

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593048

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬による歯周組織障害の組織学的考察および効果的な予防法の検討

研究課題名(英文) Histological changes of periodontal tissue by anti-tumor agents, and study on effective management of dental caries

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗腫瘍薬による晩期合併症が小児がん患者で観察される。シクロホスファミド(CY)は、小児がん治療の化学療法に使用される細胞増殖抑制剤である。本研究では、CYの投与による歯根形成中マウスの歯根形成に対する変化を観察し検討した。

生後12日のICRマウスにCYを投与し、下顎第一臼歯の歯根長を頭部エックス線規格写真を用いて測定した。また、形態学的および免疫組織学的検索を行った。生後27日では、実験群の歯根長は対照群の約60%であった。また実験群のヘルトヴィッヒ上皮鞘(HERS)は生後20日以降は消失していた。以上から、CY投与がHERSの形態と機能を変化させ、歯根形成を阻害することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, late effects of antineoplastic treatment are frequently observed in childhood cancer patients. Cyclophosphamide (CY) is one of the cytostatic drugs commonly used for cancer treatment in children. This study aimed to evaluate the effect of CY on dental development in mice. We treated 12-day-old ICR mice with CY (100 mg/kg, i.p.). Soft X-ray radiographs were obtained in lateral projection. The root / crown length (R/C) ratio of the first molar was calculated. Serial sagittal sections were prepared from the first molars and histomorphological and immunohistochemical (cytokeratin) studies were performed. At 27 days, the root length in the experimental group was approximately 60% of that in the control group. The Hertwig's epithelial root sheath in the experimental group disappeared from 20 days onwards. Our results indicate that CY can induce a defect in and alter the function of HERS and disruption of the epithelial sheath inhibits proliferation and root formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯根形成 ヘルトヴィッヒ上皮鞘 抗腫瘍薬 シクロホスファミド 小児 マウス

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・免疫療法などの治療法が進歩し、予後生存率も上昇してきている。治療後の長期生存が可能となった。しかし、最近ではさまざまな領域で、治療の副作用と考えられる二次的影響(晩期合併症)が報告されている。全身的には、心疾患や不妊、精神的な影響、ホルモンの抑制による身長などの成長抑制などが挙げられている。また顔面・口腔領域では、歯や歯周組織の形成時期の乳幼児に治療を行うと、顎骨の成長抑制、永久歯の欠如や構造異常、着色歯などが治療後の晩期合併症として認められることが本邦でも報告されている。過去には放射線治療による影響が最も強いと考えられていたが、現在では化学療法のみでの治療後においても歯の形成障害などがあらわれると多数報告がされている(河上,2004. 三穂,2004. 見明,2005)。しかし、その多くは臨床症例の統計的な報告で病理組織学的に歯および歯周組織の変化について考察したものは少ない。また、これらの報告では、歯の形成障害の程度について歯冠部の形成不全に比べ、歯根部の異常(短根化やV字形態など)の発現が多く報告されている(鈴木,2004. 山本,2007. 三穂,2009)。これは使用される薬剤の作用が歯冠部と歯根部の形成細胞への影響が異なるためと考えられる。

我々は、成長期のラット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(形成不全や欠如歯、歯根の矮小化など)が現れることを報告した。また、歯槽骨の骨形成状態をマイクロラジオグラムや蛍光薬剤を利用した時刻描記の手法を用いた結果、骨梁の形態に変化があらわれるなど骨のモデリングにも影響をあたえていることもわかった(金子,2001. 岡本,2002)。

2. 研究の目的

小児悪性腫瘍の治療に用いられている抗腫瘍薬のうち、アルキル化剤のシクロフォスファミド(以下 CY)を歯の形成期のマウスに投与し、組織学的方法および定量的方法を使用して、歯および歯周組織の変化を観察し比較考察する。

- (1) CY 投与群の濃度の違いによる歯根形成障害の程度を組織学的に比較する。
- (2) CY 投与群の経日的変化を形態的および組織学的に観察する。
- (3) 下顎臼歯部歯周組織への影響を観察する。
- (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、生後 12 日(PN12)に CY を各群に 30~200mg/kg となるよう投与し生後 20 日まで飼育し、100-CY 群は生後 76 日(PN76)まで飼育し、下顎第一臼歯(M1)の経日的変化を観察した。

