The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://doi.org/10.18910/69504
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

ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価

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)

松井　沙織

目次

緒言 2

材料および方法 5

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
   2）根管内総細菌数と生細菌数の定量解析
   3）根尖病変部の免疫組織化学的検索
2. 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索
3. 高周波照射がラット線維芽細胞に及ぼす影響の検索
4. 統計学的解析

結果 15

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
   2）根管内総細菌数と生細菌数の定量解析
   3）根尖病変部の免疫組織化学的検索
2. 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索
3. 高周波照射がラット線維芽細胞に及ぼす影響の検索

考察 18

結論 24

謝辞 25

文献 26

図表 35

緒言

根尖性歯周炎は根管内の細菌感染により惹起される疾患であり[1)]，治療としては主に手用ファイルやロータリーファイルによる感染根管内の感染源の機械的除去や，次亜塩素酸ナトリウム水溶液や EDTA を用いた根管の化学的清掃，ならびに水酸化カルシウム製剤などの根管貼薬による根管内残存細菌の化学的コントロールが臨床において併用されている。一方，抜髄の成功率の平均は 82.5% (74.0 - 91.0%) であるのに対し，初回感染根管治療の成功率の平均は 73.1% (66.1 - 80.0%) と感染根管治療の成功率は低い[2)]。この理由の一つは，一度根管内に細菌が感染すると，感染根管治療を行っても側枝やイスムスなどの解剖学的形態の複雑さのため，根管系の感染源は完全には除去しきれないことが挙げられる。さらに，根管内からは器具が到達困難である根尖孔外にバイオフィルムが形成されることもある[3-5)]。この根尖孔外バイオフィルムは，通常の根管治療では治癒しない，いわゆる難治性根尖性歯周炎の一因であると報告されている[6, 7)]。

このような感染源を完全に除去することは困難であり，臨床においてこの難治性根尖性歯周炎に遭遇した場合，現在では一般的に歯根端切除術など外科的な治療が選択されている。しかし，非外科的な処置を希望する患者も多く，今なお様々な新規治療法の開発研究が行われている。例えば，レーザーやトルイジンブルー等の光感受性ジェルを用いた抗菌光線力学療法を根管内に適用することで，象牙細管内に侵入した細菌など，通常の根管治療では除去できない感染除去の効果が期待できるとされている[8, 9)]。

今回，非外科的な処置の一つとして， 高周波を用いた根尖性歯周炎の治療法である「高周波根尖療法」に着目した。高周波は，ジアテルミー療法として幅広く利用されており，骨折後の骨に対して超音波を照射することによって骨癒合を促進させるなど，ヒトの硬軟両組織において治癒促進作用を有することが報告されている[10-12]。高周波による発熱は，電流が通電する際に導体中の自由電子が導体を構成する分子と衝突して惹起される振動エネルギーであり，歯科領域では電気メスがこの原理を応用して使用されている。一方，高周波の間接的な応用方法として，化骨治癒促進作用があり，日本でも，遷延治癒骨折と偽関節に対して整形外科領域で応用されており[13-16]，歯科領域においても近年ではインプラント埋入部の治癒促進にも利用されている[17-19]。また，これまでに高周波照射が *Porphyromonas gingivalis, Staphylococcus intermedius, Enterococcus faecalis, Streptococcus mutans* の各種浮遊細菌への殺菌効果を示すこと[20]，骨芽細胞からの TGF-β1, VEGF, FGF2 などの細胞増殖因子の遺伝子発現を誘導すること[21]，またヒトへの臨床応用にて有意に高周波照射が根尖病変の治癒を促進すること[22,23]が報告されている。しかし，根管内での高周波の効果の対象が，宿主である根尖部周囲組織なのか，パラサイトである細菌側なのか，それとも両者であるかといった作用機序については未解明のままである。

近年, Yoneda らは，ラット感染根管治療モデルの開発に成功した[24]。これは，ラットの下顎第一臼歯に根尖性歯周炎を惹起し，ラバーダム防湿下で根管拡大・形成，根管充填を行うもので，マイクロ CT にて近心根の病変体積変化を経時的に観察可能なモデルである。このモデルでは，感染根管治療によって根尖病変体積および根管内細菌量は有意に減少し，臨床

的に治癒に導く系が確立されている。このモデルを用いれば，実際に根管治療後に高周波を照射することで，どのような変化・反応が起こっているのかを評価することが可能である。

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，ラット感染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，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，*in vitro* 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。

材料および方法

1. 高周波治療器

試作した Electro-Surgical Unit system (モリタ, 大阪)を用い, 高周波照射を行った。これは根管長測定機能が付加された本体 (図 1) と, 能動電極, 対極から構成されており, フットペダルを踏むことにより高周波が能動電極から照射される。能動電極としてステンレススチール製 K ファイル (MANI, 栃木) #10 を, 対極としてラットにはステンレススチール製のフックを, *in vitro* では先端のみ通電するように加工したプローベ形状の電極を使用した。照射条件は, 周波数 500 kHz, 通電時間 1.0 秒間, 照射間隔 4 秒[22, 23]とした。

2. 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

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) 。

10 週齢雄性 Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) 32 匹を用い (表 1), Yoneda ら[24]の方法に準じてラット感染根管治療モデルで高周波照射の影響を評価した。

図 2. に本研究の実験デザインを示した。本実験において, ラットへの施術はすべてマイクロスコープ (Stemi DV4 SPOT; Carl Zeiss, Oberkochem, Germany) 観察下で行った。実験的根尖病変の形成は, Kawahara ら[25]および Kuremoto ら[26]の方法に準じて行った。

すなわち, 10 週齢雄性 Wistar 系ラットを用い, 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) による腹腔内注射で全身麻酔を施し, 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 #1/4 ラウンドバー (Dentsply, Ballaigues, Switzerland) を用いて咬合面近心窩から露髄させた。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させた。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, 高周波照射群と高周波非照射の通常根管治療群に分類した。高周波照射群には, 感染根管治療後, 根管充填直前に根尖孔外および根管内中央部に各 3 回高周波照射を行った (図 3)。通常根管治療群は通法通り根管充填を行った。高周波照射群としたラットの下顎左側第一臼歯は感染根管治療をせず対照群とした (表 1)。治療群とした右側第一臼歯は露髄後 4 週に, 4×4 cm に切り取ったラバーダムシート (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) およびラット用にオーダーメイドしたラバーダムクランプ (YDM, 東京) を用いて患歯にラバーダム防湿を施した後, 歯面を 70% エタノールで消毒した。#1/4 ラウンドバーにて咬合面から髄腔開拡後, 歯冠部の壊死歯髄を除去し, 髄床底部および根管口付近はマイクロエキスカベータ (OK マイクロエキスカ; 背戸製作所, 福岡) を用いて感染歯質の除去を行った。その後 K ファイル #8 を用いて根尖まで穿通し, 電気的根管長測定器 (Root ZX; モリタ) で 1.0 値の位置を作業長として近心根の根管拡大を行い, 最終拡大号数は #20 とし, 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて根管洗浄を行った。高周波照射群には生理食塩水を根管内に満た

し高周波を照射した。その後，滅菌ペーパーポイントを用いて根管乾燥後，最終拡大号数のガッタパーチャポイント (SybronEndo, Anaheim, CA, USA) とシーラー (RealSeal SE; SybronEndo) を用いてシングル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 フロー; GC, 東京) にて髄腔内を充填し，歯冠修復処置を完了した。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。高周波照射群，通常根管治療群および対照群の各群 n = 5 として，近心根の根尖病変を対象にマイクロ 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を行った。

1) 根尖病変体積の経時的変化

根管治療後 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 週にマイクロ CT (R_mCT2; RIGAKU, 東京) 撮影を行い，各時点において得られたデータは，Yoneda ら [24]および Kuremoto ら [26]の方法に準じて解析した。

すなわち，ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による全身麻酔を施し，マイクロ CT にて下顎第一臼歯を含む顎骨の撮影を行った。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，Y 軸は頬側根と舌側根の中心，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 (BMD) が既知のファントムを用い，CT 値を BMD 値に変換する検量線を作成し，各試料の BMD 画像を構築した。硬組織抽出の閾値を設定後，2 値化画像から根尖部透過像部の面積を計測した。各々のスライスの根尖部透過像面積を計測後，全てを重ね合わせて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た。

2) 根管内総細菌数と生細菌数の定量解析

感染根管治療直後の根管内に残存している総細菌数と生細菌数の定量解析を Yoneda ら[24]の方法に準じて行った。

すなわち，感染根管治療後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，下顎両側第一臼歯を抜去した。抜去した被験歯の近心根外表面を滅菌したスプーンエキスカベータにて掻爬，生理食塩水にて洗浄することにより歯根面付着細菌を除去後，近心根を根分岐部の位置にて離断した。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) を用いて粉砕した。粉末状の試料に 1 ml の滅菌蒸留水を添加し，30 秒間ボルテックス・ミキサー (VORTEX-GENIE 2 Mixer; M&S instruments，大阪) にて撹拌した。得られた試料を 2 等分し，一方から InstaGene matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用して遺伝子を抽出後，16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマー (357f: CTCCTACGGGAGGCAGCAG, 907r: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) [27]を用いて，real-time PCR を行い根管内の総細菌数を測定した。Power SYBR Green PCR Master Mix (10 µl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)，前述のユニバーサル

プライマー (各 0.5 µl, 最終濃度 900 nM), 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, Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) により initial denature 95℃ で 3 分間, denature 95℃ で 15 秒間, annealing 65℃ で 1 分間, extension 72℃ で 1 分間, サイクル数 30 の条件でターゲット DNA を増幅した。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℃ から 95℃ へ温度を上昇させ, この間 0.5℃ の間隔で蛍光シグナルを検出して融解曲線を作成し, 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 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。

他方は, Maezono ら[40]の方法に準じて ATP 消去剤キット (AF-3X2; TOA DKK , 東京) にて処理したサンプルの ATP を ATP アナライザー (AF-100; TOA DKK) を用いて計測することにより根管内 ATP 量, すなわち生細菌数を測定した。

3) 根尖病変部の免疫組織化学的検索

根管治療後 2, 3 週の各時点で, ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与し, Periodate Lysine Paraformaldehyde (PLP) 固定液 (和光純薬工業, 大阪) にて灌流固定を行い, 下顎第一臼歯を含む下顎骨を摘出した。軟組織を除去した上で, PLP 固定液に 24 時間, 4℃で浸漬固定後, 15% グリセリン (和光純薬工業) を添加した 10% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (同仁化学研究所, 熊本) 溶液中で約 14 日間, 4℃ にて低温脱灰し, 上昇エタノール系列にて脱水を行い, パラフィンに包埋した。パラフィンブロッ

クの試料をミクロトーム (RM2255; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて薄切し，厚さ 4 μm の連続薄切切片を作製した。その後，切片には IL-1β (ab9787; abcam, Cambridge, England), TGF-β1 (MAB240; R&D systems, Minneapolis, MN, USA), FGF2 (ab16828; abcam) に対する特異抗体を用いた酵素抗体法染色を施し，光学顕微鏡 (ECLIPSE Ni; Nikon, 東京) で観察することにより免疫組織化学的検索に供した。

