

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791375
 研究課題名 (和文) 放射線照射による歯根形成障害のメカニズムの解明～歯根の再生治療法の開発にむけて～
 研究課題名 (英文) Cellular and molecular mechanisms of the tooth root formation by radiation damage.
 研究代表者
 井出吉昭 (IDE YOSHIAKI)
 日本歯科大学・生命歯学部・助教
 研究者番号：70409225

研究成果の概要 (和文)：本研究は、放射線照射による歯根形成障害のメカニズムを解明することを目的として行った。マウスの歯根は、生後 11 日齢で根分岐部が完成し、生後 21 日齢で歯根が完成することが分かった。照射線量による歯根形成障害をマイクロ CT 撮影による 3 次元的な観察で検討を行ったところ、5Gy 照射で歯根形成障害が認められ、10Gy 照射で非照射 (0Gy) の歯根の 1/2～2/3 程度しか歯根が形成していないことを明らかにした。歯根形成においてヘルトヴィッヒ上皮鞘は重要な役割を果たすと考えられているが、現在、ヘルトヴィッヒ上皮鞘を中心に細胞増殖マーカーを使用した検討を行っている。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of tooth root formation disturbance caused by radiation. We found that in the tooth root of a mouse, the root furcation is formed 11 days after birth, and that the tooth root is completed 21 days after birth. The tooth root formation disturbance was examined according to different doses of radiation through three-dimensional observation by micro CT. The tooth root formation disturbance is observed with 5Gy of radiation, and that at 10Gy, only 1/2-2/3 the size of non-irradiated (0Gy) tooth root was formed. Hertwig's epithelial root sheath (HERS) is considered to play an important role in tooth root formation, and we are investigating this area using a cell proliferation marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：放射線治療、歯根形成、再生医療、小児白血病、マイクロ CT、BrdU、PCNA、ヘルトヴィッヒ上皮鞘

1. 研究開始当初の背景

歯の発育は、精緻な分子機構によって制御されており、発育の時期に何らかの外的刺激が加わると、歯の発育に重大な影響を及ぼすことは容易に予想できる。代表例として、小児期に行われる放射線の影響が挙げられる。小児期の放射線照射における臨床報告では、小児白血病患者の造血幹細胞移植の前処置として、放射線照射を行うことが知られている。Maguire¹⁾らは、歯冠形成期における早期の放射線の全身照射が、矮小歯、エナメル質減形成、石灰化不全を引き起こし、歯冠完成後では歯根形成が障害されると報告している。また Hölttä²⁾らが、10 歳以下で全身放射線照射を受けると歯根の形成障害が生じ、特に 3.1 歳から 5 歳の期間での放射線照射の影響はきわめて重症例となると報告している。そして特記すべきは、造血幹細胞移植治療の前処置としては、化学療法よりも放射線照射の方がはるかに歯根形成障害が大きいことを示唆しており、歯根発生期における放射線の影響はきわめて興味深い。

【参考文献】

1) Maguire A, Welbury RR. Long-term effects of antineoplastic chemotherapy and radiotherapy on dental development. Dent Update. 1996; 23: 188-94.

2) Holtta P, Hovi L, Saarinen-Pihkala UM, Peltola J, Alaluusua S. Disturbed root development of permanent teeth after pediatric stem cell transplantation. Dental root development after SCT. Cancer. 2005; 103: 1484-93.

2. 研究の目的

本研究は、歯根形成の分子機構が未解明である現状をふまえ、新生仔マウス (C57BL) の下顎臼歯の歯胚を実験モデルとして使用し、小児期の放射線照射が歯根形成に及ぼす影響について解明することを目的とする。分子レベルでの歯根の形成阻害のメカニズムを明らかにすることで、放射線照射により引き起こされる歯根形成阻害の予防や、歯根吸収を伴う多くの臨床症例に対する再生療法の開発への一助となると考えた。

3. 研究の方法

本研究は、放射線照射による歯根形成障害のメカニズムを解析するため、歯冠完成・歯根形成開始期であるマウス生後 5 日齢から歯根が完成されている 21 日齢までを観察期間と設定した。

予備実験として、コントロールとなる放射線非照射のマウスの歯根形成における経時的变化をマイクロ CT による 3 次元的な形態変化と HE 染色による組織変化を観察した。

次に再現性のある頭部に限局した放射線照射を行うためのマウス固定装置を作成し、歯根の形成障害が起こる線量と致死線量の検討を行った。

上記の予備実験により明らかとなったデータを基に、放射線照射による影響について以下の解析を行った。

(1) マイクロ CT 撮影

放射線照射による歯根形成への影響を 3 次元的に解析した。

(2) HE 染色

歯と周囲組織の観察を行い放射線照射による歯根形成への影響を解析した。

(3) BrdU の取り込み実験

放射線照射によるヘルトヴィッヒ上皮靴とその周囲の組織の細胞増殖への影響を解析した。

(4) PCNA の免疫染色

放射線照射によるヘルトヴィッヒ上皮靴とその周囲の組織の細胞増殖への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 放射線非照射 (コントロール) マウスの歯根形成の経時的变化 (図 1)

