



Title	超高磁場 MRI を用いたう蝕の進行に伴う可逆性・不可逆性歯髄炎の新規診断法の基盤の確立
Author(s)	森山, 輝一
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/95998
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学 位 論 文

超高磁場 MRI を用いた
う蝕の進行に伴う可逆性・不可逆性歯髄炎の
新規診断法の基盤の確立

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

歯科保存学講座

(指導教員：林 美加子教授)

森山 輝一

本論文の要旨の一部は，日本歯科保存学会 2022 年度秋季学術大会（第 157 回）（2022 年 11 月，岡山），第 71 回 Japanese Division, International Association for Dental Research（JADR）総会・学術大会（2023 年 11 月，仙台），102nd General Session & Exhibition of the IADR（2024 年 3 月，ニューオーリンズ，LA，米国）において発表した。

目次

I. 緒言.....	1
II. MR 画像を用いたラット歯髄組織の定量評価のための 内在性コントロールの確立	
1. 材料および方法.....	7
1) MRI による T2 強調画像, T2 map 画像の撮影	
2) 統計学的解析	
2. 結果.....	9
III. MRI を用いたう蝕由来歯髄炎の経時的観察	
1. 材料および方法.....	10
1) う蝕由来歯髄炎の誘発	
2) マイクロ Computed Tomography (CT) 画像の撮影	
3) MRI による T2 強調画像の撮影	
4) 統計学的解析	
2. 結果.....	13

IV. う蝕の各進行段階における歯髄の病理組織学的評価

1. 材料および方法.....	16
1) う蝕由来歯髄炎の誘発	
2) MRI による T2 強調画像の撮影	
3) マイクロ CT 画像の撮影	
4) 病理組織学的評価	
2. 結果.....	19

V. 断髄による不可逆性歯髄炎領域の特定

1. 材料および方法.....	22
1) 断髄使用材料におけるアーチファクト検証	
2) う蝕由来歯髄炎の誘発	
3) 術前におけるマイクロ CT 画像の撮影	
4) 術前における T2 強調画像の撮影	
5) 断髄実験	
6) 術後における T2 強調画像の撮影	
7) 術後におけるマイクロ CT 画像の撮影	
8) 病理組織学的観察	

2. 結果.....	26
VI. 考察.....	28
VII. 結論.....	44
VIII. 謝辞.....	45
IX. 参考文献.....	46
X. 図表.....	54

I. 緒言

歯科臨床において、う蝕や継発する歯髄炎および根尖性歯周炎は現在でも世界中で蔓延している疾患であり、未だに解決できていない感染症のひとつである(Listl et al. 2015; WHO 2022)。深在性う蝕が存在し、臨床的な診査および検査にて、不可逆性歯髄炎と診断された場合、一般的には抜髄法が適応となる。しかし、歯髄を全て除去することにより、う蝕などの外来刺激に対する防御反応となり得る歯髄の機能を喪失し、さらには根尖性歯周炎や歯根破折の発生リスクが増加し、最終的には歯の喪失に繋がると報告されている(Axelsson et al. 2004; Kawahara et al. 2020)。また残存歯数が健康寿命に深く関与していることが示されており(Matsuyama et al. 2017)、歯の喪失により脳血管障害(Cheng et al. 2018)、心血管障害(Cheng et al. 2018; Peng et al. 2019)、骨折(Wakai et al. 2013)および認知症(Fang et al. 2018; Oh et al. 2018)への罹患リスクが上がることが報告されるようになった。したがって、様々な全身疾患への罹患のリスクを低減させ、健康寿命の延伸のためには、歯の保存、ひいては歯髄の保存が重要である。

このような背景から、近年、歯髄保存の重要性がこれまで以上に認識されており(ESE 2019; AAE 2021)、健全歯髄組織の温存を目的とした歯髄保存療法のひとつである生活歯髄切断法(断髄)が注目されている(Cushley et al. 2019;

Donnelly et al. 2022; Duncan 2022; Philip and Suneja 2022) . 断髄は、不可逆性炎症に陥った歯髄組織のみを選択的に取り除く治療法であり (Cvek 1978) , 主に乳歯を対象におこなわれる治療法であったが、近年では不可逆性歯髄炎と診断された永久歯にも、断髄をおこなうことにより、歯髄保存に成功した症例が多く報告されている (Ng et al. 2007; Asgary et al. 2014; Linsuwanont et al. 2017; Taha and Khazali 2017; Asgary et al. 2018; Cushley et al. 2019; Uesrichai et al. 2019; Ather et al. 2022) . これには、拡大視野下での処置を可能にする歯科用マイクロスコープの普及や、Mineral Trioxide Aggregate (MTA) をはじめとするケイ酸カルシウムセメントに代表される、従来の水酸化カルシウム製剤よりも良好な封鎖性、抗菌性、および生体親和性を併せ持つ優れた歯科材料の開発・発展 (Parirokh and Torabinejad 2010; Torabinejad and Parirokh 2010; Hosoya et al. 2019) が大きく寄与していると考えられる。断髄は直接覆髄と比較して、う蝕感染象牙質や不可逆性炎症に陥った歯髄組織をより積極的かつ確実に除去することや (Fuks et al. 1982) , ケイ酸カルシウムセメントなどの材料をより緊密に充填可能なため、術後の漏洩防止が期待できる (Hecova et al. 2010) , といった利点がある (Donnelly et al. 2022) .

断髄をおこなう際には、傷害を受けている歯髄組織のなかで不可逆性炎症に陥っている範囲を正確に把握し、完全に除去する必要がある (Ricucci et al.

2019) . しかし、現在の歯髄診査法である電気歯髄診や冷温刺激診などといった感受性試験では、術前に歯髄の炎症状態を正確に把握することは困難であり (AAE 2021) , 患者の痛みという主観的評価に依存したこれらの診査結果は、実際の歯髄の病理組織学的評価との相関が低いと言われている (Mejère et al. 2012) . 現状では、断髄時に必須の不可逆性もしくは可逆性炎症に陥っている領域の鑑別を術者の経験に頼らざる得ないことが、歯内療法の中なかでも断髄が専門性と難易度の高い処置と認識される大きな要因となっている (Edwards et al. 2021) .

これらの問題は、可逆性および不可逆性歯髄炎の病態解明が依然として不十分であることに起因している (ESE 2019) . 依然として困難な歯髄診断が、術前もしくは術中に実施可能となれば、断髄をはじめとする歯髄保存療法の高い成功率が達成され、さらなる普及が期待できる . そのため、これまでの感受性試験に代わる、より正確かつ客観的な歯髄診査法の開発が急務である .

これまでに報告されている客観的な歯髄診査法として、歯髄組織の血流や血中の酸素飽和度に着目したレーザードップラー流量計 (Miron et al. 2020) やパルスオキシメーター (Gopikrishna et al. 2007) などがある . これらは、電気歯髄診などの感受性試験と比較して、高い感度および特異度を示しており (Evans et al. 1999; Gopikrishna et al. 2007; Chen and Abbott 2011; Karayilmaz and Kirzioğlu 2011) ,

より優れた診査法になり得ると期待されていたが、厳密に標準化された診査環境が必要であることから、現時点においては臨床応用に至っていない (Schmitt et al. 1991; Schnettler and Wallace 1991; Kahan 1996; Leahy et al. 1999; Polat et al. 2004; Mejàre et al. 2012; Levin 2013; Alghaithy and Qualtrough 2017) .

一方、軟組織の画像診断技術として実用化され臨床応用されている Magnetic Resonance Imaging (MRI) は医科・歯科領域で広く普及しており (Bartusik-Aebischer et al. 2022; Flugge et al. 2023) , MRI を用いることで歯髓の生死の判定が可能であるとの報告がある (Gahleitner et al. 1999; Idiyatullin et al. 2011; Assaf et al. 2014; Assaf et al. 2015; Flügge et al. 2016; Cankar et al. 2020; Juerchott et al. 2022) .

しかしこれらの報告は、ヒトの歯髓を対象とした、臨床症例の撮像を中心としたものであり、ラット等の実験動物を用いて、歯髓炎について再現性が高い解析を実施した研究報告はほとんど認められない。これは従来から用いられている MRI では、小動物の歯髓のような微小領域を精細に撮影することが困難であったためと考えられる。この問題を解決するために本研究で着目したのが、超高磁場 7 tesla (7T) MRI である。この超高磁場 MRI 装置は、日本国内において臨床上使用可能な MRI の静磁場強度の上限が 4T であるのに比較して、2 倍以上の静磁場強度を有しているため、撮影断面のスライス厚さを薄くしても信号雑音比 (Signal to Noise Ratio) が低くならず、微小な領域の精細な画像を撮

影することが可能である (Regatte and Schweitzer 2007) . 近年医科領域では、MRI の使用可能な静磁場の上限が引き上げられた諸外国において、主に脳血管疾患に対して、この 7T MRI を用いて撮影することでより精細な画像が得られ、診断精度の向上などに大きく貢献していることが報告されている (Bubrick et al. 2022; Cheng et al. 2023; Clarke et al. 2023) . そこで、この超高磁場 MRI 装置を用いることにより、従来では実現困難であった小動物における歯髄炎の詳細な観察が可能になるのではないかと考えた。

われわれはこれまでに、ラットにう蝕を誘発し、可逆性および不可逆性歯髄炎を再現性高く惹起させることが可能な、ラットう蝕由来歯髄炎モデルを確立した (Huang et al. 2023) . このモデルでは、う蝕深度が象牙質幅の $1/3$ から $2/3$ に至る場合に、歯髄に炎症が誘発され、う蝕除去後に歯髄組織の炎症反応が消失したことから、そこでは可逆性歯髄炎が惹起されていることを報告した (Huang et al. 2023) . 一方、う蝕の深度が象牙質幅の $2/3$ 以上に及んでいるものでは、さらに重篤な炎症が生じ、う蝕を除去した後も歯髄組織における炎症反応が消失しなかったことから、不可逆性歯髄炎が惹起されていることを報告した (Huang et al. 2023) . このように、動物実験モデルを用いることで、う蝕の進行段階に応じて可逆性および不可逆性歯髄炎を惹起させることが可能であるが、これはあくまでも病理組織学的な検証に基づく結果であり、術前に不可逆性炎

症の有無や範囲の正確な把握は依然として困難なままである。

以上のような背景から、ラットに誘発させた様々なう蝕の進行段階における歯髄炎に対して、7T MRI を用いて観察するとともに、病理組織学的な検討を加えることによって、これまでよりも詳細な病態解明が可能になると仮説を立てた。そこで本研究では、ラットう蝕由来歯髄炎モデルを用いて惹起された歯髄炎を 7T MRI を用いて観察することにより、う蝕由来歯髄炎に対する新規術前診断法の基盤を確立することを目的とした。

II. MR 画像を用いたラット歯髄組織の定量評価のための内在性コントロールの確立

1. 材料および方法

1) MRI による T2 強調画像, T2 map 画像の撮影

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した（承認番号：動歯 R-01-017-0）。

MRI を用いた歯髄組織の観察をおこなうにあたり、まずはラット歯髄組織の MR 画像に対する内在性コントロールとして適切な臓器の探索をおこなった。実験には、画像上より相対値である MR 信号強度が得られる T2 強調画像と、画像上より絶対値である T2 値が得られる T2 map 画像の 2 種類の撮影法を用いた。これにより、ラットの日齢や個体に関わらず、T2 値がほぼ一定で得られる臓器の探索を試みた。なお本研究では、周辺と比較して高い MR 信号領域が認められる部位を「高 MR 信号領域」と、低い MR 信号領域を認める部位を「低 MR 信号領域」と呼称することとした。

28 日齢雄性健全 Sprague – Dawley (SD) ラットに対して、70 日齢に至るまで、7T MRI (Pharma Scan[®] 70/16 US, Bruker, Billerica, MA, 米国) を用いて T2 強調画像, T2 map 画像の撮影を 1 週間に 1 回の頻度でおこなった。撮影の際、ラ

ットに吸入麻酔（セボフルラン，富士フイルム和光製薬，大阪）を施した．試料数は 4 とした．各撮影法の撮影条件は表 1 の通りである．得られた画像について，同一個体にて経時的に比較をおこなった．

2) 統計学的解析

ラット歯冠部歯髄を観察できる T2 強調画像上に観察される主要な臓器に対して，画像解析ソフトウェア (Image J Fiji, NIH, Bethesda, MD, 米国) を用いてそれぞれ定量評価をおこない，各日齢，各臓器ならびに各個体における T2 値を得た．各臓器における T2 値測定領域（関心領域：Region of Interest (ROI)）は，同一断面の T2 強調画像，T2 map 画像を参照することにより，ROI が各臓器内に収まるように設定した．また ROI の設定は画像を参照しつつ手動にておこない，ROI にて採用する輝度値については，過去の報告 (Juerchott et al. 2022) より ROI 内における最大値を用いた．

定量評価により得られた各臓器および各個体の T2 値を各日齢間でそれぞれ経時的に比較することにより，日齢や個体によらず，撮影期間中にわたってほぼ一定の T2 値が得られる臓器の探索をおこなった．統計学的検定は，統計解析ソフトウェア (IBM® SPSS® Statistics 22, International Business Machines, Armonk, NY, 米国) を用いて One-way ANOVA, Tukey's test にて危険率 5% で

おこなった.

2. 結果

同一個体の SD ラットの頭頸部における, 代表的な 70 日齢の T2 強調画像と T2 map 画像の矢状断画像を示す (図 1).

得られた各日齢の T2 map 画像上における各臓器の T2 値を Image J Fiji にて定量評価をおこない, 臓器ごとに経時的に比較した結果, 上下顎歯冠部歯髄を含む同一撮影断面上の咬筋深部において, 日齢や個体に関わらず, 統計学的な有意差を認めず, ほぼ一定の T2 値が得られた (図 2). 以上の結果をふまえ, これ以降の実験では咬筋深部を内在性コントロールとして用いることにより, T2 強調画像から得られる MR 信号強度の比較および解析をおこなうこととした.

