

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10197

研究課題名(和文) 複雑な乳歯根管系の制御 - 歯根外部吸収への修復機構の誘導と歯根安定の獲得 -

研究課題名(英文) Control of complicated root canal system of primary teeth: Induction of repair mechanisms on resorbed part of outer root surface and acquisition of tooth root stability.

研究代表者

八若 保孝 (Yawaka, Yasutaka)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60230603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：根管治療において、超音波を用いた根管洗浄および水酸化カルシウム製剤の貼薬が、複雑な乳歯根管系の制御に重要な要素であることが把握された。さらに、ラットを用いた動物実験系において、臼歯の歯根外部吸収に対する水酸化カルシウム製剤の効果により、歯根外部吸収は抑制されること、セメント質の添加が生じることが明らかになった。これは、歯根吸収部の修復機構発現の一つと考えられた。細胞培養系において、歯根吸収モデルを作製することができたが、アルカリ性の拡散に関する再現性の問題から、水酸化カルシウム製剤の効果を検索するところまでは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳歯の根管治療は、その複雑な根管系により難しいといわれている。今回の研究成果により、難しいといわれている乳歯根管治療の予後向上の可能性が十分といえないが示された。小児における齲蝕は減少傾向にあるとはいえ、根管治療が必要となる重篤な齲蝕や外傷は存在しており、健全な成長発育が望まれる小児において、口腔機能の維持増進は重要な点の一つである。この口腔機能の維持増進は、健全な歯、歯列、咬合が必須であり、その点からも、意義ある結果となった。

研究成果の概要(英文)：Regarding the root canal treatments, it was showed that the important factors of the control of complicated root canal system of primary teeth were the root canal irrigation with ultrasonic and the root canal medication by calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>). In rat root resorption model in animal experiment, we can show the effects of Ca(OH)<sub>2</sub> showed inhibition of root outer resorption and occurrence of cementum deposition. We think cementum deposition is one of repair mechanisms on resorbed part.

We could construct a root resorption model in cell culture. But we cannot reach the step as to investigate effects of Ca(OH)<sub>2</sub> due to bad reproducibility of alkalinity diffusion.

研究分野：小児歯科学

キーワード：乳歯 根管治療 水酸化カルシウム製剤 pH 歯根吸収 セメント質 根管洗浄

## 1. 研究開始当初の背景

乳歯の根管治療は、複雑な乳歯根管系により永久歯と比較して十分な根管治療は不可能とされている。具体的には、側枝、副根管、槓状根管の存在、歯根および根管の彎曲、圧平などにより、十分な根管拡大ができないこと、後継永久歯胚が乳歯歯根に近接して存在すること、生理的歯根吸収が生じること、その生理的歯根吸収を妨げないため根尖部の封鎖ができないことなどの制約が存在する<sup>1)</sup>。小児歯科臨床では、根管拡大の制限など、条件付きでの対応がなされており、水酸化カルシウム製剤の根管充填、根管貼薬への応用が一般的となっている。永久歯において、感染根管におけるバイオフィームや根管治療後のスメア層に対する有効な根管洗浄方法や水酸化カルシウムの根尖からの拡散などの研究が報告されている<sup>2)</sup>。しかし、乳歯における同様な根管治療に関する研究はほとんど認められない。しかし、根管治療の成否により乳歯が保存不可能になる場合は、小児の健全な成長発育に対しては大きなマイナス要素となる。申請者は、これまでに生理的および病的歯根吸収を組織学的に研究し<sup>3,4)</sup>、乳歯の根尖性歯周炎における根管の細菌分布は、永久歯と異なり、根管内部および根管壁に局限していること、病的歯根吸収が無秩序に生じること、病的歯根吸収部位にセメント質が添加し歯根形態の修復が生じること（図1）などを解明した。

