歯原性腫瘍の実験的研究

—MNU 胃内投与による腫瘍の誘発—

東 富 雄 小 守 昭

徳島大学歯学部口腔病理学教室（主任：小守昭教授）

〔受付：昭和60年3月20日〕

An experimental study of odontogenic tumors in rats —Induction of tumors by gastric intubation of *N*-methylnitrosourea—

Tomio Azuma and Akira Komori

*Department of Oral Pathology, Tokushima University School of Dentistry
Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Tokushima University,
3 Kuramoto-cho, Tokushima, Tokushima 770, Japan*

(Director : Prof. Akira Komori)

[Accepted for publication : March 20, 1985]

Key words : experimental odontogenic tumor / *N*-methylnitrosourea

Abstract : The experiments were designed to induce odontogenic tumors by administration of *N*-methylnitrosourea (MNU) to suckling Sprague-Dawley rats. MNU was administered by gastric intubation 2, 3 and 9 times at semiweekly intervals to 7, 9, 10 and 11 day-old rats. Histologically, seven odontogenic tumors were identified in five of a total of 28 rats. The tumors were detected in one of four 7-day-old rats given 2 mg of total doses of MNU 2 times and one of five 9-day-old rats given 2 mg of total doses of MNU 2 times. Furthermore, the tumors were induced in three of ten 11 day-old rats which had received 24 mg of total doses of MNU 9 times. All of the tumors induced in male rats were located in the jaw ; five tumors were in the mandible and only one in the maxilla, five in the right and one in the left.

Microscopically, the tumors had many teeth-like structures, epithelial elements with marked keratinization and dental papilla-like elements. The histopathological features of these tumors resembled those of the human odonto-ameloblastoma (ameloblastic odontoma).

It is concluded that the present experimental methods were useful to induce odontogenic tumors in rats.

緒 言

歯原性腫瘍は口腔領域における重要な腫瘍の一つであり、その発生ならびに発育過程を検索するには、適当な動物実験モデルが有用である。しかし、今日まで、歯原性腫瘍の実験的研究に関する報告は極めて少なく¹⁻⁵⁾、動物実験モデルも確立されていない。それは、この腫瘍が自然発生的に極めて稀であること、他の臓器の発癌実験に際しても偶発的で、しかもごく少数しか認められないこ

となどによるものと考えられる。

今回、われわれは、歯原性腫瘍の誘発を目的として、出生後まもない哺乳期のラットに *N*-methylnitrosourea (MNU) を投与したところ、歯原性腫瘍の発生をみたので、その結果を報告する。

材料および方法

雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを同居させ、固型飼料と水の自由摂取下で飼育した。交尾ならびに妊娠を確認し、出生した仔ラットを実験に用いた。出生日を1日齢として、7, 9, 10, 11日齢の雌雄の哺乳期のラットに発癌剤を投与した。用

いた発癌剤は *N*-methylnitrosourea (MNU: 半井化学, 京都) で, 使用直前に再蒸留水で10mg/ml の割合に溶解し, ポリエチレンチューブ (外径0.8mm) を装着した注射器を用いて MNU 溶液を胃内に投与した。投与に際しては, 使用の度にチューブを清拭し, MNU 溶液が口腔粘膜に直接触れないように注意した。

実験に用いたラットの総数は60匹で, これらを日齢と投与回数ならびに投与量により, 次の5群とした。I 群は7日齢のラット14匹で, MNU 溶液0.1ml (1mg) を生後7日と10日目に投与した。II 群は同じく7日齢のラット12匹で, MNU 溶液0.1ml (1mg) を7, 10, 13日目に投与した。III 群は9日齢のラット8匹で, MNU 溶液0.1ml (1mg) を9, 12日目に投与した。IV 群は10日齢のラット15匹で, MNU 溶液0.1ml (1mg) を10, 13, 16日目に投与した。V 群は11日齢のラット11匹で, MNU 溶液0.1ml (1mg) を11, 14, 17日目に投与し, 3回投与後はラットの衰弱が著しかったため, 投与を一時中止した。3回目投与の3週間後に投与を再開し, MNU 溶液0.2ml (2mg) を38, 41, 44日目に投与した。次いで0.5ml (5mg) を47,

