2) 細菌量の定量

露髄4週後に感染根管治療を行った後、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に過剰投与(200 mg/kg)することにより屠殺し、下顎両側第一臼歯を抜去した(図2c)。抜去した歯の近心根を根分岐部の位置にて離断し、近心根外表面を滅菌したスプーンエキスカベータにて搔爬することにより歯根面付着細菌を除去した。その後、近心根を液体窒素にて凍結させ、SKミル(トッケン, 千葉)を用いて粉碎した。粉末状の試料からInstaGene matrix (Bio-Rad, USA)を使用してDNAを抽出後、Kuremotoらの方法<sup>13)</sup>に準じて調製し、解析した。

すなわち、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: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)<sup>24)</sup>(各0.5 µl, 最終濃度: 1.1 µM)、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 denaturing 95°Cで3分間、denaturing 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。検量線を作製するための標準試料には *Enterococcus faecalis* SS497 株を用いた。対数増殖期末期まで培養した *E. faecalis* 菌液の濃度を希釈平板法で測定し、同濃度の菌液から InstaGene matrix を用いて作製した DNA 抽出液を段階希釈して標準試料とした。

データは 7500 System SDS software Version 2.0.2 (Applied Biosystems) を用いて解析した。

### 3) 組織学的観察

露髄 12 週後のラットにペントバルビタールナトリウムを腹腔内に過剰投与することにより屠殺した。下顎第一臼歯を含む下顎骨を摘出し、軟組織を除去した後、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）で浸漬固定（4°C，12 時間）、10%ギ酸・5%クエン酸ナトリウム水溶液で脱灰（4°C，14 日間）、エタノールで脱水を行い、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックの試料をマイクロトーム（RM2255, Leica, Germany）を用いて薄切し、厚さ 7 μm の連続切片を作製した。

得られた連続切片は交互に 2 種の染色を施した。すなわち、一方には Hematoxylin - Eosin 染色を施し、他方に Taylor の Brown - Brenn 染色<sup>25)</sup>を施した。Hematoxylin - Eosin 染色では、切片をキシレンおよびエタノールにて脱パラフィンし、水洗後、Mayer

のヘマトキシリンに 5 分間反応させ、10 分間水洗した。その後、エオジンに 3 分間反応、水洗後、エタノールにて脱水・脱色分別し、キシレンで透徹を行い、標本封入剤 (Excel mount, Falma, 東京) で封入した。Taylor の Brown - Brenn 染色は Kuremoto らの方法<sup>13)</sup>に準じて行った。切片を同一の方法で脱パラフィン後、水洗し、Harris のヘマトキシリンに 10 分間反応させ、水洗後、0.1%塩酸・70%アルコールで分別した。水洗後、0.1%飽和炭酸リチウム液を反応させ、5 分間水洗した。その後、クリスタルバイオレット液を 2 分間反応させ、2%ヨウ素溶液で 1 分間媒染し、水洗後、乾燥した。次いで、切片をエーテル・アセトン液に浸漬して脱色し、塩基性フクシン液を 3 分間反応させた後、水洗した。アセトン・ピクリン酸溶液で処理した後、キシレンで透徹を行い、封入した。標本作製後、光学顕微鏡 (ECLIPSE Ni - U, Nikon, 東京) にて下顎第一臼歯近心根およびその周囲組織を観察した。

## 5. 統計学的解析

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には Welch's *t*-test を用い、危険率を 5%として評価した。また、細菌の定量において、各群間の統計学的有意差の検定には Steel - Dwass test を用い、危険率を 5%として評価した。

## 結果

### 1. マイクロ CT によるラット歯根完成時期の評価

図 3a, b. に 4 週齢から 14 週齢までのラット下顎第一臼歯のマイクロ CT の画像と測定した近心根の歯根長および根管径を示した。4 週齢の時点で 1.7 mm であった近心根の歯根長は 8 週齢まで増加し 2.6 mm となった。その後も微増傾向を示し、14 週齢で 2.8 mm に達した。また、髓床底から根尖側 1 mm の位置での根管幅径は 4 週齢で 0.66 mm であったが、12 週齢の時点で 0.37 mm まで減少した。これらの結果より、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。本実験においては、1) 確実に歯根が完成していること、2) 根管治療を行うにあたって適当な根管の狭窄程度となっていること、の 2 点を満たす 10 週齢のラットを用いた。

### 2. ラットにおける感染根管治療モデル

#### 1) 根尖病変体積の経時的三次元計測

図 4a. に 4 根管感染根管治療モデルの露髄 4 週後および 12 週後のマイクロ CT 画像の典型的な例を示した。また、図 4b. に各期間における根尖病変体積を示した。露髄 4 週後における治療群と対照群の根尖病変全体の平均体積はそれぞれ 8.04、7.46 mm<sup>3</sup> であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。露髄 10 週後において、治療群の根尖病変全体の体積 (2.48mm<sup>3</sup>) は対照群 (4.78mm<sup>3</sup>) と比較して有意な減少を認め、露

髓 4 週後の根尖病変体積の 33%まで縮小した。対照群の根尖病変体積の最小値は露髓 4 週後の根尖病変体積の 59%であった。

図 5. に各期間における近心根の根尖病変のみの体積を示した。露髓 4 週後における治療群と対照群の近心根根尖病変の平均体積はそれぞれ 4.54、4.85 mm<sup>3</sup>であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。治療群では近心根の根尖病変体積は、露髓 6 週後以降の各時点において対照群と比較して有意に減少し、露髓 4 週後の近心根根尖病変体積の 20%にまで縮小したが、対照群の体積の最小値は 44%であった。

図 6. に各期間における遠心根の根尖病変のみの体積を示した。露髓 4 週後における治療群と対照群の遠心根根尖病変の平均体積はそれぞれ 4.69、4.55 mm<sup>3</sup>であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。どの時点においても遠心根根尖病変体積においては治療群と対照群との間に統計学的有意差を認めなかった。治療群の遠心根根尖病変体積は露髓 4 週後の 59%まで縮小し、対照群は 73%まで縮小した。

図 7a. に 1 根管感染根管治療モデルの露髓 4 週後および 12 週後のマイクロ CT 画像の典型的な例を示した。また、図 7b. に各時点における近心根の根尖病変体積を示した。露髓 4 週後における治療群と対照群の近心根の根尖病変の体積の平均はそれぞれ 0.53、0.50 mm<sup>3</sup>であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。全時点において、治療群と対照群の近心根根尖病変体積の間に統計学的有意差は認められなかった。4 根管感染根管治療モデルと異なり、1 根管感染根管治療モデルでは両群ともに露髓 7 週後において近心根根尖病変体積は最大値を示した。また、その最大値 (2.95 mm<sup>3</sup>) は、4 根

管感染根管治療モデルの最大値である露髄 4 週後の近心根根尖病変体積 ( $4.85 \text{ mm}^3$ ) と比較して有意に小さい値を示した。

## 2) 細菌量の定量

図 8. に感染根管治療直後における近心根由来の細菌量を示した。感染根管治療を行った治療群の近心根の細菌量 ( $0.8 \times 10^7 \text{ cells}$ ) は、感染根管治療を行っていない対照群 ( $3.2 \times 10^7 \text{ cells}$ ) と比較して有意に減少した。また、治療群と露髄させなかった健全歯 ( $0.2 \times 10^7 \text{ cells}$ ) との間には有意差を認めなかった。

## 3) 組織学的観察

図 9. に露髄 12 週後の治療群と対照群の Hematoxylin - Eosin 染色像および Brown - Brenn 染色像を示した。感染根管治療を行っていない対照群では根尖病変内は線維化が進んだ炎症性肉芽組織で満たされ、炎症性細胞浸潤が顕著に認められた (図 9a, c)。一方、感染根管治療を行った治療群では、肉芽組織は少なく、根尖部にセメント質の形成が観察され、根尖部歯周組織の治癒像が確認された (図 9b, d)。

根管内細菌の残存を確認する目的で行った Brown - Brenn 染色像では、感染根管治療を行っていない対照群において根管内に充満した細菌が観察された (図 9e)。一方、感染根管治療を行った治療群では根管内には残存細菌が僅かながら認められた (図 9f)。