3. 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索

初めに，口腔で病原性を発揮することが報告されている [28)]，以下に示す各種細菌のバイオフィルムを作製し，高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の評価を行った。

実験には，グラム陽性菌として *E. faecalis* SS497，*Streptococcus mutans* 10449，グラム陰性菌として *Fusobacterium nucleatum* 1436，*Porphyromonas gingivalis* 381，*Prevotella intermedia* ATCC 25611 を使用した。培地は *S. mutans*, *E. faecalis* および *P. intermedia* は Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用い，*S. mutans* には 1% スクロース (ナカライテスク，京都) を添加した BHI 培地を用いた [29-31)]。*P. intermedia* は 0.5% Bact ™ yeast extract (Becton Dickinson and Company), 1% ヘミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.05% L-システイン塩酸塩一水和物 (ナカライテスク) を添加した BHI 培地を用いた [29, 32)]。また，*F. nucleatum* は Todd Hewitt 培地 (Becton Dickinson and Company) に 0.05% L-システイン塩酸塩を添加し [29, 32)]，*P. gingivalis* は Gifu anaerobic medium (GAM) 培地 (GAM ブイヨン; 日水製薬，東京) に，

ヘミン 5 μg/ml およびメナジオン (和光純薬工業) 1 μg/ml を添加した[29, 33, 34]。バイオフィルムは, 8 時間以上唾液処理をしたハイドロキシアパタイト (HA) ディスク (オリンパス テルモ バイオマテリアル, 東京) 上に形成した[32]。HA ディスクを菌液 2 ml 中に浸漬し, 37℃, 嫌気条件下 (90% N_2, 5% CO_2, 5% H_2) にて, *S. mutans*, *E. faecalis* は 2 日間, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* は 7 日間培養し, HA ディスク表面に各種細菌のバイオフィルムを作製した。その後, 作製したバイオフィルムに対し, 高周波照射を行った。バイオフィルム作製後の HA ディスクを生理食塩水にて洗浄後, 生理食塩水 2 ml 中に浸漬した[35]。能動電極であるステンレススチール製 K ファイル #10 は, 直接照射群では HA ディスク中央に挿入し, 間接照射群では中央においたディスクを対極と能動電極で挟むよう, またディスクとは接触しないように生理食塩水中に挿入し, 各々 15 回ずつ高周波を照射した (図 4) 。非照射を対照群とし, 各群 n = 5 とした。その後, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, LSM 700; Carl Zeiss) 観察によるバイオフィルムの 3 次元解析と ATP 量測定による HA ディスク上のバイオフィルムの生細菌数の評価を行った。

CLSM による 3 次元解析は, Wake ら[36]の方法に準じて行った。すなわち, HA ディスク上に形成した各菌種のバイオフィルムを LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 室温・遮光下で 15 分間染色後, 蒸留水にて洗浄した。試料をスライドガラス上に固定し, CLSM にて観察し, その得られたデータを画像解析ソフト (Imaris 5.0.1; Bitplane AG, Zurich, Switzerland) にて 3 次元像の構築後,

bioImage_L (Chávez de Paz 2009; available from http://www.bioimageL.com/get_bioimage_L for 2-D analysis) [37-39]にて生菌と死菌の割合を算出した [15-17]。また, ATP 測定による生細菌数の評価は, Maezono ら [40]の方法に準じて前述の記載と同一の方法で行った。

4. 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 (208F; DS Pharma Biomedical, 大阪) を用いて, 高周波照射時の各種細胞増殖因子の発現を評価した。培養は, 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific), 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (和光純薬工業) を添加した 1.0 g / l グルコース含有 minimum essential media (MEM, ナカライテスク) を細胞増殖用培地として用い, 37℃, 5% CO_2 にて行った。

細胞の培養, 高周波の照射, および cDNA 合成は Yumoto ら [21]の方法に準じて行った。すなわち, 100 mm 細胞培養プレート (IWAKI, 東京) にて 100% コンフルエントの状態まで培養した後, Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, 和光純薬工業) で洗浄し, trypsin / EDTA (Sigma-Aldrich) を 3 分間作用させ細胞を回収した。その後, 遠心分離処理 (1200 rpm, 5 分間) を行い, 上清を除去した。得られた細胞を 1 ml の培地に懸濁し細胞数を測定した。細胞数測定は, 0.4% トリパンブルー染色液 (Sigma-Aldrich) 90 µl に細胞懸濁液を 10 µl 加え, 十分に撹拌したのち血球計算盤とカバーガラスの間に 10 µl 添加した。培養倒立顕微鏡 (TS100; Nikon) を用いて, 100 倍で観察し細胞懸濁液中の細胞数を算出した。48 穴組織培養プレート (Corning, Corning, NY, USA) のプレートに 1.8 $\times 10^4$ cells/well ずつ細胞を播種し, 3 日間, 37℃, 5% CO_2 環境下で培養した。

培地 500 ml 中に底面から 1 ㎜ まで能動電極としてはステンレススチール製 K ファイル #10 を, 対極としてはステンレススチール製のプローベ形状の電極を挿入し, 0, 5, 10 回高周波を照射した (図 5)。照射後 1, 3, 5 日間培養し, 各 n = 6 とした。mRNA 抽出を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて行った。その後, Total RNA 400 ng を逆転写酵素 (SuperScript IV VILO Master Mix; Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA (1 µl), Power SYBR Green PCR Master Mix (10 µl) (Thermo Fisher Scientific), 細胞増殖因子である *VEGF* (TGTGCGGGCTGCTGCAATGAT, TGTGCTGGCTTTGGTGAGGTTTGA) [41], *FGF2* (CTGTCTCCCGCACCCTATC, CTTTCTCC CTTCCTGCCTTT) [42], *TGF-β1* (TGGCGTTACCTTGGTAACC, GGTGTTGAGCCCTTTCCA G) [41]の特異的なプライマー (各 0.5 µl) に滅菌蒸留水を加えて全量 20 µl の PCR 反応溶液とした。今回, Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system により initial denature 95℃ で 10 分間, denature 95℃ で 15 秒間, annealing 65℃ で 1 分間, extension 72℃ で 1 分間, サイクル数 40 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。さらに, 増幅終了後, 60℃ から 95℃ へ温度を上昇させ, この間 0.5℃ の間隔で蛍光シグナルを検出して融解曲線を作成し, 増幅産物の特異性を確認した。データは 7500 System SDS software Version 2.0.2 を用いて解析した。遺伝子発現量の定量は, 内在性コントロールとして β-actin 遺伝子の発現量との比較により行い, この相対的定量化に必要な計算は ΔΔCt 法により行った [43]。

5. 統計学的解析

根尖病変体積変化の統計学的有意差の検定には Tamhane test, 根尖病変体積の縮小率についての統計学的有意差の検定には Student's *t*-test, 根管内細菌の定量についての統計学的有意差の検定には Steel-Dwass test を用いた. また, *in vitro* におけるバイオフィルムの生菌率についての統計学的有意差の検定には one-way ANOVA および Tukey's test を用いた. さらに, *in vitro* における線維芽細胞からの細胞増殖因子の発現量についての統計学的有意差の検定には two-way ANOVA および Tukey's test を用いた。それぞれの危険率は 5% として評価した。

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，高周波照射群と通常根管治療群は有意に減少した。さらに，高周波照射群は通常根管治療群と比較して，根管治療後 6 週以降は病変体積が有意に縮小した (図 6) 。また，マイクロ CT で得た各タイムポイントの画像データを重ね合わせることで，各期間別に骨が増加し，根尖病変が治癒した部分を抽出したところ，根管治療後 3 週までに根尖病変のほとんどが治癒した (図 7) 。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て，高周波照射群で有意に増加した (表 2) 。

2) 根管内総細菌数と生細菌数の定量解析

根管内の生細菌数及び総細菌数は，対照群と比較すると高周波照射群と通常根管治療群では有意に減少したが，高周波照射群と通常根管治療群間に有意差は認めなかった (図 8) 。

3) 根尖病変部の免疫組織化学的検索

IL-1β は根管治療後 2 週において，高周波照射群と通常根管治療群の両群で陽性細

胞が根尖病変内に広く発現していたが (図 9 a, b, e, f) 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 (図 9 c, d, g, h) 。また, IL-1β は高周波照射により発現が減退した (図 9 c, d, g, h) 。FGF2 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 (図 10 c, d, g, h) 。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と歯槽骨との境界に陽性細胞の発現増強を認めた (図 11 c, d, g, h) 。

2. 高周波照射がバイオフィルムに及ぼす影響の検索

HA ディスク上のバイオフィルムを CLSM にて観察した結果, *P. gingivalis* と *P. intermedia* のバイオフィルムに対しては高周波の直接照射により抗バイオフィルム効果を示した (図 12) 。また, 直接照射群では K ファイルの挿入痕, すなわち機械的にバイオフィルムが除去されたと考えられる部分も認めた。また, bioImage_L を用いた画像解析の結果においても *P. gingivalis* と *P. intermedia* のバイオフィルムは高周波の直接照射により有意に生菌率が減少した (図 13) 。

ATP 量測定の結果より, *P. gingivalis* と *P. intermedia* は高周波の直接照射により有意に ATP 量が減少, すなわち, 生細菌数が有意に減少した (図 14) 。

以上の結果より, 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った。

3. 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 (図 15) 。

考察

根尖性歯周炎の主たる原因は根管内の細菌感染であり，感染源のコントロールが第一義である。しかし，根管はフィン，イスムス，側枝といった解剖学的に複雑な形態を有し[44]，ファイルなどの切削器具が到達不可能な部位が存在する[45]ため，感染源である細菌を完全に除去することは困難である。そのために，通常の根管治療では治癒しない，いわゆる難治性根尖性歯周炎[6, 7]に遭遇することがあり，その根絶のために，今なお様々な新規治療法や治療薬の開発研究が行われている。

高周波根尖療法は，高周波が有するとされている殺菌効果[20]および組織の再生促進作用[13-19]に着目したものである。ヒトの臨床研究においては根管治療後 1 ヶ月から根尖病変の治癒が促進されている[22, 23]が，本実験でも根尖病変の縮小率は高周波照射により根管治療後 2 週に有意に高くなり (表 2)，根管治療後 6 週以降は高周波照射により病変体積は非照射群と比較して有意に減少した (図 6) 。以前のヒトの報告においても，今回のラットにおける研究でも，根管治療後一定期間が経過した後に，治癒促進が生じる治癒傾向は一致している[22, 23]。510 kHz の高周波をラット頭蓋骨の欠損部位に照射することにより，骨の再生を促進したことや，過剰な照射により，逆に骨の形成を阻害する可能性を報告している[46]。また，本研究では，電気メスに使用されている周波数と同等の周波数である 500 KHz を用いた。文献的には，500 KHz 以上の周波数でも殺菌効果に差はないこと[20, 22]や ヒトへの臨床研究でも使用され細胞毒性がないこと[22, 23]が報告さ