III. MRI を用いたう蝕由来歯髄炎の経時的観察

ラットのう蝕進行の程度を，7T MRI の T2 強調画像によって観察および評価をおこなうために，ラットう蝕由来歯髄炎モデルを用いて以下の実験をおこなった．

1. 材料および方法

1) う蝕由来歯髄炎の誘発

Ooshima らの報告 (Ooshima et al. 1988) に基づき，以下の方法でラットにう蝕を誘発させた (図 3 a)．

14 日齢の雄性 SD ラットに対し，テトラサイクリン (4 g / kg) (テトラサイクリン塩酸塩，富士フイルム和光製薬) を含む粉末状飼料と，ペニシリン G カリウム (4,000 U / mL) (注射用ペニシリン G カリウム 20 万単位，Meiji Seika ファルマ，東京) を含む水を 3 日間与えた．

ストレプトマイシン耐性 *Streptococcus mutans* MT8148 株懸濁液 100 μ L をストレプトマイシン (1,500 μ g / mL) (硫酸ストレプトマイシン注射用 1 g，Meiji Seika ファルマ) 添加 Brain heart Infusion 液体培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 米国) 9.9 mL 中で培養し，2 回継代後の菌体を

感染に使用した。 1×10^8 colony forming units/mL の *S. mutans* 懸濁液 10 mL を 3,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した後、上清を除去した。沈殿物を生理食塩水で洗浄し、再び遠心分離をおこない、上清を除去した。沈殿物を 10 mL の生理食塩水に再懸濁し、接種用の *S. mutans* 懸濁液とした。

抗菌剤を 3 日間投与した 17 日齢のラットに対し、*S. mutans* 懸濁液を含む生理食塩水 200 μ L をピペットを用いて経口投与し、*S. mutans* を口腔内に感染させる処置を 5 日間連続して実施した。

24 日齢のラットに対し、ラットの臼歯部プラークを滅菌綿棒にて採取し、1,500 μ g/mL ストレプトマイシン添加 Mitis Salivarius-Bacitracin (MSB) 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) に播種し、48 時間嫌気培養後にコロニー形成を評価し、*S. mutans* の口腔内への感染を確認した。

S. mutans の感染開始日から実験終了に至るまで、う蝕誘発粉末飼料（スクロース 56%、小麦粉 7% 含有）（Diet 2000, 日本クレア, 東京）を不断給餌で与え続けることにより、ラットに対してう蝕を誘発するとともに、う蝕に継発する歯髄炎を惹起させた。

う蝕を誘発していない健全歯をコントロールとして用いた (sound 群)。試料数は、各群 8 とした。

2) マイクロ Computed Tomography (CT) 画像の撮影

ラット上下顎第一臼歯におけるう蝕の進行程度の変化を同一個体にて経時的に観察するために、う蝕誘発を継続している 28 日齢から 70 日齢にかけて、マイクロ CT 撮影 (SKYSCAN 1276, Bruker) を 1 週間に 1 回実施した。撮影に先立って、全身麻酔として塩酸メデトミジン (0.15 mg/kg) (メデトミン注, 明治アニマルヘルス, 熊本), ミダゾラム (2 mg/kg) (ミダゾラム注, サンド, 東京), 酒石酸ブトルファノール (2.5 mg/kg) (ブトルファノール酒石酸塩, 富士フイルム和光純薬) を含む 3 種混合麻酔を生理食塩水 (大塚生食注, 大塚製薬, 東京) で希釈し腹腔内投与した。撮影されたデータは、画像解析ソフトウェア (TRI 3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) にて画像化した。

得られた画像を過去の報告(Huang et al. 2023)に基づき、象牙質の厚みに対するう蝕の深さが 1/3 から 2/3 に至るものを moderate 群, 2/3 を超えるものを severe 群, 露髄に至るものを exposed 群と分類した (図 3 b)。

撮影条件は最大管電圧 100 kVp, 管電流 194 μ A, スライス幅 40 μ m, Field of view (FOV) 20 mm とした。

3) MRI による T2 強調画像の撮影

ラット上下顎第一臼歯における歯髄組織の経時的変化を同一個体にて観察するために、III-1. 2) と同様に、う蝕誘発を継続しつつ、28 日齢から 70 日齢に至るまで、7T MRI にて T2 強調画像の撮影を 1 週間に 1 回実施した。なお、撮影条件は II-1. 1) と同様とした。

MRI 撮影後、sound, moderate, および severe 群では遠心の歯冠部歯髄の、exposed 群では遠心の露髄部直下歯冠部歯髄の MR 信号強度を Image J Fiji を用いて定量した。ROI の設定は、II-1. 2) と同様の手法にておこなった。II-2. より、咬筋深部が内在性コントロールとして適当であると示されたことから、得られた各群の遠心歯冠部歯髄の MR 信号強度と、同一撮影断面上の咬筋深部の MR 信号強度に対する比である MR 信号比を導き出すことにより、各群の歯冠部歯髄の MR 信号強度の定量をおこなった。

4) 統計学的解析

得られた各群の MR 信号比を、One-way ANOVA, Tukey's test にて危険率 5% で統計学的評価をおこなった。解析ソフトウェアには IBM® SPSS® Statistics 22 を用いた。

2. 結果

う蝕誘発群，sound 群における 28 日齢から 70 日齢にかけての同一個体でのマイクロ CT，T2 強調画像を経時的に撮影した結果を示す（図 4）。

全ての群のマイクロ CT 画像において，28 および 35 日齢では下顎第一臼歯の根尖孔の開大が確認された（図 4 a, b）。う蝕の進行に関しては，同じく下顎第一臼歯において，概ね 42 日齢で moderate 群へ（図 4 c），49 から 56 日齢で severe 群へ（図 4 d, e），そして 63 から 70 日齢で exposed 群へ（図 4 f, g）とう蝕が進行していく様子が観察された。

sound 群の下顎第一臼歯の T2 強調画像では，ほぼ全ての試料において 28 日齢から 70 日齢にわたり，髓角部が白色に描写される，すなわち高 MR 信号領域を認めた（図 4 o-u，図 5 i-l）。次に，う蝕が誘発されたラットでは，まずう蝕初期にあたる下顎第一臼歯の根尖孔の開大が観察された時期においては，sound 群と同様に下顎第一臼歯の髓角部において，高 MR 信号領域を認めた（図 4 h, i，図 5 e）。また，moderate 群においても，髓角部において高 MR 信号領域を認め，同一日齢の sound 群と類似した所見が得られた（図 4 j，図 5 f）。しかし severe 群では，moderate 群および sound 群と比較して，髓角に限局していた高 MR 信号領域が歯冠部歯髓の広い領域において観察された（図 4 k, l，図 5 g）。さらに exposed 群では，露髓部直下の髓角部において明らかな低 MR

信号領域が発現している像が観察された（図 4 m, n, 図 5 h）.

sound, moderate, および severe 群のう蝕近傍の歯冠部歯髄と exposed 群の露髄部直下歯冠部歯髄の MR 信号比の定量をおこなった結果, sound, moderate, および severe 群間では, 統計学的な有意差は認められなかった ($p > 0.05$). 一方 exposed 群では, 他の群と比較して有意に低い MR 信号比が示された ($p < 0.05$) (図 6).

以上の結果より, う蝕の進行に伴い高 MR 信号領域が歯冠部歯髄全体へと拡大傾向を示し, 露髄に至った場合は露髄部直下の歯髄組織において低 MR 信号領域を認めるという, 特徴的な T2 強調画像が得られた.

IV. う蝕の各進行段階における歯髄の病理組織学的評価

実験 III より，う蝕の各進行段階における歯冠部歯髄組織において特徴的な T2 強調画像が得られたことから，う蝕の進行に応じて歯髄組織内では異なる病態が引き起こされていることが示唆された．そこで，歯髄組織内における病態変化の詳細な解析をするために，病理組織学的検討をおこなうこととした．

1. 材料および方法

1) う蝕由来歯髄炎の誘発

III－1. 1) と同様の方法にて，ラットにう蝕由来歯髄炎を惹起させた．

2) MRI による T2 強調画像の撮影

II－1. 1) と同様の方法にて，う蝕由来歯髄炎が惹起されたラット歯髄の T2 強調画像の撮影をおこない，歯髄の状態を観察した．

3) マイクロ CT 画像の撮影

T2 強調画像の撮影後に，実験動物をペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル[®]，共立製薬，東京）の腹腔内過剰投与により屠殺した後，4% パラ

ホルムアルデヒド水溶液（4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液，ナカライテスク，京都）を用いて灌流固定をおこなった．続いて被験歯を含む上顎骨，下顎骨をそれぞれ摘出し軟組織を除去した後，う蝕の進行程度を観察するために，マイクロ CT（R-mCT2[®]，RIGAKU，東京）の撮影をおこなった．撮影条件は最大管電圧 90 kVp，管電流 160 μ A，スライス幅 5 μ m，FOV 5 mm とした．得られたマイクロ CT 画像より，III-1. 2) と同様の基準を用いて，う蝕の進行程度を分類した．

4) 病理組織学的評価

マイクロ CT 解析に用いた試料を，4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて 12 時間，4°C にて浸漬固定をした後，脱灰溶液（カルキトックス，富士フイルム和光純薬）中に 7 日間浸漬し，4°C にて脱灰をおこなった．脱灰終了後，上昇アルコール系列にて脱水，パラフィン包埋をおこない，回転式ミクロトーム（RM 2155，Leica，Wetzlar，ドイツ）にて厚さ 6 μ m の連続切片を作製した．作製された切片に対して，以下に示す手順にてヘマトキシリン-エオジン（以下 H-E）染色ならびに免疫組織化学染色をおこなった．

H-E 染色には，ヘマトキシリン溶液（Mayer's Hematoxylin，富士フイルム和光純薬），エオジン溶液（Pure Eosin Solution，武藤化学，東京）を用いた．

免疫組織化学染色は以下の方法で実施した．まず切片の剥離を防止するために，56℃ に設定した DNA オープン（MI-100，クラボウ，大阪）内に試料を 30 分間静置した．脱パラフィン，再水和後，10 mM クエン酸緩衝液（pH 6.0）に浸漬し，78℃ で 20 分間反応させることで抗原の賦活化をおこなった．その後室温に戻し，りん酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し，3% 過酸化水素水（過酸化水素，関東化学，東京）に 20 分間浸漬し，内在性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングをおこなった．本実験では CD43，CD68，Matrix metalloproteinases 9（MMP9）に対する免疫組織化学染色をおこなった．CD43 に関しては，10% ウマ正常血清を用いて室温環境下で 60 分ブロッキングをおこなった後，一次抗体として 1：500 に希釈したマウス抗ラット CD43 モノクローナル抗体（Anti-CD43 抗体 ab22351，Abcam，Cambridge，英国）を 4℃ で一晩反応させた．一方 CD68 および MMP9 に関しては，10% ヤギ正常血清を用いて室温環境下で 60 分間ブロッキングをおこなった後，一次抗体として 1：400 に希釈したウサギ抗ラット CD68 ポリクローナル抗体（Anti-CD68 抗体 ab125212，Abcam），および 1：250 に希釈したウサギ抗ラット MMP9 ポリクローナル抗体（Anti-MMP9 抗体 ab38898，Abcam）を 4℃ で一晩反応させた．その後 ABC キット（VECTASTAIN® Elite® ABC Kit，VECTOR LABORATORIES，Newark，CA，米国）および DAB 染色キット（ImmPACT® DAB，VECTOR

LABORATORIES) を製造元の指示に従い用いて各抗原を検出した。対比染色として Mayer's Hematoxylin を用いた核染色をおこなった。その後、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を用いた観察に供した。

2. 結果

う蝕の各進行段階における T2 強調画像, マイクロ CT 画像, H-E 染色 (図 7), および各抗体に対する免疫組織化学染色 (図 8, 9) の結果を示す。

マイクロ CT 画像において観察されたう蝕の進行程度を元に各群に分類した (図 7 a-d)。T2 強調画像では III 2. と同様に, sound および moderate 群では髄角において高 MR 信号領域が観察され (図 7 e, f), severe 群では高 MR 信号領域が歯冠部歯髄の広い領域に及んでいる様子が観察された (図 7 g)。また exposed 群では露髄部周辺において低 MR 信号領域が発生する様子が観察された (図 7 h)。

H-E 染色では, sound 群の歯髄組織においては, 炎症性細胞様細胞の浸潤や第三象牙質の形成は認められず, 象牙芽細胞の整った配列等が観察された (図 7 i, m)。また, moderate 群の歯髄組織では, 炎症性細胞様細胞の浸潤が軽度認められるようになり, 加えて, う蝕直下における第三象牙質の形成や象牙芽細胞の配列の軽度の乱れが観察された (図 7 j, n)。さらに severe 群では,

moderate 群と比較してより顕著な炎症性細胞様細胞の浸潤を認めるようになり、加えて、う蝕直下における第三象牙質の形成や象牙芽細胞の配列がより広範囲において乱れている様子が観察された（図 7 k, o）。最後に exposed 群では、露髄部の周囲においては、severe 群と比較して第三象牙質の形成や象牙芽細胞の配列がさらにより広範囲において乱れている様子が観察されるだけでなく、露髄部直下の歯髄組織中においては、核－細胞質比が高いリンパ球様細胞が著明に浸潤している様子が観察された（図 7 l, p）。

CD43 および CD68 の免疫組織化学染色をおこなった結果、sound 群では CD43 または CD68 のいずれかを発現するような細胞は認められなかった（図 8 a-d）。moderate 群では、CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の浸潤が、高 MR 信号領域とほぼ一致したう蝕直下において認められた（図 8 e-h）。severe 群では、高 MR 信号領域の拡大とともに、CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の浸潤が歯冠部歯髄の広範囲において観察された（図 8 i-l）。exposed 群では severe 群と同様に、CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の浸潤が歯冠部歯髄の広い領域において観察されただけでなく、露髄部直下においては、他群と比較してより多数の CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の集積が観察された（図 8 m-p）。この

ことから露髄部直下の歯髄組織では他の部位と比較して、より重度な炎症が惹起されていることが示唆された。

MMP9 の免疫組織化学染色をおこなった結果、sound, moderate, および severe 群において MMP9 の発現は観察されなかった (図 9 a-f)。一方 exposed 群では、T2 強調画像上において低 MR 信号領域が認められた範囲とほぼ一致して、MMP9 の発現が観察された (図 9 g, h)。特に露髄部直下においては、周囲と比較してより高密度な MMP9 の集積が観察された (図 9 h)。

V. 断髄による不可逆性歯髄炎領域の特定

実験 III および IV より，う蝕により露髄を呈する **exposed** 群では，露髄部直下歯髄において他群より有意に低い **MR** 信号比を示し，同領域においては，顕著な炎症性細胞浸潤を認めたのに加え，不可逆性歯髄の分子マーカー候補と報告されている **MMP9** (Fouad 2022) の発現が認められるなど，他のう蝕誘発群と比較して，より重篤な歯髄炎が惹起されていることが示唆された．より重篤な歯髄炎を惹起していると考えられる低 **MR** 信号領域が，実際に臨床における不可逆性歯髄炎に罹患しているかについて検証するために，III-1. 1) と同様の方法にて作製された **exposed** 群のラットに対して，低 **MR** 信号領域を選択的に除去し，それ以外の領域は保存する生活歯髄切断（断髄）実験をおこなった．

1. 材料および方法

1) 断髄使用材料におけるアーチファクト検証

断髄実験に使用する各種歯科材料の，**MRI** 撮影時における磁化率アーチファクトの有無を確認するために以下の実験を断髄実験に先立っておこなった．

断髄実験用の材料として，**MTA**（**ProRoot® MTA**，**Dentsply Sirona**，**Charlotte**，**NC**，**米国**）（以下 **MTA**），歯面処理剤（**クリアフィル®ユニバーサルボンド**

Quick ER, クラレノリタケデンタル, 東京) (以下 Quick), コンポジットレジ
ン (クリアフィル[®]マジエスティ[®] ES Flow High, クラレノリタケデンタル)
(以下 CR) を用いることとした. 断髄実験に使用する材料の Lot No. および組
成を表 2 に示す. MTA を製造元の指示に従い練和した後, 内径 3 mm, 高さ 10
mm のテフロン製のモールド内に填入し, 圧接することにより緊密に充填をお
こなった. Quick, CR に関しては同様の形状のモールド内にそれぞれ充填した
後, 2 方向から 20 秒ずつ光照射をおこない硬化させた. 続いて, 相対湿度
95%, 温度 37°C のインキュベーター (THE051FA, ADVANTEC, 東京) 中に,
テフロンモールド内に材料を充填した状態のまま 24 時間静置し最終硬化体を
得た. なおコントロールとしては, 何も充填していないモールドを用いた
(Control).

得られた各硬化体をマイクロチューブ (Safe-Lock Tubes 2.0mL, Eppendorf,
Hamburg, ドイツ) 内に入れ, 蒸留水で満たした. その後 7T MRI を用いて,
各マイクロチューブの T2 強調画像を撮影した. なお撮影条件は, II-1. 1) と
同様とした.