## 考察

根尖性歯周炎の病態の解明および治療法の開発のために、動物に実験的に根尖病変を形成する病態モデルが広く用いられてきた<sup>20-22,26-28</sup>。モデルとして用いられてきた動物はラット、ネコ、イヌ、サルなど多彩であるが、短期間に多数の個体を使用可能なラットが用いられることが多い。ラットの感染根管内の細菌叢はヒトの細菌叢と一部異なるが、好気性菌と嫌気性菌の割合等全体としては類似しているため<sup>29</sup>、ラットを根尖性歯周炎の病態モデルとして用いるのは適当であると考えられる。しかし、根尖性歯周炎を惹起させた後に感染根管治療まで行った報告は大動物を用いたものだけである<sup>30-34</sup>。ラットの歯における感染根管治療のモデルは必要と考えられているが確立が困難であり、4根管全ての根管に対する治療がなされていない不完全なモデルの報告のみである<sup>35</sup>。このことは、根管治療法や根管治療薬の開発研究が遅れをとってきた一因と考えられる。そのため、本研究ではラットの歯に根尖性歯周炎を惹起させた後、現代の技術革新のもと開発・導入された歯科用マイクロスコープやその他最新機器等を用いて感染根管治療を行うモデルを確立することを試みた。

ラットの下顎第一大臼歯の歯冠は近遠心径と頬舌径は約3×2 mmであり、ヒトの下顎第一大臼歯のおよそ4分の1程度である。また、歯根は近心根、遠心根およびその2根の中間付近に位置する頬側根と舌側根の4根4根管であり(図2c)、ヒトの下顎第一大臼歯とは歯根の解剖学的形態が大きく異なる。そのため、ヒトの歯内療法用器具をそのまま

用いて、肉眼にて根管内の処置を行うのは非常に難しい。これらの課題に対してはマイクロスコープを用いることにより解決を図った。臨床において用いられている歯科用マイクロスコープの最大倍率は標準構成で 21.3 倍 (OPMI®pico, Carl Zeiss, Germany)、25.6 倍 (ブライトビジョン LED 5000, Zumax Medical, China)、20 倍 (M320 F12, Leica, 東京) などである。一方、実験に用いたマイクロスコープの最大倍率は 32 倍であり、これらを超える倍率での観察が可能であるため、ラットの歯の髓腔内および根管内もヒトの歯と同様、精細に観察し、処置を行うことが可能であった。また、使用器具の大きさの問題に対しては、より先端径の小さな器具等を作製することにより対応した。マイクロエクスカベータは先端径 0.3 mm のものを 0.15 mm に改良し、ラットの歯の根管口にも挿入できるようにした。また、根管治療におけるラバーダム防湿の有用性については以前から報告があり<sup>36,37)</sup>、ラットにおいてもラバーダム防湿が必要不可欠である。ラットにラバーダム防湿を施した報告は以前にもあり<sup>38,39)</sup>、本研究においてもラットの歯に合うラバーダムクランプを作製して使用した。これによって防湿とそれに伴う無菌的処置が可能となっただけでなく、舌や頬粘膜の圧排が不要となり、マイクロミラーを使用しながらの高い精度の切削および根管処置が可能となった。

実験的根尖性歯周炎モデルを用いて新規治療薬の免疫反応への影響を検索した報告の中には、根未完成歯を用いているものも存在する<sup>21)</sup>。本実験では根管治療を適切に行う必要があるため、過不足なく根管拡大および根管充填ができるよう、作業長を一定にすることが容易な根完成歯を用いた。また、ラットが高齢になるにつれて歯の石灰化が進

み、根管が狭窄しすぎてファイル操作が困難となるため、ラット健全歯のマイクロ CT 撮影によって歯根の完成過程を経時的に詳細に観察し、10 週齢のラットを本実験に用いることに決定した。

4 根管感染根管治療モデルにおいて、感染根管治療を行っていない対照群の根尖病変体積も露髄 4 週後以降で減少傾向を認めた。これは Wistar 系ラットを用いて組織学的に根尖病変の面積を計測した報告と一致している<sup>40,41)</sup>。ラットの実験的根尖性歯周炎では露髄 4 週後までが病変の拡大期であり、その後慢性化し、安定化していくと考えられている<sup>42,43)</sup>。治療群の根尖病変全体の体積は対照群に対して減少傾向を認めたが、統計学的有意差を認めたのは露髄 10 週後の時点のみであった。これに対し、同一の根尖病変の近心根由来の病変のみを計測した場合は、露髄 6 週後以降のすべての時点において、治療群と対照群の間に統計学的有意差を認めた。さらに、遠心根の病変のみを計測した場合は、すべての時点において統計学的有意差を認めなかった。これらの結果は近心根と遠心根の解剖学的形態の複雑性の違いに由来すると思われる。すなわち、ラット下顎第一臼歯近心根の断面は正円形に近く根管壁の厚さは全周にわたり 0.3 mm 前後で、湾曲度の小さな歯根であるのに対し、遠心根の断面は扁平型であり、内湾壁の厚さは 0.1 mm 以下と非常に薄く、歯根の湾曲が強い。ヒトの歯根においてもファイルによる根管拡大によって根尖破折が生じることが報告されている<sup>44,45)</sup>。それと同様に、ラットの菲薄な根管壁では根管拡大および根管形成による根管壁の微小な破折もしくは穿孔が容易に生じることが推察される。その結果、遠心根の根尖病変の治癒が阻害され、病変体積が縮

小しなかったのではないかと考えられる。また、さらに根管壁が薄い頬側根、舌側根も同様にファイルによる拡大操作によって破折や穿孔が生じていると推察される。実際の処置において、慎重かつ注意深くファイル操作を行っているにもかかわらず、根管拡大時に頬側根および舌側根、遠心根の根管からの出血を認めることが多く、歯根破折や穿孔が強く疑われたが、近心根における出血を認めることはなかった。マイクロ CT 像において歯根破折が確認されたラットは実際に存在した (データ示さず)。ラットで感染根管治療をモデル化するには、術者の違いや歯根形態の違いにより生じる結果の差を最小限にすることが必要であり、ラットの下顎第一臼歯の近心根を対象とすることが適切であると考えられる。

モデルの単純化を図るために、近心根以外の根管口での断髄により近心根のみに根尖病変を生じさせ、1 根管のみに対し感染根管治療を行うモデルを作製し検討を行った。しかし、予想に反して、近心根の根尖病変体積は治療群と対照群との間で有意差は認められなかった (図 7b)。根尖病変体積が最大となる時期が露髄 7 週後であり、4 根管モデルよりも遅れたことから根尖周囲組織における局所の感染状態とその免疫応答が異なっているのが原因と考えられる。1 根管モデルは 4 根管モデルよりも細菌が増殖可能な容積が小さく、髄腔および根管内に留まる細菌量が少ないために、根尖周囲組織への抗原刺激が弱くなり局所免疫が活性化しにくく、根尖病変が拡大しなかったのではないかと推察される。

一方、MTA セメントによる直接覆髄および断髄の動物実験は病理組織学的に良好な結

果が得られており<sup>38,46)</sup>、臨床においても良好な成績を収めている<sup>47)</sup>。本研究においても術後のマイクロ CT 像で根尖病変は認められず (図 7a)、断髄および直接覆髄自体は臨床的に成功していた。MTA セメントは封鎖性に優れ、強アルカリによる殺菌作用を有するため<sup>48)</sup>、覆髄後の二次感染を防止するが、その一部が溶出し近心根根管口でも細菌の増殖を抑制した結果、根尖病変の拡大を抑制した可能性がある。

根管内の感染歯質の除去はファイルによる機械的除去と次亜塩素酸ナトリウム水溶液による化学的洗浄を併用して行った。高い根管洗浄効率を獲得し、緊密な根管充填を行うためには、最低限の根管拡大と根管テーパーの付与が必要であるが、本研究においては歯根破折を防止する目的で最終拡大号数は最大でも #20、テーパーは 4%とした。そして、根管洗浄不足とならないように、根尖付近まで薬液を届かせることのできる 30G のシリンジノズルを使用して洗浄を行った。本実験において、ラット下顎第一臼歯の感染根管治療を行うことにより  $3.2 \times 10^7$  cells であった近心根の細菌量が  $0.8 \times 10^7$  cells まで減少し、近心根の根尖病変体積は減少した。しかし一方で、Brown - Brenn 染色により治療群においても主根管の根尖孔付近および側枝に細菌が残存していることが確認された (図 9f)。ヒトの歯においても側枝が約 50%の割合で存在し<sup>49)</sup>、NiTi ロータリーファイルでも手用 K-ファイルでも細菌の完全な除去は困難とされており<sup>50,51)</sup>、臨床においても現実的には無菌治療は不可能であり、無菌的処置を行っているのが現状である。根管内の細菌を一定数以下にまで除菌・静菌したうえで新たな感染を阻止すれば、根尖部歯周組織の炎症は消退・消失へ向かう。小動物の感染根管治療モデルが存在しない