50, 53日目に投与した。各群における投与量の総量は, I, III 群が2mg, II, IV 群が3mg, V 群が24mg であった (Table 1)。なお, 投与時刻は毎回18時頃とし, MNU 投与ラットは発育状態により, 30~50日齢頃に母親から離し, 固型飼料と水の自由摂取下で飼育した。

投与終了後, 数週間以内に死亡したものは実験群から除外した。腫瘍が肉眼的に認められたものや, 衰弱の著しい動物は任意の時点で屠殺し, また, 死亡したものについても剖検を行った。各種臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定した。頭部は固定後, 軟X線写真 (softex EMB 型, ソフテックス株式会社) で撮影, 観察後, Plank-Rychlo 迅速脱灰液 (5°C) にて脱灰した。脱灰後, 頭部を2~3mm ずつ4~6個の前頭断あるいは矢状断のブロックに切り出し, 通法のごとくパラフィンに包埋した。各ブロックより6 μ m の切片を作製し, 染色はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。必要に応じて連続切片を作製し, また, 特殊染色としてアザン・マロリー染色, エラスチカ・ワンギーソン染色, 鍍銀染色, PAS 反応も行った。

Table 1

Group	Starting days	Number of rats (initial)	Time of administration	Total dose of MNU (mg)	#Available for data (sex)	Tumor bearing rat (sex)
I	7	14	2	2	4(♂4 ♀0)	1(♂1)
II	7	12	3	3	2(♂2 ♀0)	0
III	9	8	2	2	5(♂5 ♀0)	1(♂1)
IV	10	15	3	3	7(♂4 ♀3)	0
V	11	11	9	24	10(♂7 ♀3)	3(♂3)
Total		60			28(♂22 ♀6)	5(♂5)

Table 2 Experimental odontogenic tumors induced by MNU

Group	Sex	Location	Experimental days	Size of tumor (cm)
I		r. mand.	161	2.1×2.0×1.6
III		r. mand.	162	1.5×1.3×1.2
V		r. mand. & maxilla	208	1.8×1.7×1.6 microscopically
		r. mand.	212	2.5×2.2×2.2
		r. mand. & I. mand.	255	1.3×0.9×0.9 microscopically

Fig. 1 Lateral view of a rat with tumor. Note a swelling by the tumor in the left mandible.

Fig. 2 Roentgenogram of the left mandible of the rat with tumor showing a radial or irregular radiopaque areas within well circumscribed radiolucent mass.

結 果

投与後、動物は体毛が抜け落ち、全身衰弱が著しくなって死亡するものもみられた。とくにⅠ群とⅡ群では、約 $\frac{2}{3}$ の動物が1カ月以内に死亡した。結局、組織学的に検索し得た匹数はⅠ群が4匹、Ⅱ群2匹、Ⅲ群5匹、Ⅳ群7匹、Ⅴ群10匹の合計28匹(雄22匹、雌6匹)であった(Table 1)。実験終了時におけるラット28匹の日齢は、Ⅰ群では168-313(平均:250日)で、Ⅱ群では225-299日(平均:262日)、Ⅲ群では169-243日(平均:198日)、Ⅳ群では169-274日(平均:198日)、Ⅴ群では130-264日(平均:199日)であった。28匹の最小日齢は130日で、最大日齢は313日であった。

実験開始後、5カ月を経過した頃から下顎部に膨隆を認めるものがみられるようになった。Fig. 1はⅤ群の雄ラット212日目の側面写真で、左下顎部の著しい膨隆が認められる。軟X線写真では、下顎骨は著しく腫大し、類円形、結節状のX線透過性の病変がみられ、その中に放射状にはしるX線不透過物が多量に認められた(Fig. 2)。

肉眼的ならびに顕微鏡的に歯源性腫瘍としたものは、5個体、7個の病変で、いずれも雄に生じており、右側が6個、左側が1個であった。このうち、Ⅴ群の1個体では左右に、また別の1個体では上下顎に腫瘍が認められた。なお、Ⅴ群での1病変以外、病変はすべて下顎であった。腫瘍の大きさは、最大が $2.5 \times 2.2 \times 2.2$ cmで、最小のものは顕微鏡的に確認されたものであった(Table 2)。

