

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11974

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬による歯髄組織障害の客観的評価と齲蝕原因菌への効果的なアプローチ法の探索

研究課題名(英文) Evaluation of dental pulp tissue damage caused by antineoplastic drugs and search for effective approaches to cariogenic bacteria

研究代表者

河上 智美 (KAWAKAMI, TOMOMI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：30277595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児がん治療の化学療法に使用されるアルキル化剤を成長期マウスに投与し歯髄組織に及ぼす影響を検討した。薬剤投与群では、象牙芽細胞の形態変化を認め、歯根伸長の抑制がみられ歯髄腔の領域の減少が認められた。また齲蝕原因菌であるStreptococcus Mutans菌に対する抗腫瘍薬の影響を調べたところ、抗腫瘍薬の種類によりSM菌への反応に相違が認められた。以上の結果から、小児がん治療では抗腫瘍薬の影響で歯髄腔内の変化がおこり、さらに歯根形成障害があらわれること、薬剤の影響は齲蝕原因菌に対しても影響がある可能性があり、小児がん治療中や治療後の歯科フォローアップが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の臨床報告からは、小児がん治療後の長期生存者では晩期合併症である歯の形成異常や口腔疾患のリスクが高まることが明らかとなっている。小児期において化学療法が早期に開始されれば、より多くの歯胚が影響を受け、障害のおこる歯数や程度も重症化すると考えられる。また、障害の程度は、抗腫瘍薬の投与期間、間隔、薬剤の種類やその組合せなどが関係すると予想されるが、個々の薬剤に対する細胞の感受性時期や障害程度などのデータを蓄積していくことも、将来小児がん治療のプロトコルを改良していく際の資料として重要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of Cyclophosphamide(CY) on dental pulp tissues in growing mice. In the experimental group, morphological changes of odontoblasts were observed, and CY inhibited the regular formation of the roots of molars. We also investigated the effect of antitumor agents on Streptococcus Mutans, which is a cariogenic bacterium. There were differences in the response to SM bacteria depending on the type of antitumor drug. From the above results, the treatment of pediatric cancer would effect on the dental pulp tissues, and also may change the circumstance of the caries-causing bacteria. These results suggests that dental follow-up is important during and after childhood cancer treatment for childhood cancer patients and survivors.

研究分野：小児歯科学

キーワード：小児 歯の形成 抗腫瘍薬 シクロフォスファミド マウス 小児がんサバイバー

1. 研究開始当初の背景

近年の小児がんの治療の進歩は顕著で予後生存率も上昇しており、小児がん患者の7~8割以上が治癒し小児がんサバイバーとして成人期を迎えるようになっている。一般にがん治療では、化学療法、放射線療法、外科療法、骨髄移植などの集学的な治療法が用いられているが、成長期の小児に対してはこれらの治療の影響は少なくなく、治癒後にさまざまな晩期合併症があらわれることがわかってきている。治療成績の向上によってわが国でも小児がんサバイバーが増加することが見込まれており、これに伴い小児がん治療の晩期合併症が注目されるようになってきている¹⁾。小児がん長期フォローアップの経過観察からは、晩期合併症として、内分泌や循環器、認知機能、二次がんなど身体各部位への様々な合併症が報告されている²⁾

口腔領域の晩期合併症についても本邦を含め世界各地から多数の症例報告や観察研究が報告されている³⁻⁵⁾。これらの報告では晩期合併症として歯の形成不全、歯胚欠如、矮小歯、歯根の短根化や顎の発育不全などがあげられている。またこれまでの研究から我々も、成長期のマウスに抗腫瘍剤を作用させ、その頭蓋骨(上顎骨および下顎骨)の成長抑制と歯の形成異常が現れることを報告した^{6,7)}。このように研究報告が増え小児がん治療の化学療法が歯科領域の晩期合併症を引き起こす要因となることが認知されてきているにもかかわらず、集学的治療や多剤併用療法が用いられる等のさまざまな条件が重なるために、いずれの治療法や薬剤がどのような作用や影響を発育期の小児の口腔組織におよぼして晩期合併症が発症しているのか不明な点は未だ多く、またその予防法についても確立されたものがみられない。

