



Title	ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価
Author(s)	松井, 沙織
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69504">https://doi.org/10.18910/69504</a>
rights	© 2020 Matsui et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
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 ( 松井 沙織 )	
論文題名	ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価
論文内容の要旨	
<p><b>【研究目的】</b>          歯科臨床においては、通常の根管治療では治癒しない難治性根尖性歯周炎に遭遇することがあり、今なお様々な新規治療法の開発研究が行われている。その一つとして、高周波を根管内から根尖病変に照射する「高周波根尖療法」がある。これまで <i>in vitro</i> において、高周波が浮遊細菌に対し殺菌効果を持つことや、ヒト臨床研究において根尖性歯周炎罹患歯の病変の治癒を促進することが報告されているがそのメカニズムは未解明である。一方で、私が所属する研究グループは、ラットを用いた感染根管治療モデルの開発に成功した。これらを背景に、本研究では、根尖性歯周炎に対する高周波根尖療法の作用機序を解明することを目的に、ラット根管治療モデル上で高周波根尖療法が根尖病変に及ぼす影響を、マイクロCTによる 3 次元解析、細菌学的評価、ならびに免疫組織化学的検索にて評価した。さらに、<i>in vitro</i> 系で、口腔内で検出される各種細菌のバイオフィルムおよび宿主細胞、特に、ラット線維芽細胞に対して高周波が及ぼす影響を評価し、高周波照射の効果を示す対象がホストかパラサイトのいずれか、または、両者であるかについても検討を加えた。       </p>	
<p><b>【方法】</b>          高周波照射は Electro-Surgical Unit system (J. MORITA MFG Corp.) を用い、能動電極としてステンレススチール製 K ファイル #10 を、対極としてステンレススチール製のフック又はプローブ形状の電極を使用した。</p> <p>1. <u>ラット感染根管治療モデルを用いた高周波照射が及ぼす影響の検索</u>          本研究は、大阪大学大学院歯学研究科および工学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号: 22-003-2, 23-2-1）。10 週齢雄性 Wistar 系ラットを用い、ラット下顎両側第一臼歯を露髓後放置することにより根尖性歯周炎を誘発させた。右側第一臼歯は、露髓後 4 週に感染根管治療を行う治療群とし、ラバーダム防湿を施した後、マイクロスコープ観察下で K ファイルおよびマイクロエキスカベータを用いて感染根管治療を行った。その後、高周波照射群と通常根管治療群に分類した。高周波照射群には、根管充填直前に根尖孔外および根管内に各 3 回高周波照射を行ったのち、根管充填を行った。通常根管治療群は通法通り根管充填を行った。左側第一臼歯は未処置の対照群とし、治療群と対照群の両群において近心根の根尖病変を対象に以下の 3 点を解析した。</p> <p>1) 根尖病変体積の経時的变化          根管治療後 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 週にマイクロ CT の撮影を行い、根尖病変体積を計測した。近心根の根尖病変体積をそれぞれ算出し、さらに、根管充填後 1 週ごとの根尖病変体積の縮小率を算出した(各 n=5)。</p> <p>2) 根管内総細菌数と生細菌数の定量解析          根管充填直前の下顎第一臼歯の近心根のみを凍結粉碎後、蒸留水を添加し 2 等分した。一方は遺伝子を抽出した後、16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマーを用いて real-time PCR を行い根管内の総細菌数を測定し、他方は ATP 量により根管内の生細菌数を測定した(各 n=5)。</p> <p>3) 根尖病変部の免疫組織化学的検索          根管治療後 2, 3 週に PLP 固定液にて灌流固定を行い、下顎骨を採取し、脱灰後、パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。切片には IL-1β, FGF2, TGF-β1 に対する特異抗体を用いた酵素抗体法染色を施し、免疫組織化学的検索に供した。</p> <p>2. <u>In vitro における高周波が及ぼす影響の検索</u>  <p>1) 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索          供試菌株として、<i>Enterococcus faecalis</i> SS497, <i>Streptococcus mutans</i> 10449, <i>Fusobacterium nucleatum</i> 1436, <i>Porphyromonas gingivalis</i> 381, <i>Prevotella intermedia</i> ATCC25611 を用い、各菌株のバイオフィルムを直径 6 mm のハイドロキシアパ</p> </p>	

タイト (HA) ディスク上に形成した (各 n=5). 直接照射群では HA ディスク中央に能動電極を挿入し, 間接照射群では中央においてディスクを対極と能動電極で非接触にて囲むよう配置し, いずれの群も生理食塩水中に浸漬した. 各々 15 回高周波を照射し, 非照射を対照群とした. その後, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察と ATP 量測定による生細菌数の評価を行った.

## 2) 高周波照射がラット線維芽細胞に及ぼす影響の検索

10%FBS 添加 MEM で3日間培養したラット線維芽細胞 (208F) に高周波を 0, 5, 10 回照射し, その 1, 3, 5 日後に細胞から mRNA を回収した. (各 n=6). 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した後, real-time PCR を行い, 細胞増殖因子である *FGF2*, *VEGF*, *TGF-β1* の mRNA 発現量を定量評価した.

