

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463164

研究課題名(和文) 複雑な乳歯根管系の制御 - 水酸化カルシウムの拡散様相と歯根外部吸収抑制効果 -

研究課題名(英文) Control of complicated root canal system of primary teeth: Examination on ion diffusion of calcium hydroxide and effectiveness of outer root resorption control

研究代表者

八若 保孝 (YAWAKA, YASUTAKA)

北海道大学・歯学研究科(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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 根管洗浄による根管内壁のスミヤ層の除去と象牙細管の開口が、根管治療の予後に大きく影響を与える。先の研究で、永久歯では、EDTAとNaOClを使用した超音波洗浄が、乳歯では、NaOClを使用した超音波洗浄が効果的であることを示した。

本研究では、根管内壁の状態と貼薬剤である水酸化カルシウム(Ca(OH)<sub>2</sub>)の拡散様相を検索した。Ca(OH)<sub>2</sub>貼薬による歯根外表面へのアルカリ性の拡散は、根管内壁の状態に影響を受けることを示した。さらに、カルシウムイオンも歯根外表面に到達していることを示すことができた。これにより、良好な根管洗浄は、Ca(OH)<sub>2</sub>の効果を十分に発揮させることが示された。

研究成果の概要(英文)： Removal of smear layer and opening of dentinal tubules on root canal surface with root canal irrigation is important factor on good convalescence of root canal treatment. Regarding the root canal irrigation, it was showed that combination of EDTA and NaOCl with ultrasonic was effective in removing the smear layer on permanent teeth, and NaOCl with ultrasonic was effective on primary teeth.

This study investigated ion diffusion from calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>) through the root dentin of extracted human teeth. It was suggested that the smear layer removal and opened dentinal tubules by root canal irrigation with ultrasonic was valid for the alkaline diffusion from Ca(OH)<sub>2</sub> to outer root surface. Moreover, it was showed that calcium ion diffused to the outer root surface from root canal. Therefore, it was suggested that the good condition with smear layer removal and opened dentinal tubules by root canal irrigation facilitated the effectiveness of Ca(OH)<sub>2</sub> as the root canal medication.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 小児歯科 乳歯 根管治療 根管洗浄 水酸化カルシウム pH

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、副根管が存在すること、歯根および根管の彎曲、圧平、槌状の根管などにより、十分な根管拡大ができないこと、後継永久歯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マイヤ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>2,3)</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、日常臨床では根管治療の成否により乳歯が保存不可能になる症例(図1)が認められ、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っている。



図1 病的歯根吸収

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>4,5)</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などを解明した。また、永久歯の根管洗浄法は、EDTAと次亜塩素酸ナトリウムを用いた超音波洗浄が、乳歯では、EDTAの使用による脱灰の亢進が認められたため、次亜塩素酸ナトリウムを用いた超音波洗浄が、根管壁のスマイヤ層の除去および象牙細管の開口に有効であることを示した(図2、3)<sup>6)</sup>。

これまでに得た情報を基礎に、良好な予後が達成できる乳歯の根管治療法の開発は、乳歯の保存から小児の成長発育にまで、きわめて大きな影響を与えることができる。

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) 荒木孝二：根管貼薬に水酸化カルシウムを使う理由。須田英明編 New エンドドンティックス：歯界望別冊。医歯薬出版，東京，pp. 102-11，1999。

3) Clegg, M.S., Vertucci, F.J., et al.: The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. J. Endod., 32:434-436, 2006.

4) 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.

5) 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.

6) 豊田有希, 吉原俊博, 八若保孝: 各種根管洗浄法の洗浄効果と水酸化カルシウム製剤による水酸化物イオンの拡散。北海道歯誌, 34:53-64, 2014。

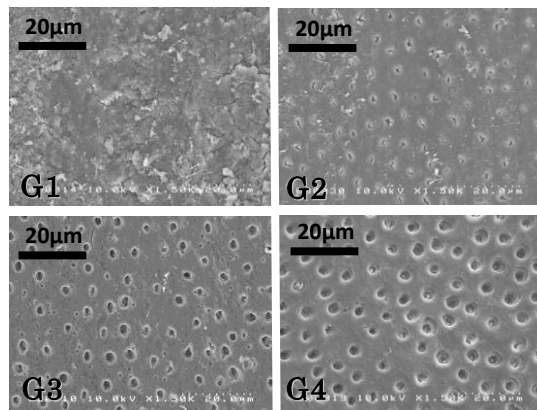


図2 永久歯歯根中央部根管内壁(SEM像)

