

# Cyclophosphamide가 白鼠下顎顆頭的 成長에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究

서울大學校 大學院 齒醫學科 矯正學 專攻

(指導 徐 廷 勳 教授)

李 炳 泰

## — 目 次 —

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 方法
- III. 實驗成績
- IV. 總括 및 考按
- V. 結 論
- 參考文獻
- 英文抄錄
- 寫眞附圖

## I. 緒 論

矯正學 分野에 있어서 下顎骨의 成長機轉을 理解하고 그에 影響을 끼칠 수 있는 内外의 要因을 把握하는 것은 正常的인 下顎骨의 成長發育을 圖謀하기 위해서 매우 重要하다.

Schneider(1965)<sup>20</sup>, Bernick와 Patek(1969)<sup>6</sup>는 下顎顆頭가 下顎骨의 成長發育에 重要한 役割을 한다고 主張하였으며 Moss(1968)<sup>24</sup>는 顎骨에 加해지는 機能的 或은 環境的 要因이 下顎顆頭的 成長을 左右한다고 報告하고 있다.

이와 같은 下顎骨成長에 對한 諸 見解를 科明하기 위하여 많은 學者들이 下顎顆頭切除<sup>25</sup>, 下顎骨運動에 關係되는 筋組織의 切斷<sup>27</sup> 및 下顎顆頭的 移植<sup>26</sup>을 통해 成長 樣態를 研究한 바 있다.

下顎顆頭軟骨의 活性도가 物理的 刺戟에 依하여 左右되는 證據를 Blackwood(1966)<sup>5</sup>, Folke와 Stallard(1966)<sup>12</sup>가 提示하고 있음에도 不拘하고 Meikle(1973)<sup>23</sup>은 下顎顆頭軟骨에서 軟骨細胞의 分裂은

外部要因과는 無關하게 일어날 수 있다고 하였다.

또한 金(1982)<sup>18</sup>은 下顎骨의 成長에 對한 記述에서 下顎顆頭軟骨이 下顎骨의 成長을 主導하는 것이 아니고 다만 局所의 成長에 適應하는 役割을 할 뿐이라고 하였다.

抗癌劑로 많이 使用되고 있는 cyclophosphamide는 抗癌效果 뿐 아니라 正常臟器組織의 分裂增殖하는 細胞에 敏感하게 作用하여 抑制的 效果를 發揮한다고 報告되고 있어<sup>3, 11, 15, 16, 20, 25, 28</sup> 特定臟器와 關聯된 成長能을 檢索하는데 매우 有效하게 利用할 수 있다.

口腔領域에 있어서 cyclophosphamide의 影響에 關한 研究로는 齒牙發生에 關하여 Vahlsing等(1977)<sup>33</sup>과 Koppang(1973)<sup>20</sup>, Adatia(1975)<sup>11</sup> 및 黃(1981)<sup>16</sup>이 報告한 바 있고 趙(1981)<sup>8</sup>가 唾液腺에 關하여 그리고 崔(1982)<sup>7</sup>가 拔齒創의 治癒機轉에 미치는 影響을 觀察한 바 있으나 下顎의 成長에 重要한 役割을 하리라 推測되는 下顎顆頭에 對한 實驗은 下顎骨의 成長機轉을 밝히는데 一助가 되리라 思料되어 著者は 成長能이 가장 活潑한 時期에 cyclophosphamide가 下顎顆頭的 成長에 어떤 影響을 미치는 가를 觀察하고 그 結果를 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

實驗動物로는 生後 4週된 Spraque-Dawley 系의 白鼠 54마리를 使用하였다. 이 中 cyclophosphamide 20mg/kg, 40mg/kg, 및 60mg/kg을 투여할 各各의 實驗群에 15마리씩을 配定하고 나머지 9마리는 對照群에 配定하여 實驗群에 投與한 cyclophosphamide와 同量의 生理的食塩水만을 投與하였다. 投

與는 各己 腹腔內에 一定量을 每日 一回 3日 동안 施行하였고 그후 5日, 10日 및 15日이 經過한 後의 所見을 보기 위하여 各各의 期間이 經過된 것은 ether麻醉下에 犧牲시켜 該當部位를 切取하고 10% 中性 formalin과 Carnoy液에서 固定하여 5% ED-TA에서 脱灰한 後 paraffin包埋切片을 製作하였다.