れている。本研究でのラットの根管治療モデルへの高周波照射の適用回数は，富永ら[22,23]のヒトへの照射条件を参考にして設定した。ヒトでは照射時の基準が根尖病変内は 2 mm 間隔，根管内は根尖から 2 mm, 4 mm で照射しているが，ヒトとラットの体格を考慮し，ラットでは根尖病変内 3 回，根尖孔外 3 回に決定した。本研究では，すでにヒトの臨床研究で使用された治療法の評価のため，実際に行っているものと類似した照射条件のみで実験を行ったが，高周波の照射回数による効果の相違については今後検討していく必要がある。

細菌に対する高周波の効果については，既に，浮遊細菌に対して殺菌効果を示すことが報告されている[20]。高周波刺激による殺菌機序としては，熱エネルギーと電気エネルギーの可能性がある。通電することによりジュール熱が発生するため，高周波照射時には熱エネルギーが発生する。PBS 125 µl 中での高周波 1 回照射時の上昇温度は約 4.1℃であり，4 秒間インターバルをあけることにより液温は元の温度まで下降する[22]。10 回連続で照射した場合は液温が 74.5℃ に上昇するが，同程度の温度で *S. mutans* MT8148 を加熱処理した場合の殺菌効果は，高周波を照射したときよりも低いとの報告がある[22]。一方，電気エネルギーによる殺菌については，1 kV/mm 以上の電位差が微生物の両端に生じた場合，微生物の細胞膜を機械的に損傷する[47]と報告している。本研究で用いた高周波を照射した際に発生する電界は小さく，この電気エネルギーのみでの殺菌は困難であると推察される。よって，高周波照射による殺菌効果は，熱により細胞膜が一部変性し，さらに電気エネルギーを受けることにより起こっている可能性が強く，機器本来の

機能である焼灼・凝固作用と考えるのが妥当であろう。

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* で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, その他のバイオフィルムに関しては殺菌効果が認められなかった (図 12, 13, 14) 。グラム陰性菌である *P. gingivalis* と *P. intermedia* にのみ効果を認めた理由としては, 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 [48]ことが関係していると推察される。グラム陰性菌である *F. nucleatum* には効果を示さない理由としては, 他の菌と比べて *F. nucleatum* は 4 μm と菌体が大きいことや, そのために他のグラム陰性菌に比べバイオフィルムの体積も大きいことが影響している可能性がある。Yumoto ら [20]および Zhou ら [49]は, 数分間のマイクロ波照射による損傷がグラム陽性菌と比較してグラム陰性菌で大きいことを報告しており, 本研究で得られた結果と一致している。また, グラム陰性菌と比較すると, 同様に成熟したバイオフィルムではグラム陽性菌のバイオフィルムは体積が大きくバイオフィルムが厚い (データ示さず) 。特に *S. mutans* は不溶性グルカンを形成する [50]ため, バイオフィルムに通電せず高周波の影響を受けなかった可能性がある。さらに, グラム陽性菌である *Lactobacillus casei* は, 約 200 μm の深さまで HA ディスクを脱灰し, 多孔質脱灰層に侵入することにより Er : YAG レーザー照射による殺菌効果を回避する事が報告されている [29]。今回, *S. mutans* のバイオフィルムにおいて高周波照射による効果を認めなかったのは, 同様に *S. mutans* が酸を産生し脱灰した HA ディスクの多孔質脱灰

層に侵入することにより高周波照射の効果を受けなかった可能性が考えられる。

また，ラットモデルにおける根管治療時の高周波照射によっても細菌量に有意な変化は認められなかった (図 8) 。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 [24]ことが関連していると考えられる。感染根管治療により，根管表層の容易に除去可能な細菌はすでに除去されており，象牙細管内の深部に侵入している細菌のみが残存していると推察される。これらの残存細菌に対して高周波照射は影響を及ぼさないことが示唆された。

他方で，宿主に対する効果として，通常根管治療群および高周波照射群の両群で，根管治療後 2 週において炎症性サイトカインである IL-1β が根尖病変内に広範囲に発現している (図 9 a, b, e, f) が，根管治療後 3 週では一部に限局した発現へと変化した (図 9 c, d, g, h) 。このことから，感染根管治療を行うことにより，破砕した感染源が可及的に除去され創傷の治癒のメカニズムが働き，経時的に根尖病変内の炎症が抑制されたと推察される。

また, IL-1β は高周波照射により発現が減退し (図 9 c, d, g, h), TGF-β1 は高周波照射により上昇した (図 11 c, d, g, h) 。IL-1β は毛細血管の内皮細胞による細胞接着分子の発現を局所的に上昇させ，単球の局所的付着を促進し，炎症部位への遊走を促進する [51, 52]。また, IL-1β は，歯周炎および歯髄における炎症の中心的なメディエーターとして同

定されており，炎症性サイトカインとして急性期の反応熱，赤血球沈降速度の上昇を誘導することが報告されている[52-55]。この IL-1β の発現が高周波照射により抑制されたことから，高周波照射は炎症を抑制すると考えられる。

TGF-β1 は，細胞増殖，分化，修復および炎症の重要な調節因子で，修復過程に関与するサイトカインの 1 つであり，抗炎症性サイトカインに属する[56-58]。TGF-β1 は，制御性 T 細胞から産生され，炎症を抑制することが報告されており[59]，本研究においても高周波照射により制御性 T 細胞が活性化され炎症抑制に働いた可能性がある。

In vitro における細胞を用いた評価については，過去にマウスの骨芽細胞に高周波を照射することで骨芽細胞からの *TGF-β1, VEGF, FGF2* などの細胞増殖因子の遺伝子発現を誘導することを Yumoto ら[21]が報告している。本実験では，根尖病変内に存在する線維芽細胞に着目した。ラット線維芽細胞に高周波を照射した場合では，10 回照射後 5 日で細胞増殖因子である *FGF2* の発現が上昇し (図 15 a)，根尖病変部の免疫組織化学的検索の結果でも FGF2 の発現が上昇した (図 10 c, d, g, h) 。FGF2 は創傷治癒時に発現し，FGF2 が VEGF を誘導し血管新生を促進することが報告されている[59]。今回用いた線維芽細胞においても，高周波照射により *VEGF* および *FGF2* の発現が増強しており，これらの細胞増殖因子が根尖病変中の血管新生に関わり治癒促進に寄与したと考えられる。TGF-β1 については，根尖病変部の免疫組織化学的検索において，高周波照射により歯槽骨と病変の境界において発現が上昇した (図 11 c, d, g, h) が，ラット線維芽細胞に高周波を照射した場合，高周波照射による遺伝子の発現量に差は認めなかった (図 15

c) 。マウスの骨芽細胞に高周波を照射すると *TGF-β1* の遺伝子発現を誘導する[21]ことより，図 11 で示された TGF-β1 は高周波照射により線維芽細胞からではなく，骨芽細胞から発現したのではないかと推察される。

以上より，高周波根尖療法は，根尖病変内の FGF2 の発現を上昇させ, TGF-β1 の発現を誘導することにより，根尖病変の治癒を促進したと推察された。

本研究で用いた高周波根尖療法により，通常の感染根管治療では対応が困難な難治性根尖性歯周炎症例に対し，非外科的処置により治癒を促進できることが示唆された。

結論

本研究では，ラット感染根管治療モデルを用いて，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試み，以下のような知見を得た。

1. ラット感染根管治療モデルにおいて，高周波照射は根尖病変の治癒を促進させた。
2. ラット感染根管治療モデルにおいて，高周波根尖療法は根管内の残存細菌に対して殺菌効果を認めなかった。
3. 高周波は *in vitro* で実験的に作製したグラム陰性菌のバイオフィルムを抑制する傾向を示したものの，グラム陽性菌には顕著な効果は認められなかった。
4. 高周波根尖療法は，根尖病変内において, TGF-β1 および FGF2 を誘導することにより，根尖病変の治癒を促進した。

以上より，高周波根尖療法は宿主側である根尖部周囲組織に対し効果を示すことにより,根尖病変の治癒促進に寄与し，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) 林 美加子教授ならびに恵比須繁之名誉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新潟大学医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 (う蝕学分野) 野杁由一郎教授に心から感謝いたします。さらに，多大なる御指導と御協力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) の前薗葉月博士，呉本勝隆博士，および米田直道博士に深謝申し上げます。また，様々な御指導と御助言を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 歯周歯内治療学分野 湯本浩通教授，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，石本卓也博士，ならびにとみなが歯科医院 冨永敏彦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 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*. 20:340-9.

2) Ng YL, 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.* 6:129-36.

5) Sunde PT, Olsen I, Lind PO, Tronstad L. (2000): Extraradicular infection: a methodological study. *Endod Dent Traumatol.* 16:84-90.

6) 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.* 38:954-9.

7) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. (2002): Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod.* 28:679-83.

8) de Oliveira LSS, de Araújo AA, de Araújo Júnior RF, Barboza CAG, Borges BCD, da Silva JSP. (2017): Low-level laser therapy (780 nm) combined with collagen sponge scaffold promotes repair of rat cranial critical-size defects and increases TGF-β, FGF-2, OPG/RANK and osteocalcin expression. *Int J Exp Pathol.* 98:75-85.

9) Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, Krasteva-Panova AZ, Kalchinov V, Mitov I, Kamenoff J. (2016): Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *J Investig Clin Dent.* 7:254-62.

10) Markov MS, Colbert AP. (2000): Magnetic and electromagnetic field therapy. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 15:17-29.

11) Jing D, Cai J, Wu Y, Shen G, Li F, Xu Q, Xie K, Tang C, Liu J, Guo W, Wu X, Jiang M, Luo E. (2014): Pulsed electromagnetic fields partially preserve bone mass, microarchitecture, and strength by promoting bone formation in hindlimb-suspended rats. *J Bone Miner Res.* 29:2250-61.

12) Cook HH, Soni NN, Montgonery JC. (1971): The effects of pulsed, high-frequency radio waves on the rate of osteogenesis in the healing of extraction wounds in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 32:1008-16.

13) Bassett CA, Mitchell SN, Schink MM. (1982): Treatment of therapeutically resistant non-unions with bone grafts and pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am.* 64:1214-20.

14) Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M. (2008): Electrical stimulation for long-bone fracture-healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am.* 90:2322-30.

15) Nelson FR, Brighton CT, Ryaby J, Simon BJ, Nielson JH, Lorich DG, Bolander M, Seelig J. (2003): Use of physical forces in bone healing. *J Am Acad Orthop Surg.* 11:344-54.

16) Goldstein C, Sprague S, Petrisor BA. (2010): Electrical stimulation for fracture healing: current evidence. *J Orthop Trauma.* 24 Suppl 1:S62-5.

17) Fini M, Giavaresi G, Setti S, Martini L, Torricelli P, Giardino R. (2004): Current trends in the enhancement of biomaterial osteointegration: biophysical stimulation. *Int J Artif Organs*. 27:681-90.