G1:NaOClとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の交互洗浄(シリンジ使用)  
G2:NaOClの超音波洗浄 G3:EDTAの超音波洗浄  
G4:EDTAの超音波洗浄 → NaOClの超音波洗浄

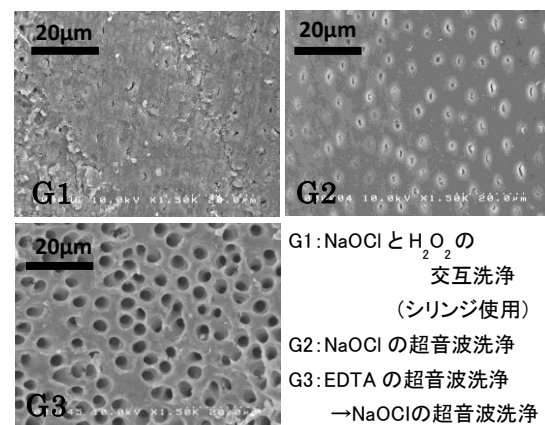


図3 乳歯歯根中央部内壁(SEM像)

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になり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。そのなかで本研究では、各種根管洗浄法と歯根外表面への水酸化カルシウムの有効な発現との関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 永久歯の使用

生理的歯根吸収を示す乳歯において、乳歯歯根が安定状態にある試料を集めることは困難で数に限りがため、永久歯歯根を使用しての研究とした。咬合誘導上、もしくは著明な歯周炎などにより抜去された永久歯で、歯根が比較的真っ直ぐな単根で単根管のものを使用した。

#### (2) 根管洗浄方法とその効果の確認

##### ①根管拡大および根管形成

選別したヒト永久歯に対し、タービンにラウンドバーを装着し、注水下にて使用し、セメントエナメル境で歯冠を切断し、根管口を露出させた。ヒト乳歯に対しては、歯冠側より通法に従い髄腔穿孔・開拡大を行い、根管口を露出させた。各試料に対して、K ファイル（デンツプライ三金、東京）を用いて根管の機械的拡大および形成を行った。15号のK ファイルの先端が根尖から見えるところを根尖側基準点とし、この点から歯冠側の基準点までの長さを根管長とした。ヒト永久歯では、根尖の太さ（アピカルサイズ）を45号以上に設定した。得られた根管長から1mm引いた長さを作業長とし、80号まで根管拡大・形成を行った。

##### ②根管洗浄

根管洗浄法は、G1：生理食塩水、G2：10% NaOCl 超音波洗浄、G3：14% EDTA 超音波洗浄、G4：14% EDTA 超音波洗浄→10% NaOCl 超音波洗浄の4種とした。根管洗浄剤の作用時間は一律45秒間に設定した。

##### ③走査型電子顕微鏡用試料の作製

試料を歯軸に沿って2分割し、通法に従って浸漬固定、脱水、置換、臨界点乾燥、蒸着により、走査型電子顕微鏡用試料を作製した。

##### ④根管内壁の観察

走査型電子顕微鏡（SEM：HITACHI S-4000、加速電圧10kV、倍率1500倍）にて根中央部と根尖部の根管内壁の観察を行い、根管内壁に残存したスミヤ層の量と象牙細管開口部の状態（象牙細管の開口率）を比較した。

