

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11089

研究課題名(和文)放射線歯根形成障害メカニズム解明の基盤研究～新たな知見を創設可能な実験システム～

研究課題名(英文)Fundamental research for elucidating mechanism of the mechanism of root formation damage caused by irradiation

研究代表者

井出 吉昭 (IDE, YOSHIAKI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70409225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループは放射線が歯根形成障害を引き起こすメカニズムに注目している。従来からの頭部照射実験は、歯胚に対する直接的ダメージが歯根形成に与える影響を観察しているとはいえない。本研究では歯胚のみに照射できる局所照射法を開発した。歯胚にのみに照射でき、歯根形成障害が生じることが確認できた。本実験モデルは、放射線の歯根形成障害のメカニズムを解明するのに有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We are focusing on the mechanism of root formation damage caused by irradiation. It is not sure whether the direct damage of irradiation on the tooth germ is involved in failure of tooth formation in head irradiated mice. In the present study, we established the local irradiation method that irradiates only the molar tooth germ. We confirmed that irradiation only the molar tooth germ, and tooth root formation was disrupted. This experimental model is useful for elucidating the mechanism of root formation damage caused by irradiation.

研究分野：発生学

キーワード：放射線照射 歯根形成 小児白血病 局所照射

1. 研究開始当初の背景

小児期の放射線治療による副次的な影響として、歯の形成障害が挙げられる。現在までに、申請者は特に歯根形成障害について注目し、マウスの頭部エックス線照射が歯根形成に重要なヘルトヴィッヒ上皮鞘とその周囲間葉組織の細胞動態に影響を与えることを報告している。

しかしながら、この様な従来から行われている頭部照射実験では、照射野に内分泌器等が含まれてしまうことから、放射線が歯胚に直接的に影響を与えているのかどうかは不明なため、放射線による歯根形成障害のメカニズムを明らかにすることを困難にしている。そのため、放射線による歯根形成障害メカニズムを明らかにする実験モデルが必要である。

2. 研究の目的

申請者は、歯胚のみに放射線の直接的な影響を与えられる実験モデルを開発し、放射線による歯根形成障害メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

当初、歯胚の器官培養法を用いた実験モデルを開発する予定であったが、歯胚のみに限局してエックス線照射する *in vivo* の実験（歯胚局所照射モデル）を行うことが可能であり、この方法が本研究には適切であると考え、再現性の高い、歯胚局所照射モデルを開発した。

マウスの下顎第1臼歯（M1）に局所照射を行うため、厚さ 11 mm の鉛ガラス（鉛当量 2.5 mm）にそれぞれ 3.6mm、3.0mm、2.4mm の円柱状の孔を開けてコリメータを製作した（図1）。

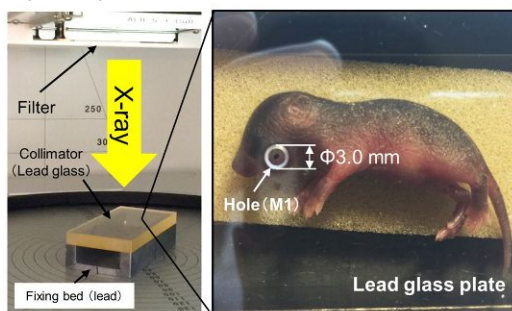


図1 鉛ガラスを使用した局所照射法

M1 は生後 5 日齢に歯根形成が開始する。この時期の M1 の位置をソフテックス撮影により確認し、局所照射部位を規格化した（図2）。

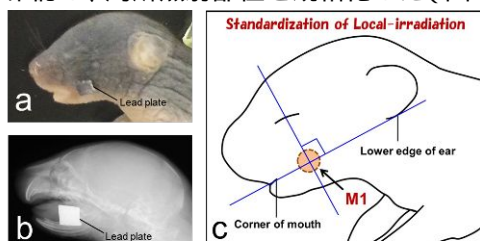


図2 照射部位の規格化
a: M1 部に鉛を置いた写真; b: ソフテックス像;
c: 規格化した図

M1 への局所照射による歯胚の影響を調べるため、生後 5 日齢のマウスに対し、コリメータを使用して 2.0 Gy 照射を行った（局所照射群）。比較対象として、頭部照射群、非照射群を設定した。照射 1 時間後に下顎を採取し、抗-gamma H2A.X 抗体による免疫染色を行い、エックス線の照射部位を確認した。また、照射 8 日後、16 日後に下顎を採取し、M1 をマイクロ CT 撮影、HE 染色、免疫染色により解析した。以上の飼育時期のマウスの体重の変化を計測した。

4. 研究成果

照射 1 時間後のサンプルにおいて抗-gamma H2A.X 抗体による免疫染色を行ったところ、M1 歯胚のみで陽性であった（図3）。以上のことから本局所照射法は歯胚に限局して照射可能であると考えられた。

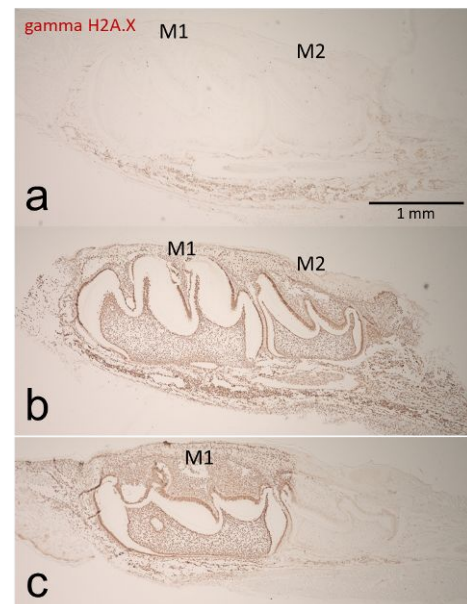


図3 H2A.X 抗体による照射部位の確認
a: 非照射; b: 頭部照射; c: 局所照射

体重の変化をみたところ、従来より研究に用いられていた頭部照射だと急激な体重減少を経て致死するのに対し、局所照射法では体重の減少は少なく、コリメータのサイズが最も小さい 2.4mm だと、非照射と体重の変化はほとんど変わらなかった（図4）。

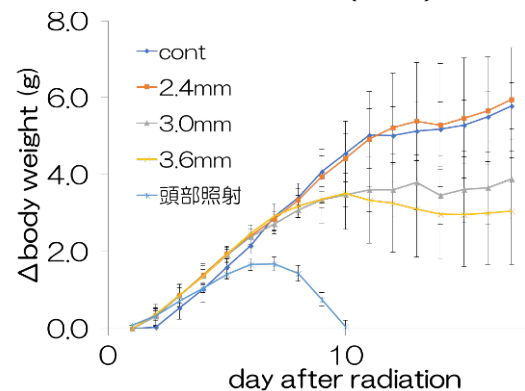


図4 照射法の違いによる体重の変化

マイクロ CT 解析を行ったところ、局所照射法では照射 8 日後で M1 の歯根は頭部照射と同様に歯根が短かった (図 4)。また、M1 遠心根の長さを計測したところ、局所照射の歯根長は非照射マウスと比べ有意に短く、頭部照射マウスと同程度であった (図 5)。

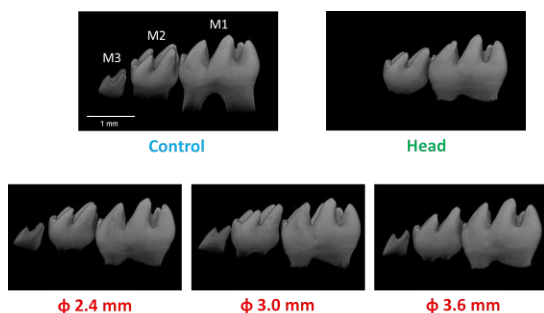


図 5 照射 8 日後の臼歯部のマイクロ CT 像

M1 遠心根の HE 染色による組織観察において、局所照射の根尖部石灰化組織は外側に反転するような形成障害がみられ頭部照射と同様であった (図 6)。

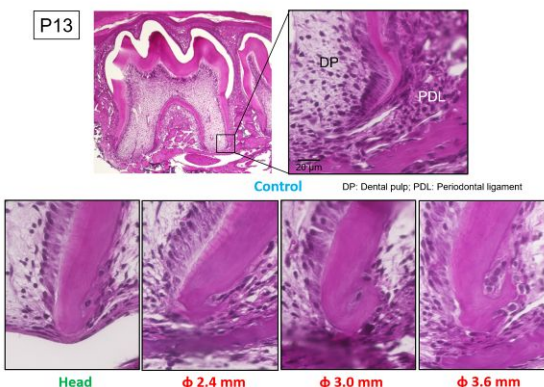


図 6 照射 8 日後の M1 遠心根の HE 染色

以上の結果より、本研究で開発した局所照射法は、歯胚に限局して照射であった。そして、照射された歯胚では歯根が短かったことから、本結果は放射線の直接的な影響による歯根形成障害が観察されたと考えられた。また、局所照射では頭部照射のような体重減少は少なく 2.4 mm では非照射と体重の変化がほとんど変わらないことから、歯根形成完成の時期まで観察可能な実験モデルと考えられた。