め、治療の成否を決定する限界残存細菌数は不明である。本実験において細菌の残存は認められるが、治療後 8 週までの経過観察では治癒経過を辿ることから、ラット下顎第一臼歯近心根を対象とした感染根管治療は臨床的に成功したと考えて良いであろう。

4 根管感染根管治療モデルでは、ラット下顎第一臼歯の近心根以外は感染根管治療時に歯根破折や穿孔を生じやすいため、全体の根尖病変体積よりも近心根のみの根尖病変体積による治癒評価のほうが治療効果を正確に反映した。一方、近心根以外を根管口で覆髓し、近心根のみに感染根管治療を施した 1 根管感染根管治療モデルでは、治療群と対照群で有意な差は認められなかった。これらの結果から、10 週齢のラット下顎第一臼歯に根尖性歯周炎を誘発後、ラバーダム防湿下で 4 根管の感染根管治療を行い、近心根根尖病変のみで評価を行うモデルがラット感染根管治療モデルとして最適であることが明らかとなった。

これまでにラットにおいて感染根管治療を行った報告はあるが<sup>35)</sup>、ラバーダム防湿による無菌的処置、4 根管すべての感染根管治療、治療後 8 週までのマイクロ CT を用いた長期経過観察を行った報告は存在せず、本研究において、世界で初めてこれらすべてを備えたラット感染根管治療モデルが確立された。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、これまでに *in vitro* で報告されている抗バイオフィーム剤<sup>52, 53)</sup>を含めた様々な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ームモデルを改良し、根尖孔外バイオフィームと難治性根尖性歯周炎との関連を明らかにするこ

とにより、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。

## 結論

本研究では、ラットにおける感染根管治療モデルの開発を試み、以下の結論を得た。

1. 10週齢のラット下顎第一臼歯に対して、ラバーダム防湿を施し、マイクロスコープ観察下で感染根管治療を行うモデルを構築した。
2. ラットの感染根管治療により近心根の細菌は減少し、根尖病変体積の有意な減少を認めた。特に近心根の感染根管治療の成功率が高いことを明らかにし、4根管のうち近心根のみでの評価が最適であることを示唆した。
3. ラット下顎第一臼歯近心根において、感染根管治療によって細菌量を約4分の1に減少させることで根尖病変が治癒傾向を示すことを明らかにした。



## 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、御指導と御校閲を賜り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）恵比須繁之教授ならびに林美加子教授に謹んで感謝の意を表します。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いたします。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) Kakehashi, S., Stanley, H. R., Fitzgerald, R. J. (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.
- 2) Ng, Y. L., Mann, V., Rahbaran, S., Lewsey, J., Gulabivala, K. (2008): Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature -- Part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J.* 41: 6-31.
- 3) Tronstad, L., Barnett, F., Riso, K., Slots, J. (1987): Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol.* 3: 86-90.
- 4) Tronstad, L., Kreshtool, D., Barnett, F. (1990): Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol.* 6: 129-136.
- 5) Sunde, P. T., Olsen, I., Lind, P. O., Tronstad, L. (2000): Extraradicular infection: a methodological study. *Endod Dent Traumatol.* 16: 84-90.
- 6) Wada, M., Takase, T., Nakanuma, K., Arisue, K., Nagahama, F., Yamazaki, M. (1998): Clinical study of refractory apical periodontitis treated by apicectomy. Part 1. Root canal morphology of resected apex. *Int Endod J.* 31: 53-56.
- 7) Song, M., Kim, H. C., Lee, W., Kim, E. (2011): Analysis of the cause of failure in nonsurgical endodontic treatment by microscopic inspection during endodontic microsurgery.

- J Endod.* 37: 1516-1519.
- 8) Wang, J., Jiang, Y., Chen, W., Zhu, C., Liang, J. (2012): Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 38: 954-959.
  - 9) Mamoun, J. S. (2009): A rationale for the use of high-powered magnification or microscopes in general dentistry. *Gen Dent.* 57: 18-26.
  - 10) Suter, B., Lussi, A., Sequeira, P. (2005): Probability of removing fractured instruments from root canals. *Int Endod J.* 38: 112-123.
  - 11) Torabinejad, M., Corr, R., Handysides, R., Shabahang, S. (2009): Outcomes of nonsurgical retreatment and endodontic surgery: a systematic review. *J Endod.* 35: 930-937.
  - 12) 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.
  - 13) Kuremoto, K., Noiri, Y., Ishimoto, T., Yoneda, N., Yamamoto, R., Maezono, H., Nakano, T., Hayashi, M., Ebisu, S. (2014): Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl Environ Microbiol.* 80: 3804-3810.
  - 14) Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H., Ebisu, S. (2010): Effects of N-acetyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontal Res.* 45: 255-261.

- 15) Maezono, H., Noiri, Y., Asahi, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., Izutani, N., Azakami, H., Ebisu, S. (2011): Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 5887-5892.
- 16) Baker, P. J., Dixon, M., Roopenian, D. C. (2000): Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 68: 5864-5868.
- 17) Verma, R. K., Bhattacharyya, I., Sevilla, A., Lieberman, I., Pola, S., Nair, M., Wallet, S. M., Aukhil, I., Kesavalu, L. (2010): Virulence of major periodontal pathogens and lack of humoral immune protection in a rat model of periodontal disease. *Oral Dis.* 16: 686-695.
- 18) Daep, C. A., Novak, E. A., Lamont, R. J., Demuth, D. R. (2011): Structural dissection and *in vivo* effectiveness of a peptide inhibitor of *Porphyromonas gingivalis* adherence to *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun.* 79: 67-74.
- 19) Settem, R. P., El-Hassan, A. T., Honma, K., Stafford, G. P., Sharma, A. (2012): *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. *Infect Immun.* 80: 2436-2443.
- 20) Tagger, M., Massler, M. (1975): Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 39: 304-317.
- 21) 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.

- 22) Hao, L., Chen, W., McConnell, M., Zhu, Z., Li, S., Reddy, M., Eleazer, P. D., Wang, M., Li, Y. P. (2015): A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun.* 83: 1235-1245.
- 23) 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.
- 24) Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., Daffonchio, D., *et al.* (2007): Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 9047-9051.
- 25) Taylor, R. D. (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.
- 26) Torabinejad, M., Kiger, R. D. (1980): Experimentally induced alterations in periapical tissues of the cat. *J Dent Res.* 59: 87-96.
- 27) Moller, A. J., Fabricius, L., Dahlen, G., Ohman, A. E., Heyden, G. (1981): Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 89: 475-484.
- 28) Walton, R. E., Ardjmand, K. (1992): Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod.* 18: 216-227.

- 29) Tani-Ishii, N., Wang, C. Y., Tanner, A., Stashenko, P. (1994): Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 9: 129-135.
- 30) Tanomaru-Filho, M., Tanomaru, J. M., Leonardo, M. R., da Silva, L. A. (2009): Periapical repair after root canal filling with different root canal sealers. *Braz Dent J.* 20: 389-395.
- 31) Ordinola-Zapata, R., Bramante, C. M., Duarte, M. H., Ramos Fernandes, L. M., Camargo, E. J., de Moraes, I. G., Garcia, R. B. (2011): The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 112: 272-279.
- 32) Farhad, A. R., Razavi, S. M., Nejad, P. A. (2011): The use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide on periapical healing. *Dent Res J (Isfahan).* 8: 197-202.
- 33) Silva, L. A., Novaes, A. B., Jr., de Oliveira, R. R., Nelson-Filho, P., Santamaria, M., Jr., Silva, R. A. (2012): Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod.* 38: 360-366.
- 34) Cohenca, N., Romualdo, P. C., da Silva, L. A., da Silva, R. A., de Queiroz, A. M., De Rossi, A., Nelson-Filho, P. (2015): Tissue response to root canal irrigation systems in dogs' teeth with apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 19: 1147-1156.
- 35) Martinez, Z. R., Naruishi, K., Yamashiro, K., Myokai, F., Yamada, T., Matsuura, K.,

