

タイトル: 根管治療におけるキレート化を再考する

英文: Chelation in Root Canal Therapy Reconsidered

Matthias Zehnder, Dr med dent, Patrick Schmidlin, Dr med dent, Beatrice Sener, and Tuomas Waltimo, Dr odont, Docent

(JOE – Volume 31, Number 11, November 2005)

背景

根管治療の目標は、根尖性歯周炎を予防または治療することである。理想的な歯内洗浄剤は、幅広い抗菌効果があり、壊死組織を溶解し、スメア層を除去し、全身毒性が低い必要があるが、すべてを満たす単一の洗浄剤は存在しない。

次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) は、壊死組織溶解作用があり、効果的な消毒剤であるが、スメア層の無機成分を溶解することはできない。

スメア層は、根管壁へのシーラーの緊密な適合を妨げる。よって、スメア層を除去するために EDTA やクエン酸などを NaOCl 溶液と交互に使用することが提唱されているが、その結果、EDTA とクエン酸の双方とも、NaOCl 溶液中の利用可能な塩素を大幅に減少させ、NaOCl の効果を無効にしてしまっている。

目的

この研究の目的は2つあった。第一に、歯内療法で最も一般的に使用される2つのキレート剤である EDTA とクエン酸が NaOCl の抗菌効果に対する影響を示すことであり、第二に、EDTA とクエン酸の潜在的な代替案を考え出すことである。

* NaOCl 溶液中で利用可能な塩素に対する錯化剤の影響

次のカルシウム金属イオン封鎖剤溶液(錯化剤)を、それぞれ NaOCl との相互作用についてテストした。

- 17%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)
- 10%クエン酸 (CA)
- 9%三リン酸ナトリウム (STP)
- 15%アミノトリスメチレンホスホン酸 (ATMA)
- 7%1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ビスホスホネート (HEBP)

溶液を混合した直後、および1時間、1日、21日後に2回繰り返して測定を行った。測定の間、溶液は5°Cに保たれた遮光容器に保管された。結果は、可能な最大値のパーセント値として表された。

* 拡大形成された根管のカルシウムキレート化、スメア層の除去

同部位から抜歯した歯の中から、同じサイズ、同じ歯根形状の60本の単根歯を選択した。抜歯に際しては、事前にすべての患者からインフォームドコンセントが得られていた。

歯は5°Cで0.1%チモール溶液に保存された。近遠心面のX線写真を撮影して、それらに1本の根管しか含まれていないことを確認した。根管は、Gates Gliddenドリル、続いてProFile (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) を使用し、クラウンダウンにて、#45.04に拡大形成した(解剖学的根尖孔の1mmアンダーに設定された作業長まで)。根管は、拡大形成中1%NaOCl溶液で洗浄された。続いて、根管を大量の純水ですすいだ。調査中の金属イオン封鎖剤溶液の錯化能力に対するNaOClの影響を評価するために、これらをH₂Oまたは1%NaOClと1:1の比率で混合した。

拡大形成された歯はランダムに10のグループに分けられた。

実験では、グループごとに1本の歯に対し、作業長より1mmアンダーな部位にISOサイズ35の洗浄針(Hawe Neos、Bioggio、スイス)を使用して、

- 5mlの錯化剤/ H₂O
- 5mlの錯化剤/ NaOCl混合物

で1分間洗浄した。

蒸留水と0.5%NaOClをコントロールとして使用した。

溶出液を個々のバイアル(ガラス製の小瓶)に保存し、原子吸光分光光度計(モデル 2380、Perkin-Elmer、コネチカット州ノーウォーク)を使用してカルシウム含有量を直ちに分析した。測定は2回行った。この実験を5回繰り返したため、グループごとに6つの溶出液を分析した。結果は、溶出液中の ppmCa²⁺として表された。一元配置分散分析を使用して、溶出液中のカルシウム濃度を異なる洗浄剤の組み合わせ間で比較した。

実験洗浄後、歯を純水で十分にすすぎ、縦方向に割った(分割した)。臨界点まで乾燥した後、各根の分割された半分の1つをスタブに取り付け、金でスパッタリングした(SCD 030、Balzers Union、Balzers、リヒテンシュタイン)。形成された根管表面を走査型電子顕微鏡(AMRAY 1810、マサチューセッツ州ベッドフォード)で観察し、歯冠部、中央部、および根尖の3分の1の典型的な領域から5つの顕微鏡写真を500倍の倍率で撮影した。これらの顕微鏡写真のそれぞれで、スメア層の有無は、2人の盲検的観察者によって次のように半定量的に推定された。