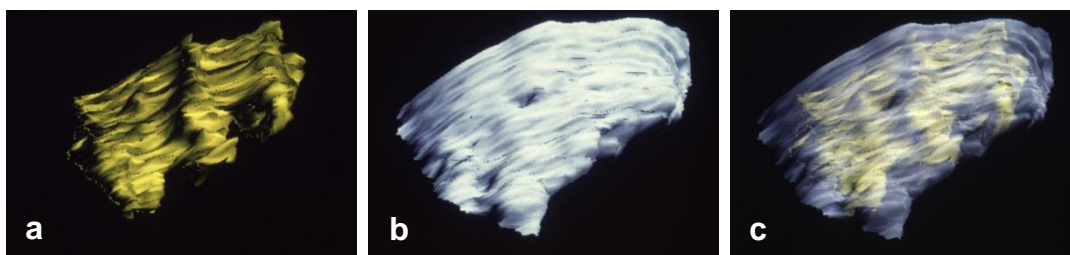


図1 根尖性歯周炎を有した乳歯根尖部の構造（組織切片より三次元構築した画像）

- a: 象牙質歯根吸収面 複雑な吸収面を呈する。
- b: セメント質面 比較的平坦な曲面を呈する。
- c: セメント質を透過性にした像 セメント質添加により歯根形態が修復されている。

また、永久歯および乳歯に関する有効な根管洗浄法に関する研究を行い、永久歯では、次亜塩素酸ナトリウムと EDTA を用いた超音波洗浄が、根管壁のスメア層の除去および象牙細管の開口に有効であるのに対し、乳歯では、次亜塩素酸ナトリウムのみを用いた超音波洗浄が、最も有効であることを明らかにした（図2）<sup>5)</sup>。さらに、良質な根管洗浄により、歯根外部吸収部へアルカリ性の拡散が認められることを明らかにした。また、ラットにおける歯根外部吸収モデルを作製し、水酸化カルシウム製剤による歯根外部吸収抑制効果を示すことができた（図3）<sup>6)</sup>。各方面からの研究により、以前と比較して乳歯根管治療の予後向上の可能性が高くなってきたといえる。しかし、現時点では乳歯の根管治療に確実な方法はまだ存在しない。これまでに得た情報を基礎に、良好な予後が確実に達成できる乳歯の根管治療法の開発は、乳歯の保存につながり、小児の成長発育において、きわめて大きな影響を与えることができる。

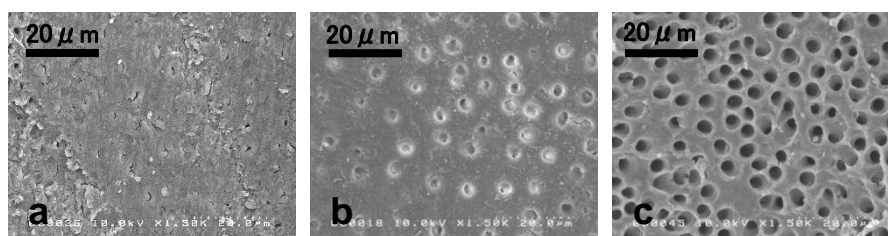


図2 乳歯歯根中央部根管内壁（SEM像）

- a: NaOCl と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の交互洗浄（シリンジ使用） スメア層で象牙細管は観察されない。
- b: NaOCl の超音波洗浄 スメア層が除去され、象牙細管が明瞭である。
- c: EDTA の超音波洗浄→NaOCl の超音波洗浄 スメア層は除去されているが、歯質が過度に脱灰されている。

