

in vivo Micro-CT を用いたラット断髄法の連続的観察

中出 俊之

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

(主指導教員：宮沢 裕夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Observations of pulpotomy in rats using *in vivo* Micro-CT

TOSHIYUKI NAKADE

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

(Chief Academic Advisor : Professor Hiroo Miyazawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要 旨

小児歯科臨床では、齲蝕や外傷にともなう歯髄処置を行う頻度が多く、乳歯や幼若永久歯では可能な限り歯髄を保存する処置が望ましく、ホルムクレゾールや水酸化カルシウムによる歯髄の断髄法が実施されている。しかしながら、ホルムクレゾールは毒性が危惧され、水酸化カルシウムは強アルカリであるために切断面表層部に壊死層が生じるため、歯髄の破壊による内部吸収が問題視されている。また、これら断髄法の評価は、臨床上の有用性から覆髄剤に関する基礎および臨床的研究が実施されているが、多くの研究が実験動物の病理組織学的検討を行うことから、多数の個体を実験に供しており、実験動物用のCTを用いた断髄後の経時的な観察報告はない。

今回我々は一匹の実験動物を連続的に観察可能な *in vivo* Micro-CT (R_mCT[®]) を使用し、ラッ

トの断髄後の経時的変化を連続的に観察した。材料はWistar系8週齢のラットを使用し、全身麻酔下にて、臨床的術式に準じて歯髄断髄法を実施した。断髄は通法の切断とCO₂レーザを応用したパルス波3Wで断髄面の蒸散を行い、ホルムクレゾールと水酸化カルシウムによる覆髄を行った。術後より連続的に同一個体をR_mCT[®]を用いて処置歯の観察を行った。なお、観察は近心根が最も大きく、予後が明瞭に確認できることから、同部の連続的観察を行った。撮影条件は管電圧70kV、管電流120 μ Aとした。観察後、5 μ mの連続切片標本を作製し、病理組織学的観察を行った。

R_mCT[®]を用いたラット断髄後の経時的変化を観察した結果、覆髄剤の吸収程度、仮封材や根尖部の透過像、断髄面直下の不透過像など処置歯の経過を連続的に観察することができた。また、通法の切断とCO₂レーザを応用した症例を比較し

た結果、CO₂レーザーを応用した症例では、ホルムクレゾール法で根尖部の透過像や歯根膜腔の拡大が少なく、水酸化カルシウム法では切断面直下に不透過像の出現など予後良好である傾向がR_mCT[®]画像により判断でき、病理組織的観察でも画像観察と同様な所見が確認できた。

以上のことから、R_mCT[®]は、一匹の実験動物を長期間観察し断髄後の覆髄剤、仮封材、処置歯の経過や予後の連続的な観察が可能であり、組織像と対応させることも可能である極めて有用な観察手段であることが確認できた。

緒 言

小児歯科臨床では外傷や齲蝕処置として歯髄処置を行う頻度が多く、乳歯と永久歯との交換を円滑に行う必要があり、永久歯列まで乳歯歯髄の役割は重要である。そのために乳歯の歯髄処置は、炎症や病的歯根吸収がみられない場合では、可能な限り歯髄を保存する歯髄断髄法が有効な治療法であり、生理的歯根吸収が1/2程度で歯冠に限局する歯髄炎では、ホルムクレゾール法（以下FC法と略す）や水酸化カルシウム法による断髄法が用いられている。FC法は殺菌作用を有し、蛋白固定作用により歯髄を固定する方法であり、臨床成功率が高いといわれている。しかしながら、FCの毒性や処置後に健全歯より早く歯根吸収や脱落を起こすことが危惧されている¹⁻⁷。水酸化カルシウム法は殺菌力を有さないもののFC法と比べると毒性が低く、骨組織誘導能に優れており、断髄面に壊死層を形成後、石灰化沈着により骨様硬組織であるデンチンプリッジが形成される。また、強アルカリであるために切断面表層部に壊死層を作り、歯髄の破壊による内部吸収が問題とされている⁸⁻¹⁷。歯髄の断髄法に関する基礎

および臨床的研究は数多く実施されているが²⁻¹⁷、断髄方法として通法の他にCO₂レーザーを応用し断髄面の蒸散を目的とした報告がある¹⁸⁻²⁰。しかし小児歯科臨床では頻用されず、経時的な観察はされていない。また、断髄法の評価は、実験動物を安楽死させ病理学的検討を行っており¹⁻¹⁷多くの動物を実験に供しているが、実験動物用CTを用いて断髄後の経時的に観察した報告はない。

今回我々は一匹の実験動物を連続的に観察可能な実験動物用CTである*in vivo* micro-CT (R_mCT[®], Rigaku Co, Tokyo, JAPAN) (以下R_mCT[®]と略す)を使用し、Wistar系ラットの第一臼歯を断髄後、処置歯の経時変化を同一個体で連続的に観察した。さらにR_mCT[®]での観察終、病理組織観察を行いR_mCT[®]画像と組織像を対応させCTの有用性の確認を行った。

材料および方法

1. 断髄後のR_mCT[®]による連続的観察

Wistar系ラット（日本SLC）6週齢の雄性を搬入し2週間環境に適応させた。なお、飼料は日本SLC社製のラット用固形飼料を与え、飲料水は自由に与えた。

8週齢のラットを使用し、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム（ネンプタール[®]）を注入し、全身麻酔下にて固定板に固定後、上顎左側第一臼歯をヨードチンキにて消毒し、1/2のラウンドバー（メルファー社製）を使用し、臨床的術式に準じてマイクロモータにて注水下で断髄し、生理的食塩水で洗浄後、滅菌小綿玉で水分の除去を行った。覆髄剤は水酸化カルシウム法としてカルビタール[®]（ネオ製薬社製）、FC法としてバルパックV[®]（日本歯科薬品社製）を包摂し

Table 1 : Experimental Design

Groups	Experimental Rat Number, Time point	Experimental Rat Number, Time point	Experimental Rat Number, Time point	Experimental Rat Number, Time point	Experimental Rat Number, Time point	Experimental Rat Number, Time point
CH	5 0 day	5 3 days	5 7 days	5 10 days	5 14 days	5 30 days
CH+L	5 0 day	5 3 days	5 7 days	5 10 days	5 14 days	5 30 days
FC	5 0 day	5 3 days	5 7 days	5 10 days	5 14 days	5 30 days
FC+L	5 0 day	5 3 days	5 7 days	5 10 days	5 14 days	5 30 days

CH; Calcium Hydroxide, FC; Formocresol, L; Laser irradiation

た。断髄は通法の断髄のほかにCO₂レーザーを応用しパルス波3Wで切断面の蒸散を行った。仮封はガラスアイオノマーセメント（GC社製：フジアイオノマータイプII）を行った。術後当日、3日、7日、14日、30日、60日後に連続的にR_mCT[®]で観察、R_mCT[®]による同一個体の連続的に覆髄剤や仮封材など処置歯の画像観察を行った。撮影条件は管電圧70kV、管電流120μAとし撮影画像はパーソナルコンピューターに保存した（Table 1）。

2. 病理組織学的観察

連続的に観察した後、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）にて麻酔後、4%パラホルムアルデヒド（0.2 M phosphate buffer : PB, PH 7.4）にて灌流固定を行い、上顎骨を離断した。試料は10%中性ホルマリン溶液にて1日間浸漬固定後、通法に従い5%EDTA溶液で1か月間脱灰し、上昇アルコール脱水後、パラフィン包埋し5μmの連続切片標本を作製した。