今後、本実験法を使用して、放射線による歯根形成障害メカニズムを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Ohyama A, Nikaido T, Tachibana T, Tominaga N, Toyomura J, Kimura E, Nakahara T, Yasuda M, Ishikawa H. Establishment and characterization of a cell line designated

Nur-1 derived from human endometrioid adenocarcinoma of uterine corpus, Hum Cell 28(2): 100-107, 2015. DOI: 10.1007/s13577-014-0108-9.

Nakahara T, Tominaga N, Toyomura J, Tachibana T, Ide Y, Ishikawa H. Isolation and characterization of embryonic ameloblast lineage cells derived from tooth buds of fetal miniature swine, In Vitro Cell Dev Biol Anim 2015. DOI: 10.1007/s11626-015-9987-7.

Mochizuki M and Nakahara T. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. Stem Cell Res Ther 2018 ; 9 (25) : doi : 10.1186/s13287-017-0761-5.

Murabayashi D, Mochizuki M, Tamaki Y, Nakahara T. Practical methods for handling human periodontal ligament stem cells in serum-free and serum-containing culture conditions under hypoxia: implications for regenerative medicine, Hum Cell 2017 ; 30 (3) : 169 - 180 , doi : 10.1007/s13577-017-0161-2.

Shinagawa-Ohama R, Mochizuki M, Tamaki Y, Suda N, Nakahara T. Heterogeneous human periodontal ligament-committed progenitor and stem cell populations exhibit a unique cementogenic property under in vitro and in vivo conditions. Stem Cells Dev 2017 ; 26 (9) : 632 - 645 , doi : 10.1089/scd.2016.0330.

Ide Y, Nayar S, Logan H, Gallagher B, Wolfaardt J: The effect of the angle of acuteness of additive manufactured models and the direction of printing on the dimensional fidelity: clinical implications. Odontology , 2017 ; 105(1) : 108-115 , doi : 10.1007/s10266-016-0239-4 .

[学会発表](計 6 件)

井出吉昭: 3D プリンター模型作製時における模型の鋭角部角度の大きさが模型精度に与える影響, 日本口腔インプラント学会誌, 28 巻特別号: 305, 2015

井出吉昭, 中原 貴, 那須優則, 石川博: 頭部エックス線照射マウスの臼歯根尖部の形態的異常, J Oral Biosci, 57: 177, 2015.

那須優則, 堀江哲郎, 井出吉昭, 三橋扶佐子, 中原 貴: 胎仔唾液腺の放射線障害に対するラジカルスカベンジャーの効果, J Oral Biosci, 57: 464, 2015

佐々木瑛美, 岩堀泰子, 原田啓介, 井出吉昭: 頭部放射線照射マウスの歯根形成期における根尖部周囲の増殖細胞の変化, 第 2 3 回日本歯科医学会総会プログラム・抄録集, 161,

2016 .

井出吉昭, ウォルファート ジョン: イン
プラントの埋入を念頭においた腓骨の解剖
学的検討, 日本口腔外科学会雑誌, 62 (総会
特別号): 253, 2016 .

井出吉昭, 深田哲也, 那須優則, 中原 貴:
マウス歯胚の局所照射法の確立と歯根形成
時の照射歯胚の形態学的観察, J. Oral
Biosci. Suppl. , 2017, 204, 2017 .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井出 吉昭 (IDE, Yoshiaki)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 70409225

(2)研究分担者

中原 貴 (NAKAHARA, Taka)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 10366768

那須優則 (NASU, Masanori)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 50130688

石川 博 (ISHIKAWA, Hiroshi)
日本歯科大学・生命歯学部・客員教授
研究者番号: 30089784

大山 晃弘 (Ohyama, Akihiro)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 90538232

豊村 順子 (TOYOMURA, Junko)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号: 80645630

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()