死腔内滲出液の質的变化に関する実験的研究

師 岡 道 夫

東京医科歯科大学歯学部保存学教室（指導：鈴木賢策教授）

東京医科歯科大学歯学部生化学教室（指導：佐々木哲教授）

（昭和 42 年 12 月 8 日受付）

A Biochemical Study on Dead Space Fluid

Michio Morooka

Department of Oconservative Dentistry Tokyo Medical and
Dental University

(Prof. Kensaku Suzuki)

Department of Biochemistry Tokyo Medical and
Dental University

(Prof. Satoshi Sasaki)

緒 言

Ingle¹⁾によれば無菌的処置のもとに行なわれた根管治療の失敗例の大半は不完全な根管充填に起因し、根管に残された僅かの空隙がその主な原因であるとしている。

他方、不完全根充でも残る空隙は肉芽組織の侵入によつて満たされるという花沢²⁴⁾25)らの見解もある。

しかし問題は肉芽組織の侵入により組織化の行なわれ難い死腔が残ることにあるようである。いずれにしても根管治療後に残される空隙は微々たるものであり、肉芽の侵入組織化を阻止する因子としては、根充剤の問題、空隙の形状、貯溜した滲出液の影響などが考えられるが、前二者に関しては既に多くの研究発表がある。しかし貯溜した滲出液に関する検討はほとんどされていない。

1931 年 Rickert と Dixon⁷⁾は金属盲管を無菌的に家兎の皮下に埋設すると、盲管開口部に著明な炎症反応が起ることを報告し、砂田²¹⁾等は象牙、鉛の根管模型で同様の事実を確めている。

1963 年小宮¹⁹⁾は規格化された根管模型を使用

し家兎の皮下で実験した結果、多数の症例に死腔内への肉芽の増殖を認めたが、肉芽組織は死腔全体を満たすに至らず、肉芽組織と貯溜滲出液の触れ合う部分は変性、壊死をともなう慢性炎症を呈し組織化の進行をはばんでいるようであつたが、模型内への肉芽の増殖には滲出液の侵入の先行を必要としていることを認め、滲出液の分解過程で肉芽誘導物質のようなものが作られることを推測し、さらに滲出液の貯溜が長期にわたれば、根管空隙の組織化を阻む催炎性、障害性に働く、物質の産生があることを予測している。

これに対して、1965 年 Peason¹⁵⁾は、プラスチック盲管を Rat の皮下に埋め盲管開口部の組織学的検索の結果、盲管開口部には炎症も肉芽の増殖も認められず、また Neoteterazolium を指示として、盲管内部と外部組織の間に組織液の環流が起つていることをとりあげ、組織内に残る空隙そのものの実害を否定している。

1966 年 Torneck¹⁶⁾も Rat の皮下で Peason と同様の実験で彼の主張を肯定するような結果を得ている。

以上のように歯周組織に対する死腔の障害性の

メカニズムに関しては異論が多く、まだ十分解明されておらず、おおかたは死腔に侵入する滲出液が重要な役割を演ずるものと推測しているようである。

そこで著者は死腔内滲出液の蛋白性分を経時的に定量分析して、2, 3の知見を得たので報告する。

実験材料

○根管模型

図(1)のように直径5mmの鉛の円柱の中央部をくりぬき根管模型を作り、内腔(髄腔に相当する)および盲管の体積を約 25 mm^3 にし、盲管を通じて周囲組織と根管模型内部(実験死腔)は交通できるように計り、他端は Stopping により閉鎖した。

図1 鉛の根管模型の横断面

- a. 盲口部(根尖部) b. 盲管(根管)
c. 内腔(髄腔)

○金網籠

家兎の皮下より創傷液を採取するため50 mesh. の18-8網の金網籠を作り、長さ25mm、中央部直径18mmの円柱体にし、この内部に創傷液を貯溜させ採取した。

○実験動物

体重2.5kg以上の成熟家兎20羽を使用した。

実験方法

番号1-18の動物では、前報²²⁾の方法にしたがつて、空の根管模型2コ、5%クロラムフェニコール（三共、根治用）を内腔に満たした根管模型2コを家兎の皮下に無菌的に埋没した。手術に際しては術後出血が起らないよう十分注意した。