18) Franchi M, Orsini E, Trire A, Quaranta M, Martini D, Piccari GG, Ruggeri A, Ottani V. (2004): Osteogenesis and morphology of the peri-implant bone facing dental implants. *ScientificWorldJournal*. 4:1083-95.

19) Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, De Pasquale V, Martini D, Fini M, Giardino R, Ruggeri A. (2007): Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *J Periodontol.* 78:879-88.

20) Yumoto H, Tominaga T, Hirao K, Kimura T, Takahashi K, Sumitomo T, Bando N, Matsuo T. (2012): Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation. *J Appl Microbiol.* 113:181-91.

21) Yumoto H, Hirao K, Tominaga T, Bando N, Takahashi K, Matsuo T. (2015): Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factors via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways. *Cell Physiol Biochem.* 35:601-15.

22) 富永俊彦. (2011):電磁波の歯内療法への応用 – EMAT (Electro-Magnetic Apical Treatment –. *四国歯誌*. 24:1-31.

23) 富永俊彦, 北池光希, 多田瑛一郎, 高比良一輝, 坂東直樹, 平尾早希, 林邦彦, 横山昌憲, 吉永仁. (2017):電磁波刺激を応用した根尖性歯周炎への対応. *日歯内療誌*. 38:36-47.

24) Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, Nakano T, Ebisu S, Hayashi M. (2017): Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep.* 7:3315.

25) 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.* 83:683-7.

26) 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.* 80:3804-10.

27) Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scuppa P, Pasqualini L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Bandi C, Sacchi L, Daffonchio D. (2007): Bacteria of the

genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:9047-51.

28) 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.* 71:8738-43.

29) Noiri Y, Katsumoto T, Azakami H, Ebisu S. (2008): Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens *in vitro*. *J Endod.* 34:826-9.

30) Ozaki K, Matsuo T, Nakae H, Noiri Y, Yoshiyama M, Ebisu S. (1994): A quantitative comparison of selected bacteria in human carious dentine by microscopic counts. *Caries Res.* 28:137-45.

31) Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, Sakata T, Ebisu S, Hayashi M. (2015): Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express.* 5:6.

32) Cruz Olivo EA, Santos D, de Lima ME, Dos Santos VL, Sinisterra RD, Cortés ME. (2017): Antibacterial effect of synthetic peptide LyeTxI and LyeTxI/β-Cyclodextrin association compound against planktonic and multispecies biofilms of periodontal pathogens. *J Periodontol.* 88:e88-e96.

33) Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M. (2015):

Inhibition of polysaccharide synthesis by the sinR orthologue PGN_0088 is indirectly associated with the penetration of *Porphyromonas gingivalis* biofilms by macrolide antibiotics. *Microbiology*. 161:422-9.

34) Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama K. (2010): A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. *Infect Immun.* 78:3801-12.

35) Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. (2003): Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol.*74:1647-51.

36) Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Gotoh K, Miura J, Machi H, Iida T, Ebisu S. (2016): Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an in situ model of dental biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2:16018.

37) Chávez de Paz LE. (2009): Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 75:1734-9.

38) Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. (2013): Ex vivo killing of *Enterococcus*

faecalis and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *Int Endod J.* 46:649-59.

39) Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. (2013): Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*. 39:346-50.

40) 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*. 55:5887-92.

41) Li J, Simeoni E, Fleury S, Dudler J, Fiorini E, Kappenberger L, von Segesser LK, Vassalli G. (2006): Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 29:779-83.

42) Mehrabani M, Najafi M, Kamarul T, Mansouri K, Iranpour M, Nematollahi MH, Ghazi-Khansari M, Sharifi AM. (2015): Deferoxamine preconditioning to restore impaired HIF-1α-mediated angiogenic mechanisms in adipose-derived stem cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. *Cell Prolif*. 48:532-49.

43) Ikeda S, Itoh S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M. (2016): Developmental Stage-Dependent Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Adipocyte Differentiation of Murine Bone Marrow Stromal Cells. *Cell Biochem Biophys.* 74:11-7.

44) Walker RT. (1988): Root form and canal anatomy of mandibular second molars in a southern

Chinese population. *J Endod.* 14:325-9.

45) Solomonov M, Paqué F, Fan B, Eilat Y, Berman LH. (2012): The challenge of C-shaped canal systems: a comparative study of the self-adjusting file and ProTaper. *J Endod.*38:209-14.

46) Sato T, Sugaya T, Kudo M, Nakatani M, Maeda M, Kawanami M, Tominaga T. (2016): High-frequency electromagnetic wave stimulation on bone repair in rat calvaria defects. *J Oral Tissue Engin.* 14:59-64.

47) Coster HG, Simmermann U. (1975): The mechanism of electrical breakdown in the membranes of Valonai utricularis. *J Membr Biol.* 22:73-90.

48) Bisset KA, Vickerstaff J. (1967): Significance of the characteristic chemical pattern of Gram positive and Gram negative bacterial cell walls. *Nature.* 215:1286-7.

49) Zhou BW, Shin SG, Hwang K, Ahn JH, Hwang S. (2010): Effect of microwave irradiation oncellular disintegration of Gram positive and negative cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87:765-70.

50) Hamada S, Torii M. (1980): Interaction of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* with various glucans. *J Gen Microbiol.* 116:51-9.

51) Martin MU, Wesche H. (2002): Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*. 1592:265-80.

52) Dinarello CA. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87:2095-147.

53) Stashenko P, Teles R, D'Souza R. (1998): Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:498-521.

54) Metzger Z. (2000): Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 16:1-8.

55) Miller GA, DeMayo T, Hutter JW. (1996): Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. *J Endod.* 22:346-51.

56) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 359:693-9.

57) Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. (2000): Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. O*ral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 90:514-7.

58) Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM. (2010): Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 39:250-6.

59) Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. (2014): TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 10:543-51.

60) Su N, Jin M, Chen L. (2014): Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res.* 2:14003.

表 1. 使用ラットと評価方法

No	右	左	
1	通常根管治療群	対照群	マイクロCT撮影
2	高周波照射群		
3	通常根管治療群	対照群	
4	高周波照射群		
5	通常根管治療群	対照群	
6	高周波照射群		
7	通常根管治療群	対照群	
8	高周波照射群		
9	通常根管治療群	対照群	
10	高周波照射群		
11	通常根管治療群	対照群	細菌学的評価
12	高周波照射群		
13	通常根管治療群	対照群	
14	高周波照射群		
15	通常根管治療群	対照群	
16	通常根管治療群		
17	高周波照射群	対照群	
18	通常根管治療群		
19	高周波照射群	対照群	
20	通常根管治療群		免疫組織化学的検索
21	高周波照射群	対照群	
22	通常根管治療群		
23	高周波照射群	対照群	
24	通常根管治療群		
25	高周波照射群	対照群	
26	通常根管治療群		
27	高周波照射群	対照群	
28	通常根管治療群		
29	高周波照射群	対照群	
30	通常根管治療群		
31	高周波照射群	対照群	
32	通常根管治療群		

表 2. ラット根尖病変体積の縮小率

	0w−1w	1w−2w	2w−3w	3w−4w	4w−6w	6w−8w
高周波照射群	0.14±0.14	0.39±0.25	0.18±0.07＊	0.06±0.03	0.10±0.10	0.02±0.06
通常根管治療群	0.15±0.16	0.31±0.24	0.09±0.04	0.07±0.04	0.10±0.07	0.05±0.05

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 (Student's *t*-test ＊$p<0.05$) 。

