

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592416

研究課題名（和文）薬物性口内炎におけるプロスタグランジンの役割の解明と  
新しい口腔ケア法の確立研究課題名（英文）Clarification of the role of prostaglandins in drug-induced  
stomatitis and establishment of a new oral care

研究代表者

河上 智美（KAWAKAMI TOMOMI）

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30277595

研究成果の概要（和文）：小児期悪性腫瘍の化学療法に使用されているアルキル化剤（シクロフォスファミド）を成長期のマウスに投与し、口腔領域におよぼす影響を検討した。薬剤投与群では、歯周組織で歯根膜繊維や歯根形成などの変化が認められ、歯の支持組織としての機能へ影響をおよぼしていると考えられた。また舌の上皮構造の変化が認められ口内炎発症に関与すると考えられたが、歯周組織にあらわれたほどの大きな変化は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the effect of cyclophosphamide on tongue epithelium and periodontal tissue in growing mice. In the treatment group the root formation was inhibited and the periodontal ligament cells were less observed compared to the control group. Structural changes in the tongue epithelium were less than the changes in periodontal tissue except high-dose group. These results suggest that the changes in periodontal tissue by cyclophosphamide affects to masticatory function as a supporting organization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：小児、悪性腫瘍、口内炎、プロスタグランジン、シクロフォスファミド

## 1. 研究開始当初の背景

小児の悪性腫瘍（白血病など）は、手術療法、化学療法、放射線療法および免疫療法などのより高度な治療法が確立し、現在では生存率も上昇してきている。近年では各器官組織の成長期にあたる小児期に悪性腫瘍の治療を行うと、さまざまな影響があらわれるこ

とが報告されている。治療後の晩期障害として口腔領域では、小児期は永久歯やその歯周組織の形成時期となるため歯胚の欠如、構造異常および着色歯などが認められることが報告されており、治療後の歯科での長期のフォローアップの必要性も示されている（河上, 2004. 三穂, 2003.）。また、化学療法の治

療途中の副作用として、口内炎が舌や粘膜に発症しやすく、これらの症状は患児らが、食事や睡眠などの基本的な生活を送っていく上で大きな苦痛と支障を与える原因の1つとなっていることが多い。(安達, 2006. 百, 2005.)。

化学療法薬の副作用としてあらわれる歯周組織や口腔粘膜への影響の詳細は、まだ明らかとなっていない部分も多く、臨床の現場においては現在のところ対症療法が主体となっており、あらわれた症状に対して有効な治療法やケア法が確立されていない。患児の治療中の免疫力低下の状態や治癒後の生活を考慮した場合、化学療法薬の口腔組織への影響や発生メカニズムを解明し、その治療法や口腔ケア法等の対策に講じていくことは重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

小児悪性腫瘍の治療に用いられている薬剤(アルキル化剤のシクロフォスファミド(以下CY))を小児期のマウスに投与して、軟組織を中心として口腔領域への影響を調べる。

(1) シクロフォスファミド投与群(以下CY群と略す)における、舌の変化を組織学的に検討する。

(2) 下顎臼歯部歯周組織への影響(軟組織である歯根膜組織に焦点をおく)を観察する。

(3) 口内炎の炎症に関与すると予想されるプロスタグランジンについて、プロスタグランジン合成酵素の発現に変化が起こっているか、舌および歯周組織で検索する。

(4) 得られた結果をもとにして、悪性腫瘍治療経験児の口腔ケアや留意すべき点について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬剤の投与

歯の形成期にあたる小児期のICRマウスの下顎骨臼歯M1の歯根形成時期である生後12日に抗腫瘍薬シクロフォスファミドを各群に30, 50, 100, 200mg/kgとなるよう投与した。

その後、生後16, 20, 24および27日まで飼育し、ネンブタール深麻酔下にて灌流固定し試料を採取した。

### (2) 全身および頭蓋の観察

全身の成長は実験開始から終了まで、各群の体重を計測した。

頭蓋の成長観察は、頭部エックス線規格写真撮影により得た側方エックス線写真を用いて観察した。

### (3) 歯周組織の観察

実験期間飼育後、下顎骨部の試料を採取し4%パラホルムアルデヒドで固定後、10%EDTAにて脱灰した。通法に従いパラフィン包埋したのち、4 $\mu$ mの連続切片を作製した。