組織標本은 toluidine blue, alcian blue, H-E 染色과 PAS反應에 依하여 觀察하였다.

### III. 實驗成績

#### 對照群에서의 所見 :

最終投與日로부터 15日間の 所見을 一括하여 보면 下顎顆頭는 全體가 軟骨로 被覆되어 있음을 볼 수 있었다.

軟骨의 最外側에는 纖維性的 關節面이 形成되어 있고 그 다음 層은 關節面에 平行하게 存在하는 紡錘形의 細胞로 構成되어 纖維性 軟骨과 硝子軟骨의 中間型 所見을 보였다.

纖維性的 關節表面 다음에는 軟骨細胞層이 構成되어 있는데 이들 細胞中 關節面에 가까이 있는 것은 細胞의 長軸이 關節面에 平行하게 存在하는 紡錘形의 軟骨小腔 속에 있고 이보다 深層에 있는 것은 胞狀化된 軟骨小腔 속에 몇個의 細胞가 들어가 層을 이루는데 이들 軟骨小腔은 거의 柱狀排列을 하고 있었다. 軟骨小腔 사이의 基質은 hematoxylin에 다소 好染性을 나타내고 또한 PAS 陽性物質과 toluidine blue에 依한 變色性에 對해서는 pH 4.0과 7.0에서 다소 强하게 反應되었다. 이와같은 軟骨層이 顆頭軟骨層 中에서 가장 두터운 樣相을 나타내었다.

以上の 軟骨層 다음으로 軟骨細胞가 破壞吸收되고 있는 層이 形成되어 있었다. 이 部位는 特히 alcian blue에 對하여 染色性이 增加하였다. 骨髓腔에는 石灰化된 骨梁들이 放射狀으로 形成되고 骨髓腔內에는 여러 發育段階의 血球들이 充滿되어 있었다.

#### 實驗群에서의 所見 :

20mg/kg 投與群에서는 全般的으로 對照群과 類似的 所見을 보였으나 다만 toluidine blue에 依한 變色性이 增殖帶에서 다소 減染된 所見으로 觀察되었다.

40mg/kg 投與群에서는 增殖帶에서 肥大帶에 걸쳐 軟骨細胞의 排列이 不規則해지며 농축된

核을 가진 細胞가 다소 增加되고 또한 細胞의 數가 減少되는 傾向이었으며 이로 인하여 顆頭軟骨의 全厚徑이 점차 減少되었다. 또한 軟骨基質에 對한 모든 染色反應이 經過日數가 많아짐에 따라 減弱되는 所見이었고 toluidine blue에 依한 變色性은 pH 7.0에서 比較的 强하게 나타났으나 pH 4.0에서는 다소 微弱해 지고 pH 2.0에서는 消失되는 傾向이었다.

骨髓腔에서의 骨梁의 發育所見은 對照群에 비해 다소 不規則한 排列을 하고 骨梁의 染色性도 低下된 傾向이었다.

60mg/kg 投與群에서는 全例에 걸쳐 顆頭軟骨의 增殖帶에서 肥大帶에 걸쳐 軟骨細胞의 排列異常과 數的減少를 惹起하는 傾向을 보였다.

그리고 40mg/kg 投與群에서 농축된 核이 觀察되기도 하였는데 이들 部位에 있어서는 pH 7.0에서의 變色性도 微弱하게 나타나는 등 거의 모든 染色性이 全般的으로 減少하고, 軟骨의 形成幅도 위축되는 傾向이 觀察되었다. 骨梁의 形成幅은 다소 넓어지고 hematoxylin 染色性보다 eosine에 대한 染色性이 相對적으로 增加되었으며 거의 모든 染色性이 彌漫性을 보였다.

### IV. 總括 및 考按

Blackwood(1966)<sup>5)</sup> 및 Kogiso(1977)<sup>19)</sup>는 白鼠 下顎顆頭를 關節面에서 부터 3 내지 4個의 層으로 分類하였다. 即 關節帶<sup>5, 19)</sup>, 增殖帶<sup>19)</sup> 또는 中間帶<sup>5)</sup>, 肥大帶<sup>19)</sup> 및 浸蝕帶의 層狀構造를 하고 있다. 本實驗의 對照群 所見에서도 이와 같은 四個의 層狀構造를 볼 수 있었다<sup>2, 4)</sup>.