マイクロ CT 撮影したマウス下顎骨の画像からコンピュータ上で歯のみを抽出し、3 次元的に歯根部を観察したところ、生後 11 日齢で歯根分岐部が完全に完成し、21 日齢で歯根形成がほぼ完成することを確認した。

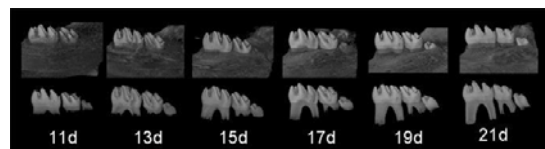


図 1. マイクロ CT による歯根の形態解析

(2) マウス頭部への照射方法の確立 (図 2)

マウスの固定装置を作製して再現性のある照射方法を確立した。



図 2. マウスの固定装置

(3) 放射線照射による致死線量の確認 (図 3)

放射線照射したマウスの体重変化により照射の影響を確認した。また、本実験により

30Gy 照射により 13 日齢で、20Gy 照射により 15 日齢で致死することを確認した。

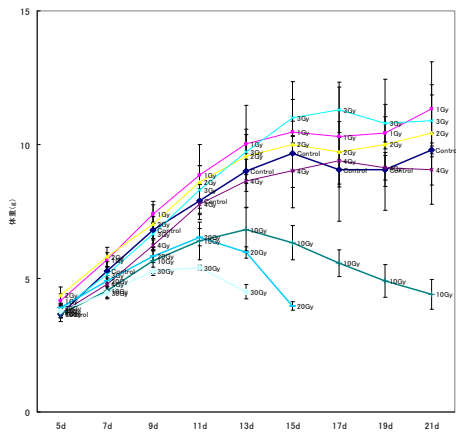


図 3. 線量別マウスの体重

(4)放射線照射マウス歯根のマイクロ CT 観察 (図 4)

照射による歯根形成への影響をマイクロ CT 装置にて観察を行ったところ、5Gy 照射で歯根形成障害が認められ、10Gy 照射で非照射 (0Gy) の歯根の 1/2~2/3 程度しか歯根が形成されないことが確認された。

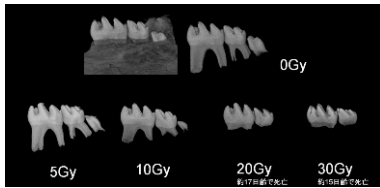


図 4. 照射群 (21 日齢) マイクロ CT による歯根形態解析

(5) 放射線照射マウスの第 1 臼歯 HE 染色像 (図 5)

HE 染色により組織変化を観察した。

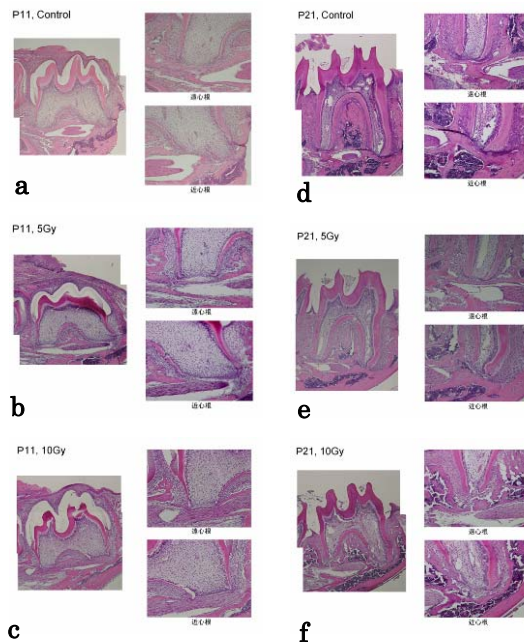


図 5. 第 1 臼歯の HE 染色 11 日齢 (a, 0Gy; b, 5Gy; c, 10Gy)、21 日齢 (d, 0Gy; e, 5Gy; f, 10Gy)

(6) ヘルトヴィッヒ上皮鞘とその周囲組織の細胞増殖の解析 (図 6)

歯根形成に重要な役割を果たしていると考えられているヘルトヴィッヒ上皮鞘とその周囲組織の細胞増殖についての検討を行うため、現在、BrdU の取り込み実験と PCNA 免疫染色を行っている。