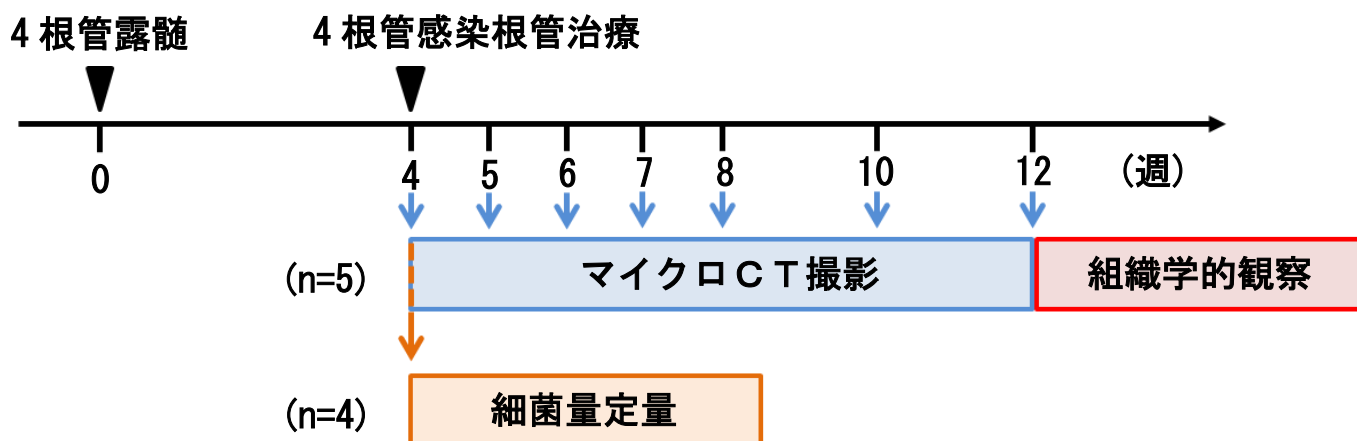
- Takashiba, S., *et al.* (2007): Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *J Endod.* 33: 936-943.
- 36) Van Nieuwenhuysen, J. P., Aouar, M., D'Hoore, W. (1994): Retreatment or radiographic monitoring in endodontics. *Int Endod J.* 27: 75-81.
- 37) Cochran, M. A., Miller, C. H., Sheldrake, M. A. (1989): The efficacy of the rubber dam as a barrier to the spread of microorganisms during dental treatment. *J Am Dent Assoc.* 119: 141-144.
- 38) 堀江卓, 劉利恵, 富士谷盛興, 河合達志, 千田彰. (2009): BMPを添加したMTAによる直接覆髓の効果について. *日歯保存誌.* 52: 393-401.
- 39) Yamasaki, M., Nakamura, H., Kameyama, Y. (1994): Irritating effect of formocresol after pulpectomy *in vivo*. *Int Endod J.* 27: 245-251.
- 40) 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.
- 41) Kohsaka, T., Kumazawa, M., Yamasaki, M., Nakamura, H. (1996): Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod.* 22: 418-421.
- 42) 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.
- 43) Stashenko, P., Yu, S. M. (1989): T helper and T suppressor cell reversal during the

- development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res.* 68: 830-834.
- 44) Liu, R., Kaiwar, A., Shemesh, H., Wesselink, P. R., Hou, B., Wu, M. K. (2013): Incidence of apical root cracks and apical dentinal detachments after canal preparation with hand and rotary files at different instrumentation lengths. *J Endod.* 39: 129-132.
- 45) Capar, I. D., Uysal, B., Ok, E., Arslan, H. (2015): Effect of the size of the apical enlargement with rotary instruments, single-cone filling, post space preparation with drills, fiber post removal, and root canal filling removal on apical crack initiation and propagation. *J Endod.* 41: 253-256.
- 46) Takei, E., Shigetani, Y., Yoshida, K., Hinata, G., Yoshida, N., Okiji, T. (2014): Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. *J Endod.* 40: 1983-1988.
- 47) Alqaderi, H., Lee, C. T., Borzangy, S., Pagonis, T. C. (2016): Coronal pulpotomy for cariously exposed permanent posterior teeth with closed apices: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 44: 1-7.
- 48) Camilleri, J., Pitt Ford, T. R. (2006): Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J.* 39: 747-754.
- 49) Ricucci, D., Siqueira, J. F., Jr. (2010): Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod.* 36: 1-15.



- 50) Dalton, B. C., Orstavik, D., Phillips, C., Pettiette, M., Trope, M. (1998): Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod.* 24: 763-767.
- 51) Shuping, G. B., Orstavik, D., Sigurdsson, A., Trope, M. (2000): Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 26: 751-755.
- 52) Kagan, S., Jabbour, A., Sionov, E., Alquntar, A. A., Steinberg, D., Srebnik, M., Polacheck, I., *et al.* (2014): Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 69: 416-427.
- 53) Ma, H., Darmawan, E. T., Zhang, M., Zhang, L., Bryers, J. D. (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.