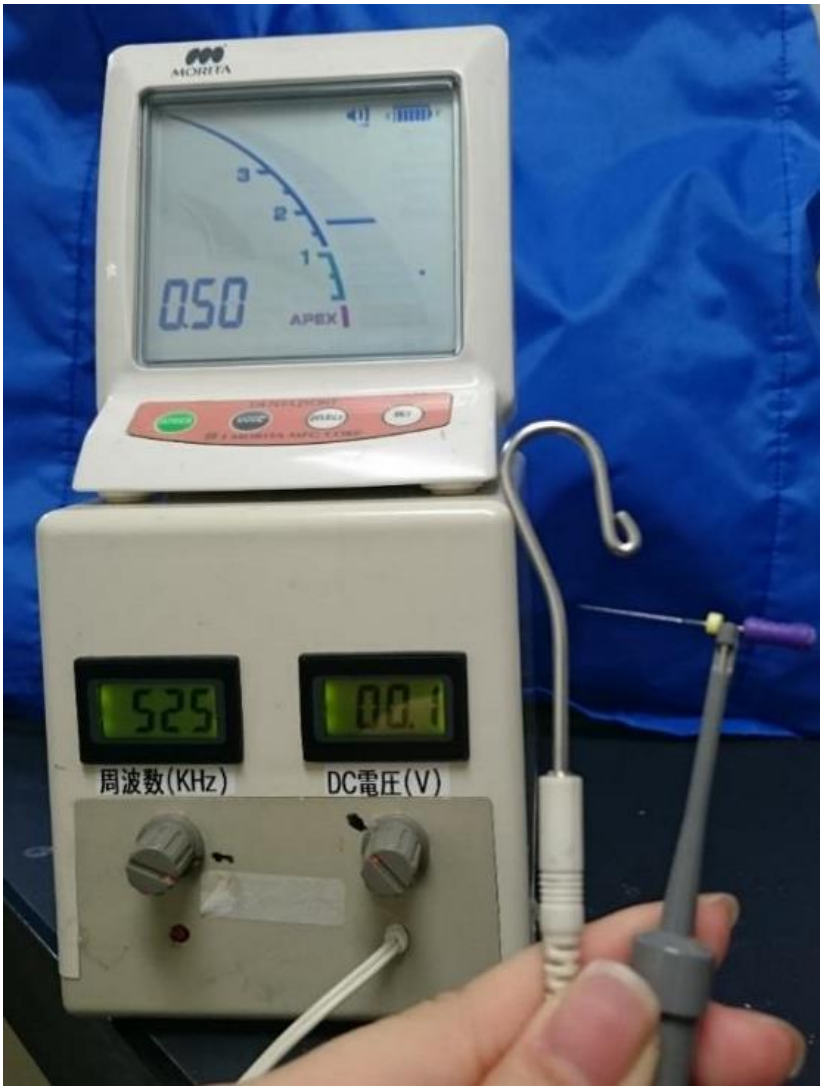

図 1. 高周波治療器

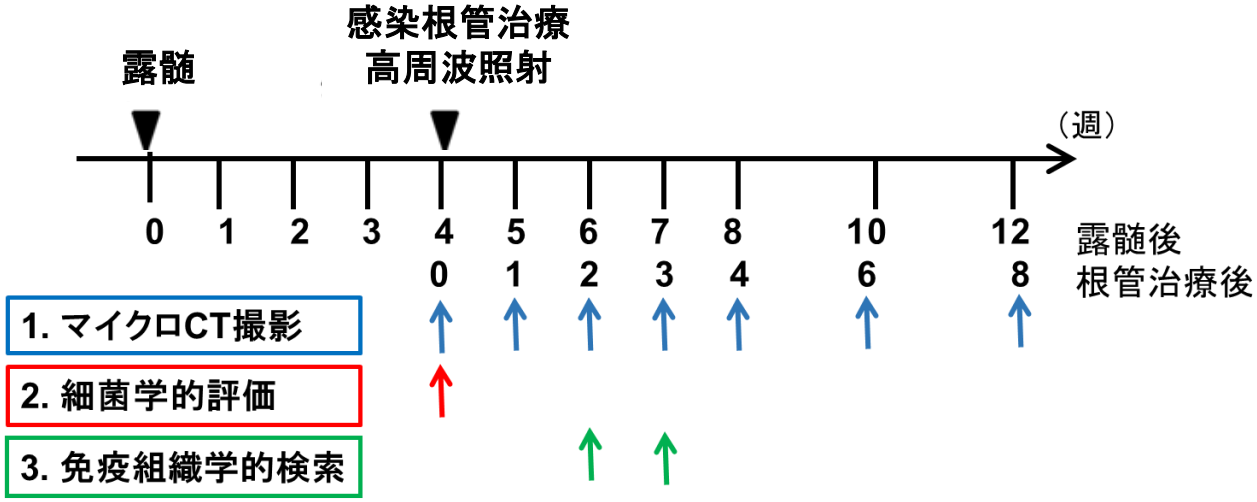

図 2. ラット感染根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の実験スケジュール

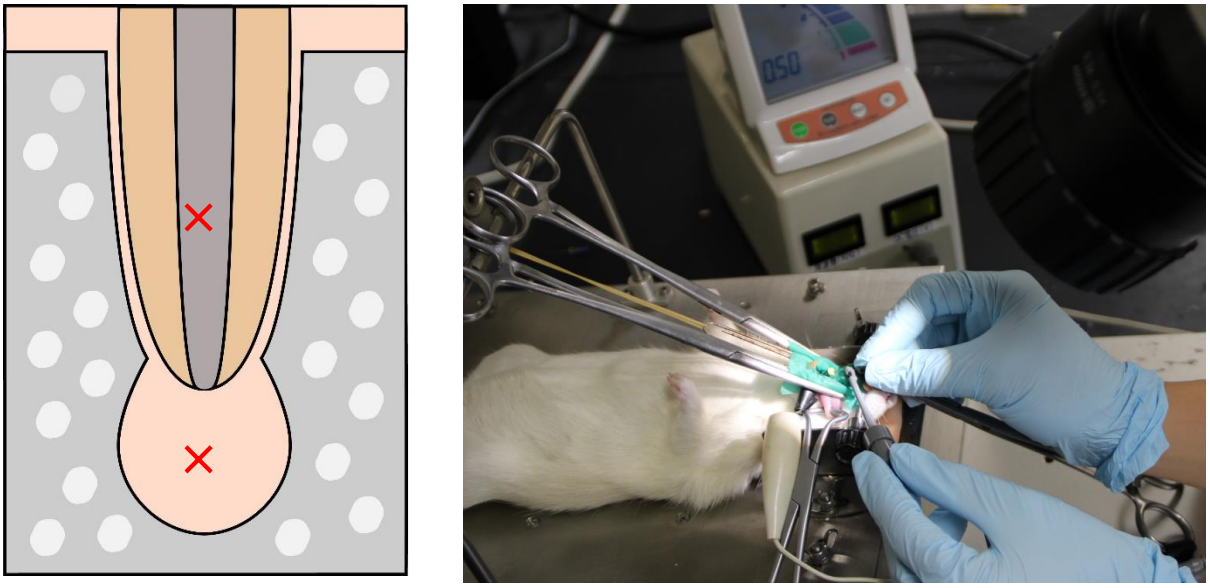

図 3. ラット感染根管治療モデルにおける高周波照射点と照射方法

×印; 高周波照射点

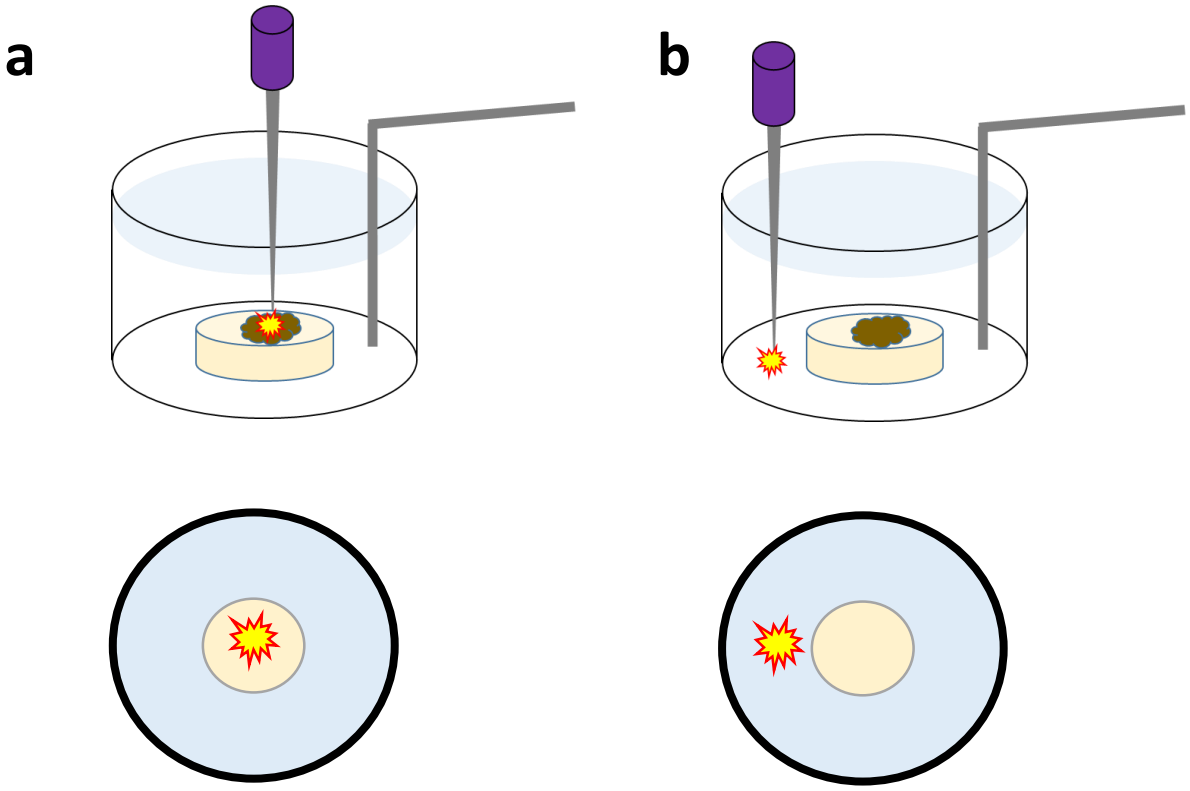

図 4. バイオフィルムへの照射方法
生理食塩水 2 ml中に浸漬し能動電極であるステンレススチール製 K ファイル #10は，直接照射群では HA ディスク中央に挿入し，間接照射群では中央においたディスクを対極と能動電極で挟むよう，またディスクとは接触しないように生理食塩水中に挿入し，各々 15 回ずつ高周波を照射した。
a: 直接照射群
b: 間接照射群

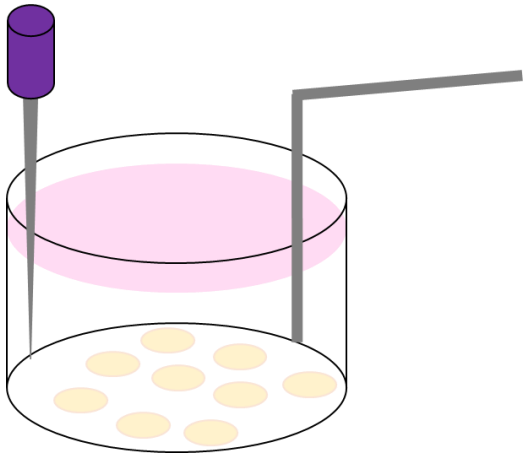

図 5. ラット繊維芽細胞への照射方法
培地 500 ml 中に底面から 1 ㎜ まで能動電極としてはステンレススチール製 K ファイル #10 を，対極としてはステンレススチール製のプローベ形状の電極を挿入し，0, 5, 10 回高周波を照射した。

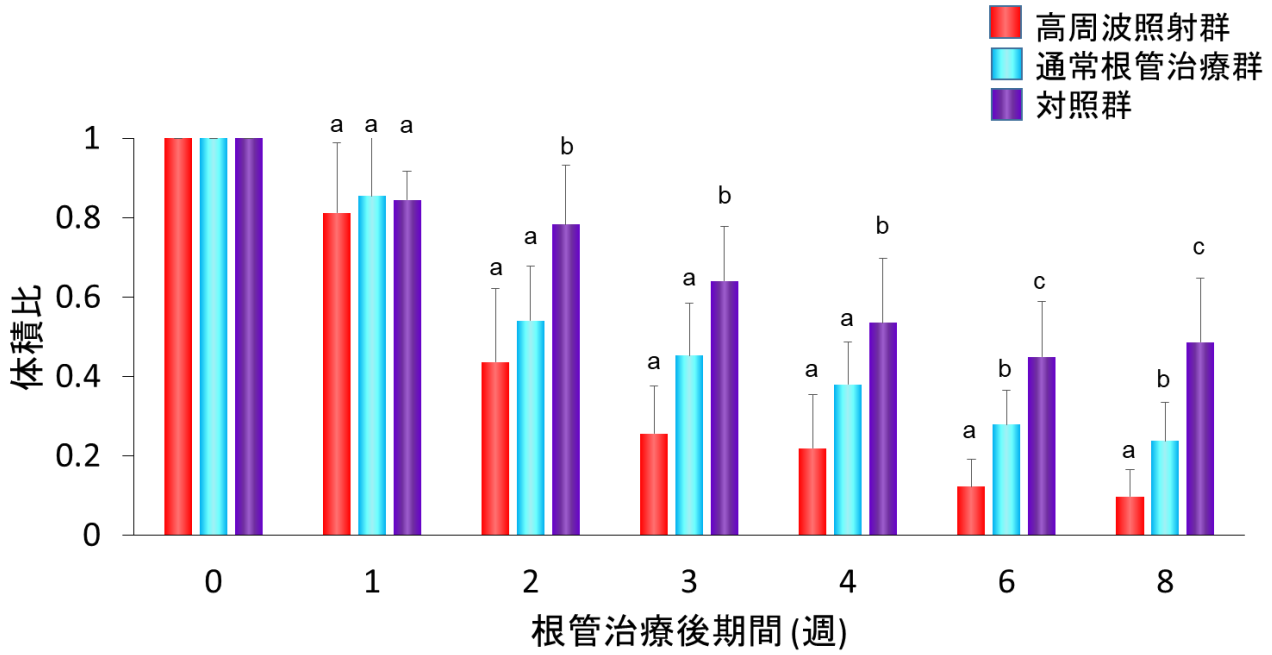

図 6. ラット第一臼歯近心根病変の体積変化

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 (各n=5) 。グラフは根管治療後 0 週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。対照群と比較して高周波照射群と通常根管治療群では根管治療後2週以降, 病変体積が有意に縮小した。また, 根管治療後 6 週以降は高周波照射により病変体積は有意に縮小した。
同一週の群において異なる文字間に有意差を認める (Tamhane test, $p<0.05$) 。