切片は、HE染色および免疫染色(サイトケラチン)を行われた。

### (4) 軟組織の観察

軟組織部の試料として舌が採取された。上記と同様に4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋され、連続切片が作製された。HE染色および免疫染色(サイトケラチン、mPGES-1)が行われた。

## 4. 研究成果

### (1) 体重変化

CY投与後、実験群では体重増加の抑制が認められたが、数日後より再び体重増加を認めた。(図1)

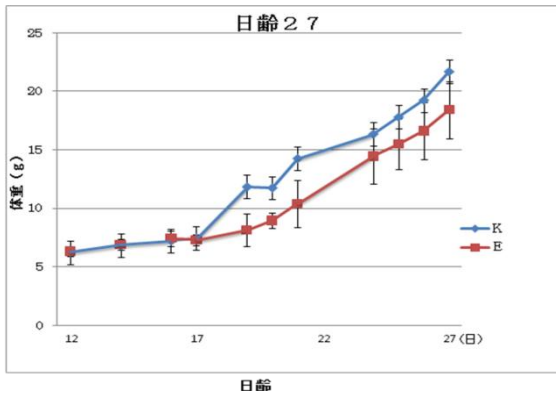


図1 体重変化

(K : 対照群、E : C Y群 100 mg/kg)

(2) 頭部エックス線写真による観察  
 生後 27 日齢の頭部エックス線写真を示す。  
 C Y群では、薬剤投与時に形成されたと考えられる切歯部の形成不全や臼歯部の歯根の短小化し、歯の硬組織形成に対するC Yの影響が認められた。(図2)



対照群



C Y群 (100 mg/kg)

図2 [頭部エックス線写真] 27 日齢

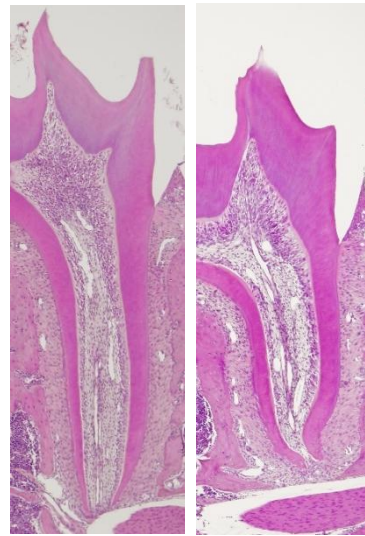
また、これらC Yによる歯根形成不全は濃度依存的に歯根の短小化や形態異常が強くあらわれた。

(3) HE 染色による歯周組織の観察

①27 日齢における歯根の形成状態

対照群に比較し、C Y群の歯根長は短く、

根形態に異常を認めた。C Y群では歯根膜腔の狭窄は認めず、やや広い傾向を示した。(図3)



対照群

C Y群 (100 mg/kg)

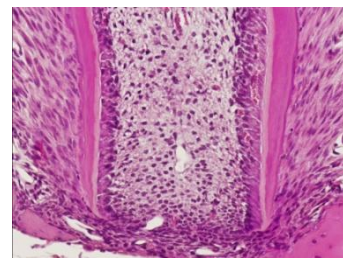
図3 M1 遠心歯根形成状態 27 日齢

②20 日齢における歯根膜繊維の状態

対照群と比較しC Y群では、M1 歯根根尖部付近の歯根膜繊維は繊維が疎で配列が不規則となっており、線維芽細胞の減少が認められる。また、歯根端部のヘルトヴィッヒ上皮鞘が短くその細胞形態が不明瞭となり、正常な歯根形成が困難であると考えられた。

(図4)

対照群



C Y群

(100 mg/kg)