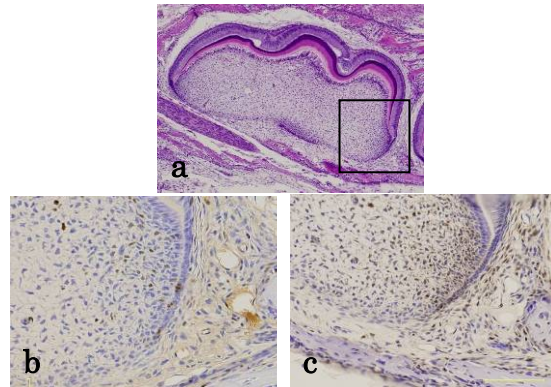


図 6. 生後 5 日齢第 1 臼歯の細胞増殖マーカーによる観察 (a, HE 染色像; b, BrdU 投与後の免疫染色像; c, PCNA 免疫染色像)

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 5 件)

- ① 井出吉昭：口のふしぎと歯のふしぎ「小児の乳歯はう蝕になったり、露髄しやすいと思うんですけど、どうしてですか?」、DH style, 査読無, 4 (1月号): 10-11
- ② 中原 貴, Nikolay Ishkitiev, 富永徳子, 井出吉昭：抜去歯由来の幹細胞にみる再生医療の未来, 日本歯科医師会雑誌, 査読無, 2010年3月号, 21-29
- ③ 井出吉昭, 岩田 洋, 山田麻衣子, 高森等, 代居 敬：CT による後歯槽管の位置の検討, 日本口腔インプラント学会誌, 査読有, 22 : 115-121, 2009
- ④ Ide Y, Nakahara T, Nasu M, Tominaga N, Ohyama A, Tachibana T, Yasuda M : Establishment and characterization of the NEYS cell line derived from carcinosarcoma of human ovary with special reference to the susceptibility test of anticancer drugs., Hum Cell., 査読有, 22 : 72-80, 2009
- ⑤ 中原 貴, 井出吉昭：歯の再生—再生歯は再生臓器の第 1 号となりえるか?—, 歯科臨床研究, 査読無, 5 : 90-97, 2008

〔学会発表〕(計 26 件)