2. 研究の目的

小児がん治療後にあらわれる歯の晩期合併症について成長期のマウスに小児がん治療に使用される抗腫瘍薬シクロフォスファミドを作用させて歯髓組織への影響を観察し、さらに各種抗腫瘍薬の齶蝕原因菌におよぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 第一臼歯歯髓形態の経日的変化

生後12日齢の歯根形成期のマウスを実験群(CY群)と対照群の2群にわけ、CY群にはシクロフォスファミドを100mg/kg、対照群には生理的食塩水を腹腔内投与した。薬剤の濃度は小児がん治療研究グループにより示されている急性リンパ性白血病プロトコール(L-99-15)の投与量に準じて決定している。薬剤投与後に所定の日齢の生後14, 16, 20, 24, 27日目(D14, D16, D20, D24, D27)まで飼育した。観察対象は下顎第一臼歯歯根とした。なお、本研究は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会の承認を得て、日本歯科大学生命歯学部動物実験指針に基づいて行った。(承認番号 第10-20号)

(2) 第一臼歯歯髓の組織変化

組織標本の作製にあたっては、臼歯列を含む下顎ブロックを通法に従いパラフィン包埋後、第一臼歯を中心とした連続薄切標本を作製した。薄切方向は歯根象牙質の変化と根尖部ヘルトウィッヒ上皮鞘(HERS)の形態を観察するために矢状断とした。染色法はHE染色を行った。

(3) 象牙芽細胞数の変化

象牙芽細胞と歯根形成との関係を検討するために、PN16のHE染色像から第一臼歯遠心根遠心側の歯根長とその象牙芽細胞数を計測した。歯根長は遠心根のセメントエナメル境から根尖の象牙質形成端までを測った。さらにこれを二等分したのち歯頸側および根尖側としてそれぞれの象牙芽細胞数を測定し比較した。

(4) 抗腫瘍薬の齶蝕原因菌に対する影響

最小発育濃度測定 (MIC)

菌株は口腔連鎖球菌である *Streptococcus Mutans* 33535 (MS) を使用した。培地は Brain heart infusion (BHI) を用いた。連鎖球菌は 37 度で一晩後期培養し、翌日培養した菌液を 10^7 /ml 個になるように菌液を調整した。

MS 菌に対する抗腫瘍薬の影響を調べるために、使用する薬剤として作用機序の異なる数種の薬剤を選択した。選択した薬剤はアルキル化剤 (シクロフォスファミド)、ピンカアルカロイド (ピンクリスチン)、葉酸代謝拮抗薬 (メトトレキサート, MTX) とした。また抗菌薬としてエリスロマイシン、スペクチノマイシン、クロラムフェニコール、さらに含嗽薬として用いられているイソジンとポピドンヨード、アズレンスルホン酸ナトリウム水和物製剤を選択し、それぞれ説明書に従って薬剤の調整を行い使用した。

96 ウェルプラスチックプレートにそれぞれの試薬の 2 倍系列希釈溶液を調整し、菌液を各ウェルに播種した。プレートは好氣的に 24 時間培養した。培養後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定を行い、MIC を決定した。

希釈平板法による生菌数測定 (MBC の測定)

前の実験で決定された MIC の濃度を参考にして使用する試料を決定し、 $50 \mu\text{l}$ ずつ MS 平面寒天培地に播種し、好気培養を行い、MBC の測定を 96 時間後に行った。

4. 研究成果

(1) 第一臼歯歯根および歯髓腔の経日的変化

生後 14 日から 27 日までの第一臼歯の HE 染色像を図 1 に示す。シクロフォスファミド投与した生後 12 日目の第一臼歯の歯根はおよそ半分程度形成されている。薬剤投与後の歯根形態は、D14 の対照群と CY 群ではほとんど差は認められなかった。その後経日的に対照群の歯根は伸長していった。しかし CY 群の歯根はわずかに長くなっているものの、D27 では対照群に比べ明らかに短く、歯根伸長の抑制が認められた。また、根尖孔の大きさは D16 の対照群と CY 群の両群ともに大きく開いていた。また両群とも経日的に根尖孔は縮小していったが、CY 群では対照群に比較して急速に根尖孔が狭まる傾向がみられた。これにより歯髓腔の大きさも、D14 ではあまり差違を認めなかったが、経日的に実験群のほうが小さくなる傾向を認めた。