#### (3) pH の計測

12本の歯を無作為に3本ずつ4グループ

(G1～G4) に分類し、G1：生理食塩水、G2：10% NaOCl 超音波洗浄、G3：14% EDTA 超音波洗浄、G4：14% EDTA 超音波洗浄→10% NaOCl 超音波洗浄の各種根管洗浄後、根管内に水酸化カルシウム粉末（JIS K 8575、purity:min、96.0%、関東化学、東京）と生理食塩水を重量比1：1の割合で練和して作製した水酸化カルシウム糊剤を、レンツロを用いて貼薬した。試料は根管内に水酸化カルシウム糊剤を貼薬した後、根管口と根尖孔を即時重合レジン（UNIFAST III、ジーシー、東京）によって封鎖した。その後、エアタービンに直径1.4mmのラウンドタイプのダイヤモンドポイント（スムースカット D4014、GC、東京）を装着し、注水下にて使用し、歯根中央部の外表面に人工的な吸収窩（2mm×3mm×1mm）を付与した。吸収窩表面をG4（EDTA 超音波洗浄45秒間→NaOCl 超音波洗浄45秒間→生理食塩水2ml）で洗浄し、スミヤ層を除去した。これらをコニカルチューブ（REF 352096、Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA）に入れた5mlの水道水に浸漬し、37℃に設定した保温庫（ACW-610、アピックス、大阪）内に保管した。pHの経時的変化を計測するため、pHメーター（HORIBA LAQUA、電極：LAQUA ELECTRODE #9618-10D、堀場製作所、京都）を用いて浸漬直後、1日後、1、2、3、4週後に、浸漬液のpH計測を行った。また、水道水5mlをコニカルチューブに入れ、水道水のみを経時的なpH変化も計測した。

#### (4) カルシウムイオンの計測

20本の歯を無作為に5本ずつ4グループ（G1～G4）に分類し、上記のpH計測の試料と同様に、水酸化カルシウム糊剤の貼薬、即時重合レジンでの封鎖、外部吸収窩の付与を行った後、外部吸収窩以外をネイルバーニッシュで被覆し、コニカルチューブに入れた10mlの脱イオン水に浸漬して、37℃で保管した。ICP発光分光分析装置（ICP-AES、P-4010、HITACHI、東京）を用いて1、2、3、4週後に、浸漬液のカルシウムイオン濃度を計測した。

#### (5) 統計

得られた結果に対し、SPSS ver. 21（IBM, Armonk, New York, USA）を使用して、統計学的解析を行った。グループ間の比較にはOne-way ANOVA および Tukey 法を用いた。また、グループ間の経時的変化の比較にはTwo-way repeated measures ANOVA を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

#### (6) 培養系での歯根吸収

抜去乳歯に対し、根管拡大を行い、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、根管試料を作製する。試料の歯根表面の軟組織を除去し、さらに培養に用いる部分のセメント質も除去し、象牙質を一部露出させる。露出させた象牙質部を研磨調整し、平坦な面を作製し、同部を EDTA および次亜塩素酸ナトリウムで表面処理を行う。

作製された根管試料に対し、各種水酸化カルシウム製剤で根管充填を行い、その後、根尖と根管口を接着性レジンで封鎖する。コントロールとして、根管充填をせず根管が空洞な試料を同様に作製する。これらの試料を培養に用いる。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、破骨細胞の培養に使用する。

培養ウェルの中央に露出した試料がある状態で、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) を播種し、vitamin C および  $\beta$ -グルタミン酸を付加した  $\alpha$ -MEM により、CO<sub>2</sub> インキュベーターを使用して、細胞培養を行う。その後、マウス頸骨から得た骨髓幹細胞と共存培養を行い、培養条件下での歯根吸収を誘導する。試料の吸収状態について、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、培養破骨細胞の大きさ、出現度、出現分布を明らかにし、写真撮影を行う。次に、試料表面の培養系細胞を次亜塩素酸ナトリウムおよび超音波を用いて除去し、試料 (歯根) の吸収部分を走査型電子顕微鏡により観察し、吸収窩の数、大きさ、吸収面積を測定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 根管洗浄方法とその効果の確認

スマヤ層が除去でき、象牙細管の開口度が高率に得られる洗浄法は G4 であった。象牙細管の開口率において、G4 は、G1、G2、G3 のそれぞれに対し統計学的有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。根管内壁の状態は、図 2 と同様なものであった。逆に、スマヤ層の除去が不十分で、象牙細管の開口がほとんど認められない洗浄法が G1 であった。今回の生理食塩水の洗浄は、次亜塩素酸ナトリウムと過酸化水素水による交互洗浄とほぼ同程度のものであった。この洗浄法の違いによる根管内壁の状態を基準にして、pH の変化ならびにカルシウムイオン濃度の変化を検索した。