さらに動物番号19~20では金網籠2コ、空の

根管模型6コを埋没した。

2週ないし6ヶ月のそれぞれの期間経過後ト殺し、皮下組織とともに根管模型をとりだし、盲口部組織の肉眼的観察を行ない、被膜から模型をとりだした。その際一部の被膜は組織切片を作り鏡検した。とりだした根管模型は仮封 Stopping を除去し、そこから内部を0.5ccの蒸留水で3回洗浄し、洗浄液を空のもの、クロマイを満たすものにおけ、それぞれ2コずつ集め2つのサンプルを作った。

動物番号19~20では金網籠より得た創傷液を4000 r.p.m で15分間遠沈し、析出したフィブリンを除去し、それぞれの籠別に0.05cc（これは2コ分の根管模型内腔の体積で、死腔全体が創傷液で満たされた場合の仮定量）をピペットでとって作った2つのサンプルと、同一体内に埋没した6コの空の根管模型から得た死腔液を2コずつ集めて作った3つのサンプルの計5コのサンプルを作った。

○定量術式

表(1)に示すように各々のサンプルには終濃度8~10%になるように15%のトリクロール酢酸(TCA)を加え4000 rpm で20分間遠沈し沈

表1 定量術式

表2 死腔液中に含まれていた蛋白成分

Drug amn. No.	C. P. tube					Empty tube			
	term	T.C.A. insoluble Dose	T.C.A. soluble Dose	ratio	remark	T.C.A. insoluble Dose	T.C.A. soluble Dose	ratio	remark
1	2 W	40.4	36.5	1.09	hyp	151.8	21.8	7.00	hyp
2	2 W	8.8	38.4	0.23		88.7	90.4	0.98	
3	2 W	17.7	39.4	0.45	hyp	96.6	43.4	2.22	hyp
4	2 W	12.8	53.2	0.24		86.7	92.9	1.20	hyp
5	4 W	17.0	111.2	0.64	po	273.3	27.2	11.00	hyp
6	4 W	66.2	59.1	0.10	po	215.2	90.5	2.30	po
7	4 W	80.4	84.0	0.96	po	138.4	106.5	1.30	po
8	4 W	71.0	46.1	1.50		114.7	85.2	1.34	po
9	9 W	185.8	17.4	11.70	po	170.3	15.8	10.80	po
10	9 W	216.2	21.6	10.00	po	330.2	64.1	5.20	po
11	9 W	170.3	11.9	14.70	po	289.0	18.3	15.80	po
12	9 W	100.6	20.0	5.00		284.1	21.6	13.60	po
13	3 M	146.0	18.0	5.20	po	202.0	25.2	8.00	po
14	5 M	174.0	29.7	5.90	po				
15	5 M	180.4	27.2	6.60	po				
16	3 M	169.2	33.7	5.00		421.0	33.0	12.8	po E
17	3 M	217.9	25.8	8.40	po	318.3	26.1	12.3	po E
18	3 M	332.6	25.8	12.90	po	232.3	26.5	8.8	po E

TCA solu, insolu Dose の単位はいずれも γ で実際の浸入量の $1/5$ 量を示す。

hyp : 盲口部組織の充血

po : 盲管内に浸入する息肉が認められたもの

E : 模型内容液が膿瘍状であつたもの

渣の TCA insoluble (蛋白) と上清の TCA soluble (polypeptide, アミノ酸) に分画した。

TCA soluble は上清を3倍量のエーテルで3回洗浄してトリクロール酢酸を除去したのち乾燥し、再蒸溜塩酸 (20%) を10 cc 加え 110°C . 24 時間加水分解した。

TCA insoluble にも10 cc 塩酸を加え同様に水解した。水解後エバポレーターで塩酸を完全に除去し、最後に濃硫酸と水酸化ナトリウムをそなえたデシケーター中で濃縮乾燥し、これに10 cc の蒸溜水を加え、水解されたアミノ酸を溶解させ、その1 cc をとり yemm cocking²³⁾ の ninhydrolin 比色定量法で測定した。

実験結果

表 (2) に示すように実験死腔 (根管模型の内

腔および盲管) に侵入した滲出液 (以下死腔液と称する) 中に含まれる TCA insoluble (蛋白) は抗生剤 (クロマイ液) を満たした例では最初の2週目の侵入量は空のものに比しやや少なかつたが4週以後は空の内腔に侵入する量と同様の経過を示し、それらは経時的に増加する傾向を示した。(表3 参照)