2) う蝕由来歯髄炎の誘発

III-1. 1) と同様の方法にて, ラットの臼歯にう蝕に由来する歯髄炎を惹起

させた．なお本実験では，露髄を呈した下顎第一臼歯を用いることとした．

3) 術前におけるマイクロ CT 画像の撮影

III-1. 2) と同様の薬剤，機器，撮影条件を用いて，ラット下顎第一臼歯のマイクロ CT 画像を撮影した．その結果，ラットの下顎第一臼歯にう蝕に起因する露髄が引き起こされており，exposed 群に相当することを確認した．

4) 術前における T2 強調画像の撮影

II-1. 1) と同様の薬剤，機器，撮影条件を用いて，ラット下顎第一臼歯の T2 強調画像を撮影した．これにより，ラットの下顎第一臼歯の露髄部直下にておいて，これまでの実験と同様に低 MR 信号領域が観察されることを確認した．

5) 断髄実験

III-1. 2) で使用した 3 種混合麻酔をラットに対して腹腔内注射にて投与し，全身麻酔をおこなった．さらに，塩酸リドカイン (20 mg / ml)，アドレナリン (0.0125 mg / ml) を含む歯科用キシロカインカートリッジ (リドカイン塩酸塩・アドレナリン注射液，Dentsply Sirona) を用いて下顎臼歯部に局所麻酔をおこなった．

以降の処置は全て、歯科用マイクロスコープ（M60, Leica, Wetzlar, ドイツ）観察下にておこなった。exposed 群のラット下顎第一臼歯に対し、ラバーダム防湿をおこない、アルコール綿球による清拭をおこなった。その後、マイクロエクスカーベーター（O・K マイクロエクスカ, サンデンタル, 大阪）およびラウンドバー（ISO #006, Dentsply Maillefer, Ballaigues, スイス）を用い、う蝕を除去した。う蝕の除去に際しては、う蝕検知液（カリエスディテクター, クラレノリタケデンタル）を使用し、う蝕が完全に除去されていることを確認した。染色部を完全に除去した後、新しい滅菌ラウンドバーに交換し、マイクロ CT 画像、ラウンドバーの径、ならびに咬頭、髓角、およびセメントエナメル象牙境といった解剖学的指標を参考にしつつ、低 MR 信号領域に相当する歯冠部歯髓を機械的に除去し、断髓をおこなった。その後、断髓面を 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて化学的に清掃し、歯髓からの止血を確認した。続いて、MTA を歯髓腔内に充填し、Quick にて歯面処理後、CR 充填をおこなった。対合歯との咬合調整をおこない、充填物の脱離を防止した。

6) 術後における T2 強調画像の撮影

断髓から 6 週間経過後、II-1. 1) と同様の薬剤、機器、撮影条件を用いて、ラット下顎第一臼歯の T2 強調画像を撮影した。

7) 術後におけるマイクロ CT 画像の撮影

術後の T2 強調画像を撮影した後、IV-1. 3) と同様の薬剤、機器、撮影条件を用いて、ラットを灌流固定した後、下顎骨を摘出し、ラット下顎第一臼歯のマイクロ CT 画像を撮影した。

8) 病理組織学的観察

IV-1. 4) と同様の方法にて、断髄後のラット下顎第一臼歯の H-E 染色、ならびに CD43, CD68, および MMP9 に対する免疫組織化学染色をおこなった。

2. 結果

断髄実験で使用する各種歯科材料に関して、磁化率アーチファクトの有無を観察したところ、全ての材料において明らかな磁化率アーチファクトは観察されなかった (図 10 a-d)。このことから、本検証に用いた各種歯科材料を用いて、断髄実験をおこなうこととした。

断髄実験前のマイクロ CT, T2 強調画像の撮影をおこなった結果、う蝕の進行に起因する露髄ならびにその露髄部直下においてⅢ, IV-2. で得られた結果と同様に、低 MR 信号領域が観察された (図 11 a, b)。

断髄実験の 6 週間後にマイクロ CT 画像の撮影をおこなった結果、断髄部直

下の歯髄組織において第三象牙質の形成が観察された（図 11 c）。また根尖性歯周炎を示唆する根尖部周囲組織の透過像は観察されなかった（図 11 c）。さらに T2 強調画像の撮影をおこなった結果、近心根において MR 信号が観察され、生活反応があることが示唆された（図 11 d）。

H-E 染色の結果、断髄面においては、MTA に接する領域に第三象牙質の形成が認められた（図 11 e-g）。一方、根尖部における骨吸収や炎症性細胞様細胞の浸潤を示す所見、さらには歯髄組織内における明らかな炎症反応は認められなかった（図 11 e-h）。免疫組織化学染色をおこなった結果、断髄後の歯髄組織内ならびに根尖部において、CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の浸潤は観察されなかった（図 12 c-f, g-j）。最後に、MMP9 に関する免疫組織化学染色をおこなった結果、MMP9 に関しても、歯髄組織内や根尖部においてその発現は観察されなかった（図 12 k-n）。

以上の結果より、露髄部直下の低 MR 信号領域を選択的に除去する断髄をおこなうことによって、残存歯髄組織中には炎症反応を認めず、断髄面直下においては第三象牙質の形成を認め、さらに根尖周囲に炎症像を認めなかったことなどから、保存した歯髄組織が治癒に導かれていることが示された。

VI. 考察

歯髄保存の重要性がこれまで以上に注視されている昨今において (ESE 2019; AAE 2021) , かつては歯髄除去療法に含まれていた断髄が, 現在では歯髄保存療法のひとつとして, 多くの研究報告が蓄積されている (Cushley et al. 2019; ESE 2019; AAE 2021; Donnelly et al. 2022; Philip and Suneja 2022) . それに伴い, 従来であれば, 不可逆性歯髄炎と診断されて抜髄がおこなわれていた症例であっても, 歯髄の不可逆性炎症領域のみを選択的に除去する断髄をおこなうことにより, 残存した健全歯髄の保存が可能であるという考えが現在は普及しつつある (Ng et al. 2007; Asgary et al. 2014; Linsuwanont et al. 2017; Taha and Khazali 2017; Asgary et al. 2018; Cushley et al. 2019; Uesrichai et al. 2019; Ather et al. 2022) .

う蝕罹患歯の歯髄では, う蝕の進行に伴い, まずは最外側の象牙芽細胞が, 次いで線維芽細胞や幹細胞, 各種の免疫細胞等が病原体を認識して, 多様な炎症反応が引き起こされると言われている (Farges et al. 2009; ESE 2019) . う蝕の進行により炎症が重篤化すると, 歯髄組織内では, 浸出液の貯留などにより組織圧が上昇し, 血管が圧迫されることにより虚血や壊死が引き起こされる (Heyeraas and Berggreen 1999; Ricucci et al. 2019) . また, このような歯髄における炎症反応は, まずはう蝕罹患部位直下の歯髄組織に限局して発生し, う蝕の進行に伴って, そこから次第に歯髄全体に波及していくということが示されて

いる(Bakhtiar et al. 2017; Ricucci et al. 2019) . これは、う蝕罹患歯の歯髄組織中において、炎症を生じている領域と、健全な領域とが同時に存在することを意味しており、う蝕の進行とともに炎症領域が徐々に拡大していく。炎症領域と健全領域が混在した状況において、重篤な不可逆性炎症を発症した歯髄組織を選択的に除去することにより、健全歯髄の保存が可能になる、という理論で断髄処置は成功すると考えられている (ESE 2019; Ricucci et al. 2019; AAE 2021) . 当然ながら、除去すべき不可逆性炎症を有する領域は症例によって異なる。しかし、現在の歯髄診査法は、客観性に乏しい患者の疼痛を基準とした歯髄全体に対するものであり、歯髄組織中の除去すべき領域を術前に決定することは不可能である(AAE 2021). そのため歯髄のより詳細な領域に対しての診断が可能で、客観的診査法の開発が必要とされている (ESE 2019; Ricucci et al. 2019; AAE 2021) .

しかし、これまでに客観的かつ正確な歯髄診断の実現を目的とした、非侵襲的な歯髄の炎症状態に関する詳細な研究報告は未だになされていない。そこでわれわれは、ラットう蝕由来歯髄炎モデル (Huang et al. 2023) と微小領域の精細な画像が撮影可能な超高磁場 7T MRI (Regatte and Schweitzer 2007) に加え、病理組織学的な手法を用いることにより、う蝕の進行とそれに伴う歯髄における炎症の関連についての詳細な解明を目指した。これにより、従来よりも客観的か

つ正確な、う蝕由来歯髄炎の新規術前診断法の基盤を確立することを目的として本研究をおこなった。

MRI を用いてう蝕由来歯髄炎の観察をおこなう際、炎症反応により歯髄組織における浸出液等の増減が予想されることから、水分量の差を明確に可視化することができ (Smith et al. 1985) , かつ MRI を用いた歯髄評価の過去の報告 (Gahleitner et al. 1999; Assaf et al. 2014; Assaf et al. 2015; Iohara et al. 2016) にて多用されている T2 強調画像を撮影するのが適切であると考えた。しかし、T2 強調画像上においては CT 画像上における CT 値のような絶対値が存在せず、相対値である MR 信号強度のみしか得られない。そのため、T2 強調画像のみでは同一個体における異なる断面の画像や異なる個体間での比較が不可能であるという問題点がある。理想的には、蒸留水やオリーブ油で満たされたマイクロチューブ等を、撮像対象となる上下顎臼歯の歯髄が含まれる同一断面上に静置し、それらをコントロールとすべきであったが (Mitsouras et al. 2017) , ラットを用いた本研究では MRI の撮影対象近傍に、マイクロチューブ等を置くための物理的なスペース確保が困難であった。そのため本実験では、T2 強調画像と同時に、絶対値である T2 値が得られる T2 map 画像を同時に撮影することとした。すなわち、得られた T2 強調画像を参考に臓器を特定し、さらに同一撮影断面となる T2 map 画像を用いることにより、先に特定した臓器における T2 値を定量解

析することとした。これにより、ラットの日齢や個体に関わらず、T2 値がほぼ一定で得られる内在性コントロールとなり得る臓器を探索することを試みた。その結果、咬筋深部がほぼ一定の T2 値を示したため（図 2）、今後の実験では、同部を内在性コントロールとして用いることとした。

う蝕由来歯髄炎の病態を解明するために、ラット下顎第一臼歯におけるう蝕の進行とそれに伴う歯髄の状態の経時的観察をおこなった。本研究においては、同一個体を用いた経時的な撮影の結果、28、35 日齢では、う蝕誘発群と sound 群の両方において、根尖の開大が観察された（図 4 a, b, 図 5 a）。過去の報告より、SD ラットの下顎第一臼歯の根尖は 35 日齢前後にて完成することが明らかとなっており (Xu et al. 2011) , これは今回の実験結果とも一致する。根未完成歯では、歯髄における反応が成熟した永久歯とは異なる可能性が考えられるため、以降の実験では、確実に根尖が完成した 42 日齢以降について着目することとした。

う蝕誘発群のマイクロ CT 画像より、う蝕が誘発され、露髄へと至る過程が経時的に観察された（図 4 a-g, 図 5 a-d）のに伴い、moderate 群では高 MR 信号領域が髄角部分に限局しており（図 4 j, 図 5 f）、severe 群では高 MR 信号領域が歯冠部歯髄の広い範囲に拡大していたのに対し（図 4 k, l, 図 5 g）、exposed 群では露髄部直下において低 MR 信号領域が発生する様子が観察され

た（図 4 m, n, 図 5 h）. その信号強度について定量評価をおこなった結果, moderate 群や severe 群における MR 信号比は sound 群と比較して有意差は認められなかったのに対して, exposed 群の露髄部直下では他群と比較して有意に低いことが明らかとなった（図 6）. 今回の MR 信号比の定量評価の際には, 過去の報告に従い (Juerchott et al. 2022), 各 ROI 内より得られる輝度値の最大値を信号強度として採用した. これは歯髄が象牙質やエナメル質などの水分含有量が少なく輝度値が極めて低い硬組織によって取り囲まれているためである (Juerchott et al. 2022). 具体的には, ROI 設定時に, 歯髄周辺の硬組織が ROI 内に一部でも含まれると, 輝度値の最小値や平均値は大きく影響を受ける可能性が高く, 歯髄組織の輝度値を安定して得ることが困難となる (Juerchott et al. 2022). 一方で, 最大値に関しては, 輝度値が極度に低い周辺の硬組織の影響は受けにくく, 安定して結果が得られるという過去の報告もあるため (Juerchott et al. 2022), 本研究においては, 各 ROI 内の最大値を歯髄の輝度値として採用することとした.

以上のように, ラット同一個体におけるう蝕の進行に伴う歯髄炎の経時的な変化を T2 強調画像の変遷という形で撮影することに成功し, さらにう蝕の進行段階に応じて特異的な T2 強調画像が得られた. このことは, MRI が非侵襲的かつ経時的に歯髄の状態を評価する技術として有用であることを示すもので

あると同時に、各う蝕の進行段階において歯髄で異なる病態が引き起こされていることを示唆している。そこで次の実験では、これまでに得られた結果の詳細について検討するために、病理組織学的評価を実施した。

歯髄炎に罹患している歯髄組織では、T リンパ球や好中球、単球及びマクロファージ等の炎症性細胞が浸潤しており、これらの細胞が炎症反応や創傷治癒に関連していると報告されている (Izumi et al. 1995; Yoshida et al. 2003; Nakanishi et al. 2005; Novak and Koh 2013)。そこで本研究では、T リンパ球や単球などといった炎症性細胞のマーカーである CD43 (Barran et al. 1997) と、マクロファージのマーカーである CD68 (Allison et al. 2023) とを用いることにより、歯髄における炎症反応の遷移を評価することとした。

一方、本研究では、歯髄炎のより詳細な病態解明の実施を目指しているため、不可逆性歯髄炎の存在を示す特異的な指標が必要であると考え、これまでに報告されている不可逆性歯髄炎のマーカー候補を用いることとした。近年、不可逆性歯髄炎に特異的な分子マーカーを探索する研究が多くおこなわれており、これまでに interleukin-1 β (IL-1 β) や interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), そして MMP9 などの炎症性サイトカインやタンパク質分解酵素等がその候補として挙げられている (Elsalhy et al. 2013; Chen et al. 2020; Kritikou et al. 2021; Wu et al. 2022)。そのなかでも MMP9 は他の分子と比較して

高頻度に報告されている (Tsai et al. 2005; Sambandam V and Neelakantan 2014; Mente et al. 2016; Rechenberg et al. 2016; Zanini et al. 2017; Chen et al. 2020; Al-Natour et al. 2021; Kritikou et al. 2021; Fouad 2022) . MMP9 はタンパク質分解酵素の 1 種である matrix metalloproteinase ファミリーのひとつで、種々の炎症や創傷治癒に深く関連していると報告されている (Nagase and Woessner 1999) , 近年では、皮膚における重度の炎症性疾患、関節リウマチ、癌の転移等といった疾患との深い関連が注目されている (Wang et al. 2014; Sharma et al. 2021; Batool et al. 2023) . 以上のことから、本研究では、より重篤な歯髄炎を表す指標として、MMP9 を用いることとした。

本研究において、moderate 群から severe 群へと歯蝕が進行するにつれて、高 MR 信号領域が歯冠部歯髄全体へと拡大する現象を病理組織学的に評価した結果、高 MR 信号領域とほぼ一致して CD43, CD68 を発現する炎症性細胞の浸潤が観察された (図 8 e-l). CD43, CD68 が表す T リンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞は前述の通り、歯髄炎の進行に伴い、歯蝕直下の歯髄組織中に発現することが知られている (Izumi et al. 1995; Yoshida et al. 2003; Nakanishi et al. 2005; Novak and Koh 2013) . 一般的に、T2 強調画像上において信号強度が高い、つまり白色に描写されるのは、その部位においてプロトン、つまりは水分が多いことを意味している (Sanjay and Ernest 2018) . そのため、健全な同一臓器と

比較して、高信号に描写される部位では、炎症や浮腫、癌化などの水分含有量が増加する現象が引き起こされている可能性が高い (Sanjay and Ernest 2018) .