##### (2) pH の計測

水酸化カルシウム糊剤を貼葉した試料の浸漬液の経時的な pH 変化を図 4 に示す。比

較として、水道水のみを経時的な pH 変化を点線で示す。水道水の pH は時間経過とともに低下した。一方、すべての実験グループでは、pH は一度低下するものの、経時的に pH の上昇が認められた。G4 は、G1~G3 と比較して 1~4 週で有意に高い pH を示し ( $p < 0.05$ )、2 週以降、開始時よりも高い pH を示した。G1~G3 の 3 グループ間で、統計学的有意差は認められなかった。

以上の結果から、根管内壁に形成されたスマヤ層をより効果的に除去する根管洗浄法を用いると、象牙細管が多く開口し、水酸化物イオンの根管内から歯根外への拡散を促進することが示唆された。

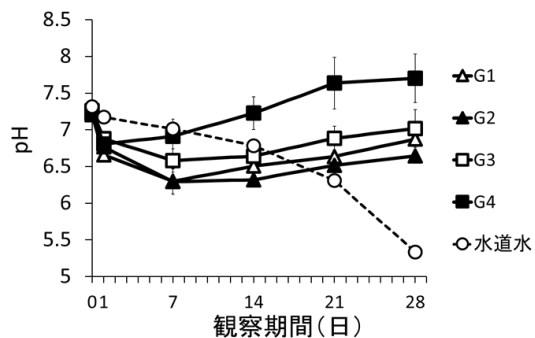


図4 pH 変化 (平均値 ± S.E.)

4 グループとも 1 日目で pH は一度低下したが、7~28 日で pH の上昇が認められた。G4 は、G1~G3 と比較して 7~28 日で高い pH を示した。 G4 vs G1, G2, G3 :  $p < 0.05$

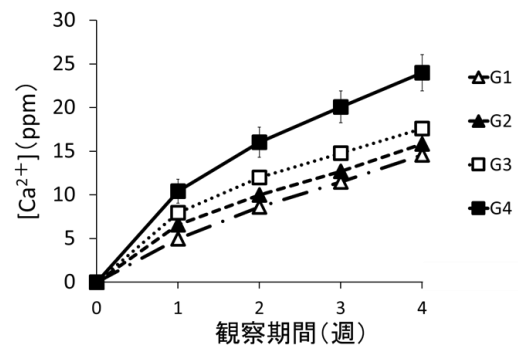


図5 カルシウムイオン濃度の変化 (平均値 ± S.E.)

G4 は、すべての期間で、G1~G3 と比較して高い値を示した。4 グループとも、0~1 週目で最も多くのカルシウムイオンが拡散していることが示された。 G4 vs G1, G2, G3 :  $p < 0.05$

##### (3) カルシウムイオンの計測

水酸化カルシウム糊剤を貼葉した試料の浸漬液の経時的なカルシウム濃度の変化を図 5 に示す。図 5 より、最もカルシウムイオン濃度が高かったのは G4 であり、他の 3 グループと比較して高い値を示し、すべての期

間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。ついで G3、G2、G1 の順であったが、3 グループ間では統計学的有意差は認められなかった。また、4 グループとも 0~1 週目で最も多くのカルシウムイオンが拡散していることが示された。

以上の結果から、EDTA と NaOCl を用いた超音波洗浄によって根管内壁のスミヤ層が除去され、象牙細管が開口することにより歯根象牙質の透過性が上昇し、カルシウムイオンの根管内から歯根外表面への拡散を促進することが示唆された。

#### (4) 培養系での歯根吸収

作製した吸収抑制モデルにおいて、コントロール（水酸化カルシウム製剤を使用せず、根管内が空洞のもの）では、図 6 に示すように、培養破骨細胞による歯根吸収の再現性を得ることができた。しかし、水酸化カルシウム製剤の応用による抑制効果を把握するまでには至らなかった。