TCA soluble (polypeptid, アミノ酸) は実験死腔に満たした抗生剤の有無にかかわらず2週~6カ月までの侵入量はほとんど同様の経過を示した。中でも興味深い特徴は2週~4週にかけ50~100 γ 程度と TCA soluble が多量に死腔内に認められるが、9週以後になると30 γ 前後に一定してしまう傾向を示したことである。(表4 参照)

さらに死腔内に侵入した滲出液 (死腔液) の TCAinsoluble : soluble の Ratio (この Ratio は死

表 3 死腔液中に含まれた TCA. insol. 量

表 4 死腔液中に含まれた TCA. solu. 量

表 5 $\text{RATIO} \left(\frac{\text{TCA. insol.}}{\text{TCA. solu.}} \right)$ の時間的推移

表 6 仮定量と死腔液中に含まれる
蛋白性物質の比較

Anim No.	term	T.C.A. insoluble Dose	T.C.A. soluble Dose	ratio
19	2 W E ₁	43.0	27.5	1.6
19	2 W E ₂	58.4	57.9	1.0
19	2 W E ₃	38.6	39.2	0.98
19	2 W WE ₁	208.8	3.8	23.0
19	2 W WE ₂	194.4	10.1	19.0
20	2 W E ₄	31.9	16.2	2.0
20	2 W E ₅	46.3	37.5	1.2
20	2 W E ₆	102.5	75.0	1.4
20	2 W WE ₃	202.8	8.7	23.0
20	2 W WE ₄	214.8	9.5	22.5

E : 死腔液
WF : 仮定量(50 mm³)の創傷液

腔液中の TCA insoluble の濃度を示す 間接値になる。すなわち Ratio の値が小さいほど濃度は高くなる) の経時的变化を追ってみると, soluble が著明に増加している 2 週～4 週の Ratio は 1 前後にほとんど一定しているのに対し, 9 週以後では 10 前後(5～15)の値に散在している。これは 2 週～4 週の死腔液中には明らかに高濃度の soluble が含まれていたのに対し, 9 週以後では soluble の濃度は低下し組織液あるいは創傷液の濃度 (Ratio 20～30)により近い値になっていることを示した。(表 5 参照)

表(6)は盲口部より死腔内に侵入して行くと考えられる創傷液を, 家兎の皮下に埋没した金網籠より採取し, この創傷液が根管模型内腔いつばいに侵入したと考えた場合の量(仮定量で 50 mm^3 の創傷液量)をピペットでとって作ったサンプル(WF₁～WF₄)中に含まれる TCA insoluble, soluble と同一個体に 2 週間埋没した空の根管模型の死腔液(E₁～E₆)中の TCA insoluble, soluble を比較したものである。

これによると仮に内腔いつばいに創傷液が侵入したとしても, 仮定量(WF₁～WF₄)中に含まれる TCA soluble 量は最大 11 γ 程度であったのに対し, いずれのサンプルの死腔液(E₁～E₆)中にも 30～70 γ 程度の TCA soluble が含まれていることが判明した。

さらに Ratio を比較すると創傷液は 20～25 で血清とほとんど同じであったのに対し, 死腔液の Ratio は 1～2 でほとんど一定した傾向を示した。このことから死腔液中には仮定量に比較し著しく多量に TCA soluble が含まれており, またその濃度は創傷液に比し, はるかに高まっていることを示した。

○組織学的観察結果

前報に報告したごとく盲管開口部以外の鉛の根管模型周囲は, いずれも埋没 2 週間を過ぎる頃線維性結合組織により, 時には模型の隅角部や側壁部に軽度の細胞浸潤, 毛細血管の新生増殖, 浮腫形成などの所見が認められ, 術後 4 週を過ぎると被包組織の線維化は進み, 8 週頃には炎症反応は

図 2 皮下組織に付けて取り出された根管模型

図 3 空の根管模型の死腔に侵入した肉芽組織(4 週)