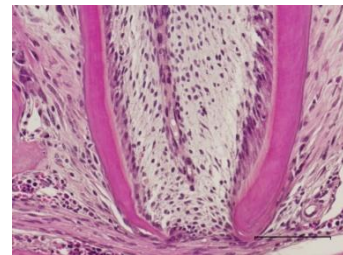


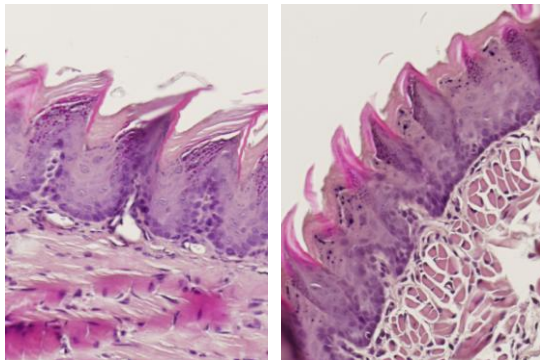
図4 M1 遠心歯根形成状態 (根尖部拡大)

20 日齢

#### (4) HE 染色による舌の観察

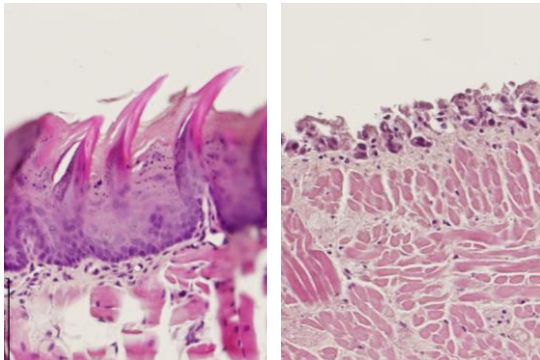
##### 20 日齢における舌の変化

C Y を 30, 50, 100, 200mg/kg をそれぞれ投与した各群で、20 日齢の舌背部重層扁平上皮の HE 染色像を比較すると、濃度による重層扁平上皮の構造の大きな変化は認められなかった。(図 5) 16 および 24 日齢の舌背部についても、濃度による大きな差異は HE 染色では観察されなかった。しかし、C Y 200mg/kg を投与した群にさらに投与 2 日後に 200mg/kg を追加投与すると、20 日齢時に舌表面の上皮構造の崩壊が認められた。



対照群

C Y 群 (50 mg/kg)



C Y 群 (200 mg/kg) C Y 群 (200 mg/kg × 2)

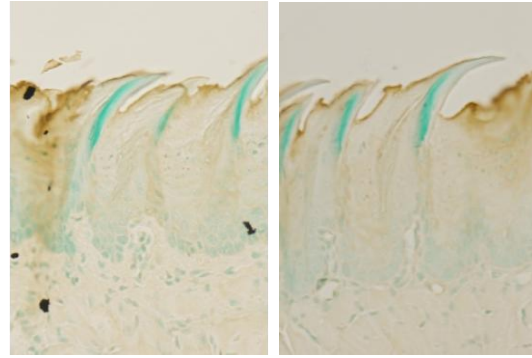
図 5 舌背部の重層扁平上皮の状態 20 日齢

#### (5) 免疫染色による舌の観察

##### ① サイトケラチン

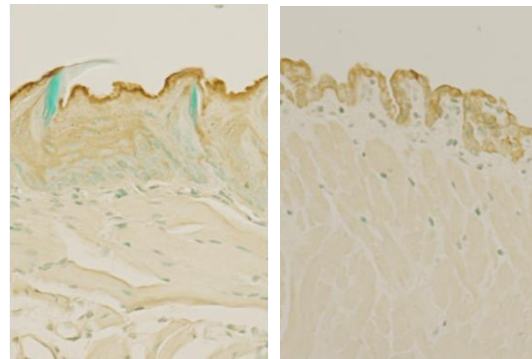
上皮組織のマーカーとしてサイトケラチンを用いた免疫染色を行ったところ、高濃度の C Y 群 (200 mg/kg) でケラチンに染色される細胞層が多くみとめられ、舌背部の表層で

も染色性が強かった。(図 6)



対照群

C Y 群 (50 mg/kg)



C Y 群 (200 mg/kg) C Y 群 (200 mg/kg × 2)

図 6 舌背部のサイトケラチンの発現状態  
20 日齢

##### ② mPGES-1

炎症と関連のあるプロスタグランジンが薬剤による口内炎にも関与していると考え、プロスタグランジン E2 の合成酵素の 1 つである mPGES-1 の抗体を用いて免疫染色を行った。しかし、対処群および C Y 群のすべてで有意な発現を認めなかった。しかし、この炎症性サイトカインの発現に関しては、抗体の種類や希釈倍率など、さらに詳細に検討が必要と思われた。