このことから、う蝕直下の歯髄組織では、血管透過性の亢進や浸出液の貯留などの炎症反応が惹起されており、組織内の水分含有量が増加したことで、高 MR 信号領域が観察されたと考えられる.

sound 群では、髓角において高 MR 信号領域を認めたものの、同領域における炎症性細胞は観察されなかった (図 7 e, i, m, 図 8 a-d, 図 9 a, b). これは、マイクロ CT の結果より観察できる、ラットの咬頭部における咬耗が関係していると考えられる (図 7 a). つまり、咬頭直下の髓角部では、常に外来刺激にさらされており、その結果、歯髄の活発な防御活動がおこなわれており、本研究の免疫組織化学染色では検出できなかった細胞等の影響により、水分量が増加する現象が起きていると推察される. 従って、本研究における高 MR 信号領域には必ずしも炎症があるわけではなく、外来刺激やう蝕への罹患の有無などの複合的な情報を統合した上で、炎症の有無については判断する必要があると考えられる.

moderate 群 と severe 群の病理組織学的評価においては、H-E 染色にて、反応象牙質の形成や象牙芽細胞の配列の乱れなどが観察されたが (図 7 j, k, n, o), これは、歯髄組織がう蝕の侵食に対しての防御活動を活性化させた結果である

と考えられる。また免疫組織化学染色の結果、両群ともに、CD43 または CD68 のいずれかを発現する炎症性細胞の浸潤が認められたが（図 8 e-l）、不可逆性歯髓炎の分子マーカー候補である MMP9 は発現が観察されなかった（図 9 c-f）。以上のことから、moderate 群では、可逆性歯髓炎が惹起されたことにより、CD43、CD68 のみの限局的な発現が認められ、さらにう蝕が進行した severe 群では、それらの発現領域が拡大したと考えられる。また本結果は、歯髓における炎症反応は初期から歯髓全体に及んでいるわけではなく、う蝕直下の歯髓組織から次第に広範囲に波及していくという過去の報告とも一致している (Bakhtiar et al. 2017; Ricucci et al. 2019)。

また moderate 群と severe 群の T2 強調画像においては、両群間において MR 信号比間の統計学的な有意差は認められなかったものの（図 6）、う蝕の進行に伴い高 MR 信号領域が拡大するといった特徴的な違いを認めた（図 7 f, g）。今後、さらに高頻度に T2 強調画像を撮影することや、MR 画像の解像度改善による ROI 設定の厳密化などにより、より詳細なう蝕由来歯髓炎の病態解明に繋がるのではないかと考えられる。

一方、exposed 群においては、露髄部直下の低 MR 信号領域において、H-E 染色ではリンパ球様の細胞の浸潤を多く認め（図 7 l, p）、免疫組織化学染色では CD43 と CD68 の発現が、他のう蝕誘発群よりも多く観察された（図 8 m-p）。

先述したように、う蝕に由来する歯髄炎をきたしている歯髄組織では CD43, CD68 が表す T リンパ球やマクロファージが観察されることから (Izumi et al. 1995; Yoshida et al. 2003; Nakanishi et al. 2005; Novak and Koh 2013), より重篤なう蝕の進行の結果、他群と比較してそれらがより多く発現したものと考えられる。さらに、moderate 群や severe 群では認められなかった不可逆性歯髄炎マーカー候補である MMP9 の発現が低 MR 信号領域とほぼ一致して観察された (図 9 g, h)。以上の結果から exposed 群では、露髄に至るう蝕の進行に伴い、他群と比較してより重篤な炎症反応が惹起されたものと考えられる。

過去の報告 (Huang et al. 2023) において、moderate 群では炎症反応に関与している M1 型マクロファージ (Murray and Wynn 2011; López-Janeiro et al. 2020) と比較して、創傷治癒に関連する M2 型マクロファージ (López-Janeiro et al. 2020; Zhang et al. 2021) が優勢に発現しており、う蝕除去後の歯髄組織にて炎症反応が認められなかったことから、可逆性歯髄炎が惹起されていることが示されている。本研究においても、moderate 群では、severe 群や exposed 群よりも CD43, CD68 の低発現を認め、かつ MMP9 の発現は観察されないなど、可逆性歯髄炎と考えられる軽度の炎症反応が惹起されていることが示され (図 8 e-h, 図 9 c, d), これは先の報告 (Huang et al. 2023) とも一致した。一方 severe 群では M1 型マクロファージが M2 型マクロファージと比較して優勢であり、う蝕除去後も

炎症反応が残存していたことから、不可逆性歯髄炎が惹起されていると報告されている。これは、severe 群よりもう蝕が進行し露髄に至っている exposed 群においても、同様に不可逆性歯髄炎が惹起されている可能性が高いことを意味している。さらに、本研究の exposed 群においても、炎症性細胞の高度な浸潤を認めるだけでなく（図 8 m-p）、不可逆性歯髄炎の分子マーカー候補である MMP9 の発現が認められた（図 9 g, h）。この結果より、MMP9 の不可逆性歯髄炎マーカーとしての信頼性がより向上したと考えられる。しかし、過去の報告 (Huang et al. 2023) で不可逆性歯髄炎とされた severe 群においては、MMP9 の発現は観察されなかった（図 9 e, f）。本研究の結果は、moderate 群と severe 群ともに可逆性歯髄炎であると示唆するものであり、severe 群については先の報告 (Huang et al. 2023) とは異なる結果が得られたことになる。その原因としては、同じ不可逆性歯髄炎であったとしても、severe 群では比較的軽度の、exposed 群ではより重度の不可逆性炎症が惹起されており、より重度の不可逆性歯髄炎の指標となり得る MMP9 が、exposed 群においてのみ発現した可能性があると考えられる。また、過去の研究 (Huang et al. 2023) と本研究との両方で用いた severe 群という基準のなかに、可逆性と不可逆性歯髄炎の分岐点が存在し、過去の報告 (Huang et al. 2023) では severe 群のなかでもより exposed 群に近いものを、本研究ではより moderate 群に近いものを対象としていた可能性も考えられ

る。今後は、より詳細なう蝕の進行段階の分類を臨床的に検討する必要があると同時に、MMP9 や不可逆性歯髄炎の分子マーカーの発現の時期についても詳細に解析する必要があると考えられる。

exposed 群の T2 強調画像において、露髄部直下で低 MR 信号領域が観察されたことより、組織の水分含有量が低下していると考えられる。しかし一方で、同部位では CD43 と CD68 陽性細胞の著しい浸潤や MMP9 の強発現が認められるなど（図 8 m-p, 図 9 g, h）、重篤な炎症反応が引き起こされていることも示されている。これは、本来であれば高 MR 信号領域として認められるはずである炎症反応が惹起されている領域が、低 MR 信号領域として撮像されているという矛盾した結果のように見える。前述したように、う蝕の進行により歯髄炎が重篤化すると、虚血や壊死が引き起こされる (Heyeraas and Berggreen 1999; Ricucci et al. 2019)。他の報告では、T2 強調画像において、壊死に至った組織では低 MR 信号が認められると示されている (Zhang et al. 2018)。これらより、露髄に至るような深在性う蝕に暴露されたことにより、露髄部直下の歯髄組織においては重篤な歯髄炎による虚血や部分的な壊死が引き起こされ、組織の水分含有量が低下することで、低 MR 信号領域が観察されたと考えられる。これは、ヒトのう蝕の進行段階と T2 値の関係を調べた過去の論文において、重度う蝕に罹患している歯髄では、健全歯髄と比較して低い T2 値が得られるとい

う報告 (Cankar et al. 2020) と一致する。この低 MR 信号領域とほぼ一致して、不可逆性歯髄炎の分子マーカーとしてより信頼性が高いとされた MMP9 の発現が観察された (図 9 g, h)。ことから、exposed 群の低 MR 信号領域では、虚血や壊死を伴う不可逆性炎症に相当するような、他群と比較してより重篤な歯髄炎が惹起されていることが示された。

以上のように exposed 群においては、低 MR 信号領域にて不可逆性炎症が惹起されている可能性が示されたが、この領域が真に不可逆性炎症領域であるかどうかを明らかにするためには、この領域を物理的に除去し、残存歯髄組織における炎症反応や創傷治癒の経緯を観察する必要がある。また、exposed 群の低 MR 信号領域は歯冠部歯髄の広い領域を占めていることから (図 9 g)、断髄によって、この低 MR 信号領域を完全に除去することで歯髄がどのような反応を呈するかを検証するために、さらなる実験をおこなうこととした。

MRI 撮影時に、矯正器具やインプラント体などの金属やその他の歯科材料が磁化率アーチファクトの原因になり得るかについての検証は過去に報告(Bohner et al. 2022)があるが、断髄実験に使用する MTA などの充填材料が、磁化率アーチファクトの原因になり得るかについての報告はほとんど認められない。そのため、断髄実験に用いる歯科材料における磁化率アーチファクトについて検証をおこなった結果、いずれの材料についてもその発生は認められなかった (図

10 a-d). 過去の報告 (Graves and Mitchell 2013) では、主に磁化率の相違が磁化率アーチファクトの原因になることが示されている。そのため、今回磁化率アーチファクトが認められなかったのは、用いた歯科材料中に磁性金属が含まれていない、もしくはごく微量にしか含まれていなかったため、試料内において磁化率の相違がほとんど発生しなかったためであると考えられる。

磁化率アーチファクトを引き起こさないことが判明した歯科材料を用いて、低 MR 信号領域を除去する断髄をおこなった結果、術後 6 週間において、断髄部直下に第三象牙質の形成が認められ (図 11 c, e-g), また歯髄で明らかな炎症反応は呈されておらず、MMP9 の発現も認められなかった (図 11 e-g, 図 12 c-e, g-i, k-m)。さらに、根尖周囲組織にも炎症所見が認められなかった (図 11 h, 図 12 f, j, n) ことから、う蝕の進行により不可逆性炎症を発症していた歯髄組織が、断髄で除去されることにより、創傷治癒機転がはたらき始めたことが示された。これは、う蝕などの感染源が適切に除去された歯髄では、それまで浸潤していた T リンパ球などの炎症性細胞が消退し、創傷治癒が導かれるとする過去の報告 (Yoshida et al. 2003) とも一致する。さらに低 MR 信号領域および MMP9 発現領域を物理的に除去後の歯髄においては、MMP9 の発現が認められず、炎症反応が消退し創傷治癒が誘導されたことから、MMP9 が不可逆性歯髄炎のマーカーのひとつとして実証されたと考えられる。

さらに、断髄後の T2 強調画像では、近心根において MR 信号が認められ (図 11 d), 歯髄における MR 信号は、歯髄の生活反応を指し示すものであるという過去の報告から (Iohara et al. 2016; Nakashima et al. 2017), 術後に近心根の歯髄組織において生活反応があることが非侵襲的に示された。一方、同一断面における断髄後の遠心根については MR 信号は認められなかった (図 11 d). これはラット下顎第一臼歯の遠心根管の頬舌径が概ね 100 μm 程度であるのに対して、今回の T2 強調画像のスライス厚さが 300 μm と大きかったことから、遠心根管を撮像できなかったためと考えられる。しかし、病理組織学的評価において、術後の遠心根内の歯髄組織においては明らかな炎症所見は認められず (図 11 e, f, 図 12 c, d, g, h, k, l), また遠心歯冠部において第三象牙質の形成等を認めることから (図 11 c, e, f), T2 強調画像では撮像できていなくても、生活力を維持していると考えられた。以上のことから、exposed 群の歯髄における低 MR 信号領域を除去したところ、保存した歯髄が創傷治癒傾向を示したことから、不可逆性炎症領域が低 MR 信号領域内に含まれているということが示された。

本研究では 7T MRI という、超高磁場 MRI を用いて歯髄の病態観察をおこなったが、現在の日本では臨床において使用可能な静磁場の上限は 3T であり、7T MRI を実臨床で用いることは困難である。しかし、3T MRI を用いたとして

も、歯列の撮影を目的として調整された適切な受信用コイルを使用すれば、ヒト歯髄であれば診断可能レベルの画像が撮影できることが報告されている (Juerchott et al. 2022) . 今後、本研究結果をもとに、臨床で用いられている MRI を用いた患者の歯髄炎診断に関する研究が実施可能となり、歯髄診断への MRI の臨床導入が、近い将来に実現できることが期待される。

本研究により、超高磁場 MRI を用いることで、これまで実現困難であった歯髄組織における不可逆性炎症を発症した領域を検知可能な、非侵襲的かつ定量的な術前診断技術の基盤が確立された。一方で、断髄を始めとする歯髄保存療法の高い成功率を達成するためには、術前診断に加えて、術中における診断技術の確立も重要な因子であると考えられる (ESE 2019; AAE 2021; Duncan 2022) . しかし、術中診断の実現に必要な不可欠な不可逆性炎症領域に特異的な分子マーカーに対する検証は未だ十分とは言えない。今後は、この不可逆性炎症領域を含むと示された低 MR 信号領域に対して、網羅的な遺伝子およびタンパク質解析をおこなう予定である。これにより、不可逆性歯髄炎に特異的な分子マーカーが特定されれば、歯髄炎の術中診断も実現可能となり、歯髄保存療法の予知性および成功率がこれまでよりも改善していくことが期待される。

VII. 結論

超高磁場 MRI を用いることで，う蝕の侵襲により不可逆性炎症に陥った歯髓の領域を選択的に術前診断可能であることが明らかとなり，歯髓炎の新規非侵襲的および定量的診断法の基盤が確立された。

VIII. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究をおこなう機会を与えて頂き，御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座 林 美加子教授に，謹んで感謝の意を表します．さらに，本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座 高橋 雄介博士，岡本基岐博士に心より感謝いたします．また，本研究の遂行にあたり様々な御指導と御協力を賜りました大阪大学大学院医学系研究科生体物理工学講座 齋藤 茂芳博士に厚く御礼申し上げます．最後に，本研究に対して御理解，御協力頂きました大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座の諸先生方に心から感謝いたします．

IX. 参考文献

- AAE. 2021. American Association of Endodontists position statement on vital pulp therapy. *J Endod.* 47(9):1340–1344.
- Alghaithy RA, Qualtrough AJE. 2017. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review. *Int Endod J.* 50(2):135–142.
- Allison E, Edirimanne S, Matthews J, Fuller SJ. 2023. Breast cancer survival outcomes and tumor-associated macrophage markers: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Ther.* 11(1):27–48.
- Al-Natour B, Rankin R, McKenna R, McMillan H, Zhang SD, About I, Khan AA, Galicia JC, Lundy FT, El-Karim IA. 2021. Identification and validation of novel biomarkers and therapeutics for pulpitis using connectivity mapping. *Int Endod J.* 54(9):1571–1580.
- Asgary S, Eghbal MJ, Ghoddusi J. 2014. Two-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: An ongoing multicenter randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 18(2):635–641.
- Asgary S, Hassanizadeh R, Torabzadeh H, Eghbal MJ. 2018. Treatment outcomes of 4 vital pulp therapies in mature molars. *J Endod.* 44(4):529–535.
- Assaf AT, Zrnc TA, Remus CC, Khokale A, Habermann CR, Schulze D, Fiehler J, Heiland M, Sedlacik J, Friedrich RE. 2015. Early detection of pulp necrosis and dental vitality after traumatic dental injuries in children and adolescents by 3-Tesla magnetic resonance imaging. *J Craniomaxillofac Surg.* 43(7):1088–1093.
- Assaf AT, Zrnc TA, Remus CC, Schönfeld M, Habermann CR, Riecke B, Friedrich RE, Fiehler J, Heiland M, Sedlacik J. 2014. Evaluation of four different optimized magnetic-resonance-imaging sequences for visualization of dental and maxillo-mandibular structures at 3 T. *J Craniomaxillofac Surg.* 42(7):1356–1363.
- Ather A, Patel B, Gelfond JAL, Ruparel NB. 2022. Outcome of pulpotomy in permanent teeth with irreversible pulpitis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 12(1):19664.
- Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. 2004. The long - term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.* 31(9):749–757.
- Bakhtiar H, Nekoofar MH, Aminishakib P, Abedi F, Naghi Moosavi F, Esnaashari E, Azizi A, Esmailian S, Ellini MR, Mesgarzadeh V, et al. 2017. Human pulp responses to partial pulpotomy treatment with TheraCal as compared with Biodentine and ProRoot MTA: A clinical trial. *J Endod.* 43(11):1786-1791.
- Barran P, Fellingner W, Warren CE, Dennis JW, Ziltener HJ. 1997. Modification of CD43

- and other lymphocyte O-glycoproteins by core 2 N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology*. 7(1):129–136.
- Bartusik-Aebischer D, Bober Z, Zalejska-Fiolka J, Kawczyk-Krupka A, Aebischer D. 2022. Multinuclear MRI in drug discovery. *Molecules*. 27(19):6493.
- Batool A, Vaithilingam RD, Mohamad Hassan NH, Safii SH, Saub R. 2023. Evaluating the potential of matrix metalloproteinase as a diagnostic biomarker in rheumatoid arthritis and periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (United States)*. 102(41): E35340.
- Bohner L, Hanisch M, Sesma N, Blanck-Lubarsch M, Kleinheinz J. 2022. Artifacts in magnetic resonance imaging caused by dental materials: a systematic review. *Dentomaxillofac Radiol*. 51(6):31.
- Bubrick EJ, Gholipour T, Hibert M, Cosgrove GR, Stufflebeam SM, Young GS. 2022. 7T versus 3T MRI in the presurgical evaluation of patients with drug-resistant epilepsy. *J Neuroimaging*. 32(2):292–299.
- Cankar K, Vidmar J, Nemeth L, Serša I. 2020. T 2 mapping as a tool for assessment of dental pulp response to caries progression: An in vivo MRI study. *Caries Res*. 54(1):24–35.
- Chen E, Abbott P V. 2011. Evaluation of accuracy, reliability, and repeatability of five dental pulp tests. *J Endod*. 37(12):1619–1623.
- Chen M, Zeng J, Yang Y, Wu B. 2020. Diagnostic biomarker candidates for pulpitis revealed by bioinformatics analysis of merged microarray gene expression datasets. *BMC Oral Health*. 20(1):279.
- Cheng F, Zhang M, Wang Q, Xu H, Dong X, Gao Z, Chen J, Wei Y, Qin F. 2018. Tooth loss and risk of cardiovascular disease and stroke: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS One*. 13(3): e0194563.
- Cheng K, Duan Q, Hu J, Li C, Ma X, Bian X, Duan C, Xiong Y, Lin J, Lu H, et al. 2023. Evaluation of postcontrast images of intracranial tumors at 7T and 3T MRI: An intra-individual comparison study. *CNS Neurosci Ther*. 29(2):559–565.
- Clarke MA, Witt AA, Robison RK, Fleishman S, Combes AJE, Houston D, Prock LE, Sweeney G, O’Grady KP, McKnight CD, et al. 2023. Cervical spinal cord susceptibility-weighted MRI at 7T: Application to multiple sclerosis. *Neuroimage*. 284(15):120460.
- Cushley S, Duncan HF, Lappin MJ, Tomson PL, Lundy FT, Cooper P, Clarke M, El Karim IA. 2019. Pulpotomy for mature carious teeth with symptoms of irreversible pulpitis: A systematic review. *J Dent*. 88:103158.
- Cvek M. 1978. Scientific articles a clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod*. 4(8):232–237.

- Donnelly A, Foschi F, McCabe P, Duncan HF. 2022. Pulpotomy for treatment of complicated crown fractures in permanent teeth: A systematic review. *Int Endod J*. 55(4):290–311.
- Duncan HF. 2022. Present status and future directions—Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J*. 55(S3):497–511.
- Edwards D, Bailey O, Stone SJ, Duncan H. 2021. How is carious pulp exposure and symptomatic irreversible pulpitis managed in UK primary dental care? *Int Endod J*. 54(12):2256–2275.
- Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. 2013. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 46(6):573–580.
- ESE. 2019. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J*. 52(7):949–973.
- Evans D, Reid J, Strang R, Stirrups D. 1999. A comparison of laser Doppler flowmetry with other methods of assessing the vitality of traumatised anterior teeth. *Dent Traumatol*. 15(6):284–290.
- Fang WL, Jiang MJ, Gu BB, Wei YM, Fan SN, Liao W, Zheng YQ, Liao SW, Xiong Y, Li Y, et al. 2018. Tooth loss as a risk factor for dementia: Systematic review and meta-analysis of 21 observational studies. *BMC Psychiatry*. 18(1):345.
- Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, Lebecque S, Staquet MJ. 2009. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 312(5):425–436.
- Flügge T, Gross C, Ludwig U, Schmitz J, Nahles S, Heiland M, Nelson K. 2023. Dental MRI-only a future vision or standard of care? A literature review on current indications and applications of MRI in dentistry. *Dentomaxillofac Radiol*. 52(4):20220333.
- Flügge T, Hövener JB, Ludwig U, Eisenbeiss AK, Spittau B, Hennig J, Schmelzeisen R, Nelson K. 2016. Magnetic resonance imaging of intraoral hard and soft tissues using an intraoral coil and FLASH sequences. *Eur Radiol*. 26(12):4616–4623.
- Fouad AF. 2022. Molecular characterization of irreversible pulpitis: A protocol proposal and preliminary data. *Front Dent Med*. 3:867414.
- Fuks AB, Bielak S, Chosak A. 1982. Clinical and radiographic assessment of direct pulp capping and pulpotomy in young permanent teeth. *Pediatr Dent*. 4(3):240–244.
- Gahleitner A, Solar · P, Nasel · C, Homolka · P, Youssefzadeh · S, Ertl · L, Schick · S. 1999. Die magnetresonanztomo-graphie in der dentalradiologie(dental-MRT). *Dentalradiologie*. 39:1044–1050.
- Gopikrishna V, Tinagupta K, Kandaswamy D. 2007. Evaluation of efficacy of a new custom-made pulse oximeter dental probe in comparison with the electrical and thermal tests for

- assessing pulp vitality. *J Endod.* 33(4):411–414.
- Graves MJ, Mitchell DG. 2013. Body MRI artifacts in clinical practice: A physicist's and radiologist's perspective. *J Magn Reson Imaging.* 38(2):269–287.
- Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. 2010. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 26(6):466–475.
- Heyeraas KJ, Berggreen E. 1999. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(3):328–336.
- Hosoya N, Takigawa T, Horie T, Maeda H, Yamamoto Y, Momoi Y, Yamamoto K, Okiji T. 2019. A review of the literature on the efficacy of mineral trioxide aggregate in conservative dentistry. *Dent Mater J.* 38(5):693–700.
- Huang H, Okamoto M, Watanabe M, Matsumoto S, Moriyama K, Komichi S, Ali M, Matayoshi S, Nomura R, Nakano K, et al. 2023. Development of rat caries-induced pulpitis model for vital pulp therapy. *J Dent Res.* 102(5):574–582.
- Idiyatullin D, Corum C, Moeller S, Prasad HS, Garwood M, Nixdorf DR. 2011. Dental magnetic resonance imaging: Making the invisible visible. *J Endod.* 37(6):745–752.
- Iohara K, Fujita M, Ariji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, Takashima A, Nakashima M. 2016. Assessment of pulp regeneration induced by stem cell therapy by magnetic resonance imaging. *J Endod.* 42(3):397–401.
- Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. 1995. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Archs oral Biol.* 40(7):609–614.
- Juerchott A, Jelinek C, Kronsteiner D, Jende JME, Kurz FT, Bendszus M, Heiland S, Hilgenfeld T. 2022. Quantitative assessment of contrast-enhancement patterns of the healthy dental pulp by magnetic resonance imaging: A prospective in vivo study. *Int Endod J.* 55(3):252–262.
- Kahan RS. 1996. Evaluation of a pulse oximeter and customized probe for pulp vitality testing. *J Endod.* 22(3):105–109.
- Karayilmaz H, Kirzioğlu Z. 2011. Comparison of the reliability of laser doppler flowmetry, pulse oximetry and electric pulp tester in assessing the pulp vitality of human teeth. *J Oral Rehabil.* 38(5):340–347.
- Kawahara H, Inoue M, Okura K, Oshima M, Matsuka Y. 2020. Risk factors for tooth loss in patients undergoing mid-long-term maintenance: A retrospective study. *Int J Environ Res Public Health.* 17(17):1–11.
- Kritikou K, Greabu M, Imre M, Miricescu D, Totan AR, Burcea M, Stanescu-Spinu II, Spinu T. 2021. ILs and MMPs levels in inflamed human dental pulp: A systematic review. *Molecules.* 26(14):4129.

- Leahy MJ, De Mul FFM, Nilsson GE, Maniewski R. 1999. Principles and practice of the laser-doppler perfusion technique. *Technol Health Care*. 7(2–3):143–162.
- Levin LG. 2013. Pulp and periradicular testing. *J Endod*. 39(3 SUPPL.): S13–S19.
- Linsuwanont P, Wimonstutthikul K, Pothimoke U, Santiwong B. 2017. Treatment outcomes of mineral trioxide aggregate pulpotomy in vital permanent teeth with carious pulp exposure: the retrospective study. *J Endod*. 43(2):225–230.
- Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. 2015. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res*. 94(10):1355–1361.
- López-Janeiro Á, Padilla-Ansala C, de Andrea CE, Hardisson D, Melero I. 2020. Prognostic value of macrophage polarization markers in epithelial neoplasms and melanoma. A systematic review and meta-analysis. *Mod Pathol*. 33(8):1458–1465.
- Matsuyama Y, Aida J, Watt RG, Tsuboya T, Koyama S, Sato Y, Kondo K, Osaka K. 2017. Dental status and compression of life expectancy with disability. *J Dent Res*. 96(9):1006–1013.
- Mejäre IA, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, Norlund A, Petersson A, Portenier I, Sandberg H, et al. 2012. Diagnosis of the condition of the dental pulp: A systematic review. *Int Endod J*. 45(7):597–613.
- Mente J, Petrovic J, Gehrig H, Rampf S, Michel A, Schürz A, Pfefferle T, Saure D, Erber R. 2016. A prospective clinical pilot study on the level of Matrix Metalloproteinase-9 in dental pulpal blood as a marker for the state of Inflammation in the pulp tissue. *J Endod*. 42(2):190–197.
- Miron M, Lungeanu D, Ciora E, Ogodescu E, Todea C. 2020. Using laser-doppler flowmetry to evaluate the therapeutic response in dentin hypersensitivity. *Int J Environ Res Public Health*. 17(23):1–15.
- Mitsouras D, Lee TC, Liacouras P, Ionita CN, Pietilla T, Maier SE, Mulkern R V. 2017. Three-dimensional printing of MRI-visible phantoms and MR image-guided therapy simulation. *Magn Reson Med*. 77(2):613–622.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 11(11):723–737.
- Nagase H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. A mini-review. *Contrib Nephrol*. 107:85–93.
- Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H, Matsuo T. 2005. Expression of macrophage inflammatory protein 3 in human inflamed dental pulp tissue. *J Endod*. 31(2):84–7.
- Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Aiji Y, Matsushita K. 2017. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical

- study. *Stem Cell Res Ther.* 8(1):61.
- Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. 2007. Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature - Part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J.* 40(12):921–939.
- Novak ML, Koh TJ. 2013. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol.* 183(5):1352–1363.
- Oh B, Han DH, Han KT, Liu X, Ukken J, Chang C, Dounis K, Yoo JW. 2018. Association between residual teeth number in later life and incidence of dementia: A systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr.* 18(1) : (1)48.
- Ooshima T, Sumi N, Izumitani A, Sobue S. 1988. Maternal transmission and dental caries induction in sprague-dawley rats infected with *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol.* 32(8):785–794.
- Parirokh M, Torabinejad M. 2010. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 36(1):16–27.
- Peng J, Song Jukun, Han J, Chen Z, Yin X, Zhu J, Song Jinlin. 2019. The relationship between tooth loss and mortality from all causes, cardiovascular diseases, and coronary heart disease in the general population: Systematic review and dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Biosci Rep.* 39(1): BSR20181773.
- Philip N, Suneja B. 2022. Minimally invasive endodontics: a new era for pulpotomy in mature permanent teeth. *Br Dent J.* 233(12):1035–1041.
- Polat S, Er K, Akpınar KE, Polat NT. 2004. The sources of laser doppler blood-flow signals recorded from vital and root canal treated teeth. *Arch Oral Biol.* 49(1):53–57.
- Rechenberg DK, Galicia JC, Peters OA. 2016. Biological markers for pulpal inflammation: A systematic review. *PLoS One.* 11(11): e0167289.
- Regatte RR, Schweitzer ME. 2007. Ultra-high-field MRI of the musculoskeletal system at 7.0T. *J Magn Reson Imaging.* 25(2):262–269.
- Ricucci D, Siqueira JF, Li Y, Tay FR. 2019. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *J Dent.* 86:41–52.
- Sambandam V, Neelakantan. 2014. Matrix metalloproteinases (MMP) in restorative dentistry and endodontics. *J Clin Pediatr Dent.* 39(1):57–59.
- Sanjay M, Ernest L. 2018. White and Pharoah's oral radiology: principle and interpretation. Elsevier. 8th:218–238.
- Schmitt JM, Webber RL, Walker EC. 1991. Optical determination of dental pulp vitality. *IEEE Trans Biomed Eng.* 38(4):346–352.
- Schnettler JM, Wallace JA. 1991. Pulse oximetry as a diagnostic tool of pulpal vitality. *J*

- Endod. 17(10):488–90.
- Sharma C, Dobson GP, Davenport LM, Morris JL, Letson HL. 2021. The role of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor TIMP-1 in burn injury: a systematic review. *Int J Burn Trauma*. 11(4):275–288.
- Smith AS, Weinstein MA, Modic MT, Pavlicek W, Rogers LR, Budd TG, Bukowski RM, Purvis JD, Weick JK, Duchesneau' PM. 1985. Magnetic resonance with marked T2-weighted images: improved demonstration of brain lesions, tumor, and edema. *AJR Am J Roentgenol*. 145(5):949–955.
- Taha NA, Khazali MA. 2017. Partial pulpotomy in mature permanent teeth with clinical signs indicative of irreversible pulpitis: A randomized clinical trial. *J Endod*. 43(9):1417–1421.
- Torabinejad M, Parirokh M. 2010. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 36(2):190–202.
- Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. 2005. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod*. 31(12):860–862.
- Uesrichai N, Nirunsittirat A, Chuveera P, Srisuwan T, Sastraruji T, Chompu-inwai P. 2019. Partial pulpotomy with two bioactive cements in permanent teeth of 6- to 18-year-old patients with signs and symptoms indicative of irreversible pulpitis: a noninferiority randomized controlled trial. *Int Endod J*. 52(6):749–759.
- Wakai K, Naito M, Naito T, Kojima M, Nakagaki H, Umemura O, Yokota M, Hanada N, Kawamura T. 2013. Tooth loss and risk of hip fracture: A prospective study of male Japanese dentists. *Community Dent Oral Epidemiol*. 41(1):48–54.
- Wang J, Shi Q, Yuan T xian, Song Q lin, Zhang Y, Wei Q, Zhou L, Luo J, Zuo G, Tang M, et al. 2014. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 433:225–231.
- WHO. 2022. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. World Health Organization.:30–36.
- Wu Q, Li S, Li R, Chen X, Guo L, Zheng Y. 2022. The detection of pro-inflammatory cytokines in exudates from dental pulp tissues. *Cytokine*. 153:1558463.
- Xu L, Yang Z, Jin F, Duan YZ, Jin Y. 2011. Characterization of rat apical tissues in different root development stage. *Connect Tissue Res*. 52(5):393–400.
- Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. 2003. Class II antigen-presenting dendritic cell and nerve fiber responses to cavities, caries, or caries treatment in human teeth. *J Dent Res*. 82(6):422–427.
- Zanini M, Meyer E, Simon S. 2017. Pulp inflammation diagnosis from clinical to inflammatory mediators: A systematic review. *J Endod*. 43(7):1033–1051.

- Zhang SM, Wei CY, Wang Q, Wang L, Lu L, Qi FZ. 2021. M2-polarized macrophages mediate wound healing by regulating connective tissue growth factor via AKT, ERK1/2, and STAT3 signaling pathways. *Mol Biol Rep.* 48(9):6443–6456.
- Zhang YZ, Cao XY, Li XC, Chen J, Zhao YY, Tian Z, Zheng W. 2018. Accuracy of MRI diagnosis of early osteonecrosis of the femoral head: A meta-analysis and systematic review. *J Orthop Surg Res.* 13(1):167.