断髄後の病理組織観察として象牙質様硬組織形成ならびに炎症の有無を確認するためにヘマトキシリンエオジン染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。さらに抗象牙質シアロタンパク質抗体（Santa Cruz biotechnology, inc. M-20 : sc-18328）、抗オステオポンチン抗体（Santa Cruz biotechnology, inc. FL-314 : sc-20788）を用いて蛍光免疫染色を施し、新生硬組織の観察を行った。

結 果

1. R_mCT[®]所見

1) 断髄後の連続的画像観察

ラット歯髄断髄後、R_mCT[®]を用いて観察した結果、ラット頭部と処置歯の詳細が三次元的に確認できた。また、同一個体の連続的な観察により、覆髄剤の吸収程度や仮封材の確認など、処置歯のX軸：歯列横断像、Y軸：歯列平行断像、Z軸：水平断像での三次元的な経過を連続的に確認することができた（Fig. 1, 2）。

連続的に一定期間観察した結果、ラットの上顎第一臼歯はZ軸：水平断像にて根管数が5根管が確認でき、近心に位置する歯根が最も大きく、R_mCT[®]において、Y軸：歯列平行断像が観察し



Fig.1 : Images of the in vivo Micro-CT (R_mCT[®])

Since its higher resolution enables clear observation of the entire hand of the rat, it is possible to compare the effectiveness of pulpotomy method.

やすいため、近心根を観察対照とした（Fig. 3, 4）。なお、ラットの健康状態を定期的に確認した結果、被曝が影響している所見はみられなかった。

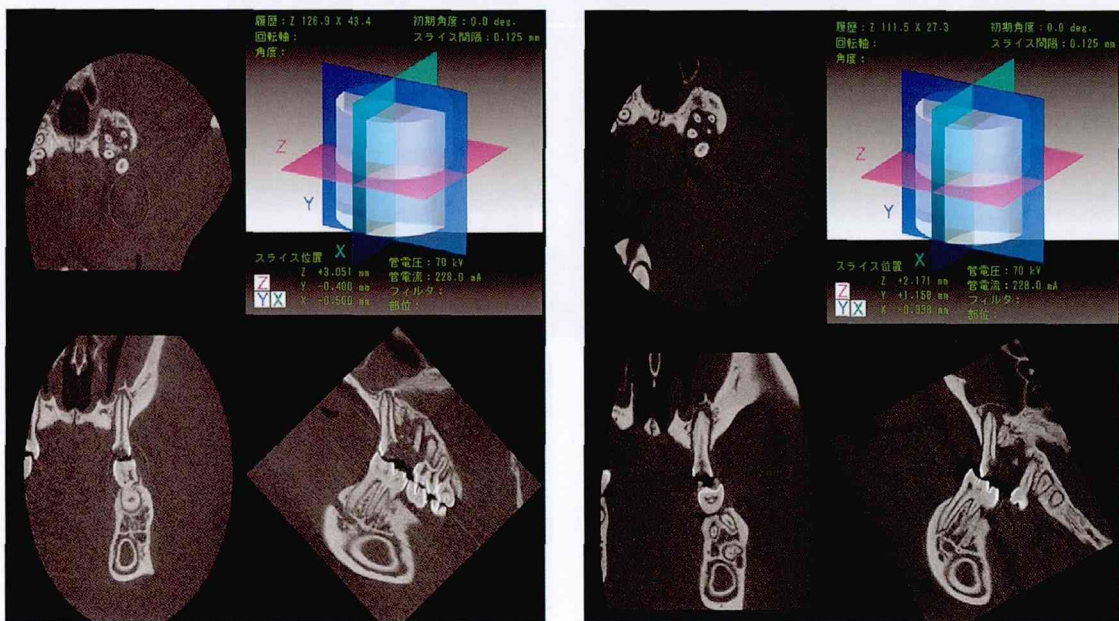
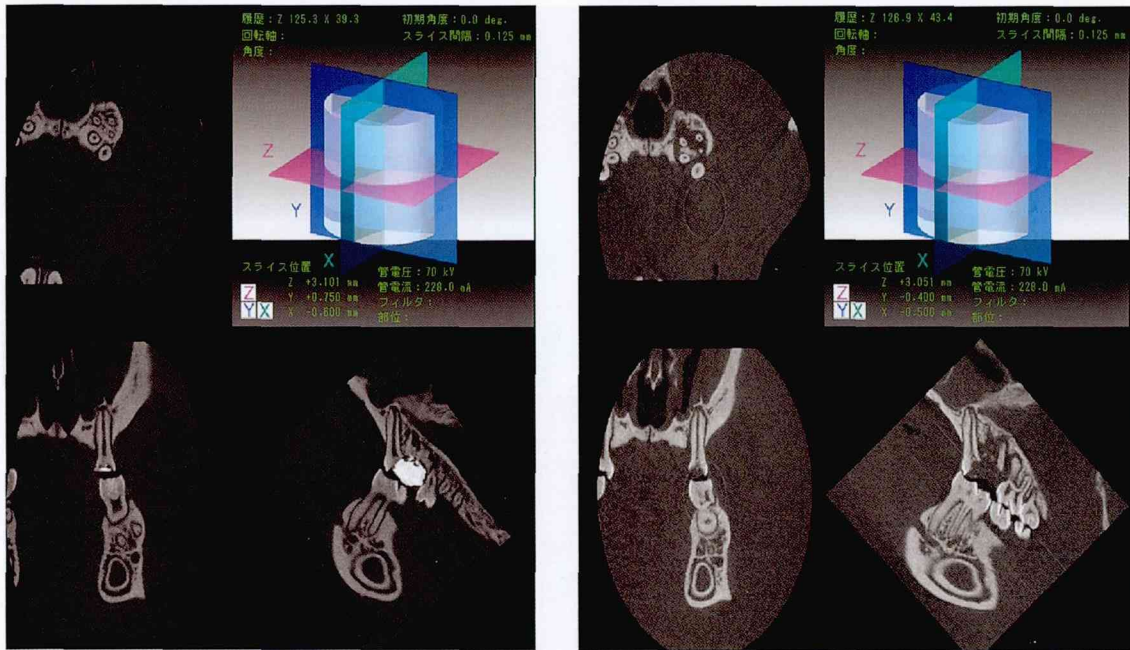
2) 水酸化カルシウム法およびFC法の連続的観察

(1) 水酸化カルシウム法

断髄後10日後から断髄面直下に不透過像が確認でき、30日までその厚みは徐々に増加した。また、根管は狭窄傾向を示し、14日後では根尖はほぼ閉鎖していた。しかし、ほとんどの症例において根尖部に透過像がみられた（Fig. 5）。水酸化カルシウム法にCO₂レーザー応用した症例では、術後から7日後まで覆髄剤が確認でき、仮封材は30日後まで明瞭に認められた。また、10日後には断髄面直下に不透過像が確認でき、30日後では不透過像が根管全体に認められた。根尖端部には透過像は認められず根尖も閉鎖する傾向を示し、予後良好であった（Fig. 6）。

(2) FC法

7日後までは断髄面直下に覆髄剤が確認できたが、30日後まで根管の狭窄はみられず、断髄面直下の不透過像は認められなかった。また、14日より一部の症例で根尖部の透過像が確認できた（Fig. 7）。FC法でCO₂レーザー応用した症例では歯根膜腔の拡大や根尖部の透過像がみられず、30日後では根尖部が閉鎖していることが確認できた。断髄面直下の不透過像は確認できなかった。また、通法に比べ術後から14日後まで覆髄剤が



14 days

30 days

Fig.2 : Images of the R_mCT[®] after Pulpotomy in Ca(OH)₂ Group

It is possible to serially observe a single experimental animal during the process post-pulpotomy.

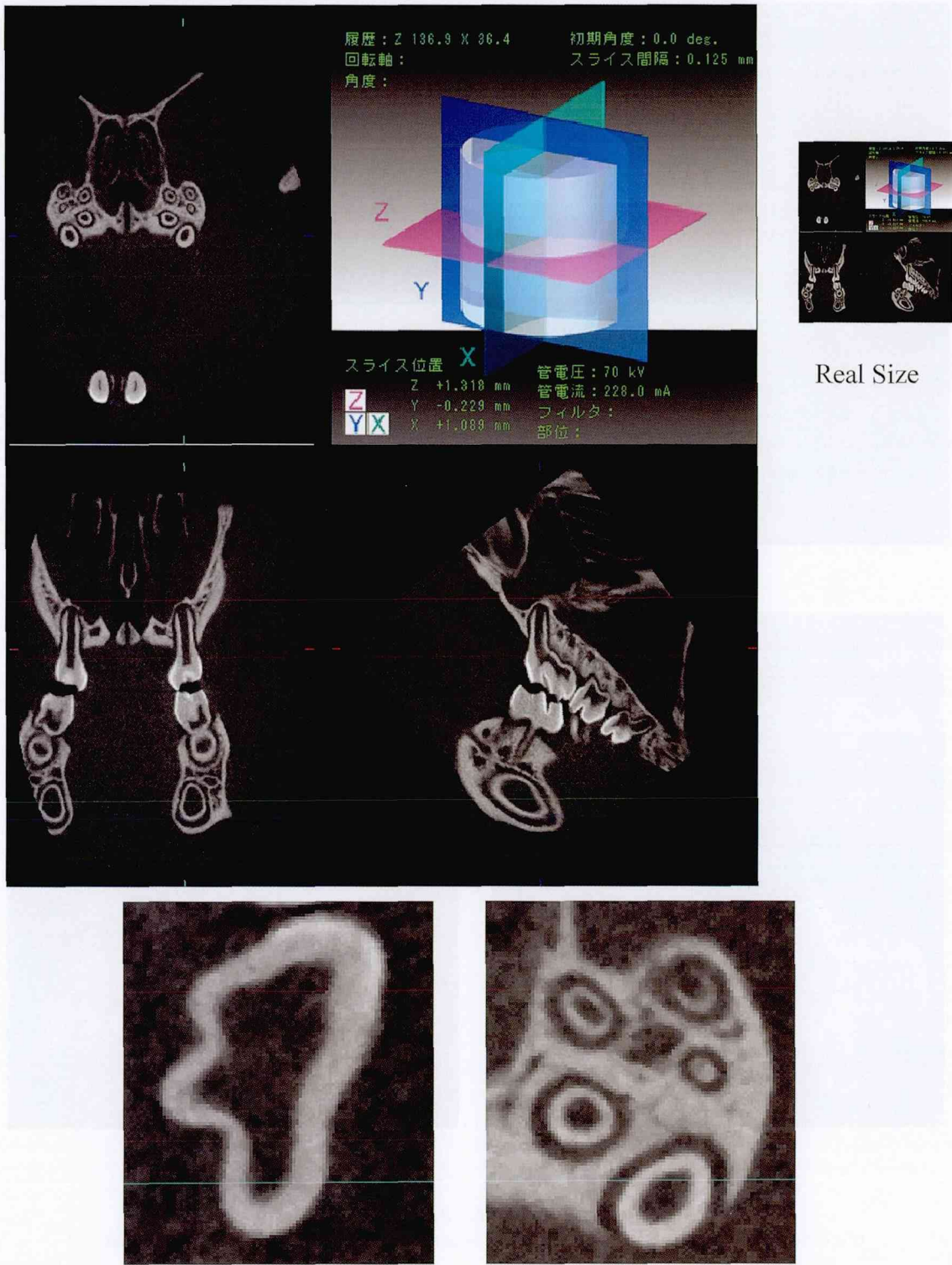
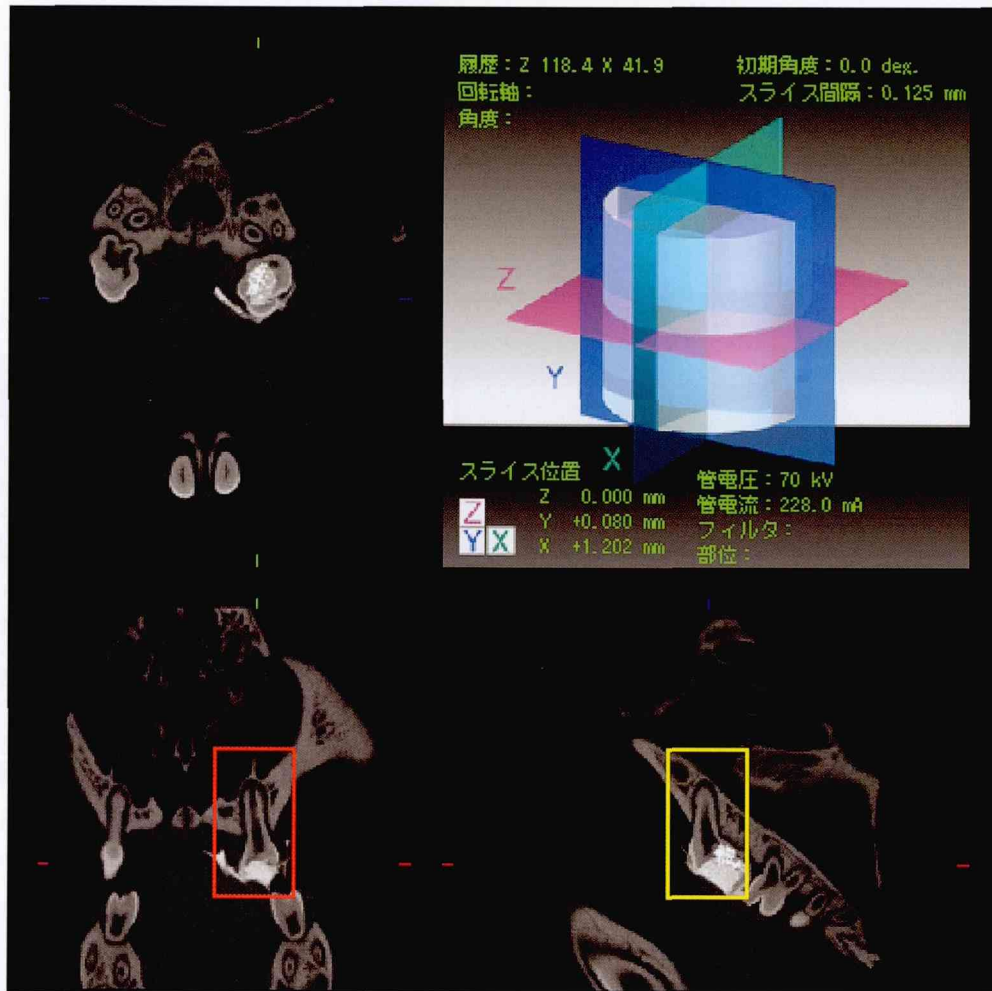


Fig.3 : R_mCT® Images of the Rat Upper First Molar
 Five roots were observed on the upper first molar of rat. The mesial root is the biggest.



Y-slice Images



X-slice Images

The Mesial root of the Rat Upper First Molar

Fig.4: R_mCT® Images of the Left Upper First Molar after Pulpotomy
Pulp capping agents and sealing cements were clearly observed.

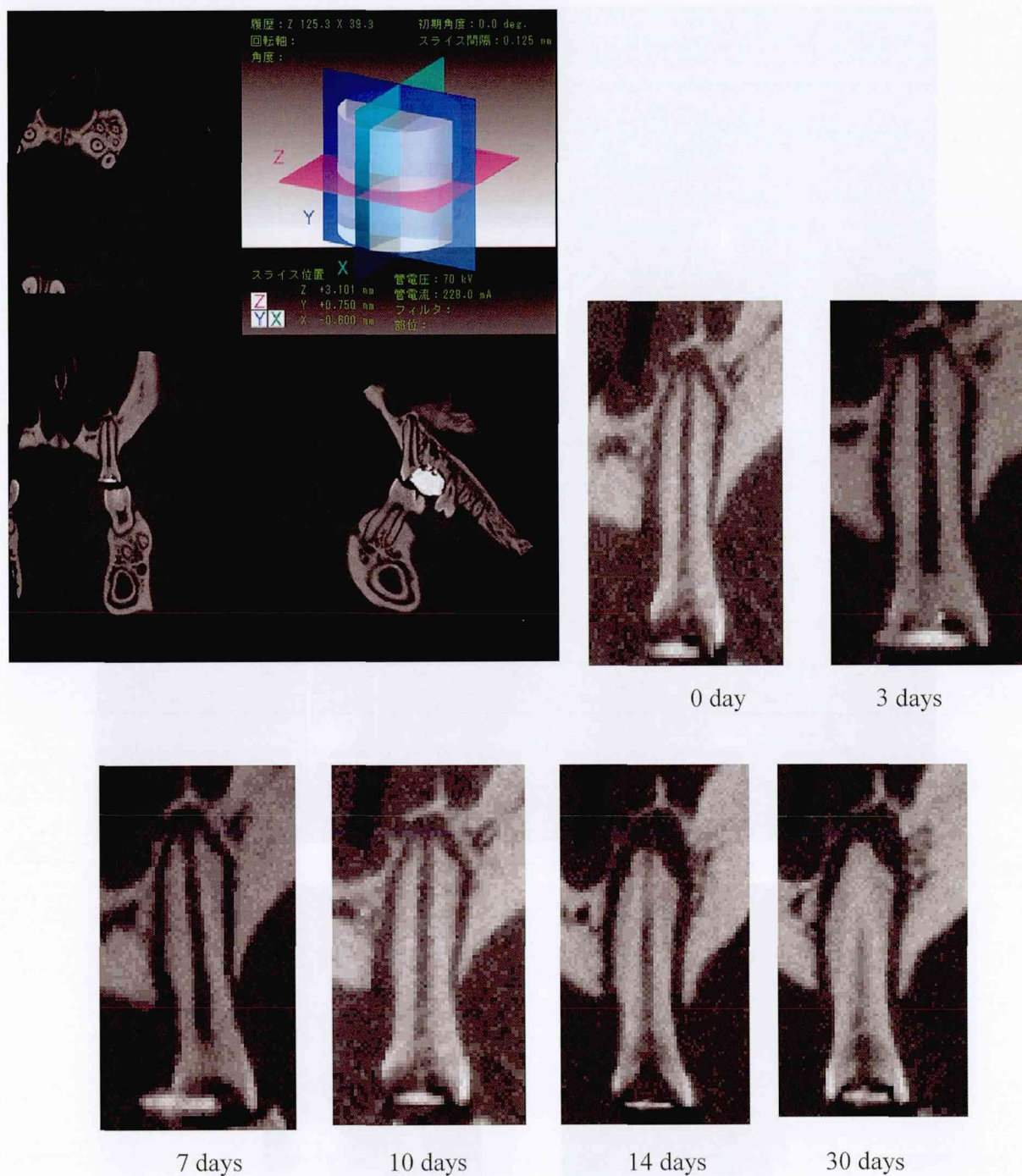


Fig.5 : Images of the R_mCT[®] after Pulpotomy in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Group (Y-slice)

There is tendency to atresia in root apex on 14 days after pulpotomy.

Obliteration stricture was observed in the root canal and the radiopaque was seen under the pulp wound surface at 30 days after pulpotomy.

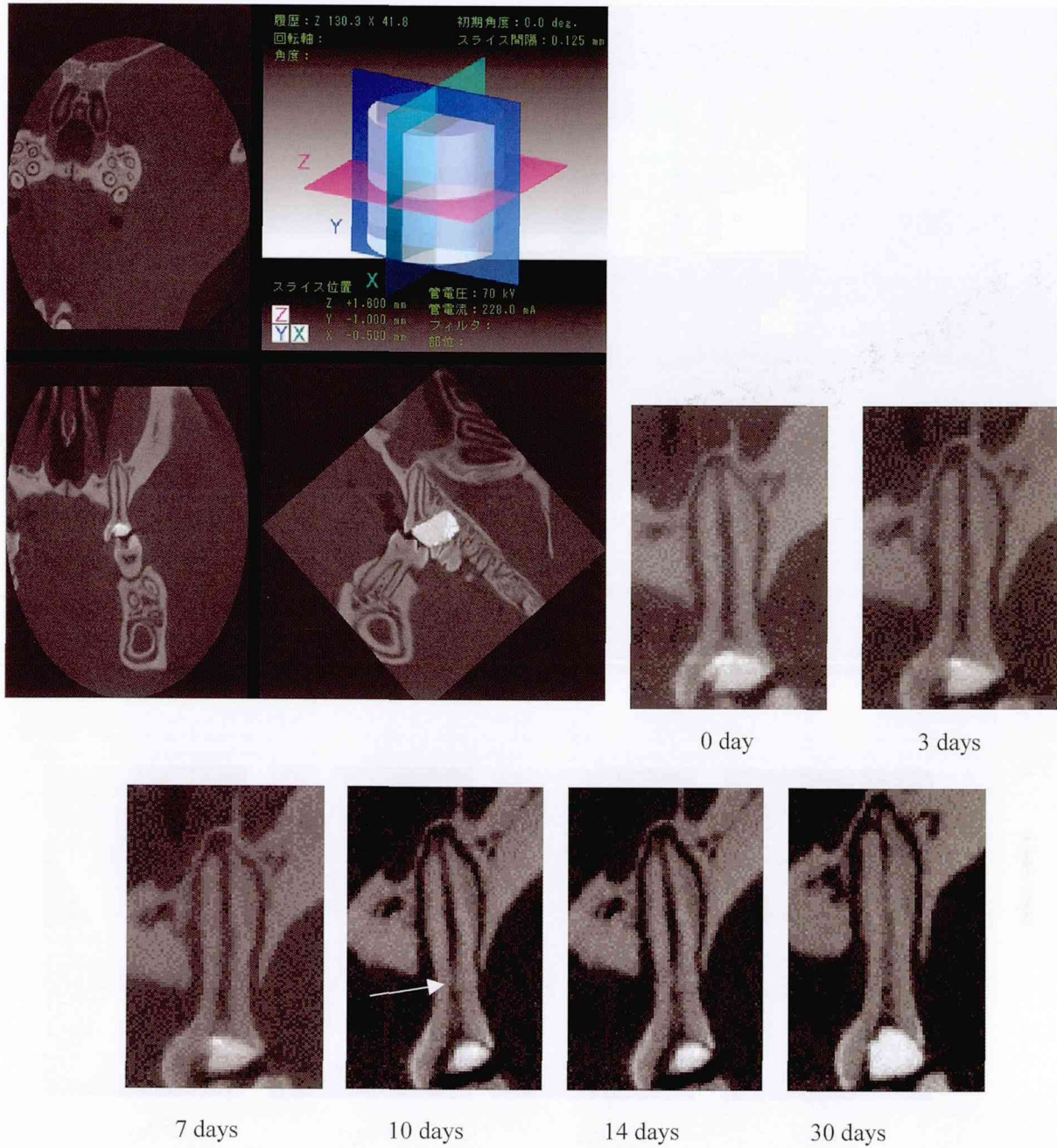


Fig.6 : Ca(OH)₂ Added the CO₂ Laser Irradiation Group (Y-slice Images of the R_mCT®)
 Pulp capping agents were seen until 7 days after pulpotomy. Sealing cements were clearly observed until 30 days after pulpotomy. The radiopaque arrow was seen under the pulp wound surface at the 10 days after pulpotomy.