- ① 井出吉昭, 中原 貴, 富永徳子, 那須優則, 田巻友一, 岩永健裕, 松永 智, 石川 博: ミニブタ下顎頰歯の発生過程における萌出変化と解剖学的解析, 日本解剖学会, 盛岡, 2010年3月
- ② 内川喜盛, 大澤銀子, 北原和樹, 井出吉昭, 織田聰一郎, 岩田 洋, 大津光寛, 横澤 茂, 岡田智雄, 仲谷 寛, 三代冬彦: 歯科医療コミュニケーション教育に参加した模擬患者の意識調査, 日本歯科医学教育学会, 広島, 2009年11月
- ③ 岩田 洋, 代居 敬, 井出吉昭, 大島正充, 高森 等: 上部構造装着後のインプラント周囲の骨吸収についての検討, 日本口腔インプラント学会, 大阪, 2009年9月
- ④ 井出吉昭, 代居 敬, 岩田 洋, 山田麻衣子, 高森 等: "Bony canine triangle"の形態学的検討, 日本口腔インプラント学会, 大阪, 2009年9月
- ⑤ 中原 貴, 田巻友一, 井出吉昭, 富永徳子, 那須優則, 佐藤 聡, 石川 博: シャーレ上での器官形成: 器官再生法による歯根・歯周組織ユニットの形成, 歯科基礎医学会, 新潟, 2009年9月
- ⑥ 井出吉昭, 中原 貴, 那須優則, 田巻友一, 岩永健裕, 松永 智, 石川 博: クラウン系ミニブタにおける下顎臼歯(頰歯)萌出の経時的変化, 歯科基礎医学会, 新潟, 2009年9月
- ⑦ Nasu M, Nakahara T, Ide Y, Tominaga N, Tachibana T, Hashimoto H, Ishikawa H: Study on the tube formation (angiogenesis) of the endothelioid cells derived from tooth buds of miniature swine, 日本ヒト細胞学会, 東京, 2009年8月
- ⑧ Nakahara T, Tominaga N, Tamaki Y, Ide Y, Nasu M, Ohyama A, Hashimoto H, Tachibana T, Ishiwata I, Sato S, Ishikawa H: Engineering a retinal tissue in vitro using newly-established cell lines derived from mouse embryonic stem cells, 日本ヒト細胞学会, 東京, 2009年8月
- ⑨ Nakahara T, Tamaki Y, Ide Y, Tominaga N, Nasu M, Ohyama A, Sato S, Ishiwata I, Ishikawa H: Establishment and characterization of amelanotic and melanotic melanoma cell lines derived from a human malignant melanoma of oral mucosa of the cheek, 日本ヒト細胞学会, 東京, 2009年8月
- ⑩ Tominaga N, Nakahara T, Ide Y, Tamaki Y, Nasu M, Ishikawa H: Isolation, characterization, and karyotype analysis of neuron, myocyte, and epithelial cells derived from primary culture of the periodontal ligament, 日本ヒト細胞学会, 東京, 2009年8月
- ⑪ Suzuki M, Tominaga N, Tamaki Y, Ide Y, Ohyama A, Nakahara T, Sato S, Ishikawa H, Mataga I: Establishment and characterization of the rhabdomyosarcoma cell line designated NUTOS derived from the human glossal very rare sarcoma., 日本ヒト細胞学会, 東京, 2009年8月
- ⑫ 佐藤健児, 岩田 洋, 井出吉昭, 河合泰輔, 原田康雄, 境野利江, 代居 敬: 歯科インプラント術前 CT 検査における画像品質基準, 歯科放射線学会, 大阪, 2009年5月
- ⑬ 井出吉昭, 代居 敬, 小倉 晋, 山田麻衣子, 石崎 勤, 高森 等: CT による "Bony canine triangle"の形態学的検討, 日本口腔科学会, 浜松, 2009年4月.
- ⑭ 井出吉昭, 代居 敬, 小倉 晋, 山田麻衣子, 石崎 勤, 高森 等: CT による "Bony canine triangle"の形態学的検討, 日本口腔科学会, 浜松, 2009年3月
- ⑮ 中原 貴, 田巻友一, 井出吉昭, 那須優則, 大山晃弘, 石渡 勇, 石川 博: 網膜再生のための新たな網膜構成細胞株の樹立—early ES 細胞からの胚子様構造体の形成とその応用—, 日本再生医療学会, 東京, 2009年3月
- ⑯ 井出吉昭, 岩田 洋, 高森 等, 小倉 晋, 山田麻衣子, 代居 敬: CT による後上歯槽動脈が走行する歯槽管の検討, 日本顎顔面インプラント学会, 東京, 2008年12月
- ⑰ 山田麻衣子, 井出吉昭, 小倉 晋, 高森 等, 代居 敬, 石崎 勤: 上顎洞粘膜の CT 画像による検討, 日本口腔外科学会, 徳島, 2008年10月
- ⑱ 中原 貴, 田巻友一, 那須優則, 井出吉昭, 佐藤 聡, 石川 博: ヒト頰粘膜に発生した悪性黒色腫由来の細胞株の樹立とその性格、特に抗がん剤感受性について, 歯科基礎医学会, 東京, 2008年9月
- ⑲ 井出吉昭, 中原 貴, 那須優則, 岩永健裕, 石川 博, 代居 敬: クラウン系ミニブタ頰歯(臼歯)の歯列変化, 日本再生歯科医学会, 東京, 2008年9月
- ⑳ 那須優則, 中原 貴, 井出吉昭, 立花利公, 橋本尚詞, 岩永健裕, 土屋秀治, 石川博: ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞の生物学的特徴, 日本再生歯科医学会, 東京, 2008年9月
- ㉑ 富永徳子, 中原 貴, 井出吉昭, 那須優

- 則, 佐藤 聡, 石川 博, 佐藤田鶴子: ラット歯根膜からの各種細胞の分離法の検討, 日本再生歯科医学会, 東京, 2008年9月
- 22 中原 貴, 田巻友一, 井出吉昭, 那須優則, 大山晃弘, 石渡 勇, 佐藤 聡, 石川博: ES細胞からの眼球原基形成と原基からの網膜構成細胞株の樹立, 日本再生歯科医学会, 東京, 2008年9月
- 23 井出吉昭, 岩田 洋, 高森 等, 小倉晋, 山田麻衣子, 濱仁 隆, 山瀬 勝, 石崎 勤, 代居 敬: CTによる上歯槽管についての検討, 日本口腔インプラント学会, 東京, 2008年9月
- 24 Ide Y, Nakahara T, Nasu M, Ohyama A, Tachibana T, Yasuda M, Yosue T, Ishikawa H : Establishment and characterization of the NEYS cell line derived from carcinosarcoma of human ovary with special reference to the susceptibility test of anticancer drugs, 日本ヒト細胞学会, 東京, 2008年8月
- 25 井出吉昭, 岩田 洋, 高森 等, 古川能史, 藤本悠彦, 代居 敬: CTによる上顎犬歯周囲骨の形態学的検討, 日本歯科放射線学会関東・北日本合同地方会, 郡山, 2008年7月
- 26 井出吉昭, 岩田 洋, 高森 等, 藤本悠彦, 代居 敬: CTにおける犬歯相当部の骨と上顎洞の検討, 第49回日本歯科放射線学会学術大会, 名古屋, 2008年5月

[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・助教

研究者番号: 70409225

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: