

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 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：2014～2016

課題番号：26463121

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬による歯の形成障害に対する有効な齲蝕予防法の開発

研究課題名(英文) Inhibition of root development by antineoplastic drug, and study on effective prevention 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・准教授

研究者番号：30277595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、小児がんの治療法が改善され、長期生存する治療経験者は増加している。一方で、小児がん治療経験者の晩期合併症が注目されるようになってきた。

本研究では、化学療法でよく使用されるシクロホスファミド(CY)が歯の形成にあたる影響を調べるため、歯の形成期のマウスにCYを投与し臼歯の歯根形成を観察した。CY作用させマウスの臼歯の形態的变化を3D立体構築画像を用いて分析した。その結果、歯根の伸長を障害し、根尖孔が早期に閉鎖する傾向を示した。また、CYはヘルトウィッチ上皮鞘の形成や象牙芽細胞の増殖を阻害しており、これらが短根でV字型の歯根形成障害を引き起こす可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent decades, improvements in therapies for childhood cancers have increased the number of survivors. However, as the survival rate of children with cancer has improved considerably, the late effects of antineoplastic therapy deserve more attention. In this study, we examined the molar teeth of young mice treated solely with cyclophosphamide(CY), in order to evaluate the effects of CY on root development until occlusion completion. We analyzed morphological changes in the molar roots of mice using 3D structural images to investigate the mechanism underlying the adverse effects of CY on dental root formation. Our results showed that CY administration in the early stages of root formation resulted in impaired root development and early closure of the apical foramen. Additionally, we showed that CY inhibited the regular formation of Hertwig's epithelial root sheath and could cause disturbances to the developing root of the molar.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗腫瘍薬 歯の形成不全 マウス シクロホスファミド 晩期合併症 小児 小児がん

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、小児がん患者の7~8割以上が治癒し成人期を迎えるようになってきている。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おり、成長期の小児に対してこれらの治療は少なからず影響を与えると考えられている。治療成績の向上によってわが国でも小児がん経験者が増加することが見込まれており、これに伴って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。このように臨床報告が増え放射線療法や化学療法など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その解明を困難にしている。

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ホスファミドを作用させて歯根形成への影響を検索する。

3. 研究の方法

(1) 第一臼歯歯根形態の経日的変化
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群にはシクロホスファミドを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16, 20, 24, 27日目(PN16, PN20, PN24, PN27)まで飼育した。観察対象は下顎第一臼歯歯根とし、3次元的形態観察を行うために、 μ CT装置(Elescan, 日鉄エレクトクス社, 福岡)を用いて撮影した。断層画像の三次元構築は、画像解析ソフトTRI/3D-BON(ラトックシステムエンジニアリング, 東京)を用いた。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) 第一臼歯遠心根の歯根長および根尖孔面積の経日的変化

歯根長は同解析ソフトを用いて、第一臼歯遠心根の歯頸部エナメル質形成端から根尖象牙質形成端までの距離を歯根長として計測した。根尖孔面積は画像解析ソフトImage-Jを用いて測定した。統計学的な有意差検定には、対照群とCY群間の歯根長および根尖孔面積について対応のないt検定を用い、有意水準は5%とした。

(3) 第一臼歯遠心根の組織変化

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常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チ上皮鞘(HERS)の形態を観察するために矢状断とした。染色法はHE染色と上皮蛋白質の特異抗体であるサイトケラチンを用いた免疫染色とを行った。

(4) 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. 研究成果

(1) 第一臼歯歯根形態の経日的変化

μCT 撮影から得られた第一臼歯三次元立体構築像を図1に示す。シクロホスファミド投与後の歯根形態は、PN16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た。しかしCY群の歯根はわずかに長くなっているものの、PN27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。一方、根尖孔の大きさはPN16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群では対照群と比較して急速に根尖孔が狭まる傾向がみられた。

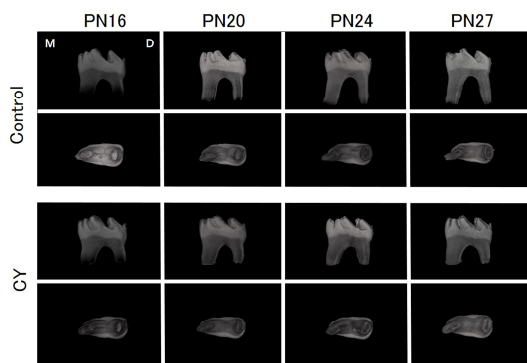


図1 下顎第一臼歯三次元構築像

(2) 第一臼歯遠心根の歯根長および根尖孔面積の経日的変化

遠心根の歯根長はPN16では両群間に統計学的有意差を認めなかった。しかし、PN27になると対照群の歯根長はPN16の約2倍に伸長していたが、CY群では短く、両群間に有意差を認めた(図2)。

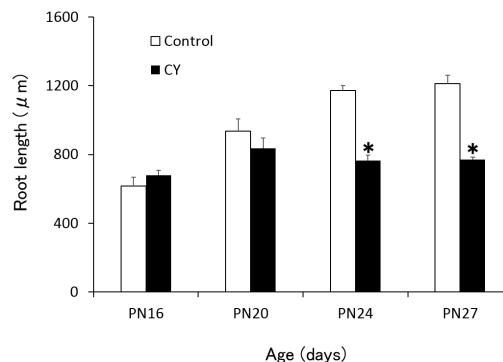


図2 遠心根の歯根長の経日的変化

一方、根尖孔の平均面積を比較すると両群とも経日的に根尖孔は小さくなっていったが、CY群では対照群より早期に面積が小さくなる傾向を示し、PN27ではCY群が有意に小さかった(図3)。

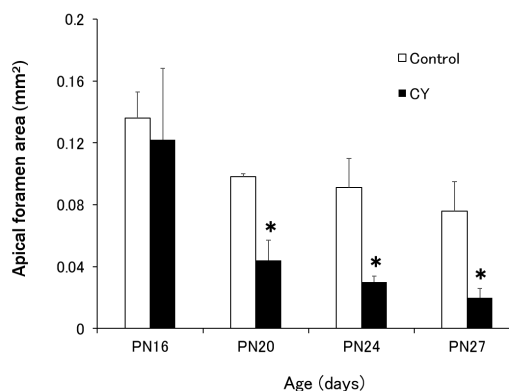


図3 根尖孔面積の経日的変化

(3) 第一臼歯遠心根の組織変化

HERSは歯根の大きさ、形状、および歯根数の決定などに重要な役割を果たしており、歯根先端部にサイトケラチン陽性細胞の2層構造として観察することができる。図4はHERS内のサイトケラチンの局在を示している。CY群で対照群に比べて、HERSの2層構造は不明瞭かつ早期に消失することが認められた。

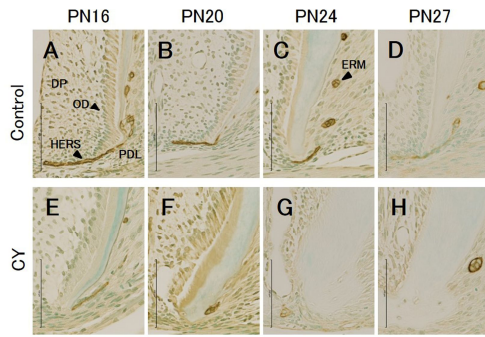


図4 HERSの経日的変化

HE染色ではCY群のPN16で根尖部のサービ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、PN24、PN27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5)。

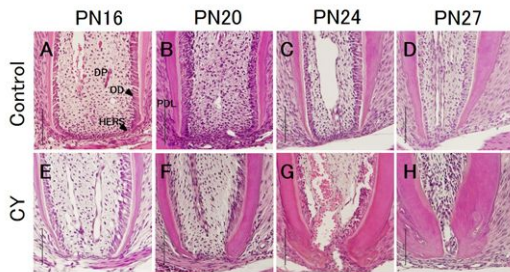


図5 遠心根根尖部のHE染色像

(4) 象牙芽細胞数の変化

歯根長は対照群に比べCY群で短く有意差がみられた。象牙芽細胞数は歯頸側においては両群に差はなかったが、根尖側ではCY群が有意に減少していた(表1)。薬剤投与時の生後12日齢では歯根のおよそ半分が形成されている時期のため、薬剤投与後の象牙芽細胞形成が阻害されていると考えられた。

表1 PN16の歯根長と象牙芽細胞数

	Control		CY		p-value
	Mean	SD	Mean	SD	
Root length (μm)	793	53	735	26	0.031
Odontoblast number (cells / 100 μm)					
whole	11.9	1.0	9.9	1.1	0.004
cervical side	11.0	1.8	9.1	1.5	0.062
apical side	13.0	0.8	10.6	1.3	<0.001

($p < 0.05$, t-test)

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で歯根の形成障害があらわれることが示された。シクロホ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た。また、シクロホスファミドは象牙芽細胞の増殖も障害するため象牙芽細胞数が減少して、歯根伸長の阻害がおこり歯根の太さが急速に細くなって根尖の閉鎖が進むことが示唆された。従って、歯根形成途上の歯に薬剤の影響が強くあらわれた場合には、歯根は短根となり根尖がV字型の形態となって形成されていくと考えられた。臨床報告や小児がん経験者のフォローアップ時のエックス線所見で認められる極端な短根やV字型の歯根形態は今回の研究の歯根形態と非常に類似しており、このマウスの研究と同様な現象が小児がん化学療法の際に小児の口腔内でおこっていると推定される。

これらの歯の形成障害は不可逆的なものであり、臨床では引き続いて口腔機能や審美性にも影響を与える可能性がある。

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, Hjerpestad 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.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

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

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.

〔学会発表〕(計3件)

河上智美, 中村侑子, 前田美穂, 苅部洋行: 抗腫瘍薬シクロホスファミドによる成長期マウスの歯根形態的变化, 日本小児血液がん学会雑誌, 53(4): 273, 2016.

Kawakami T, Nakamura Y, Karibe H: Effect of cyclophosphamide on periodontal tissue in growing mice, J Dent Res, 93 (Special Issue

B): 1628, 2014.

河上智美, 中村侑子, 前田美穂, 苅部洋行: シクロホスファミドがマウスの歯根伸長および歯槽骨形成におよぼす影響, 日本小児血液・がん学会雑誌, 51(4): 339, 2014.

〔図書〕(計2件)

河上智美(分担執筆): 第4章 支持療法 3. 歯科・口腔ケア(p.229-231), 第5章 晩期合併症 2. 各論 h. 口腔, 277-278, 小児血液・腫瘍学, 日本小児血液・がん学会編集, 診断と治療社, 東京, 2015, ISBN: 978-4-7878-2098-3.

河上智美(分担執筆): 臓器別・症状別フォローアップガイドライン 口腔組織・歯牙(p.255-256): 小児がん治療後の長期フォローアップガイドライン, (前田美穂編), 医薬ジャーナル, 東京, 2013.

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