図 4 図 3 の拡大
肉芽組織はまだもり上り程度であるが先端部には出血, 弱いリンパ球を中心とする細胞浸潤が認められる。

全く消退し, 結合組織による被包治癒を示した。

そこでこれ等側壁部の被包組織を対照として盲管開口部の組織学的検索を行なうと, クロラムフェニコール液を満たした例も, 空の例も 2 週まで

は側壁部組織と大差なく、4週になると盲口部に結合組織のもり上りを示す例が数例認められた。(図3, 4参照)

8週を過ぎると死腔内部に増殖する肉芽組織(盲管息肉)が著明で、これら肉芽組織の先端部は変性壊死におちいつており、中央部では拡張した毛細血管、出血を伴う滲出液の貯溜、リンパ球や他の組織球の軽度の滲潤などの慢性炎の反応がどの肉芽組織においてもほとんど様に認められた。(図5, 6参照)

図5 クロマイ液を満たした根管模型内腔に侵入した肉芽組織(盲管息肉)(9週)

図6 息肉の拡大

- n: 息肉の先端部壊死層
- b: 出血及び細胞滲潤
- s: 貯溜した滲出液
- c: 拡大した毛細血管

また4カ月頃になると、死腔内に増殖した肉芽は収縮する傾向を示し、なかには線維化を起している例も認められた。

考 案

根管に残された無菌の空隙の歯周組織に対する障害性の機序として死腔内に侵入貯溜した滲出液が分解し分解過程で発炎性の物質が作られるため障害を起すとするものと、また逆に浸入した滲出液と外側の周囲組織間で環流が起り貯溜滲出液中に有効量に達する障害性物質の蓄積が起らないとして、根管に残る無菌の空隙の実害を否定しているものとがある。

著者は家兎の皮下組織内に実験的死腔を設定し、死腔に侵入した滲出液の蛋白性分の経時的定量分析を試みた。

死腔液中の蛋白(TCA insoluble)は2週より6カ月まで徐々に増加する傾向を示していたが、TCA soluble (Polypeptide, アミノ酸)の蛋白性分は4週以前は50~100 γ で増量しているが、9週以後ではだいたい30 γ 前後の略々一定量に落付く傾向があつた。このような事実は予め死腔内に5%クロラムフェニコール液を満たしてあつた症例にも同じ様に起つた。

これは予め薬液を充滿した根管模型内に滲出液が侵入し薬液(クロマイ液)と置換が起つたものと考えられ、死腔と周囲組織の間に環流が起ることを示すものであろう。

TCA insoluble, soluble の Ratio の変化は死腔液中の蛋白性分(TCA insoluble 量+soluble 量)に対する soluble の濃度を間接的に表し(Ratio が大きい程 soluble の濃度は低くなる。), 死腔液の質的变化を示す値となるが、表(5)から4週頃までの死腔液の状態と9週以後の状態には明らかな差が認められる。

すなわち、4週以前の死腔液の状態は soluble の濃度は50%前後(Ratio 1 前後)を示しているのに対し、9週以後では約6~16%と soluble の濃度は低下している。そこでまず4週以前の死腔の状態について考察してみると、soluble の濃度は

創傷液や血清(それ等の濃度は3~5.5%, Ratio 20~30)に比較すると異常に高まっている。この理由については2つの可能性が考えられる。

まず、4週間までの滲出液では創傷液や組織液と異り低分子の Polypeptid やあるいわアミノ酸のみが濾出(transudation)されたものとする考え方である。これは盲管内で何か特別な凝固物の形成による半透膜構造物を必要とするように思われるが、この時期までにはこのような構造物は認められておらず、この考え方はむしろ否定的である。

つぎに創傷液や組織液と同じ組成のものが滲出液として死腔に侵入し死腔内に停滞する間に高分子物質が加水分解されて低分子の TCA soluble 分画に変ったとする考え方である。

本実験では2週間以前ノゴく初期に侵入した滲出液の組成が創傷液またわ血清と同じであるかどうかの確認を欠き推測の域を出ないが表(6)の結果も低分子物質の増加の可能性を支持している。

すなわち根管内腔を完全に満たすに足る創傷液中に含まれ得る最大量の TCA soluble 量は、たかだか10 γ 程度であるのに、同一個体から得た死腔液は内腔を充滿しないことが多いが常に30~70 γ に達する soluble 量が認められ、これらは死腔内部で Autolysis (蛋白自壊)が起ることを教えるようである。