## 4 根管感染根管治療モデル



## 1 根管感染根管治療モデル



図 1. 4 根管および 1 根管感染根管治療モデルの実験スケジュール

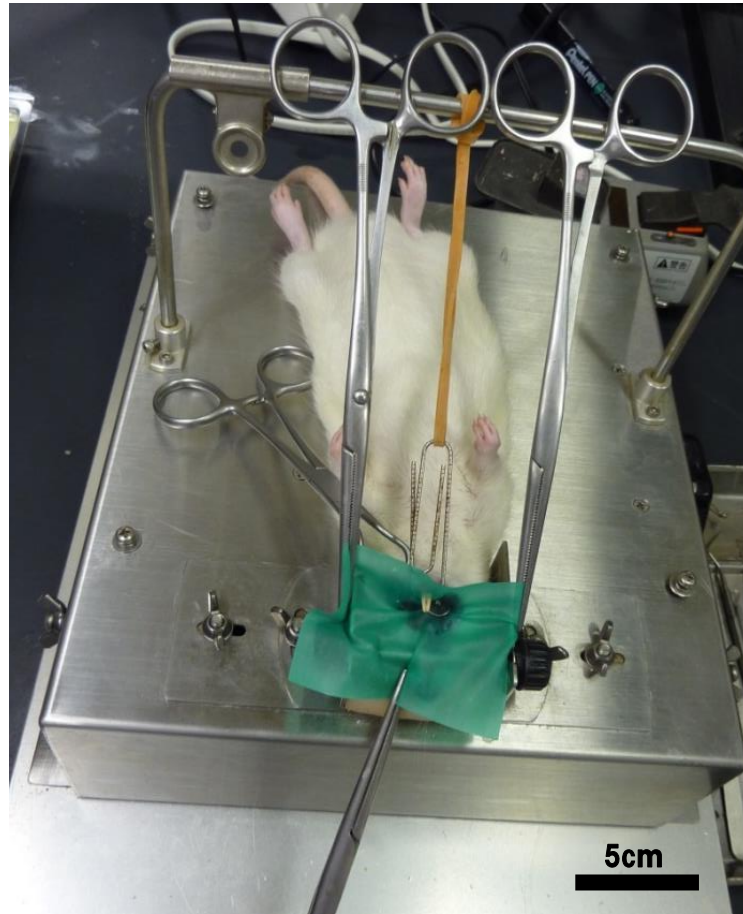


図 2a. 実験台上で感染根管治療のために準備されたラット



図 2b. ラバーダム防湿された被験歯

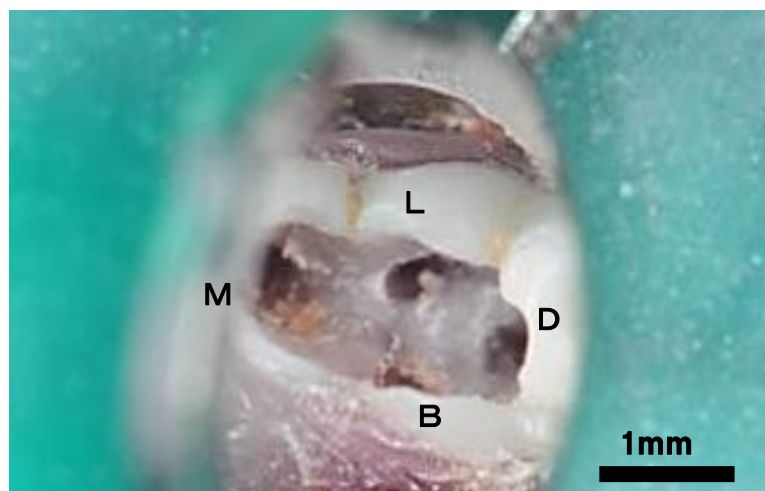


図 2c. 4 根管口が明示された被験歯  
M: 近心根、B: 頬側根、L: 舌側根、D: 遠心根

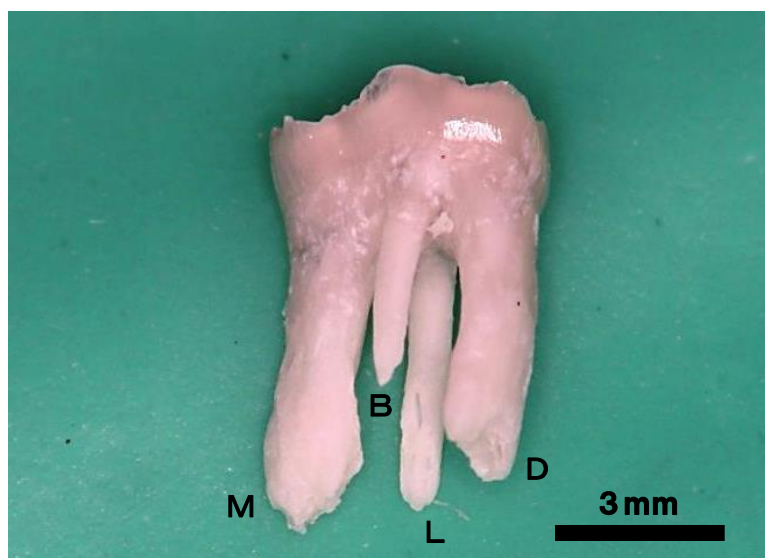


図 2d. ラットの顎第一臼歯  
M: 近心根、B: 頬側根、L: 舌側根、D: 遠心根

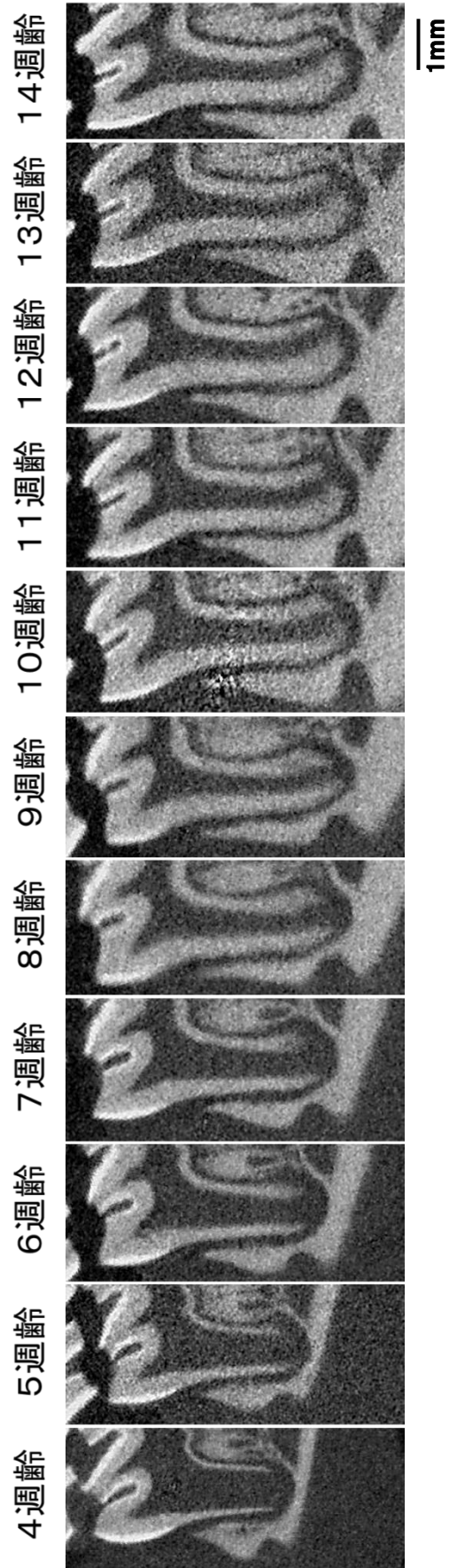


図 3a. 各週齡における下顎第一臼歯近心根のマイクロCT像（矢状断）

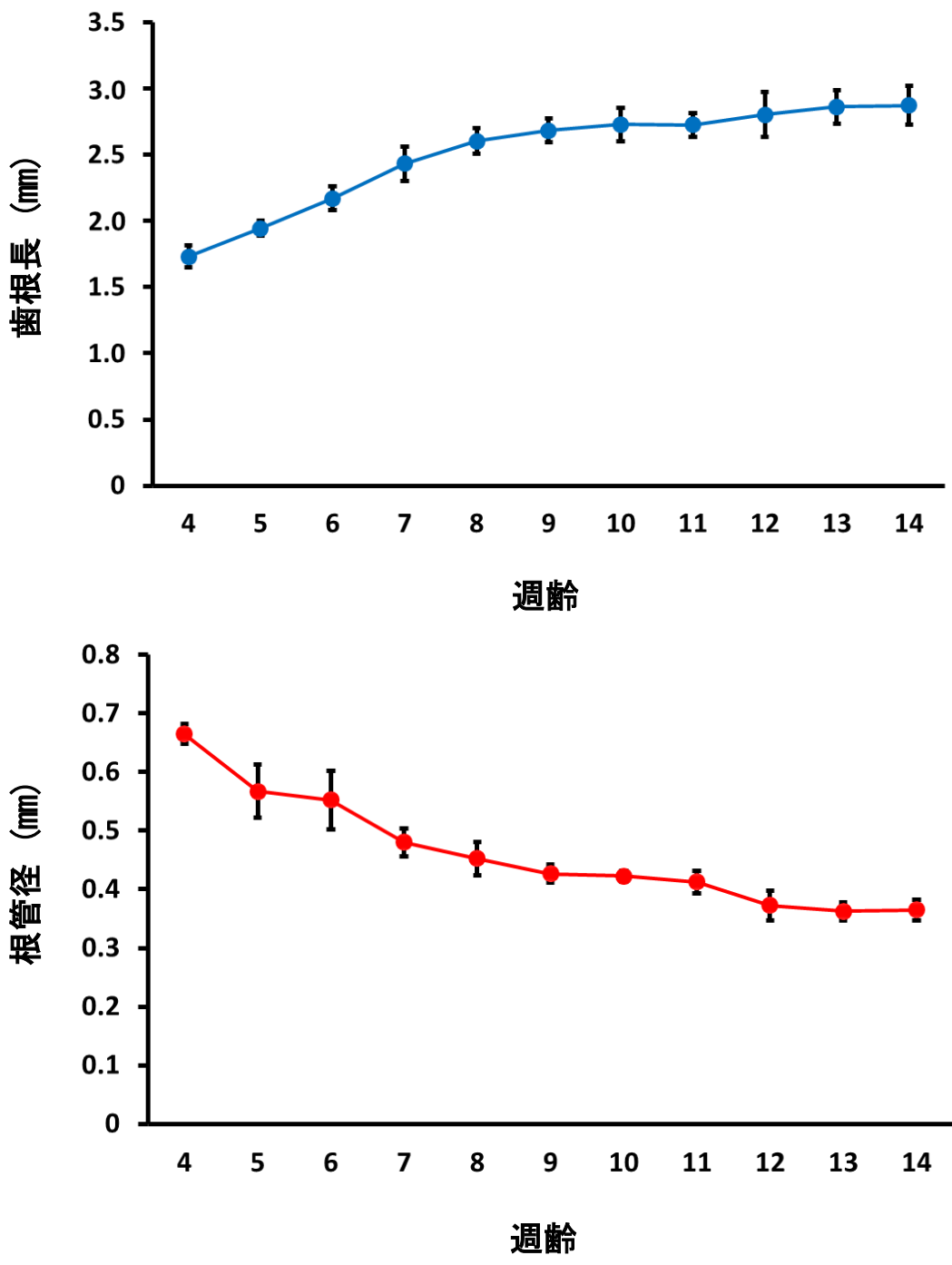


図 3b. 下顎第一臼歯近心根の歯根長と根管径の週齢変化

マイクロ CT 画像上で各週齢のラット下顎第一臼歯近心根の歯根長(髄床底から根尖までの長さ)および根管径(髄床底から 1mm 根尖側の位置での根管の幅径)を計測した (n=4)。グラフはその平均値と標準偏差を示す。

