

Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique.

Int Endod J. 2012 Sep;45(9):871-7

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr.

《Single-file テクニックを用いた

楕円形根管の細菌除去について分子および培養による定量分析》

目 的

便利で簡略なため、根管形成法として Single-file techniques が近年提案されている (Buchanan 2000, Yared 2008)。根管形成する single file として往復動作を用いた F2 Pro Taper (Yared 2008) が開発された後、いくつかの特定システムが市場にでまわっている。

・ single-file instrumentation systems の一つは Reciproc (VDW, Munich, Germany) である。この器具は M ワイヤの標準的な NiTi 合金でできており、単独で根管形成できる器具として、単回に使用することが推奨されている。サイズは 3 種類あり (R25 R40 R50)、シャフトに沿って器具のテーパーが変わり、先端から 3 mm 部分のテーパーは R25 R40 R50 で 0.08・0.06・0.05 となっている。Reciproc はモーターに適していて、毎秒 10 サイクルの往復運動で動く。往復サイクル 3 回で器具は 360° 回転する。切削面は解放面よりも角度が鋭利なため、根尖へ器具を進めることができる。

第 1 の目的は、楕円形の根管で従来の Ni-Ti rotary technique と比較して Single file テクニックの細菌除去効果を評価する事であった

第 2 の目的は、定量的リアルタイムポメラーゼ連鎖反応 (qPCR) と培養の 2 つの定量法で得られる細菌数で比較した。

材料と方法

方法として *Enterococcus faecalis* で汚染された抜去歯の楕円形の根管に Reciproc 単独または、BioRaCe シリーズのいずれかの器具を使用した。細菌のサンプルは器具使用前 (S1) 器具使用后 (S2) から採取した。

～見本選抜と準備～

- ・長い楕円形の根管をもつ、34本の抜去歯牙
- ・単根で単根管の下顎切歯と上顎第2小臼歯
- ・歯列矯正か歯周病で抜歯されたものを使用
- ・レントゲンにて根尖 5 mm のところで、
類舌・近遠心比率が 2.5 : 1 以上を示し、
根管の形態学的基準で類似したものをそれぞれ実験グループに割り当てた
- ・選ばれた歯は汚染前にプレ形成された
- ・すべての根管は access cavity 形成後、持続的に水洗し #25 まで拡大

文献紹介

- ・ 17%EDTA と 2.5%の Naocl でスメア層除去
- ・ 10%チオ硫酸ナトリウムで Naocl を不活性化し、トリプチケースソイブロスに浸漬
- ・ 空気を抜き不規則な根管に培養液を浸透させる為、1 分間超音波掛けた後
121° 20 分 オートクレープで歯を滅菌した

～細菌バイオフィルムの形成～

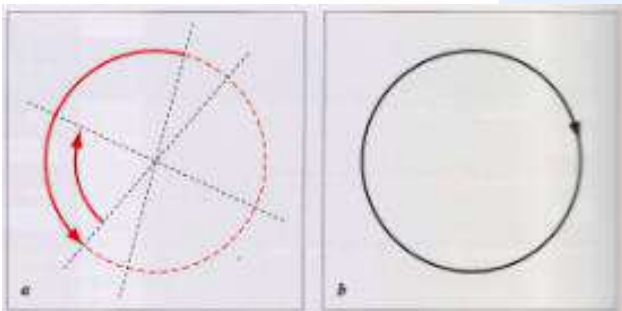
- ・ *Enterococcus faecalis* ATCC29212 を根管汚染に使用
- ・ 4 本の歯は 10%ホルマリンに浸けられ細菌コロニー化とバイオフィルム形成されているか電子顕微鏡(SEM)調べた
- ・ その 30 本の歯をそれぞれ 15 本ずつ、
2つのグループに分けて細菌除去実験を行なった
- ・ 歯牙根尖孔は即時重合レジンで封鎖し、シリコーン印象材でブロックを作りそこへ歯茎部まで植立された
- ・ 歯冠とシリコン表面は、2.5%Naocl 消毒され
10%チオ硫酸ナトリウムにより不活性化した
- ・ K ファイル#20 で作業長 WL を決定
- ・ 細菌サンプルは根管形成前に全根管から採取した