なお9週以後の死腔液は Ratio が10前後に散らばり、soluble の濃度は2~4週間に比較し著明に下つて(6~16%)いる。

組織学的には埋没後9週間頃になると外部被包組織から盲管内への著明な肉芽組織の侵入が認められ、肉芽組織の毛細血管は拡張していることが多く、血管と死腔内容との環流が起ることが推測され、TCA soluble は血管内へ運ばれ死腔内の濃度が前後に低下したものと考えられる。一方9週以後には TCA insolu 量が増し220 γ 以上に達することが多いが、模型内腔をいつばいに滲出液で満たしたとき、TCA insoluble の最大量が220 γ 程度であることから、220 γ 以上の量は細胞由来のものと考えて良いようである。

9週以後における半数例以上の Ratio が10以下(濃度9%以上)であることから、肉芽が侵入しても死腔液中には創傷液に比し soluble の濃度が高く、この期間においても死腔液中では Autolysis が起つていることを推測させる。

1963年、小宮¹⁹⁾がペーパークロマトグラフィーで検索した結果は創傷液や血清中には明確なアミノ酸のスポットは認められなかったが、3週以後の死腔液からは多数のスポットが得られ Autolysis の可能性を暗示しており、他方1965年 Pearson¹⁵⁾は Teflon tube の死腔に Neotetrazolium を満たし組織学的検索を行なつて外部周囲組織と死腔内には常に組織液の環流を認め、Rickert と Dixon⁷⁾等の報告のごとき死腔開放端の明らかな炎症反応が認められなかったことを指適し、死腔内に組織液成分が貯溜停滞し、分解して発炎物質が形成されることを否定している。

著者の根管模型実験によれば、クロラムフェニコール液で満たした症例に空の状態と同様に滲出液の侵入が起る点、さらに4週前の死腔液中の高濃度の Soluble が9週以後になると低下する点などから Pearson の circulation 説を一部認めることになるが、死腔液中で Autolysis が起つていることもまた事実であろう。

そして Autolysis が起るためには滲出液の死腔内停滞が必要であろうし、さらに滲出液の分解過程で発炎性の物質 (Polypeptide.,)¹¹⁻¹⁴⁾²⁶⁻²⁹⁾の産生が起る可能性も十分ある。

しかしこのような物質はまだ死腔内で証明されておらず、今後死腔液中の peptidase 活性の問題、さらに Vaso.active polypeptide., groblin²⁷⁾などの証明、または無菌の死腔といえども生体では Anachoratic infection が起り得るので、この点などを含めて新たな角度から追求して死腔の菌周組織に対す障害性の機序を明らかにしたい。

総 括

家兔の皮下内に鉛の根管模型を無菌的に埋没し、その実験死腔内に侵入する滲出液を2週~6か月にわたり経時的に TCA insoluble (蛋白)と

TCA soluble (polypeptide, アミノ酸) に分画し定量した。

1) TCA insoluble は経時的に増加する傾向を示したのに対し, TCA soluble は4週までは比較的多量 (50~100 γ) に認められたが9週以後はおよそ30 γ 前後に低下し一定する傾向を示した。

2) $\text{Ratio} \left(\frac{\text{TCA insoluble}}{\text{TCA soluble}} \right)$ は死腔液の各期間における質的变化を示す値であるが, これによると4週までの死腔液中には高濃度 (50%前後) のsoluble を認め, これが9週以後になると6~16%と低下し 両者の 間には 明らかな 差が認められた。

3) 死腔内侵入以前の状態での滲出液(創傷液)の仮定量(死腔内をいっぱい満たす量)中には最大10 γ 程度の soluble しか認められなかつたのに対し, 同一個体から得た死腔液には30~70 γ の soluble が認められ, 死腔液中では soluble が明らかに増量していることが認められた。

4) 根管模型外部被膜の組織学的検索の結果, 9週以後は盲管を通して死腔内に侵入する肉芽組織が多数認められ, そこには変性壊死を伴う慢性炎症反応が認められ, 毛細血管の拡張はとくに著明だった。

5) 以上の結果から根管に残された死腔の歯周組織に対する障害性の機序について2, 3の考察を試みた。

(本実験は前報 (口病誌 34 巻 3 号)の実験に引き続き行なったもので本文中の資料は前報の一部を重複して使用した。)

稿を終えるにあたり終始御懇切な御指導御校閲を賜りました。鈴木教授, 佐々木教授に心からの感謝を捧げます。

また教室の小宮先生, 清水先生 (生化学教室) には実験の細部にわたり御援助いただき厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ingle J. I.: Root canal obturation, J. A. D. A., 53: 47, 1956.
- 2) Heinz U.: Gedanken zur Wurzelbehandlung, D. Z. Z., 18: 1431, 1963.