X. 図表

表 1 T2 強調画像, T2 map 画像の撮影諸条件

	T2 強調画像	T2 map 画像
Sequence type	fast spin echo 法	fast spin echo 法
Voxel size	$0.1 \times 0.1 \times 0.0363 \text{ mm}^3$	$0.125 \times 0.125 \times 0.0011 \text{ mm}^3$
Matrix	320×320	256×256
Field of view	$32 \times 32 \times 12 \text{ mm}^3$	$32 \times 32 \times 12 \text{ mm}^3$
Number of slices	20	20
slice thickness	0.3 mm	0.3 mm
Repetition time	3,500 msec	2,500 msec
Echo time	36 msec	9 ~ 108 msec (9 msec step 12 echo)
Bandwidth	122 Hz/pixel	122 Hz/pixel
Number of excitations	4	1
Echo train length	8	8
Time of acquisition	9 分 20 秒	1 分 20 秒

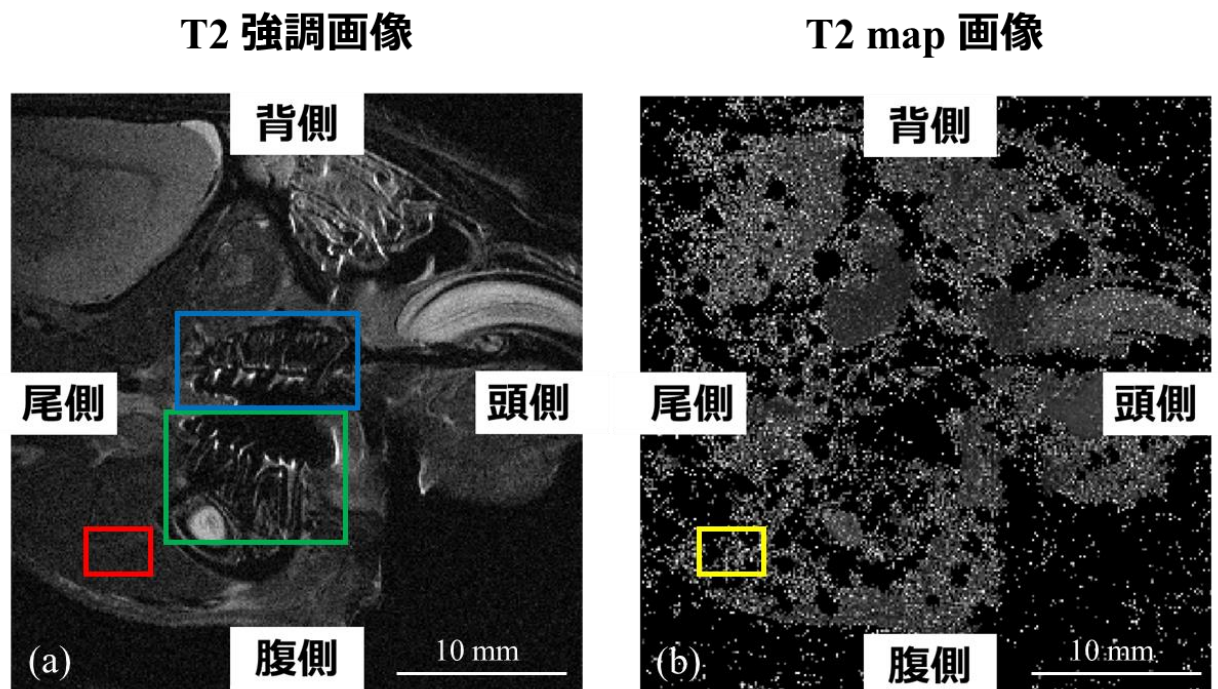


図 1 70 日齢におけるラット頭頸部の T2 強調画像，
および T2 map 画像 (矢状断)

70 日齢 SD ラット頭頸部の代表的な T2 強調画像 (a)，および T2 map 画像 (b) を示す (矢状断，同一撮影断面)．青枠は上顎臼歯部，緑枠は下顎臼歯部，赤枠は咬筋深部，黄枠は赤枠と同部位の咬筋深部を示す．

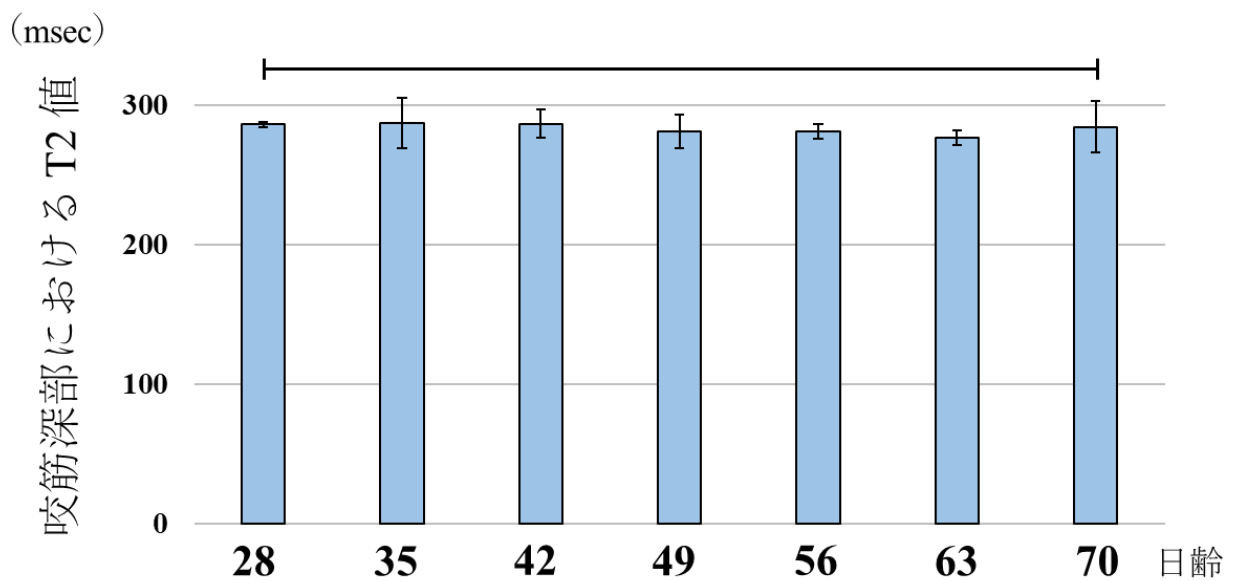


図 2 T2 map 画像上の咬筋深部における T2 値の経時的比較

健全 SD ラットの T2 map 画像上の咬筋深部における，T2 値を経時的に比較した結果を示す．同一線で示された群間においては，統計学的有意差は認めないことを表す（one-way ANOVA，Tukey test, $p > 0.05$ ，試料数 4）．

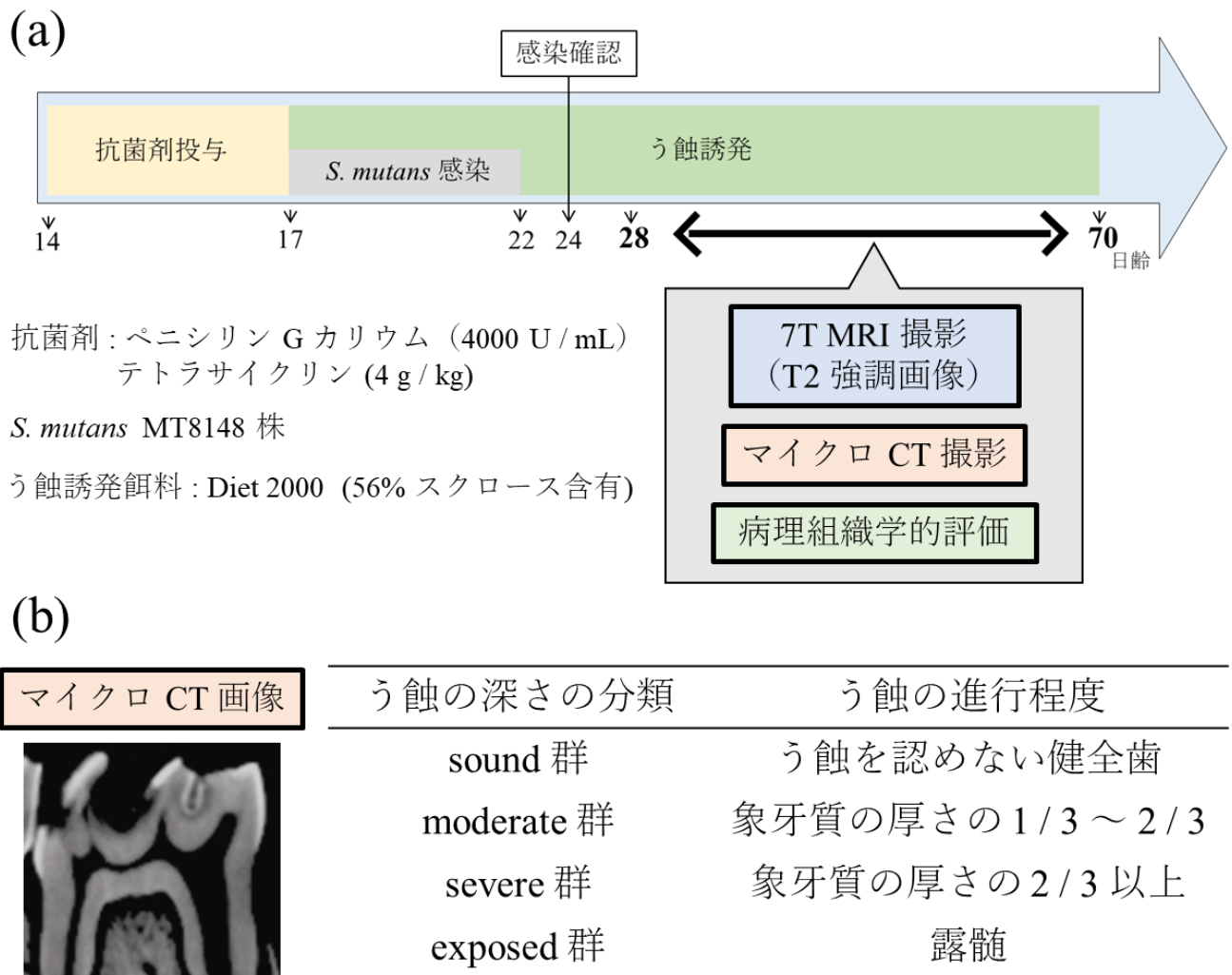


図 3 ラットう蝕由来歯髄炎モデルの概要

本研究で使用したラットう蝕由来歯髄炎モデルのタイムライン (a) とう蝕進行度の分類 (b) を示す.

本研究における全ての実験は、28 日齢から 70 日齢の間で行われ、必要に応じて 7T MRI による T2 強調画像の撮影、マイクロ CT 画像の撮影、病理組織学的評価をおこなった (a) .

う蝕の進行程度について、各時点において撮影されたマイクロ CT 画像より、sound, moderate, severe, および exposed 群に分類した (b) .