- 0 : 象牙細管の 90~100%が見える。
- 1 : 象牙細管の 50~90%が見える。
- 2 : 象牙細管の 10~50%が見える。
- 3 : 象牙細管の 1~10%が見える
- 4 : 象牙細管の 0%が見える。(=何も見えない)

歯ごとのスコアの中央値は、異なる洗浄法間のさらなる計算と比較に使用された。これらは、Kruskal-Wallis ANOVA と、それに続く Mann-WhitneyU 検定を使用して実行された。溶出液中のカルシウム濃度とそれぞれの歯のスメア層スコアとの間の相互依存性を評価するために、スピアマンの順位相関係数が計算された。統計分析では、p 値 0.05 が有意差を示すと見なされた。

*NaOCl 抗菌効果に対する錯化剤の影響

実験では、Enterococcus faecalis ATCC29212 が試験体として選択された。細菌を 50ml のトリプシンソイ寒天培地(TSB、Oxoid、ハンプシャー、イギリス)に一晩インキュベートし、その後 2000 μ g で 10 分間遠心分離した。

分細胞を洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に再懸濁した。600 nm でのこの懸濁液の光学密度は 0.778 であり、108 CFU / ml に相当する。

『CFU/g(ml) とは、Colony Forming Unit(コロニーフォーミングユニット)の略称で菌量の単位である。(コロニーを形成する能力のある単位数)100CFU/g または 100CFU/ml とは1g または1ml 中に菌が 100 個存在することを表している』。

文献紹介

エッペンドルフチューブは、1%NaOCl を含むキレート剤溶液の 1:1 混合物 990 μ l で満たされた。PBS が陽性対照として機能した。追加の実験では、上記の混合物の 1:10 および 1:100 に希釈したものをテストした。10 μ l の細菌懸濁液の一定分量を各チューブに加え、最終的な細胞密度を約 10⁶ CFU / ml にした。

チューブを室温で 15 分間インキュベートした。96 ウェルマイクロタイタープレート（血清学的検査, 微生物学スクリーニング, 試料の保管および輸送などに用いるプレート）に TSB を充填した（ウェルあたり 200 μ l）。次に、10 μ l の薬剤-細胞懸濁液の一定分量を各ウェルに移した。この手順により、薬剤が 1~20 倍に希釈され、最終的に E. faecalis の接種材料は 10⁴CFU / ml になった。その結果、理論上の成長なしの検出限界は 99.99% だった。その後、細胞を 37°C で 48 時間インキュベートし、各ウェルの TSB を滅菌ピペットチップと混合し、マイクロタイタープレートを分光光度法で読み取った。各実験は 2 回繰り返された。

増殖陽性培養物の純度は、トリプティックソイ寒天培地（Oxoid）で一晩培養した後、グラム染色とコロニー形態を顕微鏡像によって（顕微鏡像を確認することで）管理された。

新たに培養した E. faecalis ATCC 29212 懸濁液 10 μ l を増殖陰性ウェルに添加し、37°C で 24 時間インキュベートした。そして、希釈した薬剤の残留物が、細菌の回復を阻害する効果について測定した。

結果

*NaOCl 溶液で利用可能な塩素

純粋な NaOCl 水溶液は、実験中の 21 日間安定したままだった。（表 1：文献より改変）

表 1：時間の経過に伴う 1%次亜塩素酸ナトリウムとの水性隔離剤溶液のさまざまな混合比での遊離利用可能な塩素の量（理論上の最大値のパーセントとして表される）および pH

Agent	Wt/vol	Ratio	pH	1 min	1 h	1 d	21 d
(H ₂ O)	-	1:1	11.7	100%	100%	100%	100%
		5:1	11.2	100%	100%	100%	100%
		1:5	11.9	100%	100%	100%	100%
EDTA	17%	1:1	8.2	10%	0%	0%	0%
		5:1	8.0	10%	0%	0%	0%
		1:5	8.4	10%	0%	0%	0%
Citric acid	10%	1:1	2.4	0%	0%	0%	0%
		5:1	1.8	0%	0%	0%	0%
		1:5	4.3	0%	0%	0%	0%
STP	9%	1:1	9.8	100%	100%	100%	100%
		5:1	9.3	100%	100%	100%	100%
		1:5	10.6	100% ¹	100%	100%	100%
ATMA	15%	1:1	0.8	10%	0%	0%	0%
		5:1	0.6	0%	0%	0%	0%
		1:5	1.1	20%	0%	0%	0%
HEBP	7%	1:1	10.7	100%	80%	20%	0%
		5:1	10.6	100%	50%	10%	0%
		1:5	11.3	100%	100%	90%	20%