(2) 全身および歯根長の観察

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られた側方エックス線写真を用いて、M1 遠心根の歯冠長および歯根長を測定し、その歯冠歯根比を算出比較した。

(3) 歯根形成および歯周組織変化の観察

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 μm の連続切片を作製した。

切片は、HE 染色にて観察した。

(4) ヘルトヴィッヒ上皮鞘の観察

歯根端形成部のヘルトヴィッヒ上皮鞘の観察のために、連続切片を免疫染色(サイトケラチン)法を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 濃度による歯根長の変化

30-200mg/kgの濃度でCYを投与したところ、生後20日の歯根長は濃度依存的に減少する傾向を示し、100mg/kg以上の濃度では有意差を認めた。

(2) 体重変化

100mg/kg CY投与後、100-CY群では一時的な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)

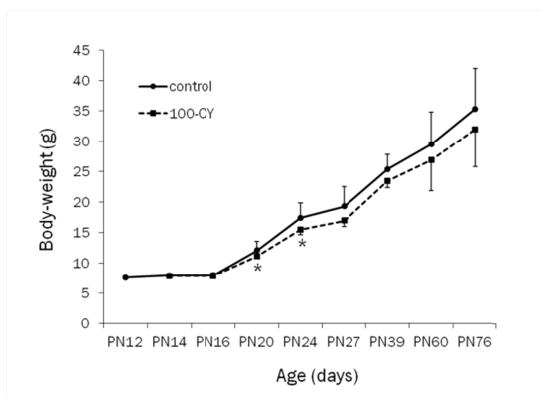


図1 体重変化

(3) 頭部エックス線写真による観察

生後27日(PN27)までの歯根長を示す。100-CY群では臼歯部の歯根は短小化し、歯の硬組織形成に対するCYの影響が認められた。(図2)

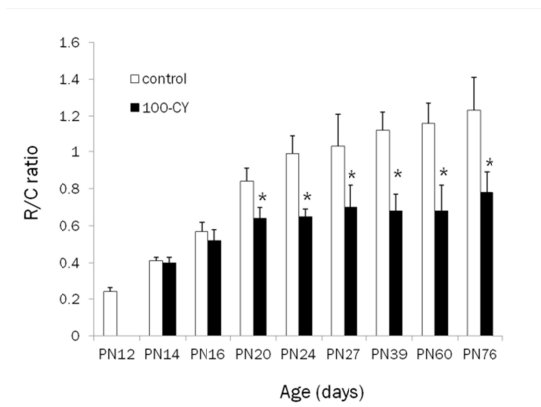


図2 歯冠/歯根比の経日的変化

(4) HE染色による歯周組織の観察

歯周組織の経日的変化

生後16日(PN16)では対照群に比較し、100-CY群の歯根長は短く、歯根膜腔が拡大し、歯槽骨は形成不良を示した。(図3)

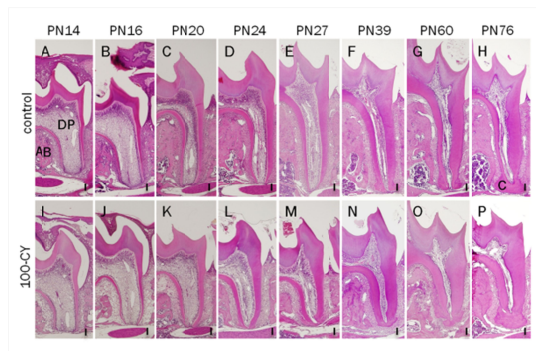


図3 M1の経日的歯周組織変化

歯根尖部における歯周組織の変化

対照群と比較し100-CY群では、生後14日(PN14)でM1歯根根尖部付近の歯根膜線維は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。しかし生後20日(PN20)では対照群より早期に100-CY群でセメント質の形成が開始されていた。(図4)