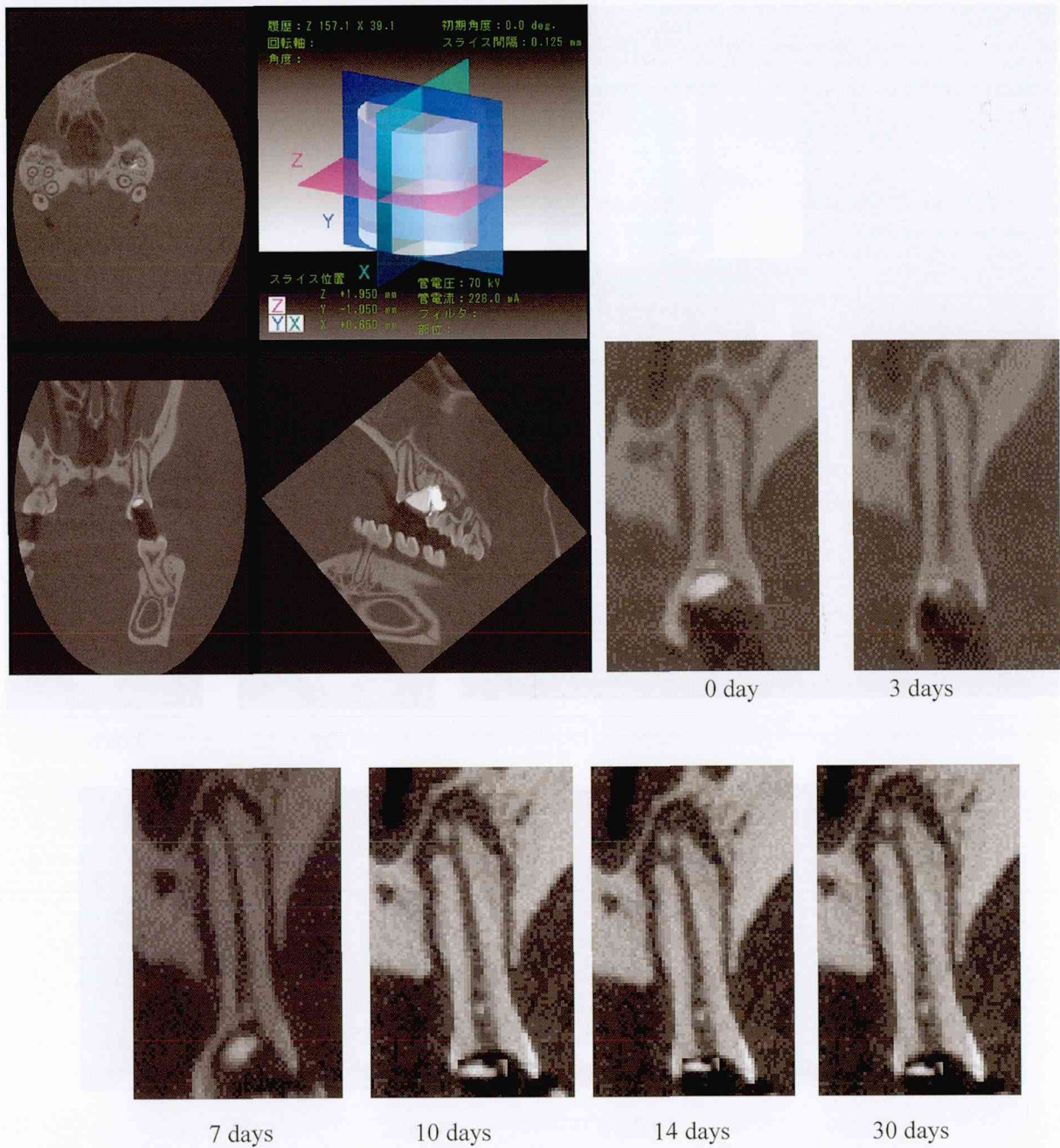


Fig.7 : Images of the R_mCT[®] after Pulpotomy in FC Group (Y-slice)

Pulp capping agents were observed under wound surface until 7 days after pulpotomy. The radiolucency was seen at the apical region on 14 days after pulpotomy.

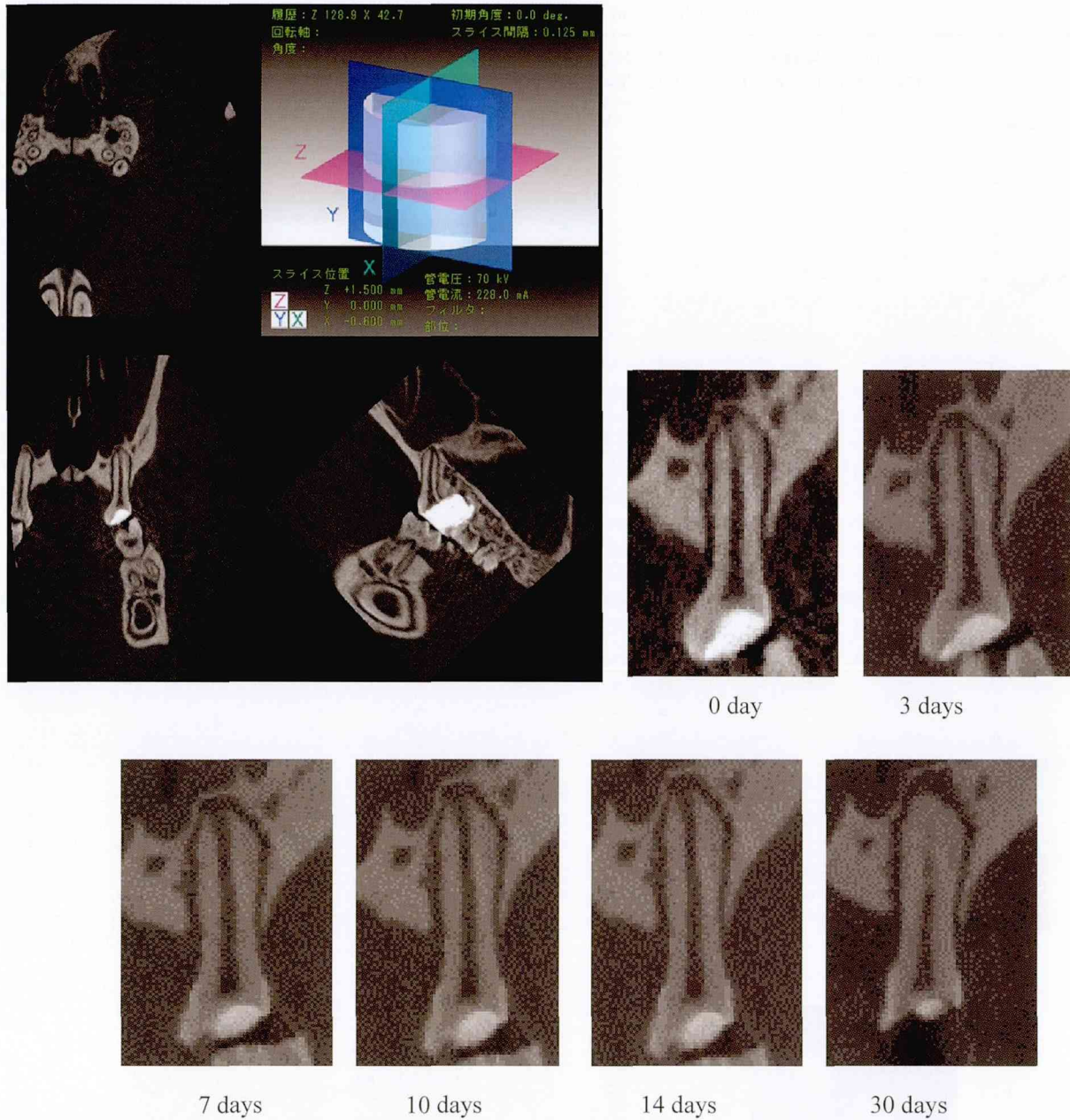


Fig.8 : FC Added the CO₂ Laser Irradiation Group (Y-slice Images of the R_mCT®)