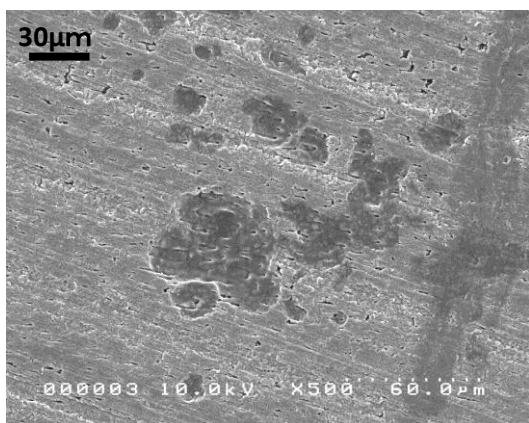


図6 培養系での歯根吸収窩(SEM 像)

浅いものから深いものまで、多数の吸収窩が歯根表面に形成されている。

培養破骨細胞の活性の有効時間と水酸化カルシウムの効果の到達時間の調整、培養にかかる歯根表面の処理状態、根管歯質の厚さの調整（水酸化カルシウムの効果の到達時間の調整）など、試料の作製において、より詳細な調整が必要であることが示唆された。

本研究の結果、永久歯においては、EDTA と NaOCl を併用した超音波洗浄を行う方法が最もスミヤ層を除去し、象牙細管を開口させ、歯根周囲の pH の上昇やカルシウムイオンの拡散を促すことが示された。よって、乳歯においては、先の研究で示した、NaOCl の超音波洗浄により、同様な効果を得ることが考えられた。歯根周囲の pH の上昇やカルシウムイオン濃度の上昇は、根管に貼薬した水酸化

カルシウムの効果が有効に拡散していることを示すものであり、歯根の外部吸収の抑制の大きな要因となると考えられた。しかし、培養系での水酸化カルシウムによる歯根吸収抑制を示すところまで到達できなかった。

今後、培養系での歯根吸収を検索する上で、再現性の確立を中心に、研究を進める予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 八若保孝、外傷に伴う歯根外部吸収への対応、日本外傷歯学会雑誌、査読有、11 巻、9-15 頁、2015 年。
- ② 八若保孝、乳歯根管治療の実践的ポイント、日本歯科医師会雑誌、査読有、67 巻、1084-1092 頁、2015 年。
- ③ 豊田有希、吉原俊博、八若保孝、各種根管洗浄法の洗浄効果と水酸化カルシウム製剤による水酸化物イオンの拡散、査読有、34 巻、53-64 頁、2014 年。

[学会発表] (計 4 件)

- ① 久田明奈ほか、根管洗浄の比較と水酸化カルシウム貼薬後のイオン拡散、第 53 回日本小児歯科学会学術大会、2015 年 5 月 21-22 日、広島国際会議場（広島県広島市）。
- ② 久田明奈ほか、各種根管洗浄の洗浄効果と水酸化カルシウム製剤による根周囲の pH 変化、第 31 回日本小児歯科学会北日本地方会、2013 年 10 月 26 日、ねぶたの家ワ・ラッセ（青森県青森市）。
- ③ Y. Yawaka et al., The endodontic study for the control of resorption on outer root surface with dental trauma. The 24<sup>th</sup> Congress of the International Association of Paediatric Dentistry. June, 12-15, 2013., Seoul (Korea) .
- ④ 豊田有希ほか、乳歯における各種根管洗浄法の洗浄効果と水酸化カルシウム製剤による水酸化物イオンの拡散、第 51 回日本小児歯科学会学術大会、2013 年 5 月 23-24 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）。

[図書] (計 1 件)

- ① 八若保孝ほか、編者 朝波惣一郎、王宝禮、矢郷香、クインテッセンス出版株式会社、薬 '17/ '18 歯科 疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本、2016 年、214 頁 (176-179 頁)。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八若 保孝 (YAWAKA, Yasutaka)

北海道大学・大学院歯学研究・教授

研究者番号：60230603

(2) 研究分担者

中村 光一 (NAKAMURA, Koichi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50580932