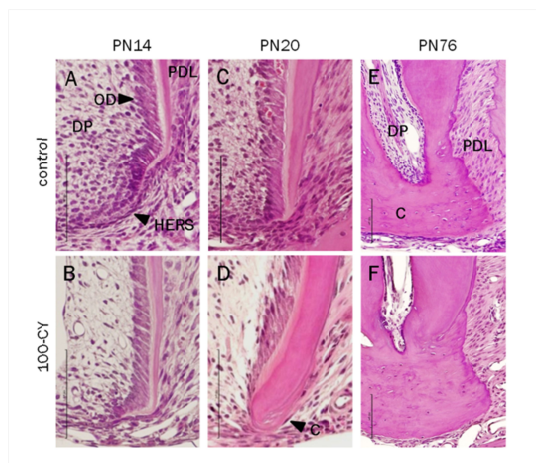


図4 第一臼歯歯根尖部歯周組織の変化

(5) 免疫染色によるヘルトヴィッヒ上皮鞘の観察

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、100-CY群では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っており、早期に喪失が認められた。ヘルトヴィッヒ上皮鞘は歯根形成に重要な役割をすることがわ

かっており、この形態の変化や早期喪失が歯根形成異常の一因となっていると考えられた。(図5)

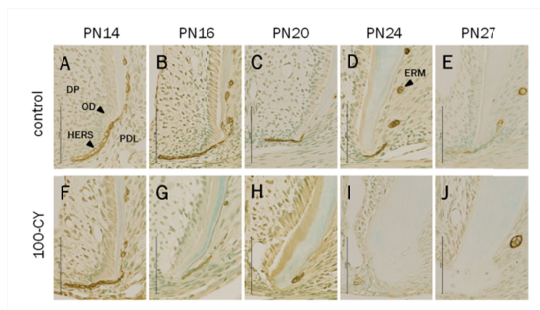


図5 ヘルトヴィッヒ上皮鞘の変化

以上の結果から、抗腫瘍薬として用いられているアルキル化剤のCYは成長期に使用されると、歯根や歯槽骨形成に影響をおよぼすことが示唆された。

小児期に悪性腫瘍の治療を受けた小児や保護者に対しては、CYによる二次的な障害が口腔組織に現れる可能性があることを説明する必要がある。また、CYはその作用が一回の投与量だけでなく総投与量に依存することにも留意し、悪性腫瘍治療後にも長期にわたり、歯根形成や歯周組織の成長発育に伴う変化や顎口腔の機能について経過観察していくことが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

中村侑子、河上智美、苅部洋行：シクロホスファミドによるマウス臼歯の歯根形成抑制と歯の萌出遅延、小児歯誌、査読有、51(3)、2013、360-371.

〔学会発表〕(計 7件)

Nakamura Y, Kawakami T, Karibe H: Cyclophosphamide on dental developmental defects in growing mice, The 24th International Congress of IAPD 2013、2013年6月15日、韓国ソウル。

Kawakami T, Nakamura Y, Karibe H:

Inhibition of the molar root formation by cyclophosphamide in young mice, The 24th International Congress of IAPD 2013、2013年6月12日、韓国ソウル。

中村侑子、河上智美、苅部洋行：シクロホスファミドによるマウス歯根形成抑制の3次元再構築、第51回日本小児歯科学会、2013年5月23日、長良川国際会議場(岐阜)。

Nakamura Y, Kawakami T, Karibe H: Effects of Cyclophosphamide on Root Formation in Growing Mice. The 91st IADR general session、2013年3月22日、米国シアトル。

中村侑子、岡本亜祐子、酒寄浩章、河上智美、苅部洋行：抗腫瘍薬シクロホスファミドがおよぼす歯根形成期歯胚の細胞変化について、第27回日本小児歯科学会関東地方会、2012年10月27日、鶴見大学記念館神奈川。

河上智美、中村侑子、苅部洋行：抗腫瘍薬シクロホスファミドがマウスの歯根形成におよぼす影響、第29回日本障害者歯科学会、2012年9月28日、札幌コンベンションセンター北海道。

安藤侑子、河上智美、苅部洋行：抗腫瘍薬シクロホスファミドがマウスの歯周組織におよぼす影響、第50回日本小児歯科学会、2012年5月12日、東京国際フォーラム東京。

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