Pulp capping agents and sealing cements were observed until 30 days after pulpotomy. There is tendency to atresia in root apex after 30 days post-pulpotomy. The radiolucency was not found at the apical region.

Table 2 : Observation after Pulpotomy using the R_mCT®

Score	Capping Agents				Sealing Cement				Dentin like tissue				Apical Lesion			
	CH	CH+L	FC	FC+L	CH	CH+L	FC	FC+L	CH	CH+L	FC	FC+L	CH	CH+L	FC	FC+L
3 days																
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	±	+	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-
7 days																
1	±	+	+	±	+	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	±	±	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	±	+	+	+	±	±	±	+	-	-	-	-	-	-	±	-
4	+	±	+	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	±	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-
10 days																
1	-	+	+	±	±	±	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	±	±	±	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	±	±	±	±	+	-	-	-	-	-	-	±	±
4	+	±	±	±	+	+	±	+	±	±	-	-	-	-	-	-
5	+	±	±	±	+	±	+	+	-	±	-	-	-	-	±	-
14 days																
1	-	+	±	±	±	+	±	+	±	+	-	-	±	-	-	-
2	-	+	+	±	±	±	±	±	+	-	-	-	-	±	-	-
3	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	±	-	±	±
4	+	±	-	±	±	±	±	+	±	±	-	-	-	-	-	+
5	-	±	-	-	±	±	±	+	+	+	-	-	+	+	±	-
30 days																
1	-	±	-	±	±	+	±	+	+	+	-	-	±	-	-	-
2	-	±	±	±	±	±	±	±	+	+	-	-	-	+	-	±
3	-	±	-	±	±	±	-	±	+	+	-	-	±	-	±	±
4	+	±	-	-	-	±	-	±	±	+	-	-	-	±	-	+
5	-	-	-	-	±	±	-	+	±	±	-	-	+	+	+	-

CH, Calcium Hydroxide ; FC, Formocresol ; L, Laser irradiation



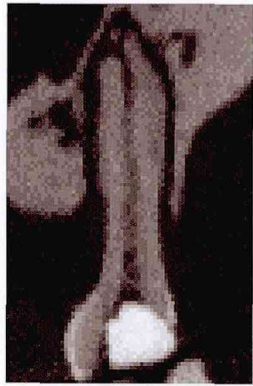
30 days



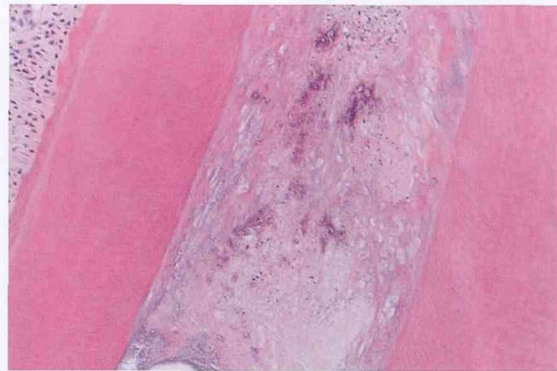
HE × 100

Fig.9-1 : Images of the R_mCT® after Pulpotomy in Ca(OH)₂ Group

Inflammatory cells (arrow) were present and infiltration was observed under the pulp wound surface, calcified deposits (*) were found in the central area of root canal.

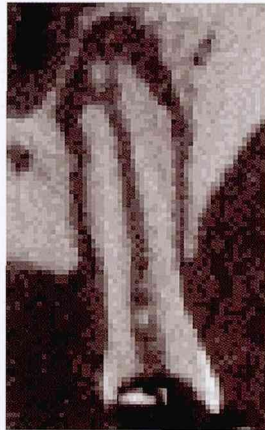


30 days



HE × 100

Fig.9-2 : Ca(OH)₂ Added the CO₂ Laser Irradiation Group
Many of calcified globular structure were observed in the central area of root canal.



30 days



HE × 100

Fig.9-3 : Images of the R_mCT[®] after Pulpotomy in FC Group
Necrotic zone was seen beneath the pulp wound surface.



30 days



HE × 100

Fig.9-4 : FC Added the CO₂ Laser Irradiation Group
The pulp wound surface is covered with a necrotic zone, and degenerative cells in a necrotic zone.