～Reciproc group～

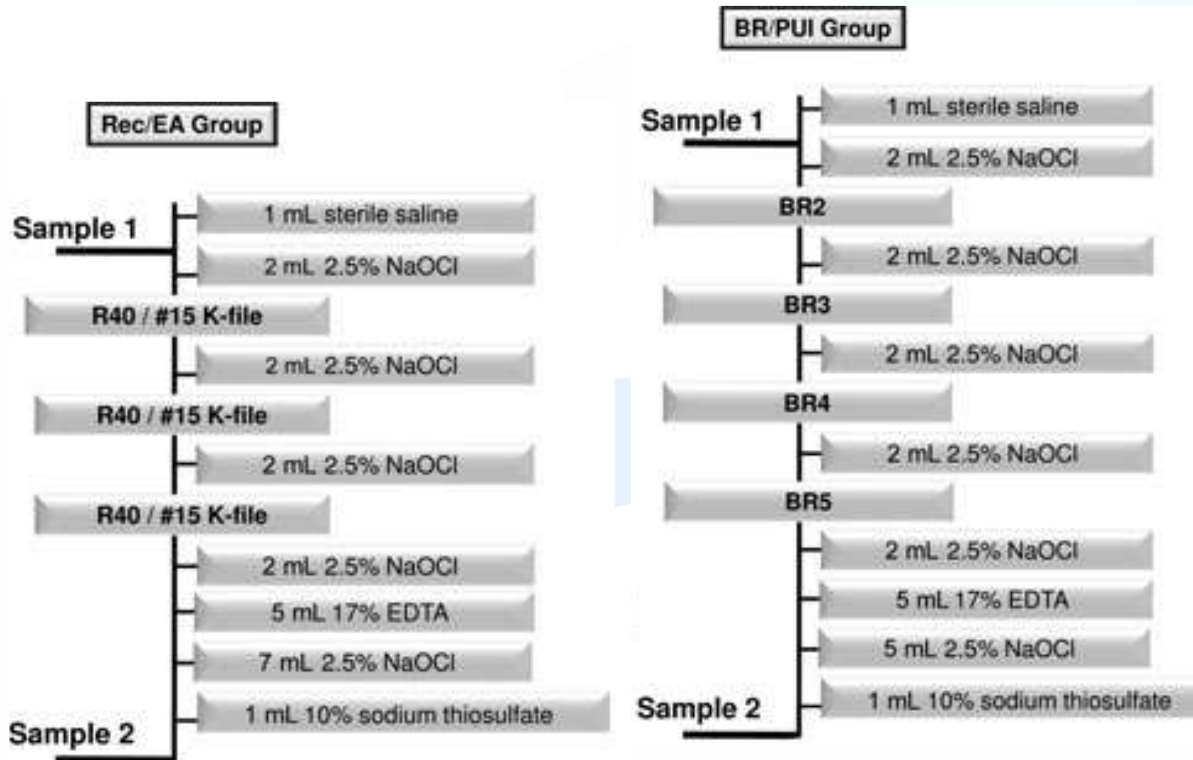
- ・ R40 往復運動 (反時計回り 150° 時計周り 30° 正逆交互に回転)
- ・ #15 ファイルが作業長 WL に達するまで繰り返された
- ・ 使い捨てシリンジ 30 ゲージ NaviTip 針にて、根管形成後 17%EDTA 5ml→2.5%Naocl 7ml
で洗浄後、10%チオ硫酸ナトリウムで不活性化した
- ・ 器具使用后 (S2) サンプルを採取した

～BioRace group～

- ・ BR2(#25 0.04 taper)～BR5(#40 0.04 taper)にて作業長 WL まで形成
- ・ 使い捨てシリンジ 30 ゲージ NaviTip 針にて、根管形成後 17%EDTA 5ml→2.5%Naocl 5ml
で洗浄後、10%チオ硫酸ナトリウムで不活性化した
- ・ 器具使用后 (S2) サンプルを採取した (fig1)



- (a) reciprocal motion は
反時計回りの phase で根管切削
- (b) rotary motion では
時計回りで切削が行なわれる