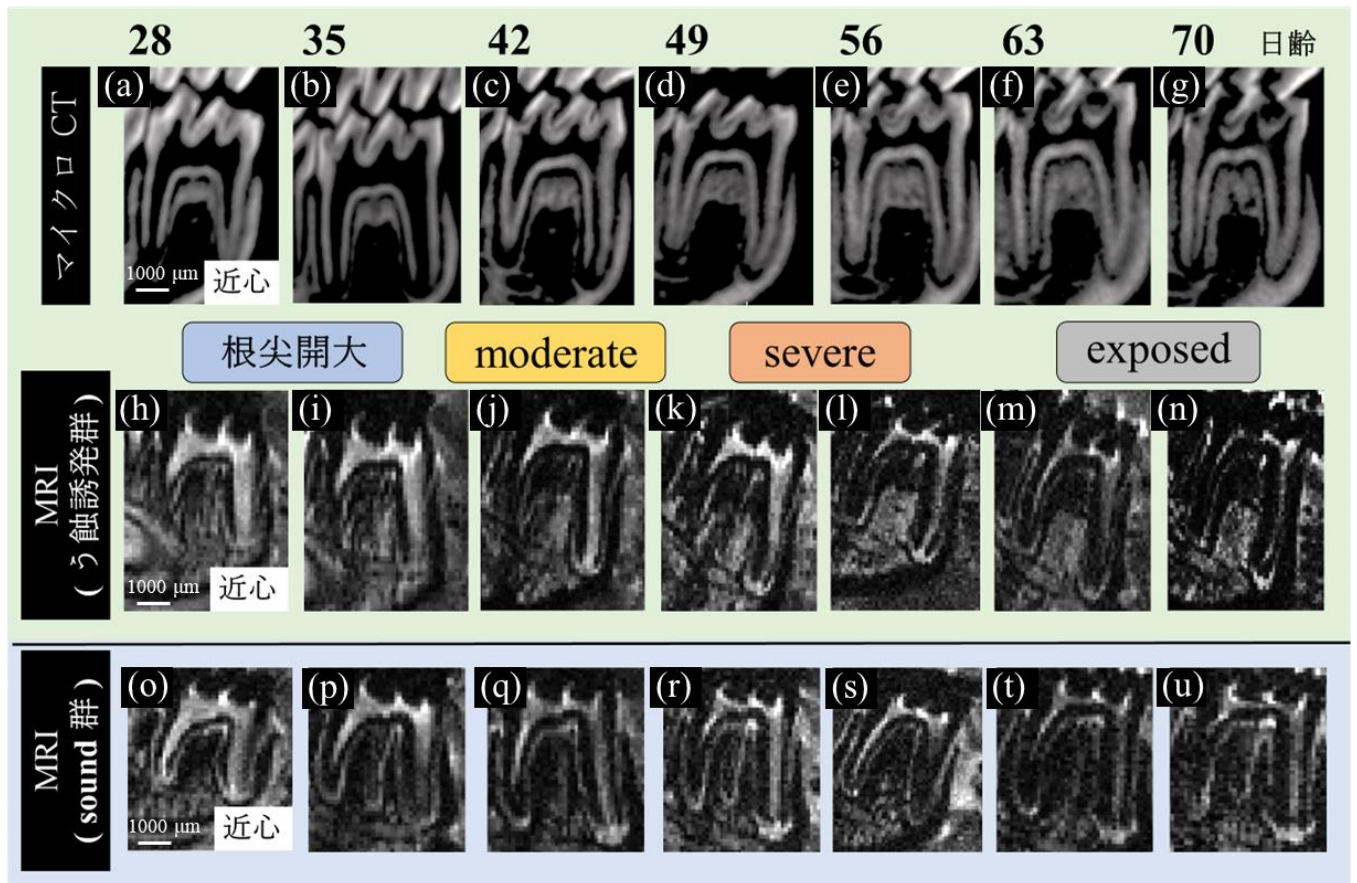


図 4 う蝕由来歯髄炎の経時的マイクロCT画像，およびT2強調画像

う蝕の進行および歯髄，根尖性歯周組織を経時的に撮影したマイクロCT画像（a-g），T2強調画像（h-n），および健全歯のT2強調画像（o-u）を示す．

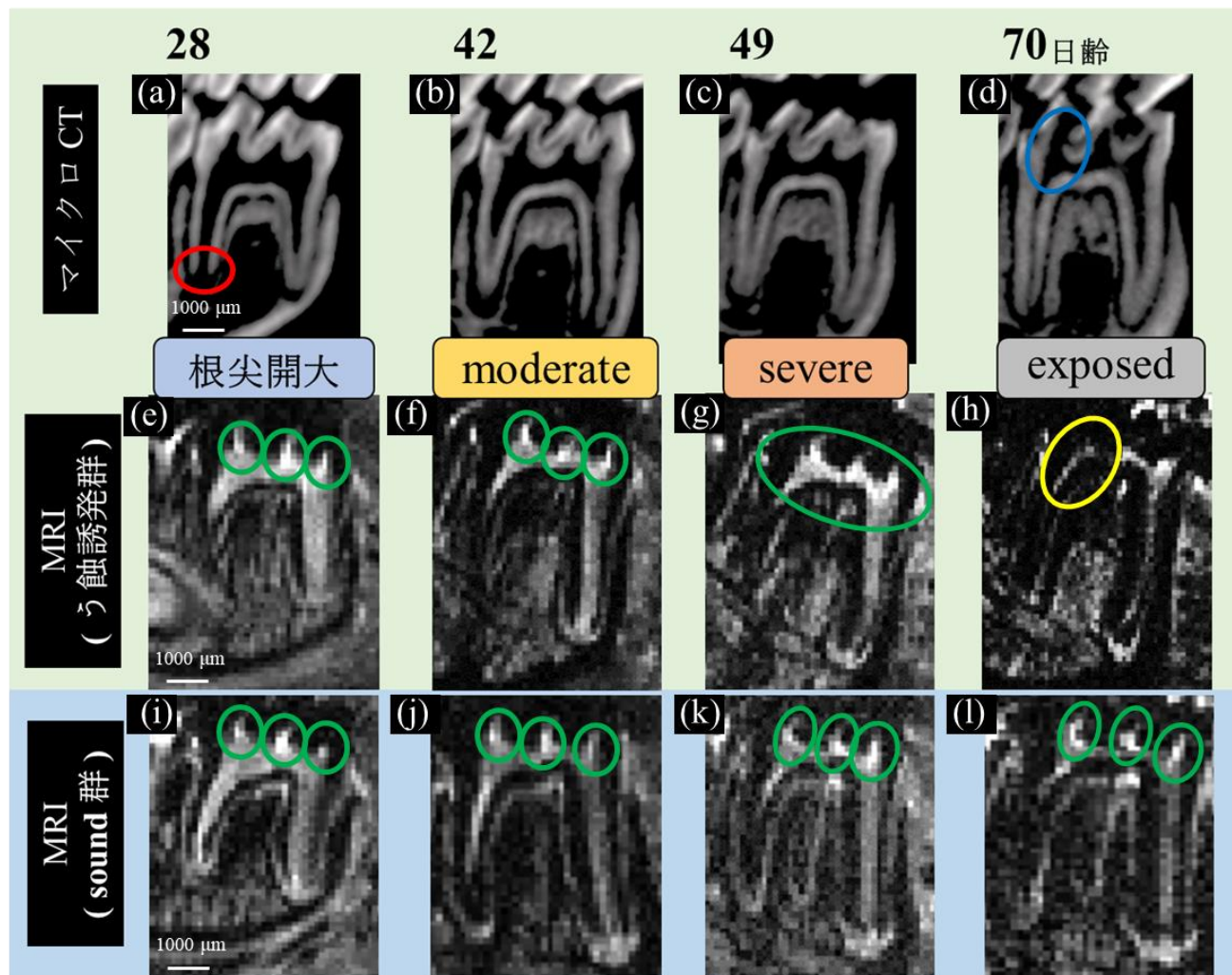


図 5 う蝕由来歯髄炎の経時的マイクロ CT 画像，および T2 強調画像

う蝕誘発群の各群における代表的なマイクロ CT 画像 (a-d)，T2 強調画像 (e-h)，および各同一日齢の健全歯の T2 強調画像 (i-l) を示す (図 4 の一部)。赤丸は開大した根尖，青丸は露髄部，緑丸は高 MR 信号領域，黄丸は低 MR 信号領域を示す。

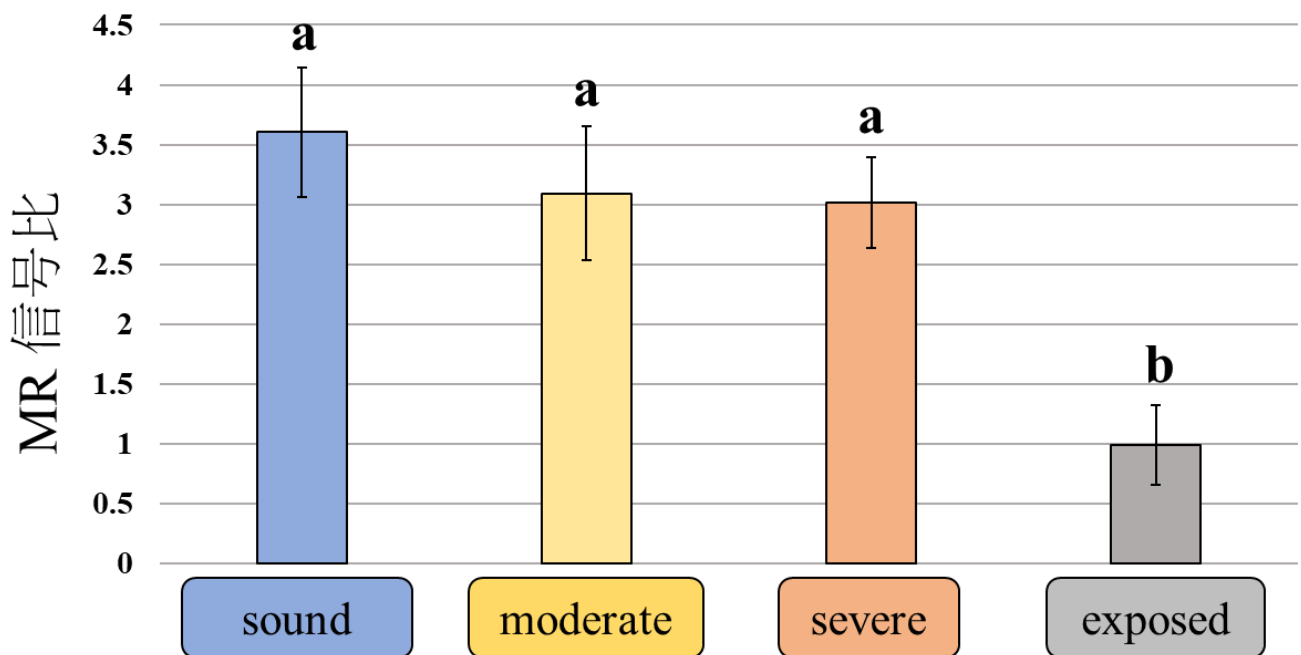


図 6 う蝕の進行段階における MR 信号比の定量評価

う蝕の進行段階ごとに，sound，moderate，および severe 群ではう蝕直下歯冠部歯髓の，exposed 群では露髓部直下の歯冠部歯髓の MR 信号比を定量評価した結果を示す．縦軸の MR 信号比は，咬筋深部の MR 信号強度に対する，歯冠部歯髓もしくは露髓部直下の歯冠部歯髓 MR 信号強度の比を表す．また，同一文字間においては，統計学的有意差は認めないことを表す．（one-way ANOVA，Tukey test， $p < 0.05$ ，試料数 8）

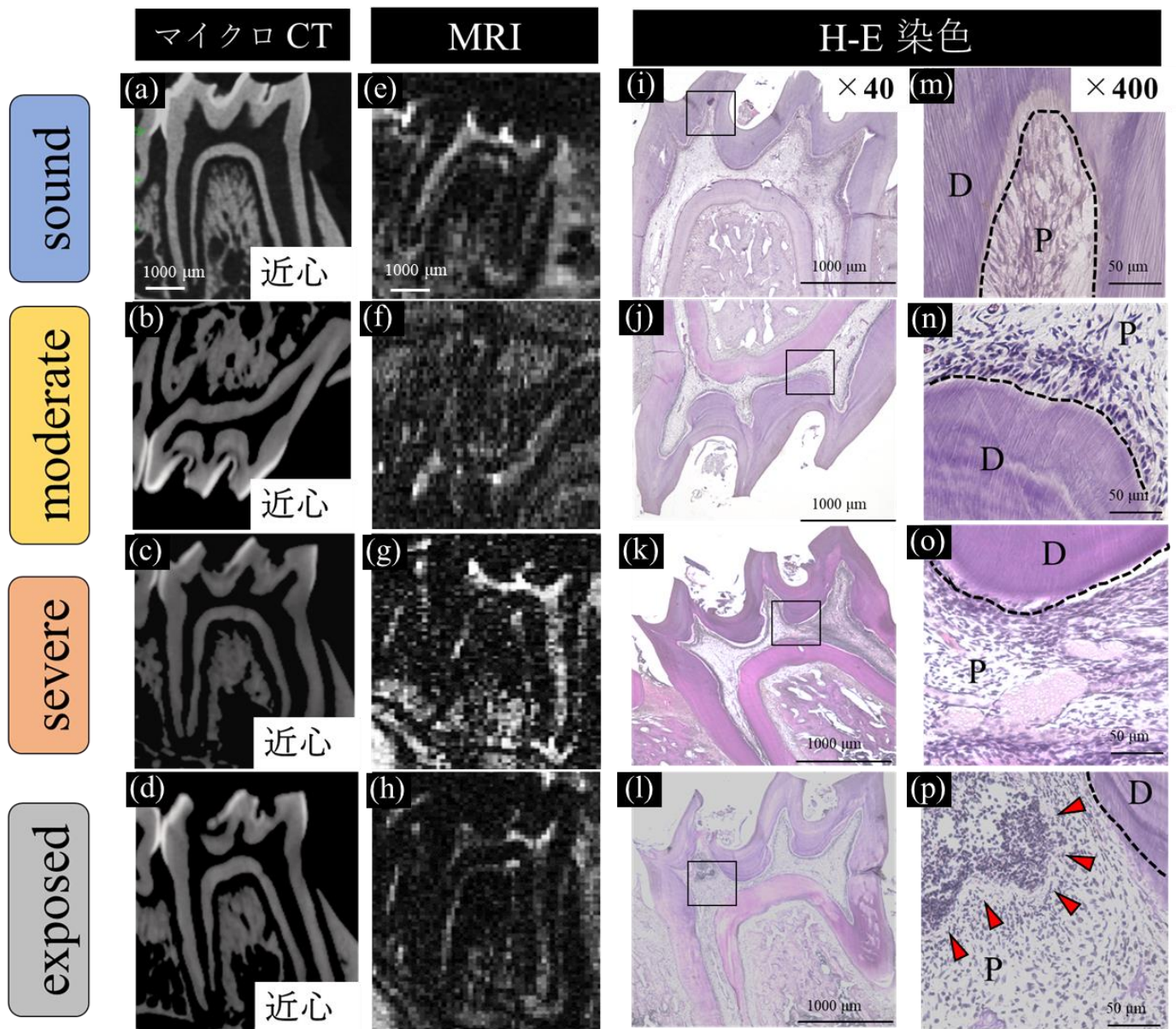


図 7 う蝕の進行段階におけるマイクロ CT 画像，T2 強調画像，および H-E 染色像

各う蝕の進行段階ごとの，マイクロ CT 画像（a-d），T2 強調画像（e-h）および H-E 染色の結果（i-p）を示す．赤矢尻は炎症性細胞様細胞の浸潤，D は象牙質，P は歯髄を示す．

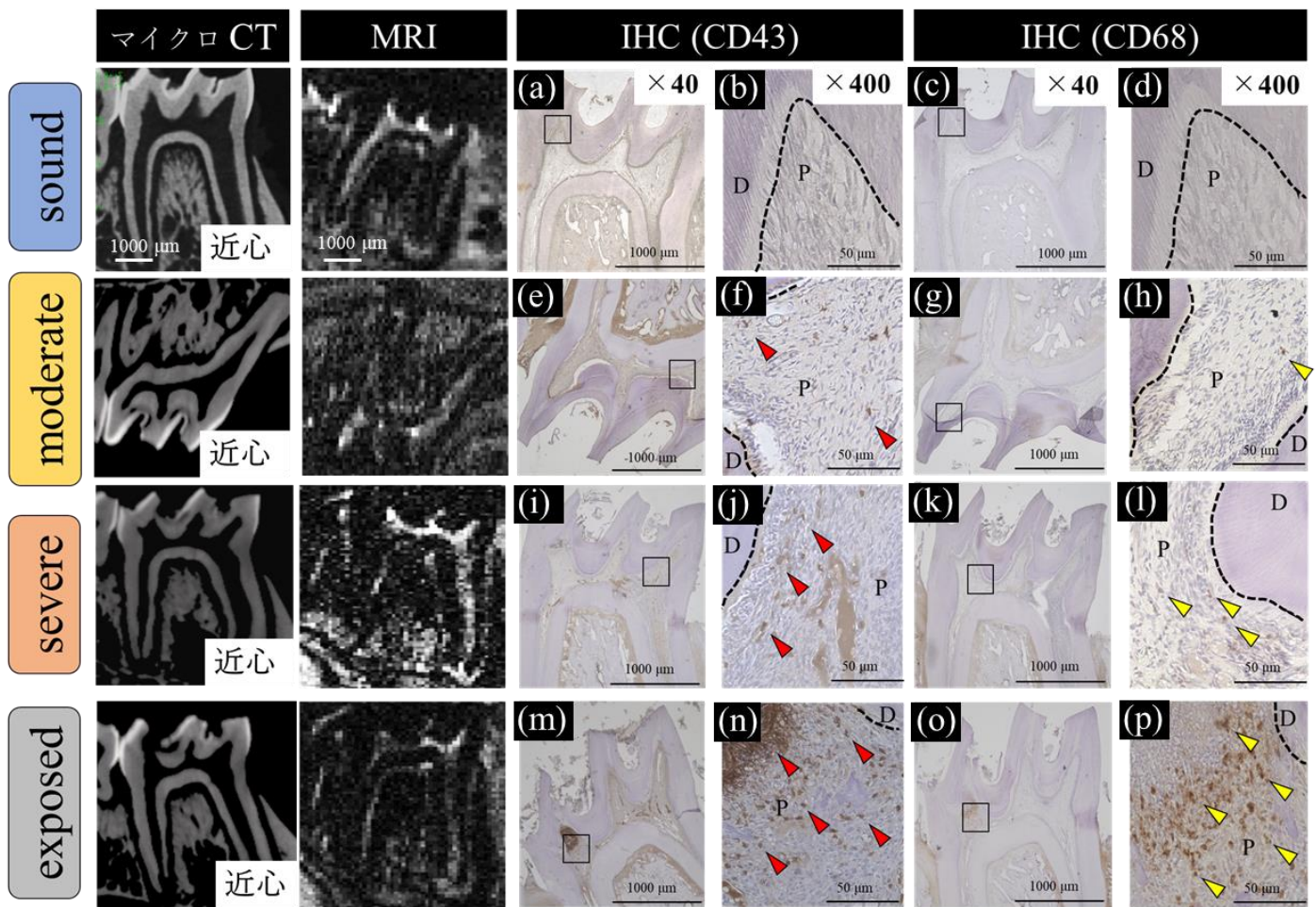


図 8 う蝕の進行段階におけるマイクロ CT 画像，T2 強調画像，
ならびに抗 CD43 抗体および抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学染色像

各う蝕の進行段階ごとの，マイクロ CT 画像，T2 強調画像，ならびに
抗 CD43 抗体 (a, b, e, f, i, j, m, n) および抗 CD68 抗体 (c, d, g, h,
k, l, o, p) を用いた免疫組織化学染色像を示す．赤矢尻は CD43 陽性細胞，
黄矢尻は CD68 陽性細胞，D は象牙質，P は歯髄を示す．