## 【結果】

### 1. ラット感染根管治療モデルを用いた高周波照射が及ぼす影響の検索

#### 1) 根尖病変体積の経時的変化

近心根の根尖病変の体積は, 対照群と比較し, 高周波照射群および通常根管治療群は有意に縮小した. さらに, 高周波照射群は通常根管治療群と比較し, 根管治療後 6 週以降は病変体積が有意に縮小した (Tamhane test, p < 0.05). また, 根管治療後 1 週ごとの根尖病変体積の縮小率を算出した結果では, 根管治療後 2 週から 3 週の根尖病変の縮小率は, 通常根管治療群と比較し, 高周波照射群で有意に増加した (Student's t-test, p < 0.05).

#### 2) 根管内総細菌数と生細菌数の定量解析

根管内総細菌数および生細菌数は, 未処置群と比較して治療群では有意に減少したものの, 高周波照射群と通常根管治療群の間に統計学的有意差は認めなかった (Steel-Dwass test, p < 0.05).

#### 3) 根尖病変部の免疫組織化学的検索

根管治療後 2 週において, IL-1β 抗体陽性細胞が高周波照射群および通常根管治療群で根尖病変内に広く発現しているのに対し, 根管治療後 3 週になると両群で発現が一部に限局した. また, IL-1β は高周波照射により発現が減退した. *FGF2* および *TGF-β1* は, 根管治療後 3 週の高周波照射群では通常根管治療群と比較して根尖病変内に陽性細胞の発現増強を認めた.

### 2. In vitro における高周波が及ぼす影響の検索

#### 1) 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索

HA ディスク上に形成したバイオフィルムに対しては, *P. gingivalis* と *P. intermedia* という特定のグラム陰性菌において, 直接照射 15 回で細菌への殺菌効果を認め, その他菌種のバイオフィルムに対しては殺菌効果を認めなかつた (One-way ANOVA with Tukey's test, p < 0.05).

#### 2) 高周波照射がラット線維芽細胞に及ぼす影響の検索

ラット線維芽細胞に高周波を照射した場合, *FGF2* は 10 回照射後 5 日, *VEGF* は 5, 10 回照射後 5 日で非照射と比較して遺伝子の発現量が有意に増加した (Two-way ANOVA with Tukey's test, p < 0.05).

## 【考察と結論】

本研究において, *in vitro* で形成したバイオフィルムに対し, グラム陰性菌である *P. gingivalis* と *P. intermedia* は高周波の直接照射によりわずかに殺菌効果を認めたものの, 他のバイオフィルムに関しては殺菌効果を示さなかつた. この理由の一つとしては, 細胞壁の構造がグラム陰性菌と陽性菌では異なっており, グラム陽性菌に比較してグラム陰性菌は細胞壁が薄いことが関係していると推察される. また, ラット根管治療後の高周波照射によつても細菌量に有意な変化は認められなかつた. この原因として, 根管内および根尖孔外のバイオフィルムに直接高周波を照射することが困難であることや, 感染根管治療後, つまり, 感染源を機械的あるいは化学的に除去した後の残存細菌は, 治療前の 4 分の 1 程度まで減少していることが関連していると考えられる. 以上の結果より, 高周波根尖療法は感染根管内の細菌に対し殺菌効果を示さないことが明らかとなつた.

他方で, ラット根管治療モデルにおいては, 炎症性サイトカインである IL-1β は高周波照射により発現が減退したことから, 高周波照射により炎症が抑制されたと考えられる. また, ラット線維芽細胞に高周波を照射した場合には, 10 回照射後 5 日で細胞増殖因子である *FGF2* の発現が, 5 および 10 回照射後 5 日で *VEGF* の発現が上昇し, 根尖病変部の免疫組織化学的検索の結果においても創傷治癒時に発現が上昇するとされている *TGF-β1* および *FGF2* の発現が上昇したため, これらの細胞増殖因子が根尖病変の治癒促進に寄与したと考えられる.

以上より, 高周波根尖療法は宿主側である根尖周囲組織に対し作用し, 根尖病変の治癒促進に寄与することが明らかとなり, 難治性根尖性歯周炎に対する非外科的な治療法の一つとして有用であることが示唆された.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏名 ( 槩 )	松井 沙織 )	氏名
論文審査担当者	主査	教授	林 美加子
	副査	教授	今里 聰
	副査	准教授	北村 正博
	副査	講師	住友 倫子

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、根尖性歯周炎に対する高周波根尖療法の作用機序を解明することを目的に、ラット根管治療モデルで高周波根尖療法が根尖病変に及ぼす影響を、また、*in vitro* にてバイオフィルムおよびラット線維芽細胞に対し高周波が及ぼす影響を評価したものである。

その結果、高周波根尖療法は、根管内の残存細菌への殺菌効果は示さないものの、宿主側の根尖周囲組織の細胞増殖因子を誘導する作用があり、根尖病変の治癒を促進することが明らかとなった。

以上の研究成果は、高周波根尖療法が根尖性歯周炎に対する非外科的な治療法の一つとして有用であることを示すものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められる。