肉眼的には、腫瘍の剖面は淡黄白色の軟かい組織成分と灰白色の硬組織成分とが混在しており、この結節状の腫瘍は周囲との境界が明瞭であった。

組織学的には、腫瘍はすべて顎骨内にあり、下顎に生じたものでは、下顎骨は外側に著しく圧排されて菲薄化していた(Fig. 3)。腫瘍は全例ともほぼ同様な組織像で、腫瘍組織は歯牙様組織からなる多量の硬組織と、著しい角質変性を伴った上皮性組織、および鬆疎な線維性組織から構成されていた(Fig. 4)。この硬組織は、セメント質、細管構造の明らかな象牙質、ならびに少量のエナメル質のみられる複雑・集合歯牙腫様像を呈していた(Figs. 4, 5)。一方、軟組織の部分は、紡錘形ないし星状の細胞からなる鬆疎な歯乳頭様組織中に、類円形または蕾状の上皮胞巣が認められた。この胞巣の辺縁部には、円柱状のエナメル芽細胞様細胞の配列がみられた(Fig. 6)。所により、硬組織形成を伴った歯胚様の構造や(Fig. 7)、エナメル上皮腫を思わせる上皮のシート状の増殖(Fig. 8)、実質囊胞と思われる所見も認められた(Fig. 9)。これら上皮巢の中心部では、著しい角質変性を示しており、時にghost細胞あるいは多数の多核巨細胞もみられた。腫瘍細胞には異型性はみられなかった。硬組織成分と上皮成分の比率は部位により様々であったが、全般に結節状の腫瘍周辺部は上皮性組織と歯乳頭様の線維性組織

Fig. 3 An entire figure of the frontal section through the tumor of the left mandible. (H-E. $\times 4.5$)
OT : odontogenic tumor T : tongue M : right mandible

Fig. 4 Low-power view of the tumor. The tumor consists of irregular dentin, enamel matrix, cementum, ameloblastic epithelium and dental papilla. (H-E. $\times 80$)

Fig. 5 A higher magnification of a field from the tumor shown in Fig. 4. (H-E. $\times 160$)
E: enamel matrix D: dentin
P: dental papilla

Fig. 6 A higher magnification of the tumor. Epithelial nests simulating tooth bud are seen in odontogenic mesenchym. (H-E. $\times 200$)

Fig. 7 A higher magnification of the tumor. Note enamel organ-like structure associated with dentin formation. (H-E. $\times 160$)

Fig. 8 A higher magnification of the tumor. Note ameloblastomatous proliferation of the epithelium with keratinization in the central parts. (H-E. $\times 200$)

Fig. 9 A higher magnification of the tumor. Note parenchymal cyst formation with central degeneration within follicle of the tumor. (H-E. $\times 160$)

に富んでいた。一方、左下顎に生じ、顕微鏡的に確認された病変は、第1臼歯の舌側歯槽部より下顎骨上方部に大きな嚢胞を形成しており、内腔面は上皮組織で被覆され、内腔には好酸性の液状物を有していた (Fig. 10)。この嚢胞の上方部には上皮の不規則な増殖と石灰化物が認められた。また、この病巣部の半連続切片による検索では、この嚢胞の遠心部上方に歯源性腫瘍とみなしうる小さな腫瘍組織塊が認められ、それは象牙質様構造、角質変性を伴った上皮性組織、ならびに歯乳頭様組

Fig. 10 A large cyst formation is seen beside the lingual site of the first molar of the left mandible, which is not associated with incisor. (H-E. $\times 70$)
MO: left first molar T: tongue
I: left incisor

Fig. 11 Note a tumor in a part of cyst wall shown in Fig. 10. (H-E. $\times 100$)
T: tumor CS: cystic space

Fig. 12 Photograph shows early stage of the tumor (arrow) in the maxilla. (H-E. $\times 100$)

織の増殖よりなっていた (Fig. 11)。顕微鏡的に認められた上顎での病変は、第2臼歯根間隔の歯槽部にみられ、角化を伴った不規則な上皮の増殖と硬組織より成っており (Fig. 12)、これは歯原性腫瘍の初期像と考えられた。

この誘発された腫瘍組織は、臼歯あるいは切歯を巻きこんでおり、これらの歯牙には種々の程度の形成障害がみられた。

結局、これらの腫瘍は組織学的には歯原性腫瘍であり、ヒトでのエナメル上皮歯牙腫、WHOの組織分類では歯牙エナメル上皮腫に最も類似した所見であった。

考 察

ラットにおける歯原性腫瘍の自然発生については、Bullock & Curtis⁶⁾ は August 系ラットについて全身の自然発生腫瘍を検索し、2,450匹以上の観察例中、2匹の雌に odontoma がみられたとしている。同様に、Ratcliffe⁷⁾ は、Experimental Colony Strain 393匹と Wistar Stock colony 75匹のラットについて検索し、Experimental Colony Strain の雌の1匹に下顎の adamantinoma がみられたと記載している。本実験で用いた Sprague-Dawley 系ラットでは、歯原性腫瘍の自然発生についての報告はみられていない⁸⁾。

発癌剤を用いた実験でも、歯原性腫瘍発生の報告は散発的で、発生頻度も低く、多くは偶発的で、再現性は乏しい。Herrold¹⁾ は、生後1カ月の雌雄の Syrian ハムスターに MNU を静脈内あるいは胃内に投与し、高頻度に歯原性腫瘍を誘発したと報告している。しかし、これに準じた向後²⁾ や Edwards⁹⁾ の実験では、明らかな歯原性腫瘍は認められていない。最近では、Eisenberg ら⁵⁾ は Wistar 系ラットに MNU を胃内へ投与し、81匹中6匹に歯原性腫瘍の発生がみられたと報告している。また、Berman & Rice⁴⁾ は Fisher F 344ラットで肝の部分切除後に MNU を静脈より投与し、134匹中29匹に歯原性腫瘍の発生がみられたと記載している。他の発癌剤を用いた実験では、Wang ら³⁾ は Long-Evans 系ラットに N-butyl-nitrosourea (BNU) を胃内へ投与し、68匹中4匹に ameloblastic odontoma をみている。しかし、同様な方法での Takeda ら¹⁰⁾ の報告では、この種の腫瘍の発生はみられていない。

本研究では、出生後間もない哺乳期の仔ラットに MNU を胃内へ投与し、組織学的に検索した28匹中5匹(18%)、7病変に歯原性腫瘍の発現がみられた。これは、今までの発癌剤による歯原性腫瘍の誘発実験がいずれも1カ月齢前後の動物に発癌剤を投与している点が異なっていた。一方、vesselinovitch & Mihailovich¹¹⁾ は、新生児あるいは乳児期の MRC ラットにウレタンを腹腔内へ投与し、全身諸臓器での腫瘍の発生を検索しており、この実験動物116匹中2匹に ameloblastoma

がみられたと報告している。また、Jurgelski ら¹²⁾ は532匹の仔 opossum を用い、ethyl-nitrosourea (ENU) を経口的に投与し、全身の embryonal tumor を検索している。このうち、生下時から12週齢の間に ENU を投与した動物の16匹に ameloblastoma の発生がみられたと述べている。Edwards¹³⁾ は inbred Lewis ラットに MNU を胃内、腹腔内および静脈内へ投与し、胃内投与した離乳期のラット8匹中1匹、また若い成熟ラット10匹中1匹に歯原性腫瘍がみられたとしている。このように、歯牙の発育期あるいは動物の免疫機構の完成期を考慮して発癌剤の投与時期を決定することは重要なことであると考ええる。本研究では、7, 9, 11日齢に投与したラットに歯原性腫瘍の発現がみられているので、この日齢範囲では、いずれでも腫瘍は生じうるものと考えられる。しかし、日齢の若いものでは、投与後の死亡率が高かった。

発癌物質の投与量と回数については、発癌物質の種類にもよるが、MNU では、全身諸臓器への影響を検索した報告によると、70~100mg/kg 体重の1回投与により歯原性腫瘍が認められている^{14,15)}。Edwards¹³⁾ は、歯原性腫瘍の誘発には大量を1回投与したほうがよいと述べている。一方、BNU では、300mg/kg 体重の大量を4回行って歯原性腫瘍の発生をみている³⁾。本研究では、初回の投与量が50~100mg/kg 体重に相当し、比較的大量であった。投与回数はV群で9回、投与量は総量で24mg となり最も多く、3匹に計5個の歯原性腫瘍が認められた。しかし、投与回数と量については、更に検討することが必要であると考ええる。