調査中の STP 溶液は、次亜塩素酸ナトリウムと相互作用しなかった。遊離塩素の 100% は、すべての混合比で最大 21 日間測定された。HEBP 溶液は、1 時間後に遊離塩素含有量のいくらかの減少を引き起こした。この喪失は用量に依存的であり、時間とともに続いた。ただし、新鮮な混合物は 100% の遊離塩素を保持していた。対照的に、EDTA および ATMA 溶液は、NaOCl と混合するとすぐに OCl⁻ / HOCl のほぼ完全な損失を引き起こした。この現象は、CA / NaOCl 混合物でさらに顕著であり、利用可能な遊離塩素含有量が 1 分未満でゼロに減少した。

*拡大形成された根管のカルシウムキレート化、スメア層の除去

形成された根管を水で 1 分間洗浄すると、最小限のカルシウムが溶出した（表 2：文献より改変）。

表 2：溶出液中のカルシウム濃度（平均 ppm±SD）および、洗浄した歯のスメア層の中央値

Irrigant Combination (1:1, vol/vol)	Calcium Concentration	Smear Score
H ₂ O/H ₂ O	2 ± 2 ^a	4 ^a
1% NaOCl/H ₂ O	3 ± 1 ^a	4 ^a
9% STP/H ₂ O	3 ± 2 ^a	4 ^a
9% STP/1% NaOCl	5 ± 2 ^{ab}	4 ^a
7% HEBP/H ₂ O	12 ± 4 ^{bc}	3.5 ^{ab}
7% HEBP/1% NaOCl	16 ± 4 ^c	3 ^{bc}
17% EDTA/H ₂ O	36 ± 8 ^d	2 ^d
17% EDTA/1% NaOCl	36 ± 2 ^d	3 ^{cd}
10% CA/H ₂ O	77 ± 17 ^e	2 ^d
10% CA/1% NaOCl	66 ± 13 ^e	1.5 ^d

グループごとに 6 本の歯が灌注された。上付き（肩つき）文字を共有するグループは、それぞれの列で統計的に有意なレベルで差がなかった（Ca²⁺ 値の ANOVA、スメア層スコアの Kruskal-Wallis / Mann-Whitney U 検定、p < 0.05）。

同様に、NaOCl と STP にはカルシウム結合効果がなかった。これらの溶液では、スメア層はほとんど、または、まったく除去されなかった。試験濃度の HEBP 溶液はカルシウムキレート能力を示した。これは EDTA で観察された錯化能力の約 3 倍弱く、10%CA で観察されたものの約 5 倍弱かった。CA は EDTA よりも多くのスメア層を除去し、EDTA は HEBP よりも多くを除去する傾向があった。水または NaOCl と混合した場合、CA と HEBP の 5% レベルで差が有意だった。混合物中の NaOCl の存在は、カルシウムキレート能力またはスメア層の除去に関してカルシウム錯化剤に影響を与えなかった。溶出液中のカルシウム濃度と根管に残っているスメア層の量の間には強い負の相関関係があった（RSpearman -0.86）。

*NaOCl 1s 抗菌効果に対する錯化剤の影響

次亜塩素酸ナトリウムは、0.005% の濃度で 99.9% の細菌を殺した（1:100 希釈、表 3：文献より改変）。

表 3 : 溶液およびそれらの水性希釈液中での 15 分間のインキュベーション後の E. faecalis ATCC29212 の増殖

Irrigant Combination (1: 1, vol/vol)	Dilution		
	1:1	1:10	1:100
1% NaOCl/ H ₂ O	-	-	-
7% HEBP/ H ₂ O	+	+	+
7% HEBP/ 1% NaOCl	-	-	-
17% EDTA/ H ₂ O	-	-	+
17% EDTA/ 1% NaOCl	-	-	+
10% CA/ H ₂ O	-	+	+
10% CA/ 1% NaOCl	-	-	+