主に 2.5%Naocl 1 根管合計 15ml 洗浄時間 平均 11 分間

～サンプリングの手順と処理～

- S1 サンプルは 0.85%滅菌生理食塩水 1ml で、くっついてない細胞を除去する為洗浄
- WL まで 3～5 つのペーパーポイントで採取、それぞれ 1 分間根管に置いた後すぐに 1ml の滅菌生理食塩水を含むチューブに移された
- S2 サンプルは、楕円形根管から細菌最大回収法 (Siqueia et al2010) 変法で採取
- 10%チオ硫酸ナトリウムで満たされた根管に、滅菌された GP#35 or #40 でポンピングしてゆすりサンプル採取
- 滅菌されプレカーブをつけたステンレススチール#20K ファイルを WL まで挿入
- 先端が頬・舌側の凹みに接する様に 3 回 回し 3 回引き上げ繰り返した
- 根管が乾くまで滅菌ペーパーポイントで根管内容物を吸った
- 1ml 滅菌生理食塩水を入れたチューブに移され、1 分間かき混ぜてすぐ培養された
- サンプル半分は培養、残り半分は qPCR 分析用の DNA 抽出に用いた

～培養による定量化～

- サンプルは生理食塩水で 10 倍ずつ薄められた(S1 10^{-5} S2 10^{-2})。
- 100ml の一定分量は Mitis-Salivarius 寒天上に植菌され 48h 37° で暖められた。
- CFU(成長コロニー形成単位)を数え、概知の希釈要因に基づいて実際の数に換算した。

～qPCR の定量化～

- QIAamp DNA Mini Kit を使用、サンプルの半分から DNA は抽出された
- DNA 抽出を最大にする為にリゾチームによる 30 分間の前保温のステップが加えられた (=リゾチームを 30 分間作用させた)
- 抽出された DNA は qPCR 分析まで、-20° に凍らせた
- *Enterococcus faecalis* 細胞数はそれぞれのサンプルから得られた標準曲線に基づいて推論された。
- 細菌の定量化の為、10-log-fold 標準曲線を作るために *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 が用いられた

- DNA は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を利用して新しい純粋培養から抽出され、分光光度計で定量された

～統計分析～

- 定量的(細胞数)、定性的(培養または PCR のポジティブ/ネガティブコントロール) 2パラメーター評価
- それぞれ Wilcoxon matched test と Mann–Whitney U test が、グループ内とグループ間の比較に用いた
- グループ内の定量分析では、S1 と S2 の *E.faecalis* 数の減少を比較
- グループ間の定量分析では、2 つの器具システムの S2 での絶対数を比較
- S2 後のグループ間の qPCR または培養のポジティブコントロールは two-tailed Fisher's exact テストを使用比較
- qPCR か培養によって得られる S1 と S2 の全体数は Wilcoxon matched pairs テストで比較
- すべての分析の有意水準は $P < 0.05$ で合わせた

結 果

電子顕微鏡で調べたところ、4つのコントロールの根管壁に *E.faecalis* が定着する事に成功しており、しばしば、バイオフィルム構造を作っていた(データは公開しない)。

細菌除去の実験で使われるすべての歯の S1 サンプルで、qPCR と培養の結果が陽性だったことより、根管への細菌の定着をさらに確認することができた。

～グループ内分析～

両グループ内で定量検査において S1 から S2 で細菌数が減少したことにより、

化学機械洗浄により細菌を著しく減少することが示された。(qPCR と培養データ両方とも $P < 0.001$)

両グループにおいて、S1 から S2 への細菌数の減少の平均は 99.9% 上回った。

～グループ間分析～

Table 1 *Enterococcus faecalis* counts before (S1) and after chemomechanical procedures (S2). Data from quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

Groups	S1			S2		
	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
Reciproc	1.06E + 06	2.36E + 05	2.84E + 04–7.17E + 06	2.68E + 02	0	0–2.18E + 03
BioRaCe	3.85E + 06	3.27E + 06	1.67E + 05–2.41E + 07	2.35E + 03	1.12E + 03	0–2.73E + 04

化学機械的清掃前 (S1) と後 (S2) の *Enterococcus faecalis* のカウント数 qPCR 分析データ

Table 2 *Enterococcus faecalis* counts before (S1) and after chemomechanical procedures (S2). Data from culture analysis

Groups	S1			S2		
	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
Reciproc	1.35E + 06	1.41E + 06	2.40E + 05–2.05E + 06	1.69E + 02	0	0–2.18E + 03
BioRaCe	6.88E + 05	8.00E + 04	2.80E + 03–9.44E + 06	6.68E + 02	0	0–8.80E + 03