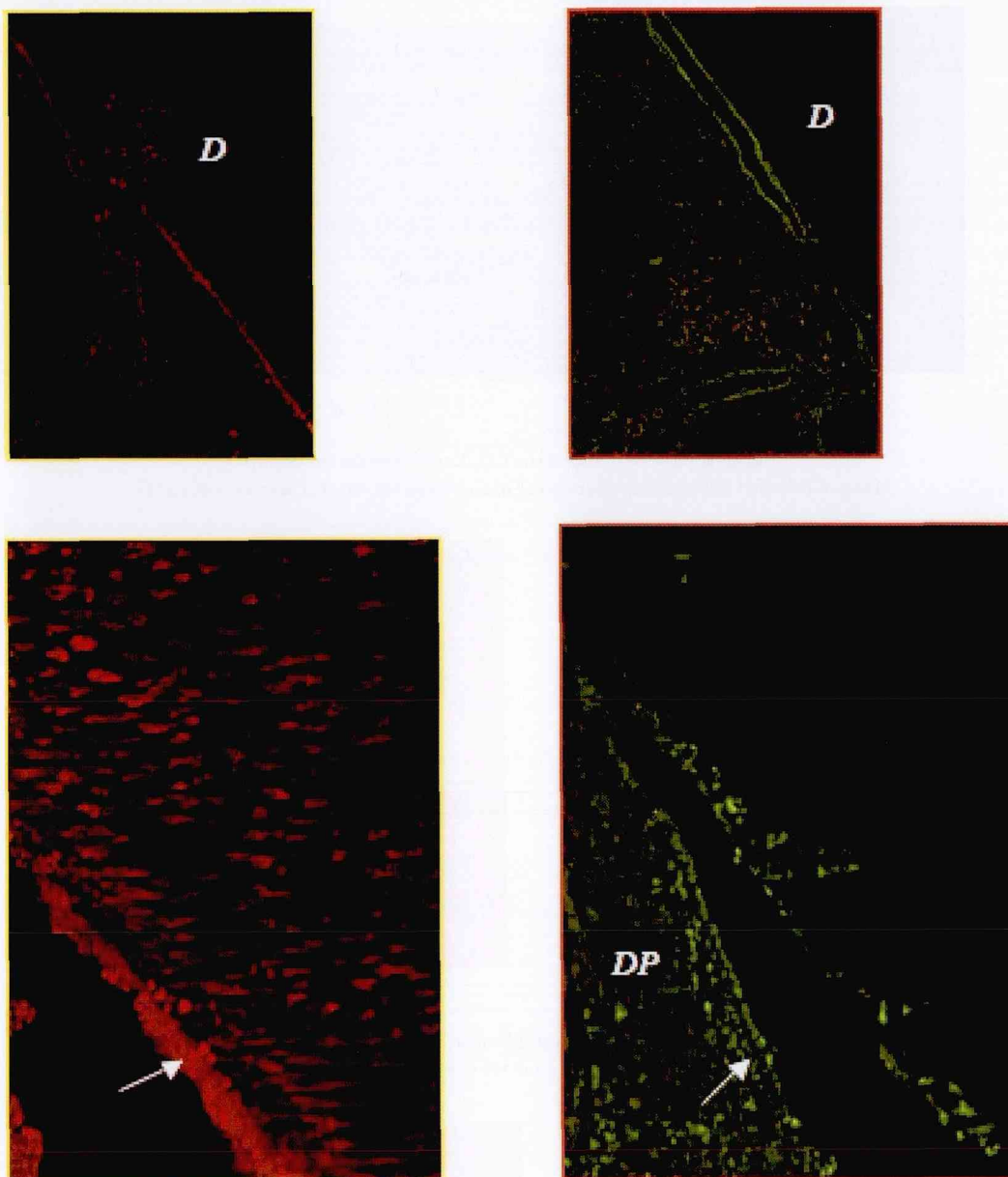


Fig.9-5 : Immunofluorescence localization of dentin sialoprotein (DSP) and osteopontin (OPN) in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group
The matrix of newly formed dentin-like tissue showed positive-reactivity for DSP and OPN.

観察でき、予後良好である傾向が確認できた (Fig. 8).

各実験群の観察画像では、覆髄剤は水酸化カルシウム法およびFC法ともに CO_2 レーザー応用した症例において明瞭に確認できた。仮封材は各症例で差はみられなかった。断髄面直下の不透過像の出現は水酸化カルシウム法で多く観察でき、 CO_2 レーザー応用した症例において顕著に確認できた。根尖部の透過像の出現はFC法で多くみられた (Table 2).

2. 病理組織学的所見

1) ヘマトキシリンエオジン染色による観察

水酸化カルシウム法では断髄面直下に炎症性細胞の浸潤が認められ、歯根中央部には部分的にヘマトキシリンで染色される細胞外基質が確認でき、その様相は石灰化硬組織に類似していた (Fig. 9-1)。また、水酸化カルシウム法に CO_2 レーザー応用した症例では、歯根中央部に同様な構造が多く認められた (Fig. 9-2)。

FC法では断髄面直下に壊死層が観察でき (Fig. 9-3)、FC法に CO_2 レーザー応用した症例

では、断髄面直下に壊死層が観察でき変性が認められ、デンチンブリッジは確認できなかった (Fig. 9-4).

2) 免疫組織化学的観察

水酸化カルシウム法で観察された硬組織様構造物は免疫組織化学的に象牙質シアロタンパク質とオステオポンチン局在を示す反応を示した (Fig. 9-5).

考 察

1. R_mCT[®]について

従来のマイクロCTはエックス線管球とセンサーが固定されており被写体を回転テーブルに固定させる方法である。生体では回転中に頭部や尾部が管球に接触してしまうことから撮影が困難であり、そのために標本の作製が不可欠であった。新井ら²¹⁻²⁴⁾は、1992年より歯科医療に特化した小型のエックス線CTの開発に着手し、1997年に小照射野コーンビームエックス線CT (Ortho-CT[®]) の試作に成功し臨床応用を行っている。その後、Ortho-CTの技術をモリタ製作所に技術移転し、歯科・耳鼻科領域において硬組織の三次元的画像診断装置として小照射野エックス線CTの実用機として3DXを開発した。近年新井ら²²⁾が開発したR_mCT[®]はラットなどの実験用小動物を安定したステージに保持し、管球とセンサーを回転させることにより、被写体を回転させることなく麻酔下の小動物を容易に撮影し、R_mCT[®]画像を用いて三次元的な観察が可能となった²³⁻²⁸⁾。撮影時間は17秒と短時間で一度の撮影により1億画素の三次元的な画像を得ることが可能であり、解像力は最小で10×10×10μm、最大で100×100×100μmであることから麻酔下の実験用ラットの頭部全体の画像を鮮鋭に観察し経時的な観察に適することが可能となり、本研究においては同一個体の連続的な観察により、覆髄剤の吸収程度や仮封材の確認など、処置歯の歯列横断像、歯列平行断像および水平断像での三次元的な経過を連続的に確認することができた。

2. 歯髄断髄法について

近年、歯髄断髄法にはレーザーの応用など様々な方法²⁶⁻²⁸⁾が試みられているが、未だ小児歯科臨床で頻用されず、ホルムクレゾールを使用するFC法と水酸化カルシウム法が多用されている。

城戸ら¹¹⁾の直接覆髄を行った研究では、覆髄後7日から14日には覆髄面下部の歯髄内に象牙芽細胞様細胞が分化し、既存の象牙質壁に球状の石灰化球が形成され、覆髄後30日および60日には、修復象牙質形成が歯髄全体に拡大し、覆髄面下部に明瞭な象牙質橋が形成されたと報告している。本研究では、R_mCT[®]画像により、術後0日、3日、7日、10日、14日までは覆髄剤、仮封材が明瞭に確認できた。しかしながら30日では一部で覆髄剤が観察できず、仮封材が脱離している症例もみられた。また、象牙質様構造物であると思われる不透過像の出現は、水酸化カルシウム法で10日後に断髄面直下に不透過像がわずかに認められ、14日以降で明瞭に観察できた。また、FC法では根尖部の透過像の出現が14日後に疑わしい画像が観察できたが、30日以降に多く観察できた。本研究では水酸化カルシウム法において予後良好であり、その傾向はCO₂レーザーを応用した症例に顕著であることから断髄後の対応として有用であることも推測できた。

病理組織学的観察では、水酸化カルシウム法で断髄面直下に炎症性細胞の浸潤が認められ、硬組織様構造が確認できた。FC法では断髄面直下に壊死層が多く観察できたが硬組織様構造は確認できなかった。CO₂レーザーを応用した症例には、水酸化カルシウム法では、歯根中央部にヘマトキシリンに染まった石灰化物が数多く確認でき、FC法では断髄面直下に壊死層がみられ、炎症性細胞の浸潤も確認できた。水酸化カルシウムを用いた歯髄断髄後の治癒経過では³⁻⁸⁾、水酸化カルシウムは強アルカリであるために、これに接した歯髄は深部まで壊死に至り、術後2週間前後になると、この線維状の壊死層に沿って象牙芽細胞様の細胞配列と象牙前質様物質の形成がみられ、次に硬組織の形成が開始され術後6~8週間以降では完全に象牙質様構造を有する硬組織が隙間なく1層形成され治癒は完了するといわれている。また、術後14~28日以降では歯髄側に細胞を埋入した骨様象牙質突起を有する新生象牙芽細胞が規則正しく配列し、ほぼ完成したデンチンブリッジの形成が認められる⁵⁻⁸⁾。本研究でも処置後14日後以降に断髄面直下に不透過像が多くみられ同様な結果を示した。本研究ではCO₂レーザーを応用した症例において予後が良好な傾向がみら

れたが、CO₂レーザーは断髄面を蒸散し、通法に比べ止血効果があることから¹⁸⁻²⁰⁾、覆髄剤の薬効によるものと推測でき、CO₂レーザーの有用性が判断できた。また、14日後にR_mCT[®]画像で観察できた根管内の不透過像を抗象牙質シアロタンパク質抗体と抗オステオポンチン抗体を用いて局在を免疫組織化学的に検討した結果、免疫染色により観察部位が陽性の染色性を示したことから新生硬組織は象牙質様硬組織であることが推測できた。