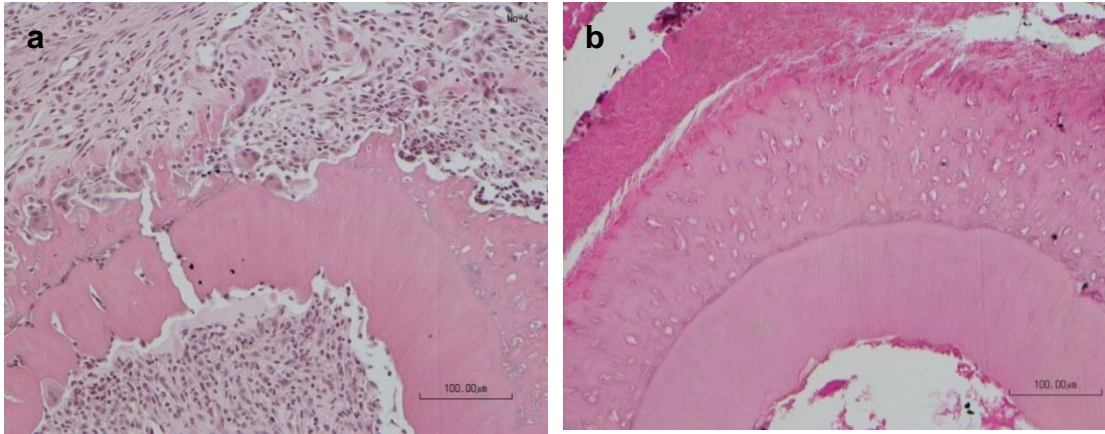


図3 ラット臼歯歯根の吸収状態 (H-E 染色)

- a: コントロール群 著明な歯根吸収により、残存歯根量(面積)が減少している。多数の吸収窩が歯根表面に認められ、セメント質が観察されない部分も認められる。多核巨細胞(破歯細胞)が歯根周囲に多数観察される。
- b: 実験群 著明な吸収窩は認められず、比較的一定した厚みの象牙質が観察される。セメント質も同様である。多核巨細胞(破歯細胞)が歯根周囲に観察されない。

## 2. 研究の目的

重篤な根尖性歯周炎や外傷により乳歯歯根の異常吸収が生じ、根管治療を実施しても歯根吸収の存在により予後不良で抜歯となる症例が存在する。研究の目的は、良好で確実な予後を獲得するための乳歯の根管治療法を開発するものである。その中で本研究は、培養系での破歯細胞に対する貼薬剤の効果を把握すること、さらにセメント質による修復機構を解明することにより有効な根管貼薬方法を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養系歯根吸収モデルの作製

北海道大学病院歯科診療センター小児・障害者歯科で抜去した乳歯および永久歯ならびに当教室の同門から研究・教育のために譲渡された抜去乳歯・永久歯を使用した。これらの歯に対し、根管拡大を行い、乳歯については次亜塩素酸ナトリウムと超音波治療器による根管洗浄を、永久歯については EDTA と超音波治療器による根管洗浄と次亜塩素酸ナトリウムと超音波治療器による根管洗浄を行い、根管試料を作製した。試料の歯根表面の軟組織およびセメント質を除去し、露出した象牙質部を研磨調整し、ラウンドバーを用いて便宜的吸収窩を作製し、同部を EDTA および次亜塩素酸ナトリウムで表面処理を行った。作製された根管試料に対し、各種水酸化カルシウム製剤を用いて根管充填を行い、その後、根尖と根管口を接着性レジンで封鎖した。対照として、生理食塩水に浸したペーパーポイントを根幹に挿入し、同様に接着性レジンで根尖と根管口を封鎖した。この試料を培養に用いた。培養ウェルの中央に歯根象牙質が一部露出するようにした培養環境を確立させ(図3)、培養系における歯根外部吸収モデルを作製した。

### (2) 細胞培養

#### ①破骨細胞の培養

培養ウェルの中央に露出した試料がある状態で、ラット破骨細胞 V-2 を培養し、破骨細胞の数と大きさを、酒石酸耐性酸フォスファターゼ活性を利用したデジタルマイクロスコープによる観察で計測した。また、試料上の培養細胞を除去し、吸収窩の状態を走査型電子顕微鏡で観察した。

#### ②骨髄幹細胞の培養

マウス大腿骨から得た骨髄幹細胞を培養ウェルに播種し、vitamin C およびβ-グルタミン酸を付加したα-MEMにより、CO<sub>2</sub>インキュベーターを使用して、細胞培養を行った。培養条件下での修復機構を誘導する。試料の修復状態について、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を利用したデジタルマイクロスコープによる観察を行う。一部の試料は、切片を作製し、光学顕微鏡で修復状態を関するとともに、ALP、α1(I)コラーゲン、OPN、DSP、OCNの検出に関して組織化学的検索を行う。

#### ③分子生物学的検索

②の培養細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて硬組織関連因子である ALP、α1(I)コラーゲン、OPN、DSP、OCN の mRNA、歯根吸収関連因子である OPG、IL-6、TNF-α、COX2 の検出を行う。また、ウエスタンブロッティング法にてタンパクの発現を検索する。