化学機械的清掃前 (S1) と後 (S2) の *Enterococcus faecalis* のカウント数 培養データ

Table1 と 2 は、2 つのグループ間の qPCR と CFU 数の平均値と中央値、範囲を示す。S1 サンプルのグループ間の定量分析に、有意差は無かった ($P>0.05$) これは実験における細菌汚染の方法で、均一な細菌量を提供できていたことを示している。S2 サンプルのグループ間定量分析で、qPCR と培養でも器具テクニックによる有意差は無かった。 ($P>0.05$)

定量分析では qPCR と培養のどちらを用いても (+) / (-) な結果が両方見られた (Table3)

Reciproc グループの S2 サンプルで qPCR は 6 本、培養では 7 本が (+) だった。

BioRace グループの S2 サンプルは qPCR 8 本、培養では 6 本 (+) を示した。

S2 サンプルのグループ間の定性的 (+/-結果の発生) 比較は有意差を示さなかった。 ($P>0.05$)

～定量化方法間の比較～

qPCR と培養により得られる細菌数の比較は S1 と S2 で実験された (サンプル数はそれぞれ 30 本)

S1 サンプルでの qPCR では培養と比べて *E.faecalis* のカウント数が明らかに高かったが ($P<0.05$)

S2 サンプルでは方法間で有意差無かった。 ($P>0.05$)

楕円形根管の化学機械的清掃(S2)と補助的アプローチ(S3)後に、qPCR と培養分析でポジティブだった数

Table 3 Incidence of positive results in quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and culture analyses after chemomechanical preparation (S2) and supplementary approaches (S3) in oval-shaped canals

Groups	qPCR	Culture
	S2	S2
Reciproc	6/15 (40) ^a	7/15 (47)
BioRaCe	8/15 (53)	6/15 (40)

^aNumber of cases with positive result/number of cases examined (%).

考 察

この研究の主な目的は、抜歯し *E.faecalis* で実験的に汚染させた楕円形の根管で、

従来の NiTi テクニックと比較して single file テクニックの細菌除去効果を評価する事であった。

・ Single-file テクニックは近年入手出来るようになったが、それらのクリーニングと除菌の効果に関してのエビデンスはまだ初期段階である。円形の根管であらゆる Pro Taper 器具と比較した時、single-file F2 Pro Taper テクニックがクリーニングに関して類似した結果を示したが、楕円形の根管では最

適な状態を示さなかった。 (De-Deus *et al.*2010)

今日の定量結果において、qPCR か培養のどちらか一方では化学的清掃は根管内の細菌数をかなり減少させることを示した。形成に使用されるシステムに関係なく以前の研究と多く一致する。

・ バクテリアは楕円形の根管の凹んだ場所に取り残されるので、そこに届かせ除菌するのが主な目的である。残存バクテリアは細胞数・デットスペースでの細菌の成長・栄養の供給の得られる場所と

その細菌の毒性・歯根周囲組織への近接している事などの、いくつかの要因により治療結果にリスクをもたらすかもしれない。

- **Single-file** テクニックについての一つ興味ある事として、根管の除菌する能力を指し形成過程の簡易化とより効率の良いプレパレーションによって、抗菌性洗浄剤が少量で済み、あるいは根管中における抗菌性洗浄剤の短時間の作用もしく両方を達成できるかもしれない。
- **Real-time qPCR** は定量方法として広く使われてきた。この点において、通常感受性が高いということは菌の感知力も高く、単に定量できるということでは無く培養出来ない菌や死んでいる菌も定量する事ができるのが特徴であり、それは培養より優れている。**qPCR** の欠点は死んだ細菌まで見つけてしまう事であり、プレパレーション後の除菌した後でも死んだ菌を感知し、高い数値を示してしまう。この問題を回避する方法はあるけれど、この研究では使わなかったそうです。

結 論

今回シングルテクニックを含む2つのシステムを使い、楕円形の根管で細菌数をかなり減少させた。根管形成の号数・抗菌性洗浄剤の量・洗浄の間隔が類似しているのであれば、**single file** テクニックは他のテクニックに相当する抗菌効果を提供することができる。治療後の **qPCR** と培養のサンプルに有意差は示さなかった。そして、両方の方法が抗菌性効果が示された。

前田 都(6期アドバンス受講生) 福西 一浩