本研究で生じた腫瘍は、V群の1例で上顎に初期像と思われる小さな腫瘍性病変がみられた以外、腫瘍はすべて下顎骨内に出現していた。発癌剤投与による歯原性腫瘍の誘発実験では、Eisenberg ら⁵⁾、Wang ら³⁾、Edwards¹³⁾ の研究でも同様に腫瘍はすべて下顎に生じており、Herrold¹⁾ の実験では大部分が下顎に、また、Jurgelski ら¹²⁾ の研究では上下顎にみられている。自然発生例の報告でも、Bullock & Curtis⁶⁾ と Ratcliffe⁷⁾ の研究では、歯原性腫瘍はすべて下顎にみられている。従って、今までの報告でも大多数の実験的歯

原性腫瘍は下顎に生じている。この理由については、使用した動物や発癌剤の種類または投与方法などをも考慮し、今後、検討することが必要である。

動物に出現している歯原性腫瘍の組織型については、これも使用した動物の種類と発癌剤、または、投与方法や投与時期などに関連するが、自然発生例では、August 系ラットで odontoma が⁶⁾、Experimental Colony Strain ラットで adamantinoma がみられている⁷⁾。発癌剤投与実験においては、ハムスターに MNU を投与した Herrold¹⁾ の報告によると、出現した歯原性腫瘍の組織型は投与方法により多少異なっており、静注群では ameloblastic fibroma 2例, ameloblastic odontoma 3例, complex odontoma 1例で、胃内投与群では acanthomatous ameloblastoma 2例, ameloblastic fibroma 3例, ameloblastic odontoma 4例, complex odontoma 1例で、歯牙硬組織の形成を伴ったものが多い。一方、ラットを使った実験例では、developing complex odontoma (Eisenberg ら⁵⁾) ; complex odontoma 26例, ontoameloblastoma 2例, ameloblastic carcinoma 1例 (Berman & Rice⁴⁾) ; ameloblastic odontoma (Wang ら⁸⁾) とほとんどが歯牙腫ないし歯牙硬組織の形成を伴った歯原性腫瘍であった。本研究での歯原性腫瘍の組織型は、今までの報告者のものと大差なく、複雑ないし集合歯牙腫と呼ぶべき歯牙様硬組織成分と、エナメル上皮腫と考えられる軟組織成分とが認められた。われわれは、本研究での、この歯原性腫瘍は、組織

学的にはヒトのエナメル上皮歯牙腫、あるいは WHO の歯牙エナメル上皮腫に最も類似したものと考えた。

MNU 投与により、口腔粘膜をはじめ、全身の諸臓器に種々の腫瘍が生じることが知られている。本研究でも口腔粘膜や他臓器に腫瘍の発現がみられたが、この点に関しては別に報告する予定である。

本研究では、顕微鏡的に確認された2病変以外の腫瘍は、臼歯と切歯を巻き込んでいた。臼歯ないし切歯と腫瘍の位置関係は、本腫瘍の組織発生上、重要な問題である。また、再現性についても、その後の実験で同様な腫瘍の発現をみている。いずれも重要な問題であり、詳細に検索し、あらためて報告する。

結 語

哺乳期における7, 9, 10, 11日齢の雌雄の SD ラットに対し、MNU を胃内に投与したところ、28匹中5匹に7個の歯原性腫瘍が発生した。腫瘍はいずれも雄に生じており、上顎が1個、下顎が6個であった。左右別では、左側が1個、右側が6個で、すべて顎骨内に生じていた。