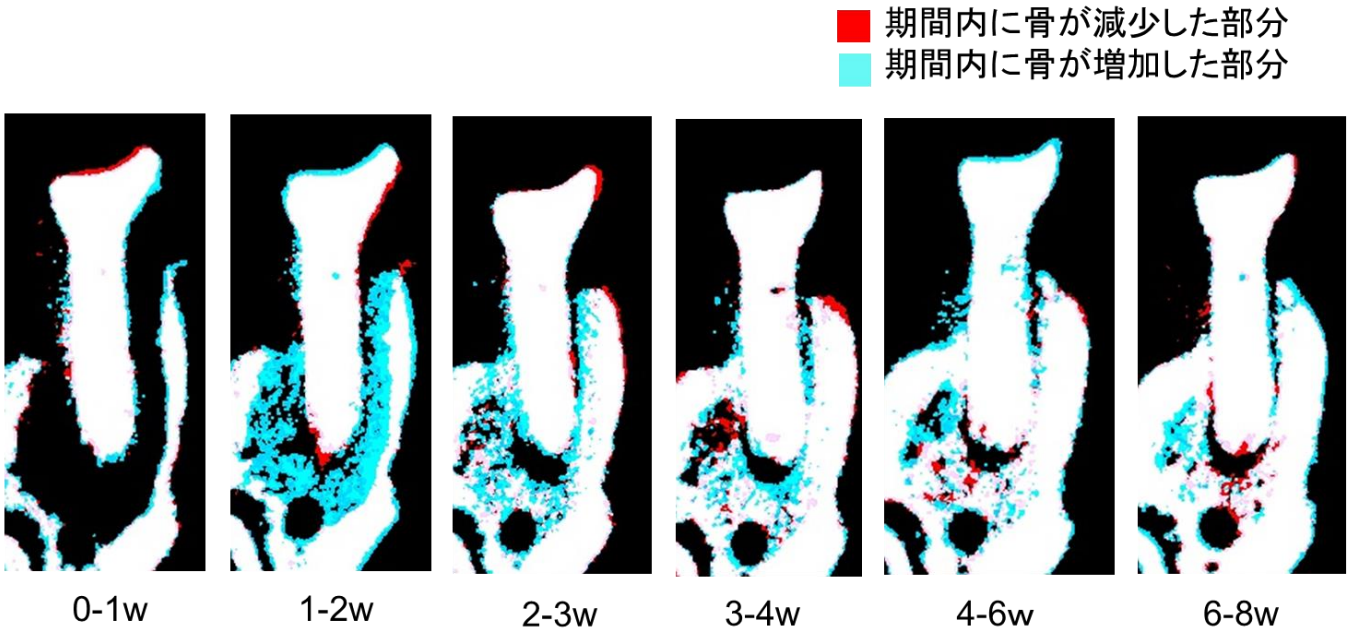

図 7. 高周波照射群の根尖病変の治癒経過

マイクロ CT で撮影した各タイムポイントでの画像データを重ね合わせることで, 根管治療後の各期間別に治癒した部分を水色で 示した。

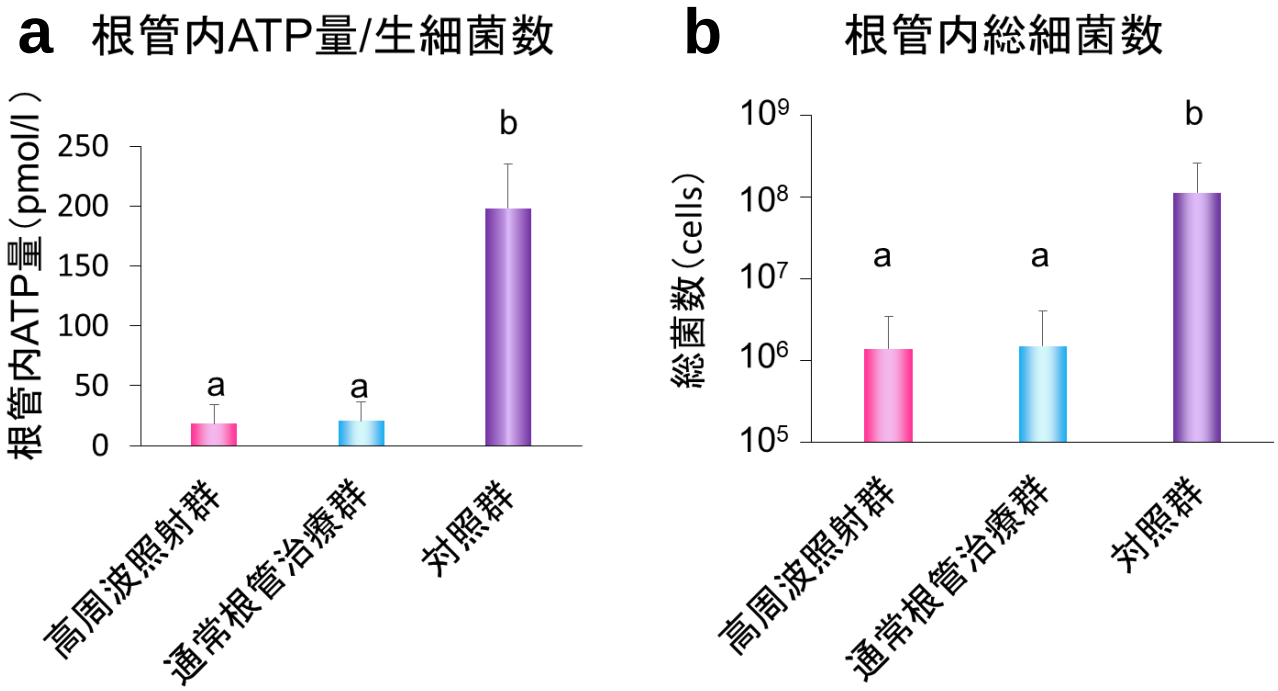

図 8. ラット感染根管治療モデルにおける第一臼歯近心根の細菌学的評価

a: 感染根管治療直後の根管内ATP量 (生細菌数)
b: 感染根管治療直後の根管内総細菌数

露髄後 4 週に感染根管治療および高周波照射直後の根管内総細菌数と根管内ATP量, s すなわち根管内の生菌数を定量解析した。対照群としては，左側第一臼歯を用いた (各 n=5)。また、グラフはその平均値と標準偏差を示す。治療群の根管内細菌量は対照群に比べて有意に減少していたが, 高周波照射による差は認めなかった。
同一グラフ内の異なる文字間に有意差を認める (Steel-Dwass test, $p<0.05$) 。

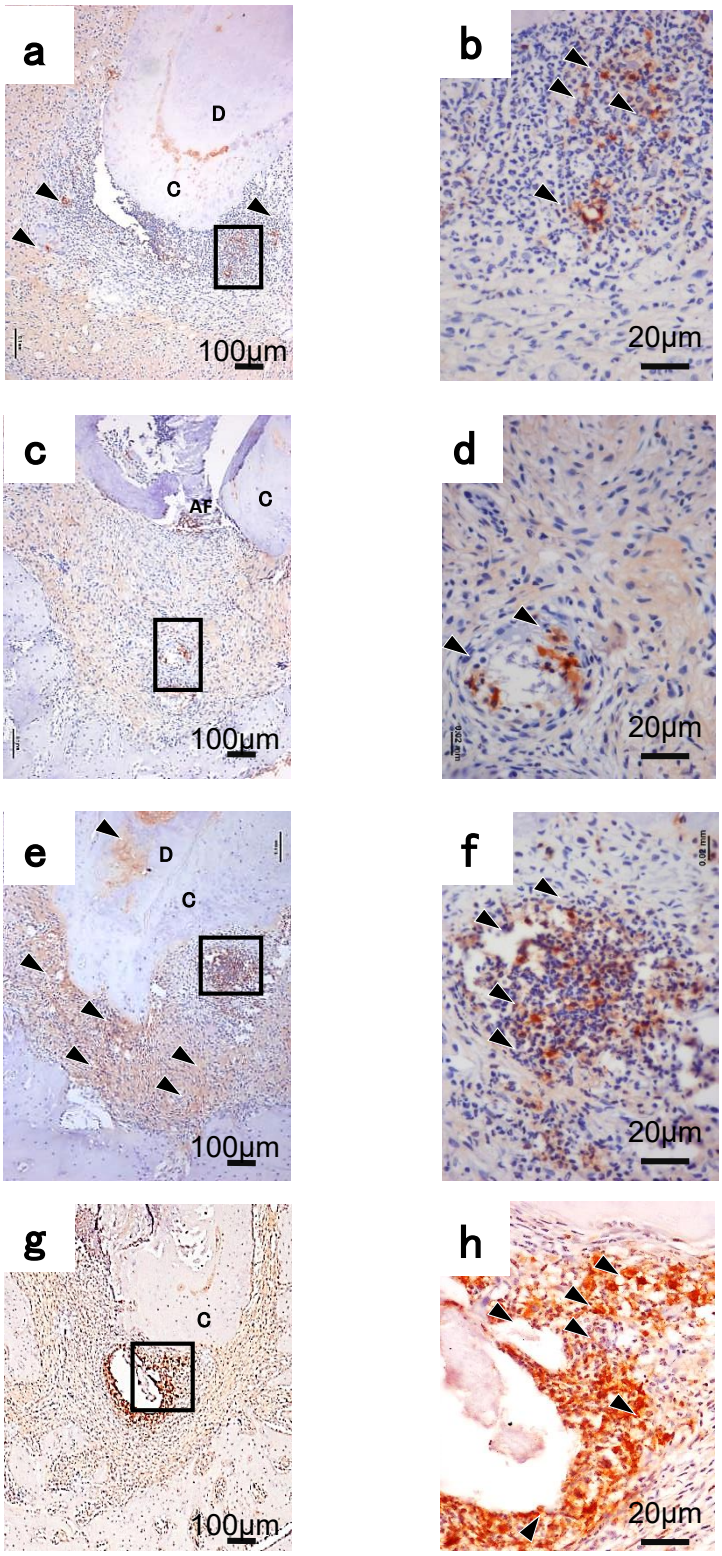

図 9. IL-1β に対する近心根根尖部の免疫組織化学的検索

a: 根管治療後 2 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
b: aの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
c: 根管治療後 3 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
d: cの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
e: 根管治療後 2 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
f: eの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
g: 根管治療後 3 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
h: gの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)

(AF: 根尖孔, C: セメント質, D: 象牙質, 矢尻: IL-1β 陽性細胞)