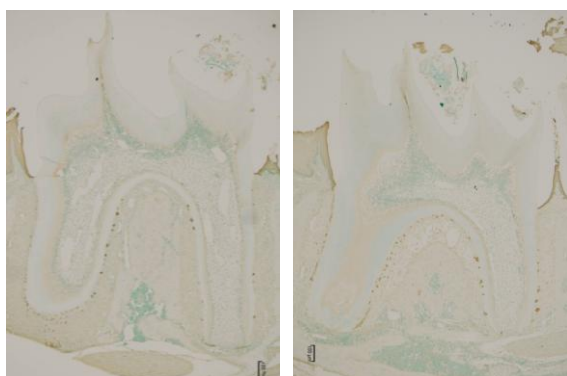
#### (6) 免疫染色による歯周組織の観察

##### サイトケラチン

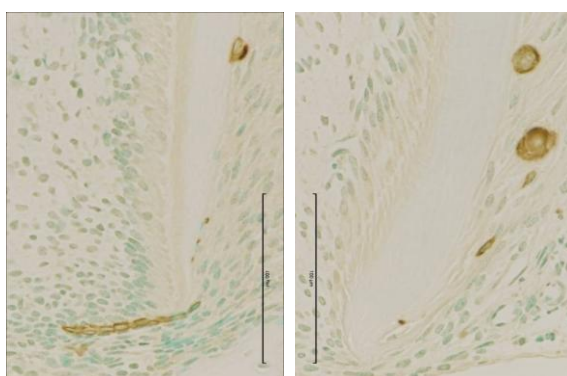
舌と同様にサイトケラチンを用いて、歯根形成先端部の歯周組織について調べた。20 日齢のマウス臼歯 M1 を観察すると対照群において、歯根尖形成端部でサイトケラチンに染



まる細胞層を認めた。この部位はヘルトヴィッヒ上皮鞘に相当すると考えられる。(図7) また、歯根膜腔内に同様に染色される上皮細胞塊の点在が認められ、これらはマラッセの上皮残遺と考えられた。一方 CY 群では、歯根形成端部で対照群にみられる帯状に並ぶ上皮細胞は認められず、マラッセの上皮残遺と思われる細胞集団も大きくまばらに点在していた。歯根形成に重要な役割を果たしているといわれているヘルトヴィッヒ上皮鞘が早期に消退していることから、歯根形成シグナル伝達が行われず、歯根形成障害を引き起こしていると考えられた。



対照群                      CY 群 (100 mg/kg)  
(図中の右側歯根が M1 遠心根となる)



対照群                      CY 群 (100 mg/kg)

図7 M1 サイトケラチン発現状態 20 日齢  
(上段 : M1 全体、下段 : 遠心根根尖部拡大)

これらの結果から、抗腫瘍薬として用いられているアルキル化剤の CY は、歯根形成などの硬組織や歯根膜などの軟組織に影響を

およぼすことが示唆された。治療を受ける小児や保護者に対しては、CY の作用効果が用量依存性であるので 1 回の投与量とともに総投与量にも留意し、形成途中である歯周組織にも影響を与えること、2 次的な機能障害が誘発される可能性のあることについても説明が必要である。また、今回の結果からは舌の上皮では、歯周組織で明瞭な変化があらわれている濃度や時期において組織の形態変化が表出していない場合があった。これらの時間的あるいは部位的差異については、薬剤の作用点に影響を受けていると予想されるが、今後炎症の発症についてさらに詳細に検討する必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等表者、研究分

(研究代担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 甲田彩理沙、岡部浩子、米山博巳、安藤侑子、青柳暁子、河上智美、苅部洋行：抗腫瘍薬がラットの硬組織形成におよぼす影響，第 24 回日本小児歯科学会関東地方会抄録集：31，2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河上 智美 (KAWAKAMI TOMOMI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30277595

### (2) 研究分担者

苅部 洋行 (KARIBE HIROYUKI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：50234000

小方 清和 (OGATA KIYOKAZU)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：90250006

(H20, 21 年度 : 分担者、H22 年度 : 退職)