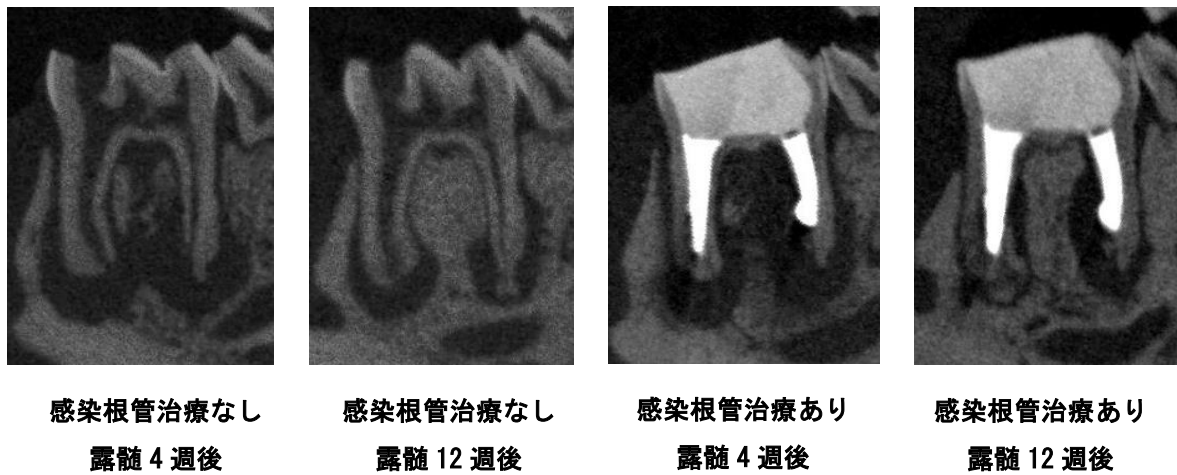


図 4a. 4 根管感染根管治療モデルのマイクロ CT 矢状断像

4 根管感染根管治療モデルの露髄 4 および 12 週後の典型的なマイクロ CT 画像を示す (近心: 各画像の左側)。治療群の近心根根尖病変は縮小したが、遠心根根尖病変は残存した。治療群の遠心根には破折か穿孔を疑う像が観察された。

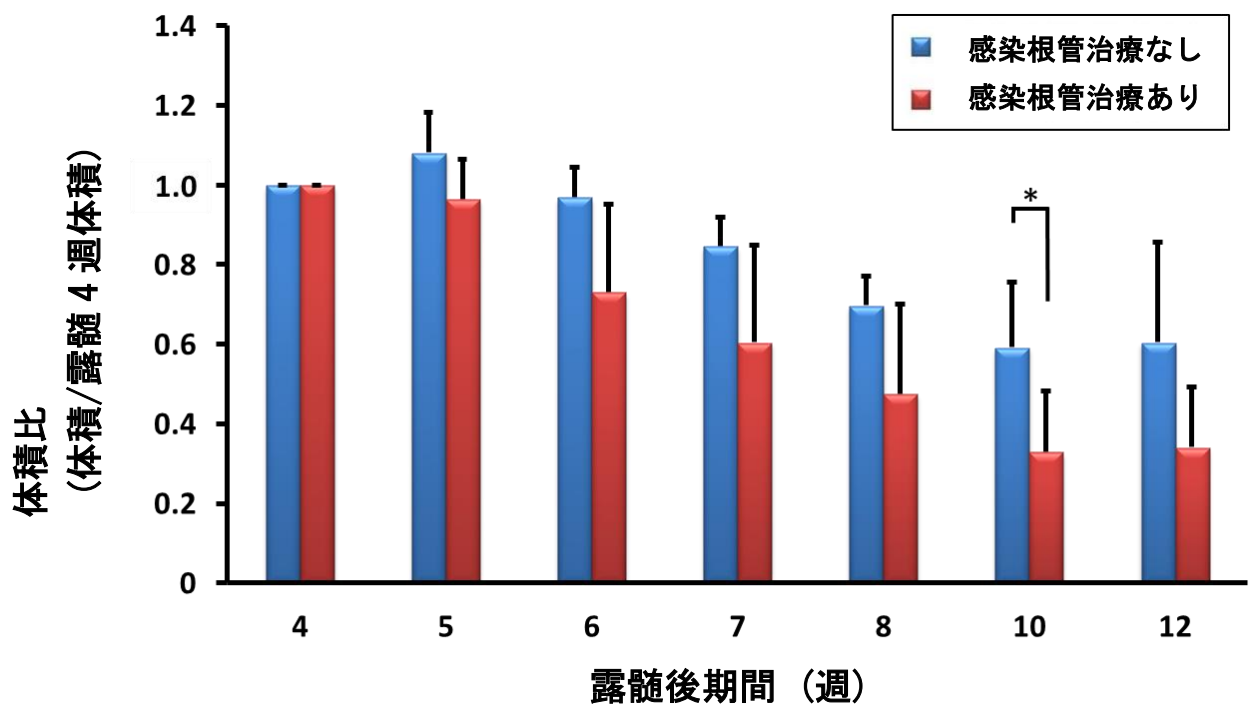


図 4b. 4 根管感染根管治療後の根尖病変体積 (4 根全体)

マイクロ CT データの解析により各期間における根尖病変体積を計測した (n=5)。グラフは露髄 4 週後の体積に対する各期間の体積の比の平均値と標準偏差を示す。露髄 10 週後において治療群の根尖病変体積は対照群と比べて有意に小さかった (Welch's *t*-test, \**p* < 0.05)。

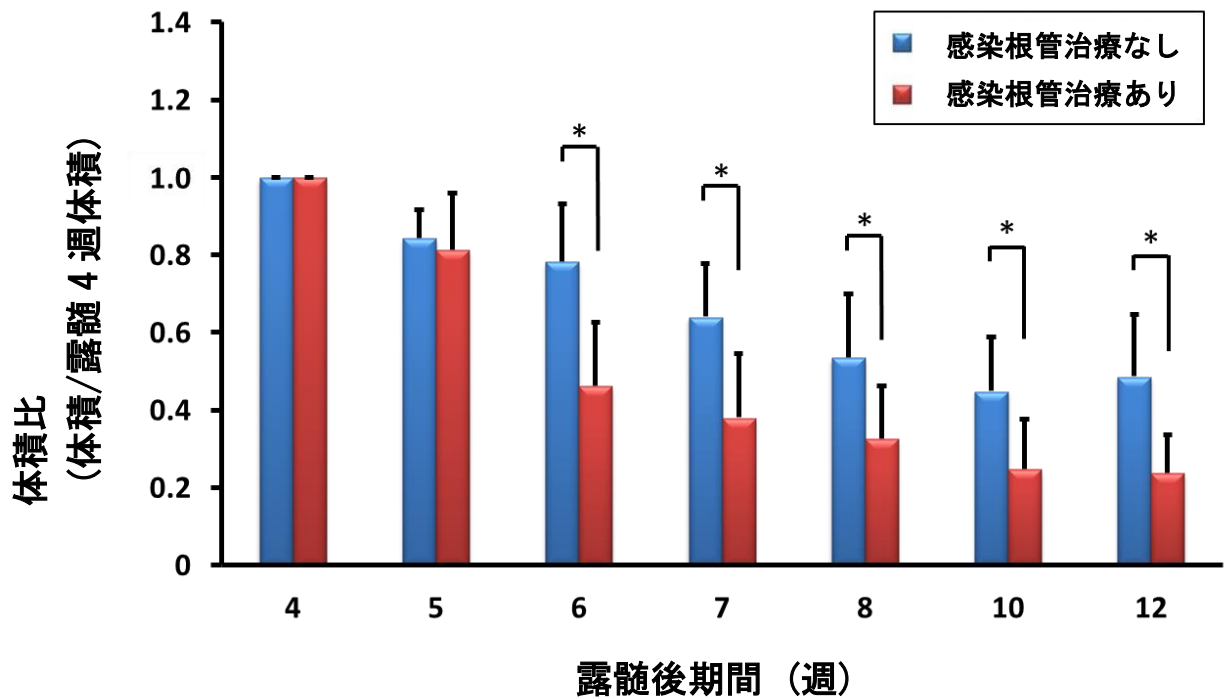


図 5. 4 根管感染根管治療後の近心根根尖病変の体積

マイクロ CT データの解析により各期間における近心根の根尖病変体積を計測した (n=5)。グラフは露髄 4 週後の体積に対する各期間の体積の比の平均値と標準偏差を示す。露髄 6 週後以降において治療群の近心根根尖病変体積は対照群と比べて有意に小さかった (Welch's *t*-test, \* $p < 0.05$ )。