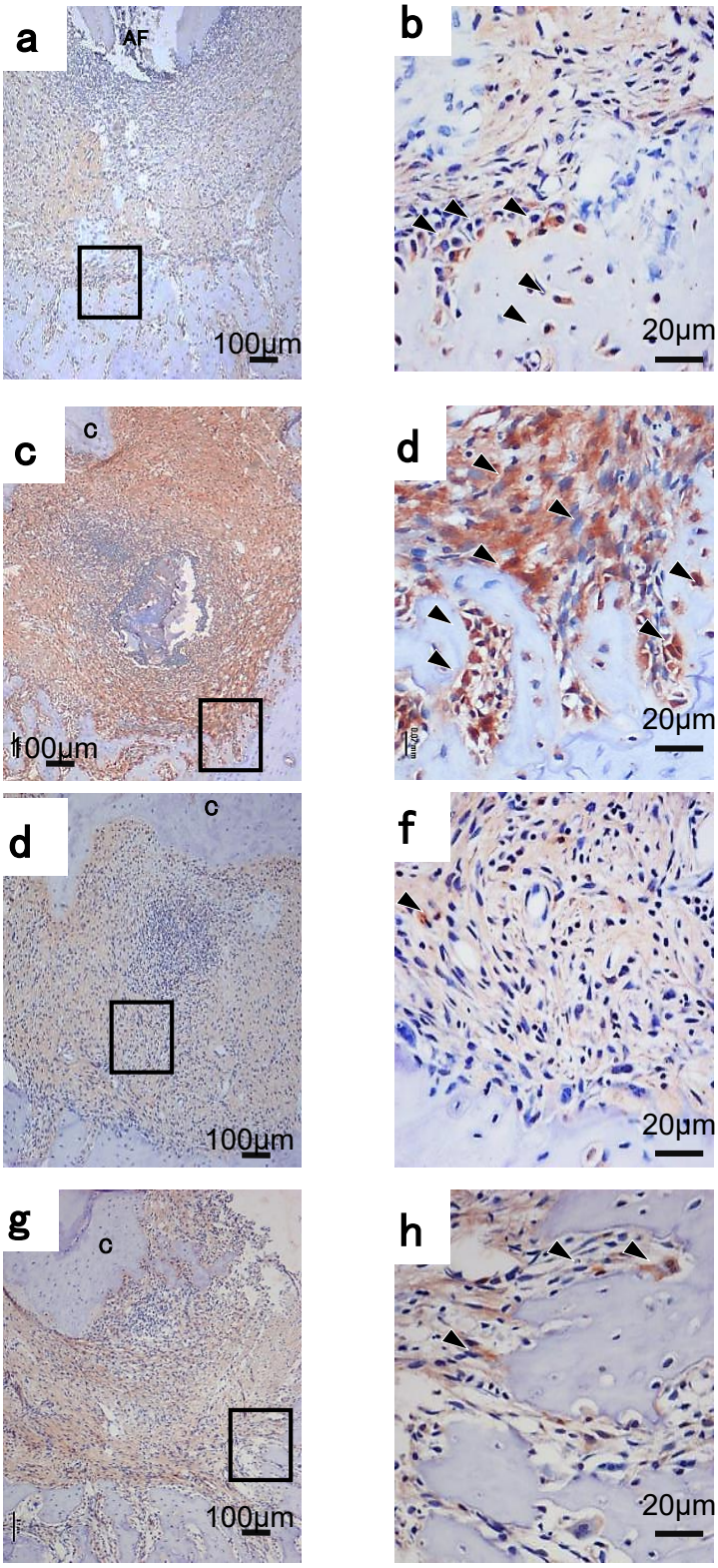

図 10. FGF2 に対する近心根根尖部の免疫組織化学的検索

a: 根管治療後 2 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
b: aの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
c: 根管治療後 3 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
d: cの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
e: 根管治療後 2 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
f: eの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
g: 根管治療後 3 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
h: gの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)

(AF: 根尖孔, C: セメント質, 矢尻: FGF2 陽性細胞)

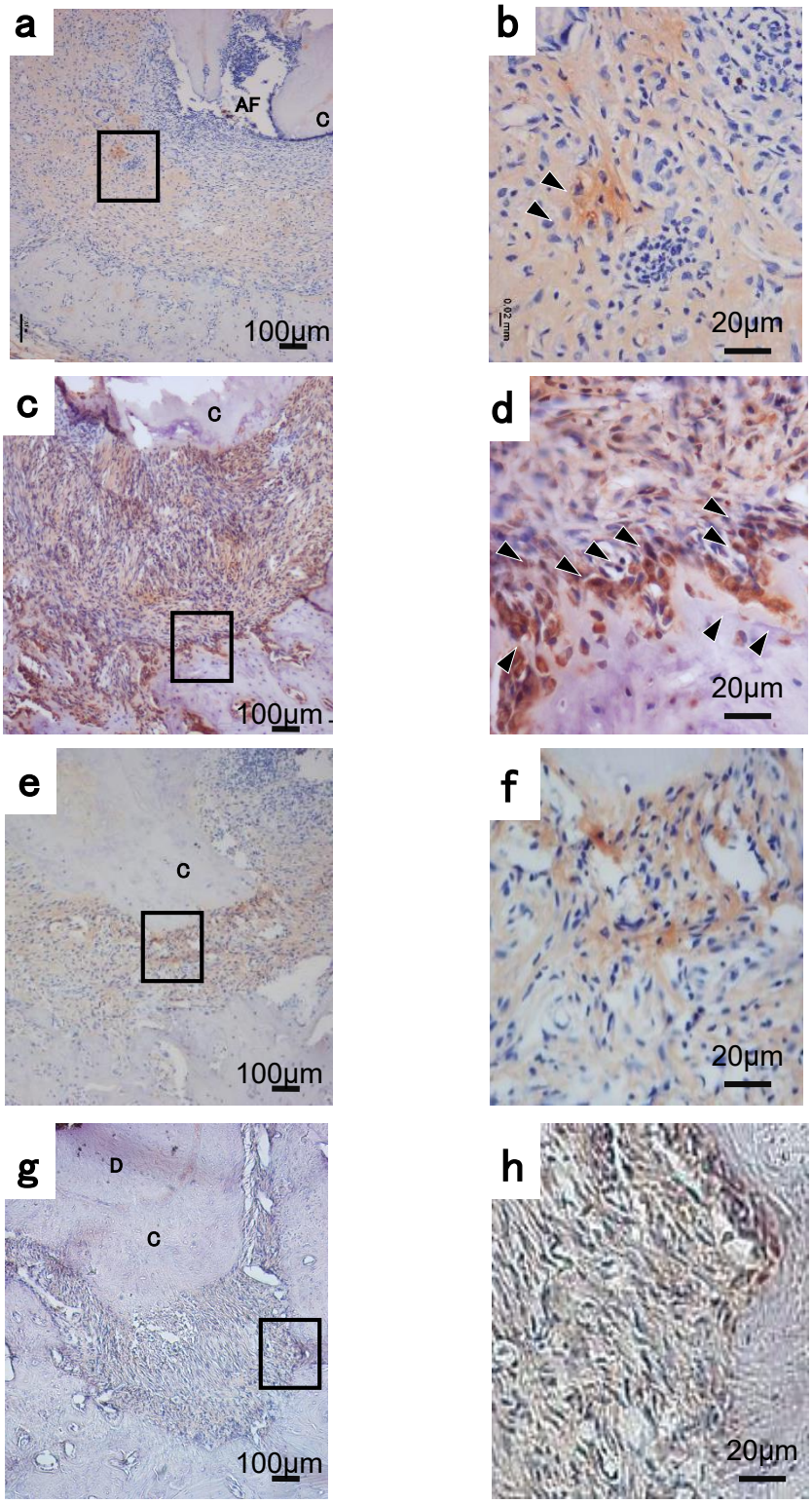

図 11. TGF−β1に対する近心根根尖部の免疫組織化学的検索

a: 根管治療後 2 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
b: aの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
c: 根管治療後 3 週の高周波照射群の染色像(観察倍率:×40)
d: cの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
e: 根管治療後 2 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
f: eの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)
g: 根管治療後 3 週の通常根管治療群の染色像(観察倍率:×40)
h: gの実線で囲まれた領域の拡大像(観察倍率:×200)

(AF: 根尖孔, C: セメント質, D: 象牙質, 矢尻: TGF−β1陽性細胞)