### (3) 統計

得られた結果に対し、Bonferroni's test を使用した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。



図4 歯根吸収モデル

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養系歯根吸収モデルの作製

十分な数の乳歯が確保できず、永久歯も使用して吸収モデルを作製した(図4)。

##### (2) 細胞培養

###### ①破骨細胞の培養

培養自体は良好に進んだが、歯根吸収抑制効果に関しては、ばらつきが大きく、水酸化カルシウム製剤群と対照群とに有意な差が認められなかった。再現性に問題があると判断し、いろいろな可能性を考え、各試料のアルカリ性の拡散に差が生じていると考え、使用した試料の歯根のアルカリ性拡散の状態を検索した。アルカリ性の拡散が、歯根外表面に達している試料、達していない試料がバラバラに認められた(図5)。根管壁から便宜的に付加した歯根吸収窩までの距離、ならびに便宜的吸収窩の表面処理に問題があることがわかり、調整を行っている状況である。

###### ②骨髄幹細胞の培養

上記のように、歯根吸収モデルに問題が生じたため、骨髄幹細胞の培養に到達できなかった。

###### ③分子生物学的検索

上記のように、歯根吸収モデルに問題が生じたため、骨髄幹細胞の培養に到達できなかったため、分子生物学的検索はできなかった。

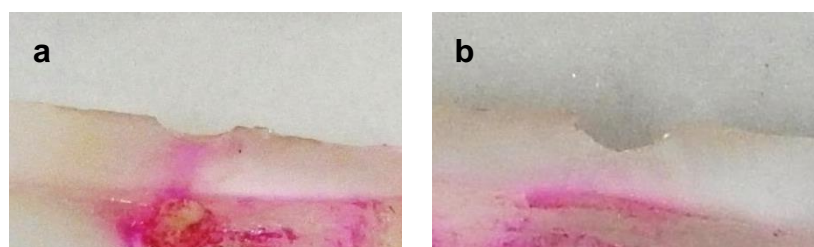


図5 歯根外表面へのアルカリ性の拡散

アルカリ性の拡散を、フェノールフタレインを用いて可視化した。ピンクの部分がアルカリ性 (pH8.5以上) の部分を示す。

a : 到達群 アルカリ性の拡散が歯根外表面に到達している。

b : 非到達群 アルカリ性の拡散が根管内面にとどまっている。

#### <引用文献>

- 1) 神山紀久男 : 乳歯・幼若永久歯の解剖学的特徴—特に歯髓腔の形態—。歯科ジャーナル, 23:437-446, 1986.
- 2) Clegg MS, Vertucci FJ, et al. : The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. J Endod, 32:434-436, 2006.
- 3) Yawaka Y, Osanai M, Shirai Y, Hasegawa T, Kaga M, Oguchi H: Resorption of human deciduous root with apical periodontitis by cultured osteoclasts. Ped Dent J, 14 : 121-126, 2004.
- 4) Yawaka Y, Osanai M, Akiyama A, Harada R, Oguchi H: Histological study of deposited cementum in human deciduous teeth with pathological root resorption. Ann Anat, 185 : 335-341, 2003.
- 5) Toyota Y, Yoshihara T, Hisada A, Yawaka Y: Removal of smear layer by various root canal irrigations in primary teeth. Ped Dent J, 27:8-13, 2017.
- 6) Nishimi M, Nakamura K, Hisada A, Endo K, Ushimura S, Yoshimura Y, Yawaka Y: Effect of N-acetylcysteine on root resorption after tooth replantation. Ped Dent J, 30:72-79, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 八若保孝	4. 巻 41
2. 論文標題 乳歯の感染根管治療の勘所	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ザ・クインテッセンス	6. 最初と最後の頁 58-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yawaka Y, Takahama A, Nishiura M, Sawaguchi M, Oshima S
2. 発表標題 Dental caries treatments of congenital epidermolysis bullosa: A case report
3. 学会等名 26th International Association for Disability and Oral Health
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中村 光一  (Nakamura Koichi)  (50580932)	北海道大学・歯学研究院・助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------