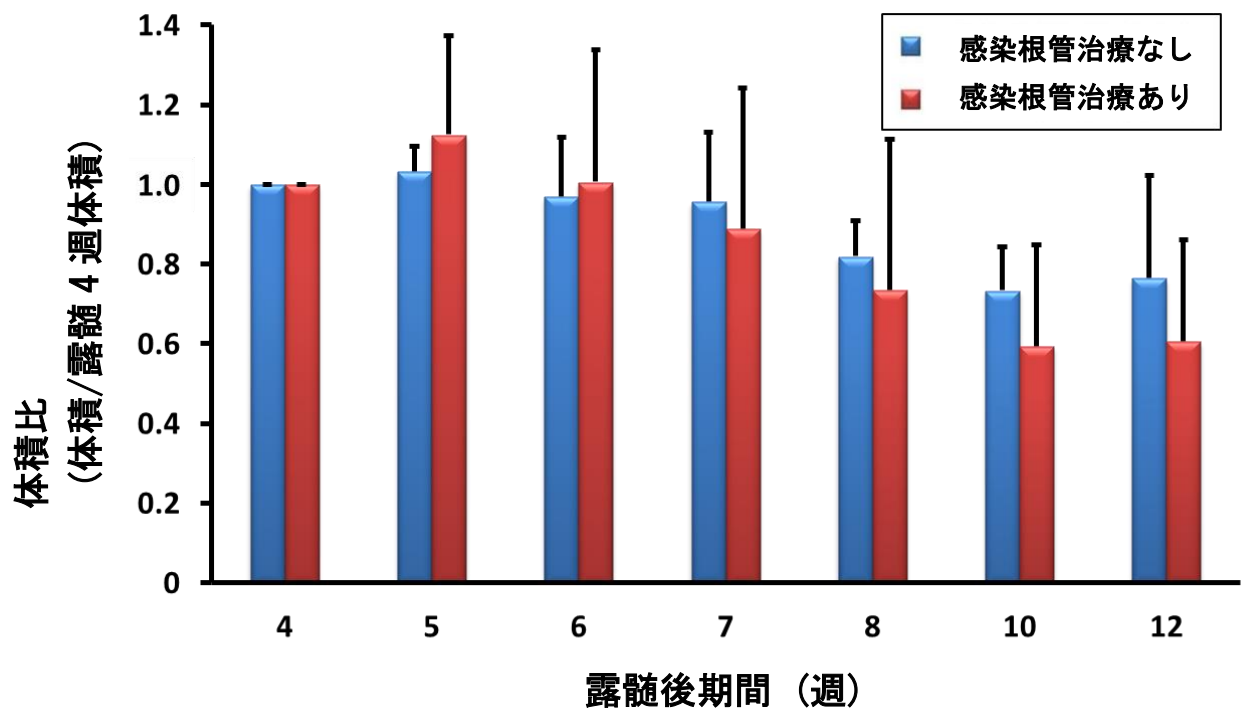


図 6. 4 根管感染根管治療後の遠心根根尖病変の体積

マイクロ CT データの解析により各期間における遠心根の根尖病変体積を計測した (n=5)。グラフは露髄 4 週後の体積に対する各期間の体積の比の平均値と標準偏差を示す。すべての期間において遠心根根尖病変体積は治療群と対照群との間に統計学的有意差を認めなかった (Welch's *t*-test)。

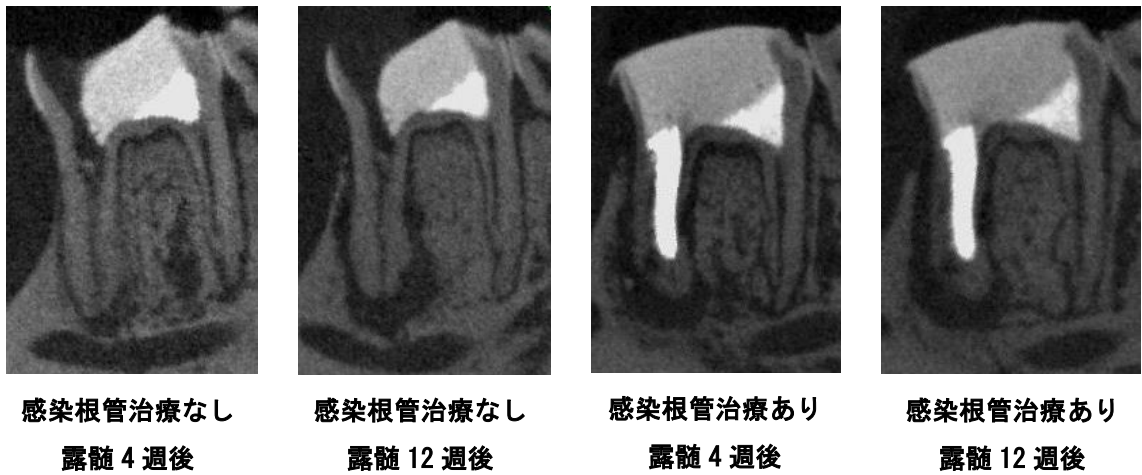


図 7a. 1 根管感染根管治療モデルのマイクロ CT 矢状断像

1 根管感染根管治療モデルの露髄 4 週後および 12 週後のマイクロ CT 画像の典型的な例を示す（近心：各画像の左側）。両群とも近心根根尖病変は縮小しなかった。両群の遠心根は断髄しているため根尖病変を認めなかった。

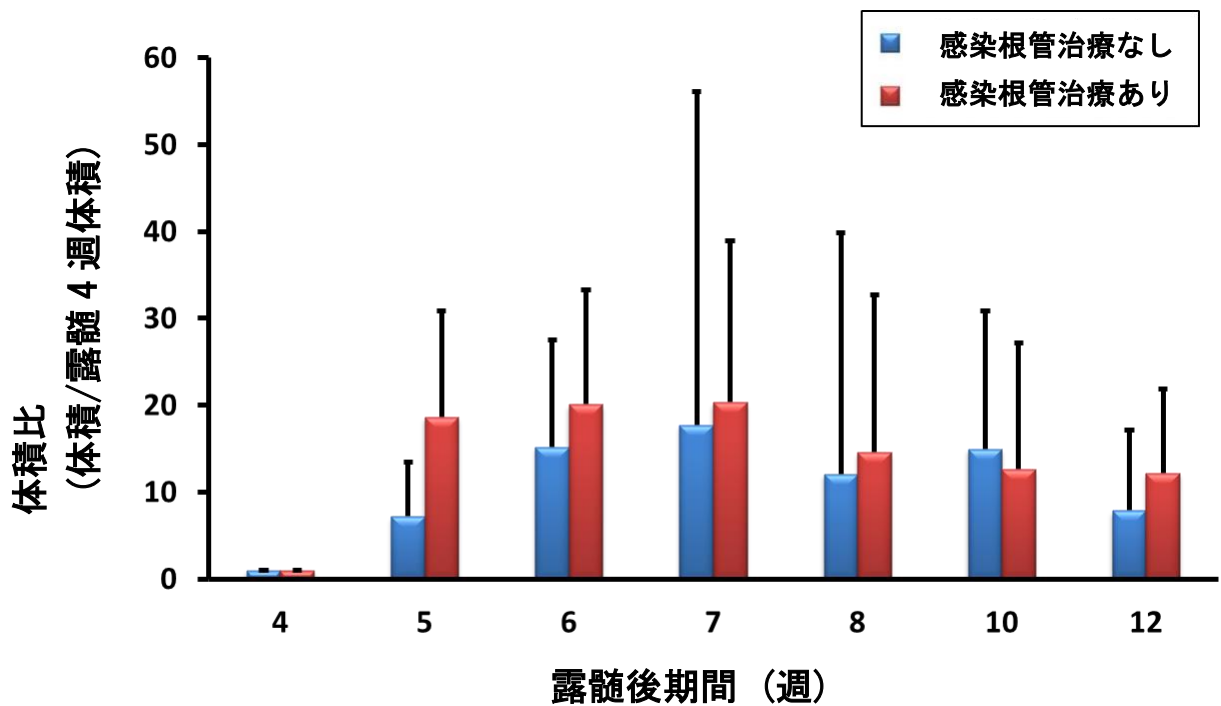


図 7b. 1 根管感染根管治療モデルの近心根根尖病変体積

マイクロ CT データの解析により各期間における近心根根尖病変体積を計測した (n=5)。グラフは露髄 4 週後の体積に対する各期間の体積の比の平均値と標準偏差を示す。すべての期間において近心根根尖病変体積は治療群と対照群との間に統計学的有意差を認めなかった (Welch's *t*-test)。