結 論

R_mCT[®]を用いてラット断髄法を連続的に観察した結果、歯断髄後の患歯の硬組織形成過程、仮封材ならびに覆髄剤の吸収程度が明瞭に観察できた。また、CO₂レーザーを応用した症例では、通法の断髄に比べ、FC法では根尖部の透過像や歯根膜腔の拡大が少なく、水酸化カルシウム法では切断面直下の硬組織誘導が良好であった。

R_mCT[®]による観察はラットなど、実験用小動物を連続的に三次元的に観察することが可能であり、組織像を対応させ比較することも可能であり有用性が確認できた。

本研究は松本歯科大学動物実験計画書(027-05)により実施した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終止御親篤なる御指導、御鞭撻と御高閲を賜った松本歯科大学大学院健康増進口腔科学講座 宮沢裕夫教授に衷心より感謝申し上げます。また、御指導を賜った松本歯科大学大学院硬組織疾患制御再建学講座 中村浩彰教授、健康増進口腔科学講座 山本昭夫教授、松本歯科大学大学院 新井嘉則客員教授ならびに硬組織疾患制御再建学講座 永沢 栄准教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 宇佐美祐一 (1987) 水酸化カルシウムを貼布した歯髄切断部の初期石灰化に関する微細構造学的研究. 基礎歯誌 **29**: 293-331.
- 2) Avram DC and Pulver F (1989) Pulpotomy medicaments for vital primary teeth. Survey to determine use and attitudes in pediatric dental practice and in dental schools throughout the world. *J Dent Child* **56**: 426-34.
- 3) Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E and Cerra F (1990) Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* **170**: 56-60.
- 4) Krenm V, Brand-Saberi B and Wachtler F (1991) Hyaluronic acid influences the migration of myoblasts within the avian embryonic with bud. *Am J Anat* **192**: 400-6.
- 5) Samuel SK, Hurta RAR, Sperman MA, Wright JA, Tuvrley EA, Tuvrley EA, and Greenberg AH (1993) TGF- β 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol* **123**: 749-58.
- 6) Sasaki T and Watanabe C (1995) Stimulation of osteoinduction in bone, wound healing by high molecular hyaluronic acid. *Bone* **16**: 9-15.
- 7) Yoshiba K, Yosiba N, Nakamura H, Iwaku M and Ozawa H (1996) Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res* **75**: 1590-7.
- 8) Zhang M and Fukuyama H (1999) GCRP immunohistochemistry in wound healing and dentin bridge formation following rat molar pulpotomy. *Histochem Cell Biol* **112**: 325-33.
- 9) Kitamura C, Kimura K, Nakayama T and Terashita M (1999) Temporal and Spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cell involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. *J Dent Res* **78**: 673-80.
- 10) 木村奈津子, 有田憲司, 西野瑞穂 (1999) 水酸化カルシウムによる歯髄断髄法の改良に関する研究-その1 水酸化カルシウム貼薬期間に関する病理組織研究-. 小児歯誌 **37**: 734-46
- 11) 城戸秀美 (2000) ラット白歯の歯髄断髄切断後の修復象牙質形成に対する水酸化カルシウム製剤, ホルムクレゾール製剤, 高分子ヒアルロン酸製剤の効果に関する組織学的・微細構造的な研究. 昭和歯会誌 **20**: 294-309.
- 12) 城所 繁 (2001) 幼若永久歯歯髄切断法の実験的研究-FC法とCa(OH)₂法の歯髄内血管の動向について-. 愛院大歯誌 **39**: 463-85.
- 13) Lovschall H, Fejerskov O and Flyvbjerg A (2001) Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res* **15**: 108-12.

- 14) Ito K, Gomi Y, Sato S and Arai Y (2001) Clinical application of a new compact CT system to assess 3-D images for the preoperative treatment planning of implants in the posterior mandible. *Clin Oral Implants Res* **12** : 439-542.
- 15) Zhang M, Fukuyama H, Zhang J and Tanaka T (2003) Immunoelectron microscopic study of CGRP-immunoreactive nerve terminals in wound healing and dentin bridge formation after pulpotomy in rat molar. *Acta Histochem. Cytochem* **36** : 43-9.
- 16) Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatat N, Hollweck R, Crispin A and Folwaczny M (2005) Effectiveness of 4 pulpotomy techniques - randomized controlled trial. *J Dent Res* **84** : 1144-8.
- 17) Rodd HD and Boissonade FM (2006) Immunocytochemical investigation of immune cells within human primary and permanent tooth pulp. *Pediatr Dent* **16** : 2-9.
- 18) 海老原 新 (1989) Nd:YAG レーザーの歯髄断髄切断法への応用に関する実験的研究. *日歯保存誌* **32** : 1670-84.
- 19) 北村慶史, 加藤喜郎 (1999) レーザー照射と高分子接着性レジンによる直接歯髄覆とうが露髄部の創傷治癒に及ぼす効果に関する病理組織的研究. *日歯保存誌* **42** : 461-77.
- 20) Suzuki M, Katsumi A, Watanabe R, Shirono M and Katoh Y (2005) Effects of an experimentally developed adhesive resin system and CO₂ laser irradiation on direct pulp capping. *Operative Dentistry* **30** : 702-18.
- 21) Arai Y, Tammisalo E, Honda K, Iwai K, Hashimoto K and Shinoda K (1998) Development of Ortho cubic super high resolution CT (Ortho-CT). *Car '98 Computer assisted radiology and surgery*, 780-5. *Elsevier, Amsterdam*.
- 22) Arai Y, Tammisalo, E, Honda K, Iwai K, Hashimoto K and Shinoda K (1999) Development of a compact computed tomographic apparatus for dental use. *Dento Maxillo-Fac Raiol* **28** : 245-8.
- 23) Arai Y, Honda K, Iwai K, Shinoda K (2001) Practical Model "3 DX" of limited cone-beam X-ray CT for Dental use. *Car '01 Computer assisted radiology and surgery*. Amsterdam : Elsevier : 671-5.
- 24) Hashimoto K, Arai Y, Iwai K, Araki M, Kawashima S and Terakado M (2003) A comparison of a new limited cone beam computed tomography machine for dental use with a multidetector row helical CT machine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93** : 371-7.
- 25) 大須賀直人, 松田厚子, 趙 満琳, 新井嘉則, 紀田晃生, 岩崎 浩, 宮沢裕夫 (2004) 歯科用小照射野エックス線 CT 画像による未萌出の観察. *小児歯誌* **42** : 535-40.
- 26) Arai Y, Yamada A, Ninomiya T, Kato T and Masuda Y (2005) New Micro Computed Tomography (R_mCT[®]) developed for *in vivo* Animal Experiment. *Oral Radiology* **21** : 14-8.
- 27) Osuga N, Yang J, Yamakawa Y, Ninomiya T, Arai Y, Wang RR, Xu Q, Iwasaki H and Miyazawa H (2006) Micro-CT observation of rat dental pulp healing after pulpotomy in *in vivo* study. *Ped Dent J* **16** : 1-6.
- 28) Yang J, Osuga N, Li X, Wang RR, Xu Q, Yanagisawa S, Kida A, Arai Y and Miyazawa H (2007) Observations of Pulpotomy in Rats Using *in vivo* Micro-CT-The changes after treatment of formocresol and calcium hydroxide pulpotomise or CO₂ laser irradiation- *Ped Dent J* **17** : 32-9.