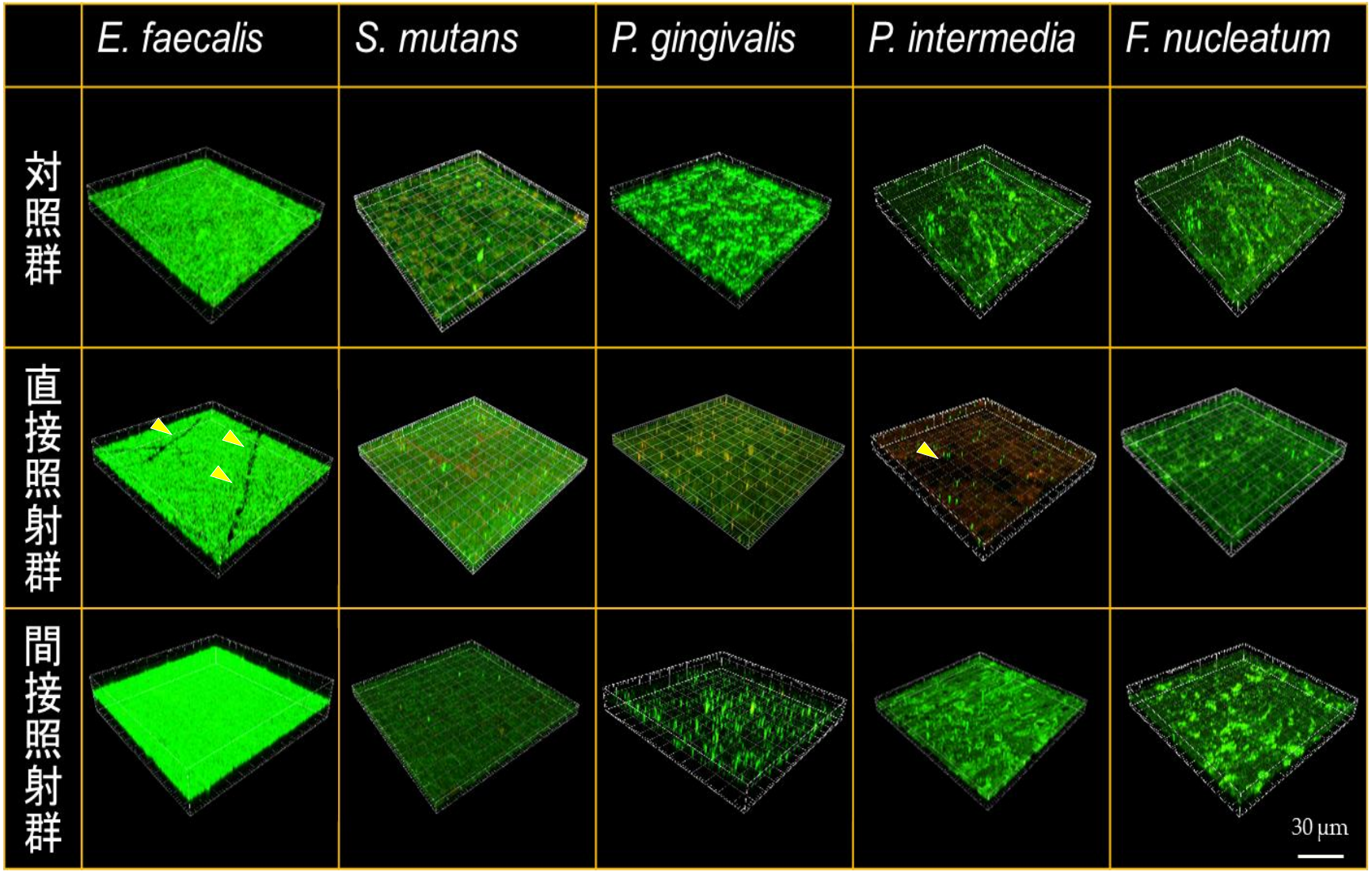

図 12. CLSMを用いたバイオフィルムの3次元的構造の観察
緑: 生菌, 赤: 死菌, 観察倍率: ×100
矢尻: ファイル挿入痕

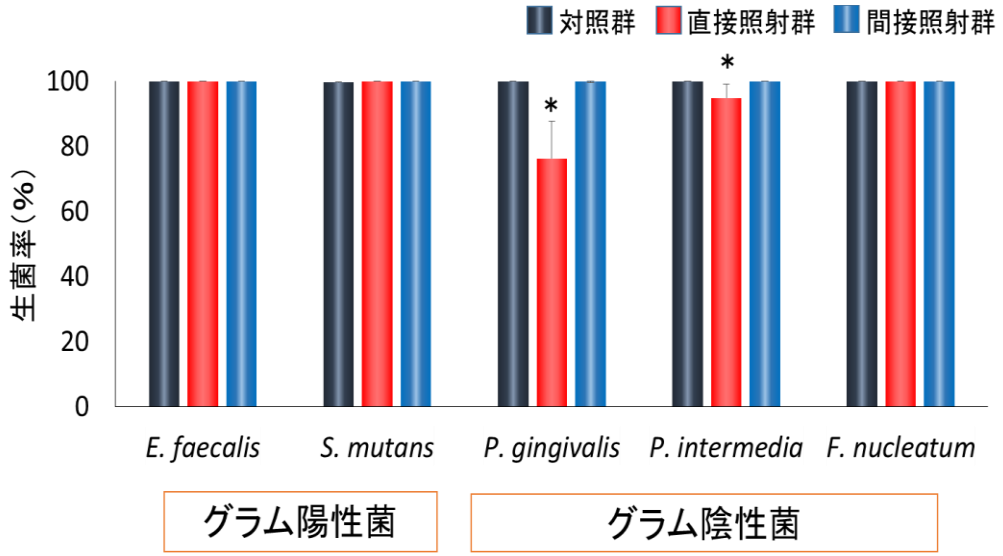

図 13. CLSMの画像解析により得られた各種バイオフィルムの生菌率

CLSMで得た画像から画像解析ソフトウェアを使用し生細菌率を算出した。
グラフはHAディスク上の各種バイオフィルムの生細菌率の平均値と標準偏差を示す (One-way ANOVA および Tukey's test, ＊p<0.05) 。

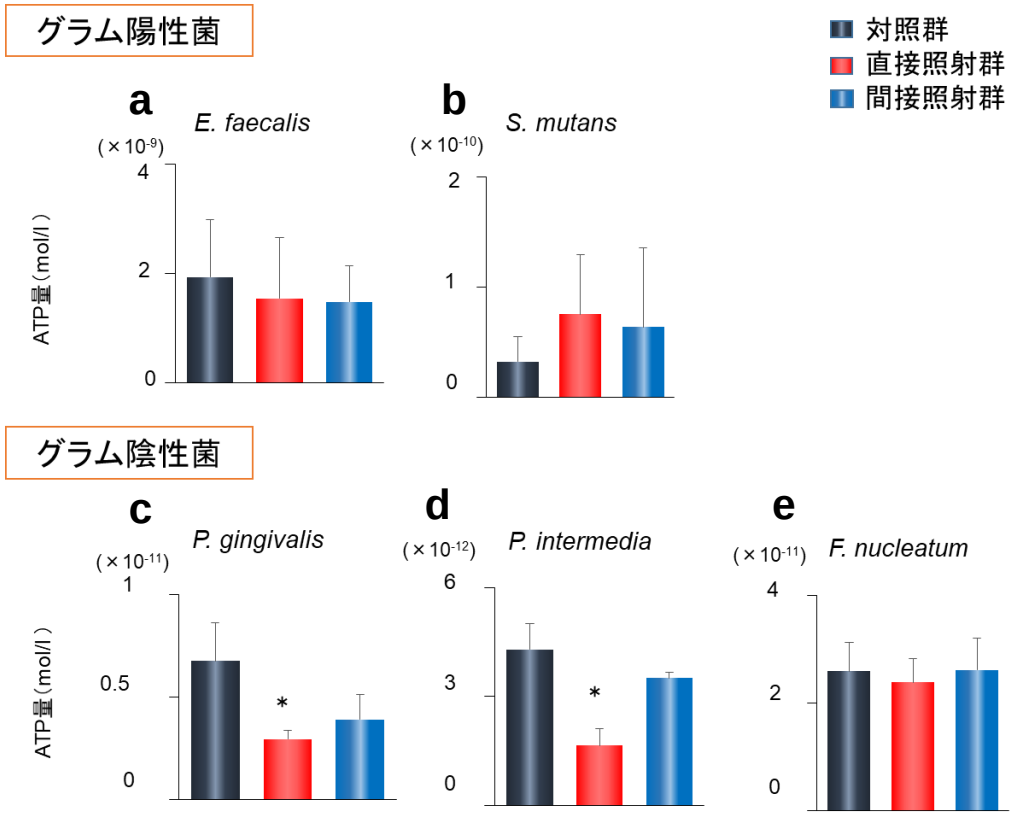

図 14. 高周波照射後のバイオフィルムの ATP 量測定による生菌数定量

高周波照射が各種細菌のバイオフィルムに及ぼす影響をバイオフィルムの ATP 量測定により生細菌数を算出し評価した。グラフは各種細菌が HA ディスク上に形成したバイオフィルムの ATP 量の平均値と標準偏差を示す (One-way ANOVA および Tukey's test, ＊p<0.05) 。

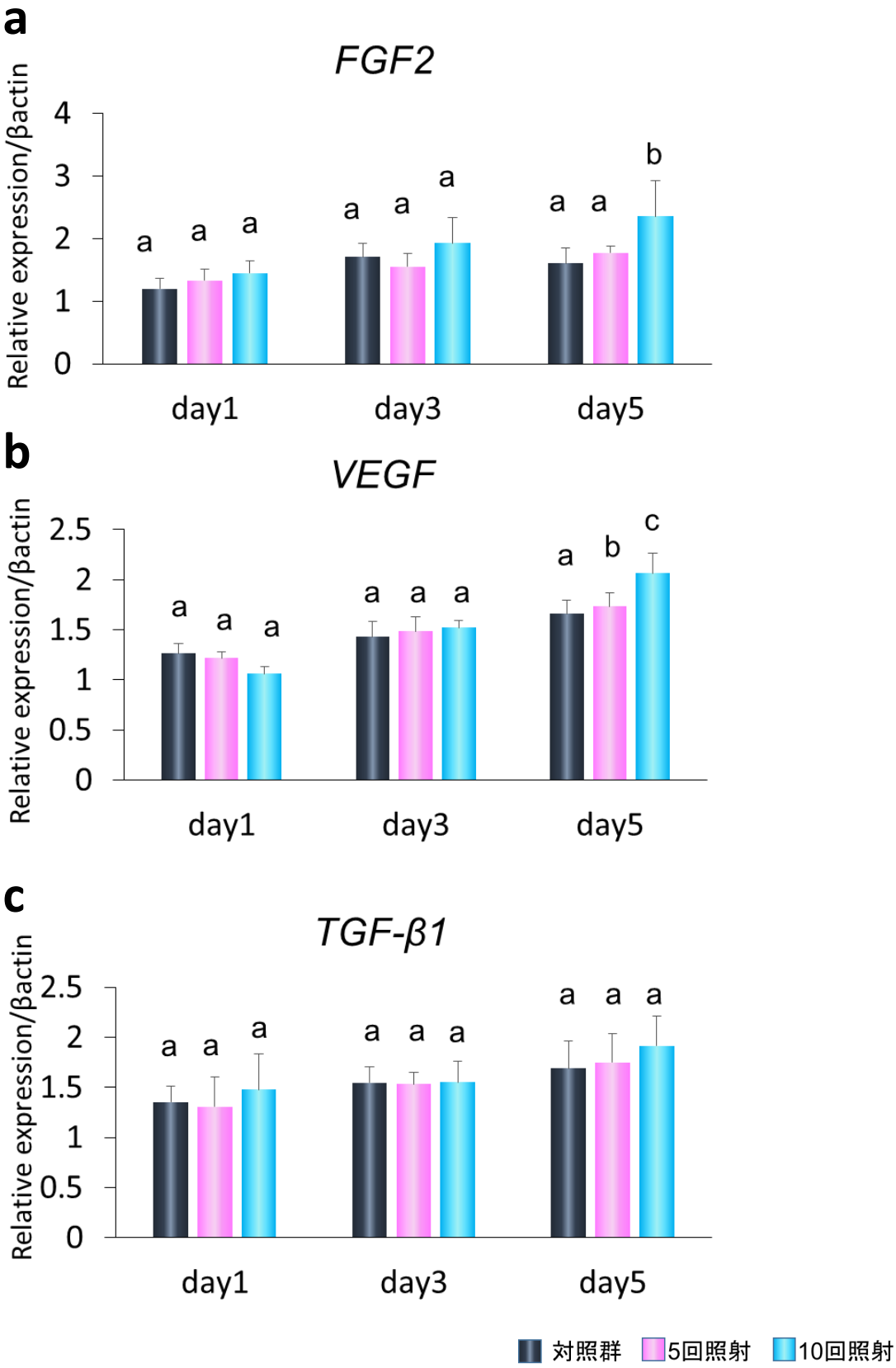

図 15. ラット線維芽細胞における細胞増殖因子発現量の経時的変化

ラット線維芽細胞における (a) *FGF2*, (b) *VEGF*, (c) *TGF-β1* の発現量を β −actin 遺伝子の発現量との比較で, 相対的定量化により算出した平均値と標準偏差を示す。同一グラフ内の異なる文字間に有意差を認める (Two-way ANOVA および Tukey's test, $p<0.05$) 。