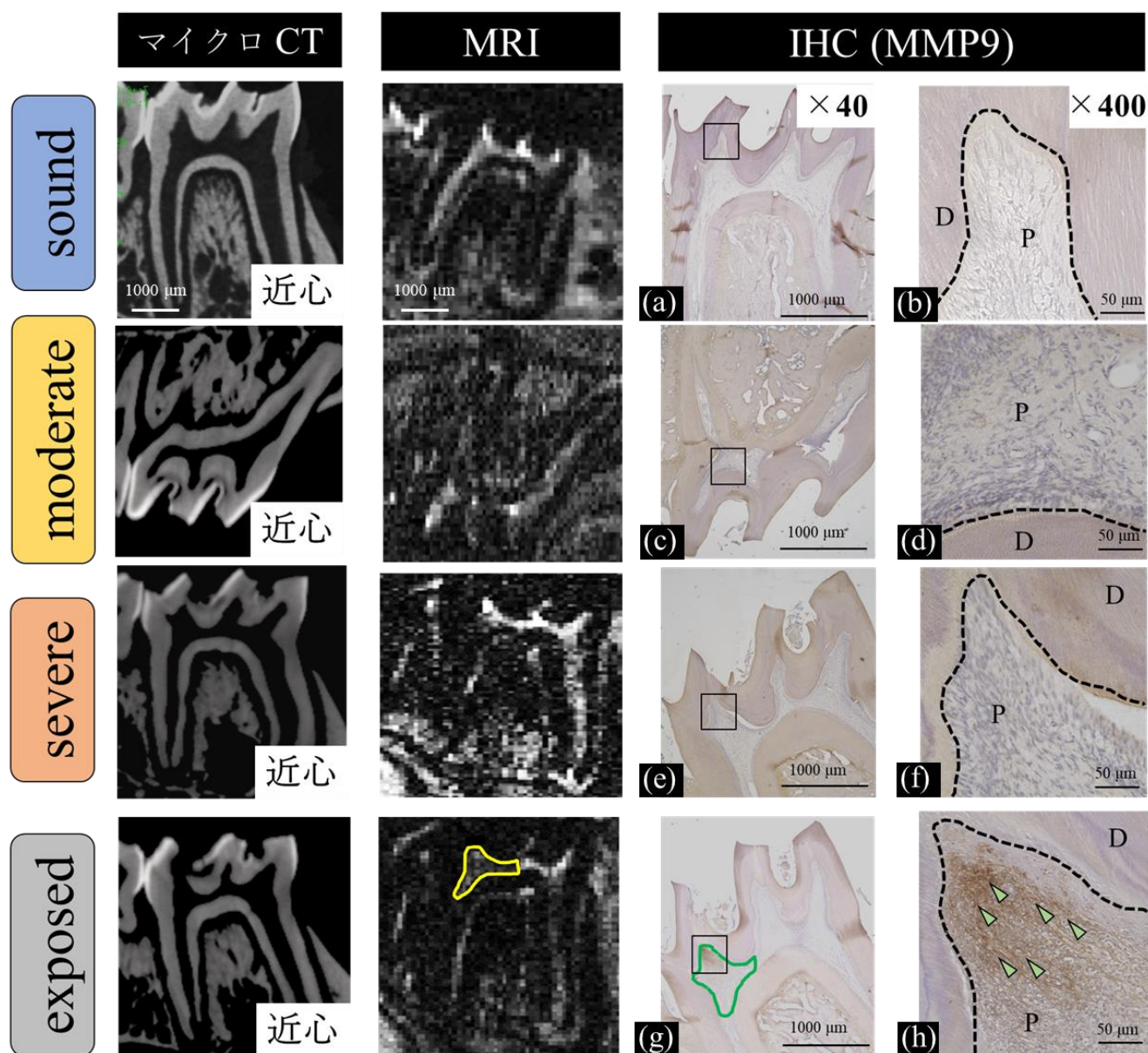


図 9 う蝕の進行段階におけるマイクロ CT 画像，T2 強調画像，および抗 MMP9 抗体を用いた免疫組織化学染色像

う蝕の進行段階ごとのマイクロ CT 画像，T2 強調画像，および抗 MMP9 抗体を用いた免疫組織化学染色像（a-h）を示す．黄枠は低 MR 信号領域，緑枠は MMP9 の陽性反応を認める部位，緑矢尻は MMP9 陽性部，D は象牙質，P は歯髄を示す．

表 2 ラット断髄実験に用いた歯科材料と組成

材料名	略称	Lot No.	組成 (WT%)
ProRoot [®] MTA	MTA	355831	ボルトランドセメント (主成分：ケイ酸カルシウム) (60 - 90%) , 酸化ビスマス (10 - 40%) , その他
クリアフィル [®] ユニバーサルボンド Quick ER	Quick	270396	Bis-GMA, MDP, HEMA, 親水性アミド系モノマー, シリカ系マイクロファイラー, エタノール, 光重合触媒, 化学重合促進剤, 精製水, フッ化ナトリウム, その他
クリアフィル [®] マジェスティ [®] ES Flow High	CR	1C0102	TEGDMA (10%未満) , 疎水性芳香族ジメタクリレート, シラン化バリウムガラスファイラー, シラン化シリカファイラー, カンファークイノン, 重合促進剤, 重合開始剤, その他

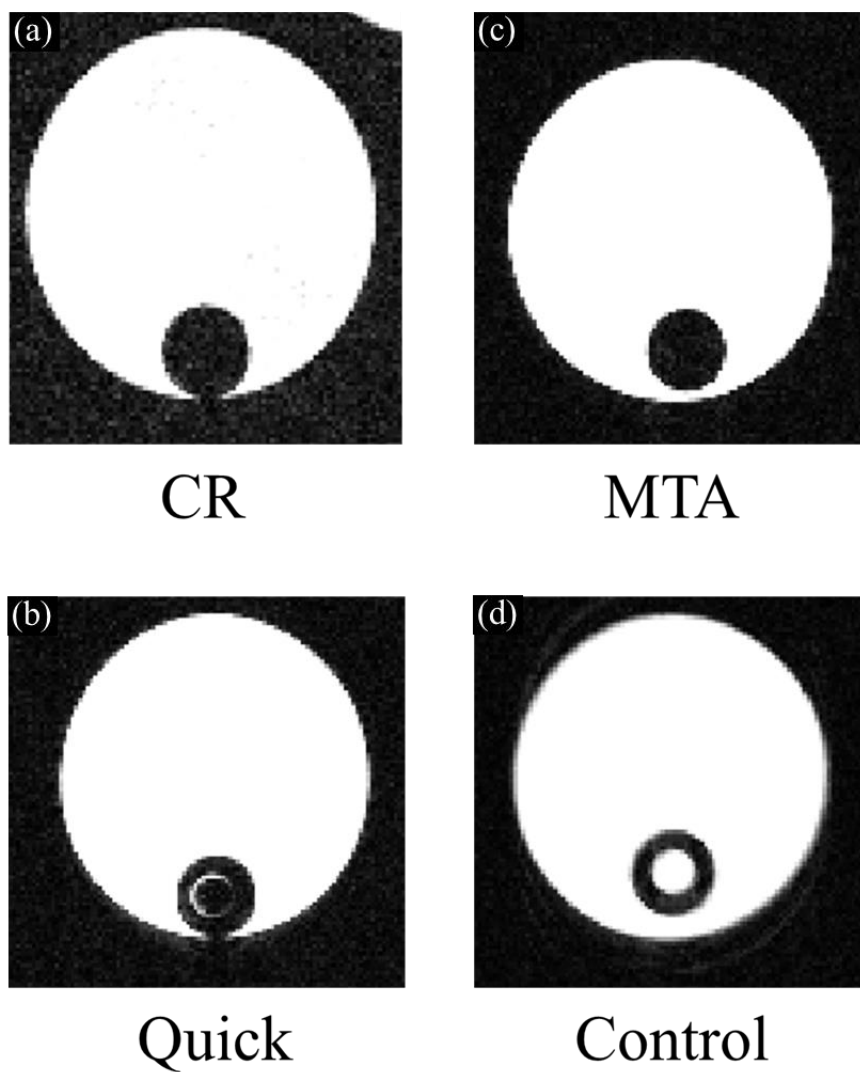


図 10 ラット断髄実験に用いた歯科材料の T2 強調画像

ラット断髄実験に用いた歯科材料の T2 強調画像を示す (a-d) . 各材料をテフロンチューブに充填後, 蒸留水で満たされたマイクロチューブ内に静置して撮影した. 各図の白色部は蒸留水が撮像されたものを示す.

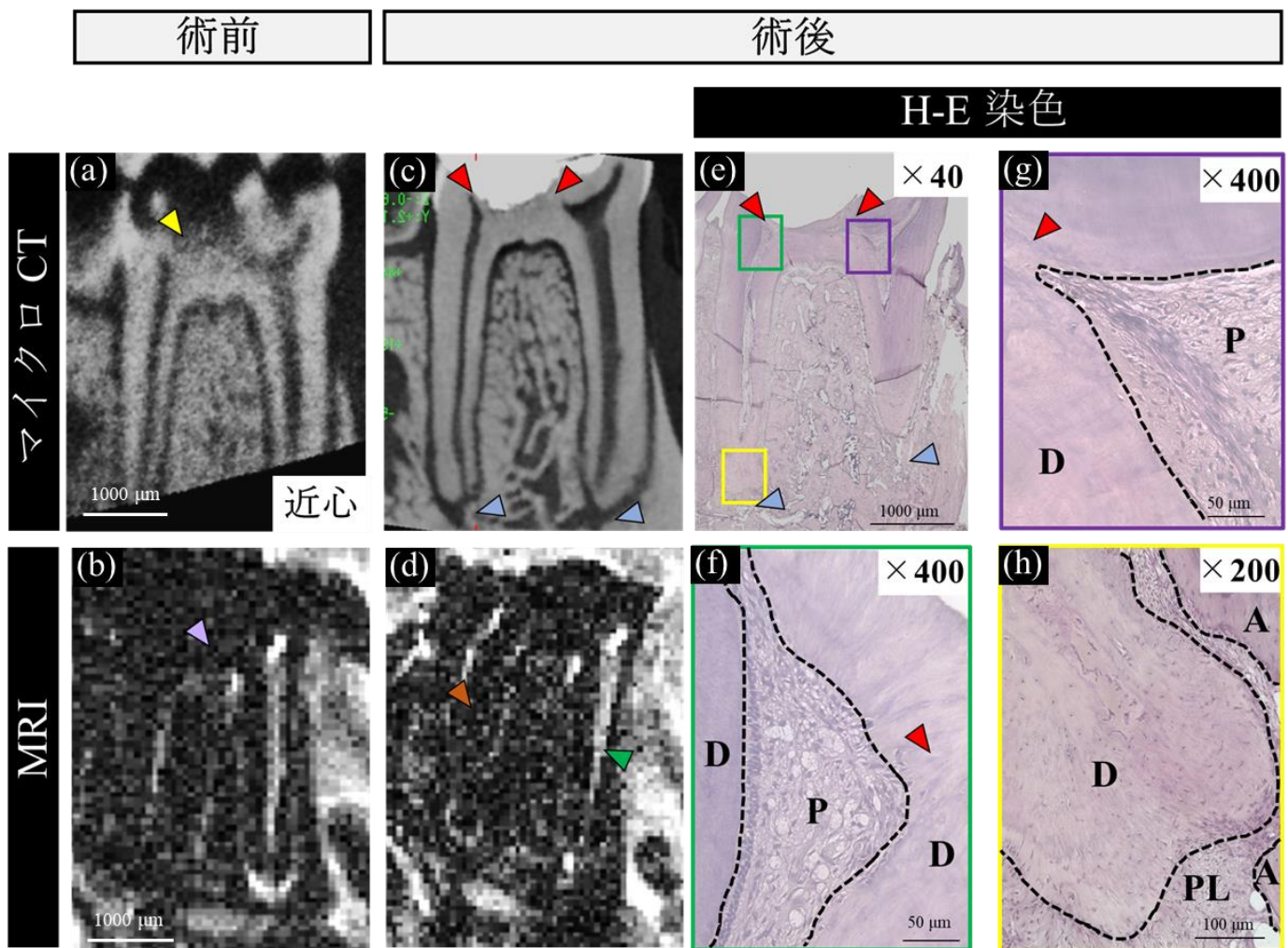


図 11 断髄実験の前後における，マイクロ CT 画像，T2 強調画像，および H-E 染色像

断髄実験の前後におけるマイクロ CT 画像 (a, b) , T2 強調画像 (c, d) , および H-E 染色像 (e-h) を示す. 黄矢尻は低 MR 信号領域に相当する歯髄腔，紫矢尻は低 MR 信号領域，赤矢尻は第三象牙質の形成部位，青矢尻は炎症反応や透過像を認めない根尖部，茶矢尻は断髄前後に生活反応が撮像されなかった遠心根，緑矢尻は断髄後に生活反応を認めた近心根，D は象牙質，P は歯髄，A は歯槽骨，PL は歯根膜を示す.

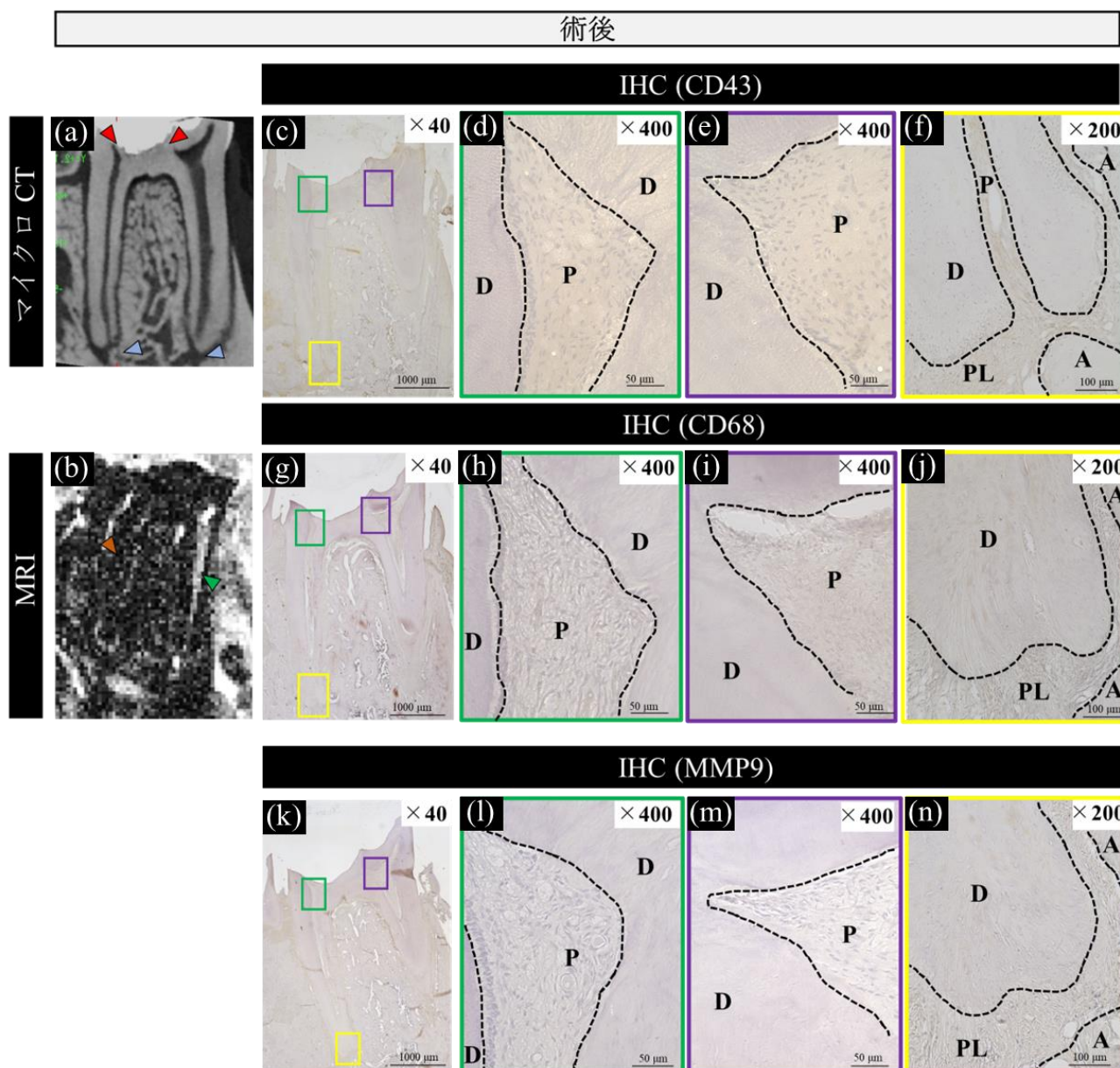


図 12 断髄実験後における，マイクロCT画像，T2強調画像，ならびに抗CD43抗体，抗CD68抗体，および抗MMP9抗体を用いた免疫組織化学染色像

断髄実験後のマイクロCT画像（a），T2強調画像（b），ならびに抗CD43抗体，抗CD68抗体，および抗MMP9抗体を用いた免疫組織化学染色像（c-f, g-j, k-n）を示す．赤矢尻は第三象牙質の形成部位，青矢尻は炎症反応や透過像を認めない根尖部，茶矢尻は断髄前後に生活反応が撮像されなかった遠心根，緑矢尻は断髄後に生活反応を認めた近心根，Dは象牙質，Pは歯髄，Aは歯槽骨，PLは歯根膜を示す．