- 3) Sommer R. F., Ostrander F. D. and Crowley M. C.: "Clinical Endodontics" W. B. Saunders Co., 1961.
- 4) Crossman L. I.: "Root Canal Therapy" Lea and Febiger 1955.
- 5) Haldi J. John K.: Comparative concentration of various constituents of blood plasma and dental pulp fluid. J. D. R., 428, 1965.
- 6) Spilling J. A., Milch L. E.: Fractional analysis of experimental wound fluid, proc. Exp. Biol. and Medic. 85: 553, 1954.
- 7) Rickert U. G. and Dixon C. M.: The controlling of root surgery, Int Dent. Con. Supp., 85: 553, 1954.
- 8) Selye H.: Diaphrags for analysing the development of connective tissue, Narut, 701, 1959.
- 9) Selye H. and others: Induction of adipose tissue development by mechanical means, Plast & Reconstruct. Surg., 3: 250, 1959.
- 10) Östby B.: The Role of the blood clot in endodontic therapy, Acta. Odont. Scandinav., 19: 323, 1961.
- 11) Spector W. G.: The inflammatory response Bacterio. Rev. 117, 1963.
- 12) Rocha e Silva: The Physiobiological significance of bradykinin, Annals N. Y. acad. of science, 1963.
- 13) Boissonas R. A.: The synthesis of bradykinin and of related peptides, Annals N. Y. acad. of science, 1963.
- 14) Elliot D. F.: Brudikindn and its modes of release, Annals N. Y. Acad. of science, 1963.
- 15) Pearson A. H. and Goldman M.: A preliminary investigation of the "Hallow tude" theory in endodontics. studies with Neotetrazolium. J. or. therap. and pharmaco, 618, 1965.
- 16) Torneck C. D.: Reaction of rat connective tissue to polyethylen tube implants, OS. OM. OP. 379, 1966.
- 17) Hatton E. R.: Histopathology of apical region of teeth with partly filled root canals, J. A. D. A., 77: 1850, 1921.
- 18) Gall H.: Über apikale Heilungsvorgänge nach pulpa-exstirpation ohne Wurzelfüllung, Schw. Mon. für. Zahn., 46, 213, 1936.
- 19) 小宮徳次郎: "死腔の根尖創傷治癒に及ぼす影響について", 日保歯雑誌, Vol. 5, 87, 1963.
- 20) 鈴木賢策: "根管充填の基準", 歯界展望, 1079 p. 昭 32 年.
- 21) 砂田今男, 西堀, その他: "根管充填に関する実験的研究", 歯界展望, Vol. 16, 昭 34 年.
- 22) 師岡道夫: "根管消毒剤の根尖創傷治癒に及ぼ

- す影響に関する実験的研究 ”. 口病誌, Vol. 34, 1967.
- 23) 赤堀四郎: “ 生化学実験講座 ”, 丸善 Co, 昭和 40 年.
- 24) 花沢, 近藤, その他: “ 種々なる根管充填に関する実験的研究 ”, 歯科学報, Vol. 42, 462, 昭和 12 年.
- 25) 兵藤: “ 実験的根管充填に際して認められた根端附近組織の治癒 ”, 歯科学報, Vol. 46, 753, 昭和 16 年.
- 27) 鈴木友二: “ 活生ポリペプチド ”, 世界保健通信社, 昭和 41 年.
- 27) 林秀男: “ 炎症と生化学 ”, 代謝, Vol. 708 p. 1965.
- 28) 鈴木友二: “ キニンと炎症 ”, 代謝, Vol. 2, 726 p. 1965.
- 29) 島本多喜雄: “ 抗キニン剤 B 23 の作用とその背景 ”, 医学のあゆみ, 442, 1964.