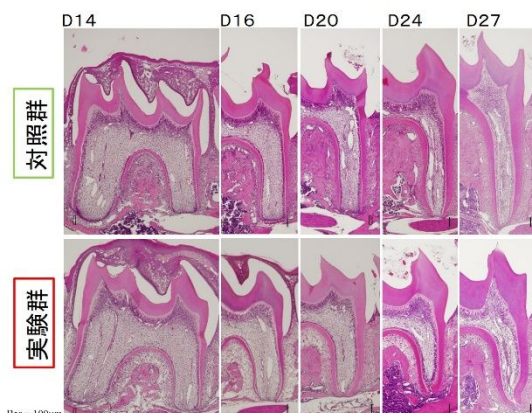


図 1 下顎第一臼歯三次元構築像

(2) 第一臼歯遠心根の歯根部歯髄象牙芽細胞の経日的変化

生後 14 日から 27 日までの第一臼歯遠心根の根尖部歯髄象牙芽細胞の HE 染色像を図 1 に示す。実験群では対照群と比べて象牙芽細胞は細胞数が減少し、D20 頃より明らかに細胞の丈が長く核が歯髄側に位置している象牙芽細胞から象牙芽細胞の丈がやや低くなり、それぞれ核は細胞の中心や象牙前質の近傍に位置する象牙芽細胞に移行し始めている様子が観察され、異なる様相をみせた。また、CY 群の D16 で根尖部のサーピカルループ構造は消失し、象牙芽細胞の細胞質の萎縮がみられ、D24、D27 と日齢が進むにつれて根尖部の象牙質の厚みが対象群に比べて厚く、根尖孔が小さくなっているのが認められた。

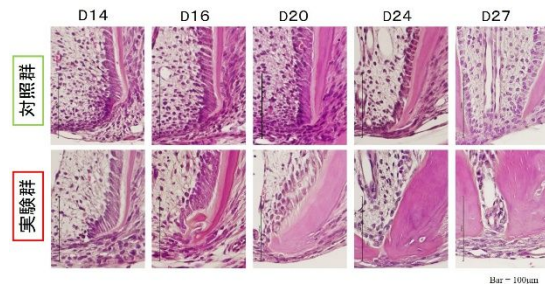


図 2 遠心根の歯根長の経日的変化

また、HE 染色では CY 群の D16 で根尖部のサーピカルループ構造は消失し、象牙芽細胞の細胞質の萎縮がみられ、D24、D27 と日齢が進むにつれて根尖部の象牙質の厚みが対象群に比べて厚く、根尖孔が小さくなっているのが認められた。

(3) 抗腫瘍薬の齶蝕原因菌に対する影響

今回、齶蝕原因菌 MS を用いて各種抗腫瘍薬や抗菌薬、含嗽薬による MIC および MBC の測定を試みた。抗菌薬であるエリスロマイシン、スペクチノマイシン、クロラムフェニコールの MIC/MBC は測定が行えた。含嗽薬であるポピドンヨード、アズレンスルホン酸ナトリウム水和物製剤についても MIC が測定できた。しかし、抗腫瘍薬については MIC が決定できたものと判定が困難であるものがあつた。MS を用いた MIC 測定の研究を調べてみると、薬剤の種類によっては同じ菌種間でも同じ値を示さないことや、株が異なると値が異なるという報告もみられる。今回使用した抗腫瘍薬の中では、現在のところアルキル化剤(シクロフォスファミド)と葉酸代謝拮抗薬(メトトレキサート)は MIC が決定できたが、ピンカルカロイド(ピンクリスチン)は測定不能であつた。菌株が 1 種類ということも考え合わせると、さらにプロトコールを調整して検討を加えることが必要であると考え。そのため、今回は MIC/MBC の数値の公表は検討段階として控え、追加実験後にデータを示したい。