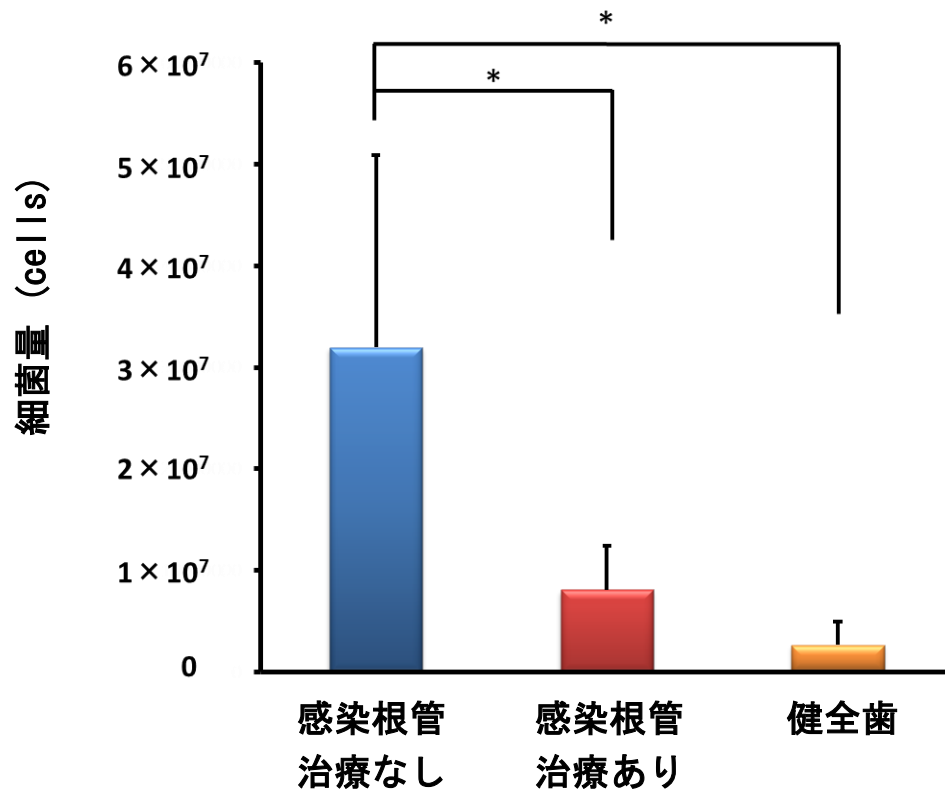
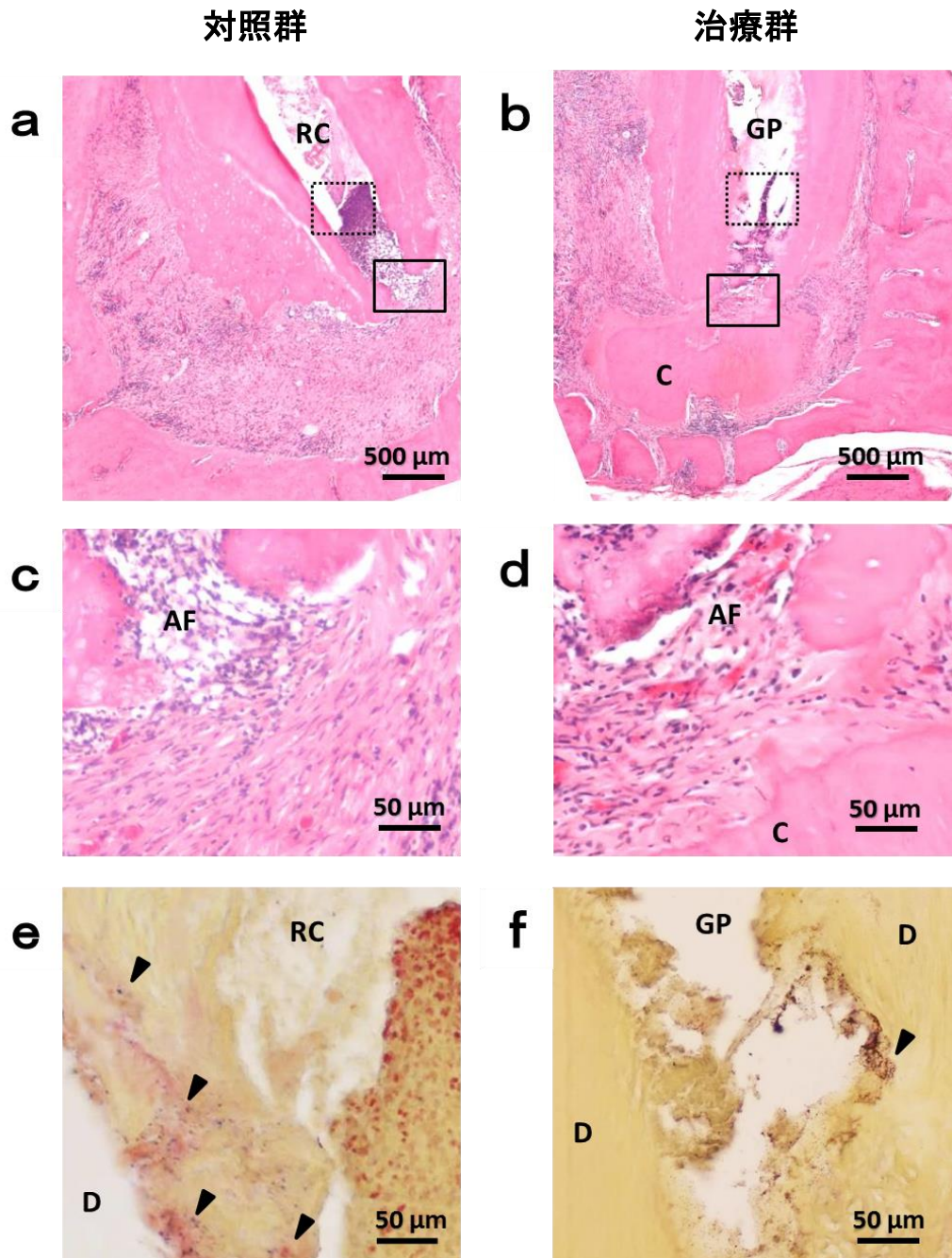


図 8. 感染根管治療直後(露髄 4 週後)における近心根の細菌量

リアルタイム PCR によって近心根由来の細菌の定量を行った (n=4)。グラフはその平均値と標準偏差を示す。治療群の近心根の細菌は対照群に比べて有意に少なく検出された (Steel-Dwass test,  $*p < 0.05$ )。



**図 9. 露髄 12 週後の Hematoxylin-Eosin 染色像および Brown-Bren 染色像**  
 a : 露髄 12 週後の対照群の近心根根尖部の Hematoxylin-Eosin 染色像 (観察倍率:  $\times 40$ )  
 b : 露髄 12 週後の治療群の近心根根尖部の Hematoxylin-Eosin 染色像 (観察倍率:  $\times 40$ )  
 c : a の実線で囲まれた領域の Hematoxylin-Eosin 染色拡大像 (観察倍率:  $\times 200$ )  
 d : b の実線で囲まれた領域の Hematoxylin-Eosin 染色拡大像 (観察倍率:  $\times 200$ )  
 e : a の点線で囲まれた領域の Brown-Bren 染色拡大像 (観察倍率:  $\times 200$ )  
 f : b の点線で囲まれた領域の Brown-Bren 染色拡大像 (観察倍率:  $\times 200$ )  
 (RC:根管, AF:根尖孔, GP:ガッタパーチャポイント, C:セメント質, D:象牙質, 矢尻:細菌)