組織学的には、ヒトでの歯牙エナメル上皮腫(エナメル上皮歯牙腫)に最も類似した所見であった。

本研究は、歯原性腫瘍の誘発における動物実験モデルとして有用な方法であると考えた。

本研究の一部は文部省科学研究費(一般研究 B, No. 59480356)の補助によった。

抄録：歯原性腫瘍の誘発を目的として、哺乳期における雌雄の SD ラットに MNU 水溶液を胃内に投与した。組織学的に検索した28匹中5匹に7個の歯原性腫瘍が認められた。腫瘍の発生は、MNU を7日齢のラットに2回、総量2mg を投与した群の4匹中1匹に、9日齢のラットに2回、総量2mg を投与した群で5匹中1匹に、さらに11日齢のラットに計9回、総量24mg を投与した群で10匹中3匹にみられた。腫瘍はいずれも雄に生じており、すべて顎骨内にあった。上下顎別には、上顎が1個、下顎が6個で、左右では、左側が1個、右側が6個であった。組織学的には、多数の歯牙様硬組織と著しい角質変性を伴った上皮性組織、および鬆疎な歯乳頭様組織からなっており、ヒトでの歯牙エナメル上皮腫(エナメル上皮歯牙腫)に最も類似していた。

本研究で用いた方法は、歯原性腫瘍の実験モデルとして有用であると考えられた。

文 献

- 1) Herrold, K. M. : Odontogenic tumors and epidermoid carcinomas of the oral cavity. An experimental study in Syrian hamsters. *Oral Surg.* **25** : 262-272, 1968.
- 2) 向後隆男：N-nitrosomethylurea による歯原性腫瘍の実験的研究。口病誌 **39** : 191-212, 1972.
- 3) Wang, H., Terashi, S. and Fukunishi, R. : Ameloblastic odontoma in rats induced by N-butyl nitrosourea. *Gann* **66** : 319-321, 1975.
- 4) Berman, J. J. and Rice, J. M. : Odontogenic tumors produced in Fisher rats by a single intraportal injection of methyl nitrosourea. *Archs. Oral Biol.* **25** : 213-220, 1980.
- 5) Eisenberg, E., Murthy, A. S. K., Vawter, G. F., and Krutchkoff, D. J. : Odontogenic neoplasms in Wistar rats treated with N-methyl nitrosourea. *Oral Surg.* **55** : 481-486, 1983.
- 6) Bullock, F. D. and Curtis, M. R. : Spontaneous tumors of the rat. *J. Cancer Res.* **14** : 1-115, 1930.
- 7) Ratcliffe, H. L. : Spontaneous tumors in two colonies of rats of the Wistar Institute of Anatomy and Biology. *Am. J. Pathol.* **16** : 237-255, 1940.
- 8) Thompson, S. W., Huseby, R. A., Fox, M. A., Davis, C. L., and Hunt, R. D. : Spontaneous tumors in the Sprague-Dawley rat. *J. Nat. Cancer Inst.* **27** : 1037-1057, 1961.
- 9) Edwards, M. B. : Some effects of N-methyl nitrosourea on the oral and odontogenic tissues of the Syrian golden hamsters. *Archs. Oral Biol.* **23** : 515-524, 1978.
- 10) Takeda, Y., Hatakeyama, S., Sashima, M., Morita, H., Fujisawa, Y., and Suzuki, A. : Proliferation of epithelial rests in periodontal ligament of rats induced by 1-butyl-1-nitrosourea. *Jpn. J. Oral Biol.* **24** : 520-522, 1982.
- 11) Vesselinovitch, S. D. and Mihailovich, N. : The development of neurogenic neoplasms, embryonal kidney tumors, harderian gland adenomas, Anitschkow cell sarcomas of the heart, and other neoplasms in urethan-treated newborn rats. *Cancer Res.* **28** : 888-897, 1968.
- 12) Jurgelski, W., Hudson, P. M., Falk, H. L. and Kotin, P. : Embryonal neoplasms in the opossum : A new model for solid tumors of infancy and childhood. *Science* **193** : 328-332, 1976.
- 13) Edwards, M. B. : Effects of N-methyl nitrosourea on oral and dental tissues in the inbred Lewis rat. *Archs. Oral Biol.* **25** : 262-272, 1980.
- 14) Leaver, D. D., Swann, P. N. and Magee, P. N. : The induction of tumors in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea. *Brit. J. Cancer* **23** : 177-187, 1969.
- 15) Thomas, C. and Bollmann, R. : Untersuchungen zur Organotropie der Krebs erzeugenden Wirkung des N-Nitroso-N-methyl-Harnstoffes (NMH) an Ratten. *Experientia* **25** : 50-51, 1969.