実験は 3 回行った。+ : 成長、- : 成長なし（細菌の 99.9%以上が死滅）。

EDTA は 1:10 希釈で細菌の再増殖を根絶したが、1:100 希釈では根絶しなかった。クエン酸は 1:1 希釈で抗菌効果を示したが、それ以上希釈すると効果を発揮することはなかった。STP は、スミア層除去剤としての性能が低いため、この分析から除外された。HEBP は細菌の生存率に影響を与えなかった。EDTA または CA を NaOCl と混合すると、1:100 希釈で NaOCl の抗菌効果が失われた。対照的に、HEBP は（HEBP を NaOCl と混合しても）NaOCl の殺菌効果を妨げなかった。

議 論

この研究では、次亜塩素酸ナトリウムと、現在使用されているスミア層除去の可能性のある物質との化学的相互作用をテストした。結果は、次亜塩素酸塩製剤の抗菌効果が、組織溶解の可能性と同様に、溶液中の遊離塩素（OCl⁻および HOCl）の関数であることを確認した。臨床的に、交互洗浄では、大量の次亜塩素酸塩を投与してキレート剤の残留物を洗い流し、NaOCl がその抗菌性および組織溶解性を発現できるようにする必要があることを示唆している。ただし、NaOCl と EDTA / CA の反応を考慮すると、後者の成分を簡単に使用することは難しい。

この研究でテストされた EDTA / CA に変わって使用できる代替案の中で、HEBP が最も有望であるように思われた。HEBP は無毒であり、一般的に骨疾患の治療に全身的に使用される。さらに、家庭用およびパーソナルケア製品の補助剤として使用されている。ただし、7%HEBP 溶液は、10%CA よりも根管を搔爬する効果が有意に弱かった。

20%HEBP 溶液では、17%EDTA または 10%CA で得られたものと同様のカルシウム量が根管から溶出された。1 分の洗浄時間は比較的短かったことを考慮しなければならない。ただし、EDTA などの強力なキレート剤を使用して洗浄時間が長くなると、歯根象牙質が弱くなり、形成のエラーが発生する可能性がある。

したがって、7～10%HEBPなどの、よりアグレッシブでないカルシウム錯化剤を根管形成の全過程で投与することが良いかもしれない。HEBPは、NaOClの効果の喪失を恐れることなく、チェアサイドでNaOClと混合することができる。

いずれにせよ、そのような単純化された洗浄方法が歯根象牙質への消毒を改善するかどうかはまだ示されていない。

報告の考察

2021年現在において、根管洗浄剤として、具備すべき条件をすべて満たしている洗浄剤は存在していない。しかし、壊死組織などの有機質を溶解、バイオフィームへの抗菌作用、エンドトキシンを不活化する能力を有し、最も使用されている洗浄剤は今も変わらずNaOCl溶液である。しかし、NaOCl溶液は、無機質溶解作用を持ち合わせていない。

この、NaOCl溶液の持ち得ない能力を補助すべく、EDTA溶液の使用が推奨されており、スメア層の除去が目的とされている。EDTA用液はキレート剤であり、本論文では様々な溶液のNaOCl溶液との相互作用について研究、報告された。

本論文中の「臨床的に、交互洗浄では、大量の次亜塩素酸塩を投与してキレート剤の残留物を洗い流し、NaOClがその抗菌性および組織溶解性を発現できるようにする必要があることを示唆している。ただし、NaOClとEDTA / CAの反応を考慮すると、後者の成分を簡単に使用することは難しい。」という記述があるが、NaOClとEDTAが反応すると、即座にNaOCl中の塩素成分が失われていき、NaOClの効力が著しく減少してしまうため、交互に洗浄する際には、根管から根管内バキュームなどを用いて、それぞれの溶液を排除した状態とし、改めてもう一方の溶液を根管内に用いるという方法がよいのではないかと考えている。

しかし、現時点でスメア層を除去することが、根管治療の最終的な目標である「根尖性歯周炎の予防と治癒」を達成するためにどれ程効果があるのかは、十分な検証がなされておらず、結論は出していないが、スメア層が根管内に存在することで引き起こされるデメリットも報告されており、根管内の細菌数を制御する上では、スメア層の除去は有効であると考えられる。

今後も洗浄剤の開発、その適用方法、そして、使用する順番や作用時間など、様々な研究、考察がなされていくことと思うが、いまだに確立したものは見出されていない。根管洗浄における明確な「答え」が早期に見つかることを期待する。

報告者:安部貴之