以上の結果から、臨床報告で示唆されているように、小児がん治療の化学療法に使用される抗腫瘍薬、今回使用したシクロフォスファミドが歯根形成に重要な HERS を形成する細胞の増殖を阻害した結果、その後の歯根伸長は抑制され歯根の形成障害(短根化)がおこるために歯髄腔の形態の変化も不可逆的におこることが示唆された。また、シクロフォスファミドは象牙芽細胞の増殖を障害し、その細胞数が減少し、さらに象牙芽細胞の形態の変化が観察されることから形成される象牙質の構造上の変化の可能性も考えられた。また、今回は抗腫瘍薬の齶蝕原因菌に対する影響について測定を試みた。最も一般的な MS 菌を用いて MIC 測定による影響を調べたが、抗腫瘍薬によっては MS 菌に対して静菌的あるいは殺菌的に作用する可能性があることが示唆され

た。しかし、結果にも記述したように、MS 菌の菌種が少ないことや測定不能の薬剤もあり、その原因が明らかではないので、さらに術式等を検討し直して再実験する必要があると考える。小児がんサバイバーが増加する将来を考えると、歯根の形態異常や歯数の異常、歯質の構造上の変化の可能性と今後ますます歯科でのフォローアップが重要となってくると考えられる。

引用文献)

- 1) 前田尚子, 堀部敬三: 小児がん経験者の晩期合併症, 小児科, 58: 171-178, 2017.
- 2) 前田美穂編: 小児がん治療後の長期フォローアップガイドライン, 医薬ジャーナル社, 2013.
- 3) Wilberg P, Kanellopoulos A, Ruud E, Hjermastad MJ, Fosså SD, Herlofson BB: Dental abnormalities after chemotherapy in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia 7-40 years after diagnosis, Support Care Cancer, 24: 1497-1506, 2016.
- 4) Effinger KE, Migliorati CA, Hudson MM, McMullen KP, Kaste SC, Ruble K et al. : Oral and dental late effects in survivors of childhood cancer: a Children's Oncology Group report, Support Care Cancer, 22: 2009-2019, 2014.
- 5) Hsieh SG, Hibbert S, Shaw P, Ahern V, Arora: Association of cyclophosphamide use with dental developmental defects and salivary gland dysfunction in recipients of childhood antineoplastic therapy, Cancer, 117: 2219-2227, 2011.
- 6) Kawakami T, Nakamura Y, Karibe H . Cyclophosphamide-Induced Morphological Changes in Dental Root Development of ICR Mice. PLoS ONE, 2015;10(7): e0133256. doi:10.1371/journal.pone.0133256
- 7) Kawakami T, Nakamura Y, Karibe H_ Cyclophosphamide inhibits root development of molar teeth in growing mice. Odontology, 2014; Jun 3 [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s10266-014-0158-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kameoka Ryo, Kawakami Tomomi, Maeda Miho, Horii Tsukasa, Yanagisawa Ayako, Shirase Toshiomi	4. 巻 30
2. 論文標題 Dental management of a childhood cancer survivor with malformed primary teeth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.pdj.2019.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河上智美	4. 巻 55
2. 論文標題 小児がん経験者の歯根はなぜV字型となるのか 抗腫瘍薬によるマウス臼歯の歯根形成抑制	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 345-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kawakami T, Maeda M, Ueda T, Okamoto A, Karibe H
2. 発表標題 Late-effects of Cancer Therapy on Tooth Development in Japanese Children
3. 学会等名 97th General Session and Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawakami T, Hagiwara Y, Yoneyama H, Nakamura Y, Ogata K, Karibe H
2. 発表標題 Dental management of oral self-injurious behavior in patients with epilepsy: a Case report
3. 学会等名 International Association for Pediatric Dentistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawakami T, Kameoka R, Shirase T, Maeda M, Karibe H
2. 発表標題 Dental management of a childhood cancer survivor with arrested primary teeth
3. 学会等名 International Association for Disability and Oral Health (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河上智美 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 175
3. 書名 歯科国試パーフェクトマスター 小児歯科学 第4版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	苅部 洋行 (KARIBE HIROYUKI) (50234000)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	