Blackwood(1966)<sup>5)</sup>는 白鼠에 <sup>3</sup>H-tymidine을 投與하고 이들이 各層에서 label되는 樣相을 追跡하여 關節層의 細胞와 深層의 細胞는 서로 다른 經過를 取한다고 報告하였다.

Blackwood(1966)<sup>5)</sup>, Folke와 Stallard(1966)<sup>12)</sup>는 增殖帶의 活性도가 外部에서의 物理的 刺戟에 依해 左右된다고 하는데 反하여 Meikle(1973)<sup>23)</sup>은 增殖帶에서의 細胞分裂은 外部要因과 無關하게 일어날 수 있으며 外部要因은 細胞分化에 關係하나 增殖活性에는 關係하지 않는 것 같다고 하였다.

이에 本 實驗에서는 顆頭軟骨의 成長이 일어나는 部位가 곧 下顎骨의 growth site에 該當하리라 보고 臟器組織에 發育抑制 效果를 나타낸다고 報告

되고 있는 cyclophosphamide를 致死量에 未達하는 수준<sup>20, 28, 31, 32, 33</sup>으로 投與하여 顎頭軟骨에 미치는 影響을 觀察하고자 하였다.

Koppang(1973)<sup>20</sup>은 cyclophosphamide 25~40mg/kg 投與時 X-線 500Rads의 照射과 같은 效果를 나타내고 象牙質에 niche가 나타났다고 하였다. 그러나 Adatia(1975)<sup>11</sup>는 40mg/kg 投與로는 基底부의 象牙基質形成障礙가 미약하거나 없었다고 하였고 80mg/kg 投與時 basal odontogenic layer의 形成障礙가 招來되어 齒髓細胞가 消失된 無細胞帶가 나타났다고 하였다.

Friedman(1967)<sup>10</sup>은 白鼠에 500mg/kg을 投與하여 1時間後엔 거의 消失됨을 觀察한 바 있다.

Vahlsing等(1977)<sup>34</sup>은 75mg/kg을 投與한 경우 切齒萌出速度와 저작기능이 低下됨을 報告하였다. 그리고 cyclophosphamide는 그 作用期間과도 密接한 關係를 갖고 있어 短期的 作用時에는 成長發育을 阻害한다고 하였다.

Hansen(1979)<sup>19</sup>은 cyclophosphamide가 교원합성을 抑制한다고 하였고 崔(1982)<sup>7</sup>는 基質形成의 形成障礙가 야기 된다고 보고 하였다.

이와 같은 事實로 미루어 볼때 本實驗에서 投與된 分量은 投與時期에서의 細胞分裂像에 充分히 影響力을 미칠 것으로 思料되었으며 顎頭軟骨의 增殖帶에서 肥大帶에 걸쳐 나타난 軟骨細胞의 數의 減少와 排列不整 및 一部變性된 核의 出現, 厚徑의 減少等은 cyclophosphamide의 作用에 起因한다고 믿어진다.

Leblond等(1955)<sup>21</sup>에 依하면 軟骨基質에는 chondroitin sulfate와 같은 酸性粘液多糖類가 蛋白과 複合하여 巨大分子로 存在하며, 또한 toluidine blue에 對한 變色性을 나타낸다고 한다.

本實驗에서의 toluidine blue에 對한 變色性의 低下는 chondroitin sulfate와 같은 酸性粘液多糖類가 減少됨을 뜻하므로 cyclophosphamide는 軟骨細胞의 成長뿐 아니라 基質形成에도 抑制的 效果를 惹起시킨 것으로 思料된다<sup>9, 17, 21, 35</sup>. 또한 이와 같은 所見은 浸蝕帶에서의 石灰化 과정과 骨梁의 形成에도 作用되었음이 alcian blue에 依한 염색소견에서 추정할 수가 있었다<sup>36</sup>. 한편 投與量이 增加함에 따라 骨髓腔의 狹少化가 觀察되기도 했는데 이와 같은 所見도 亦是 cyclophosphamide의 影響에서 비롯된 것이라 思料된다<sup>18, 19</sup>.

Moss(1968)<sup>24</sup>는 顎頭の 皮下移植 實驗에서 移植

片의 消失에 內的要因이 없다고 했으나 Horikoshi(1974)<sup>14</sup>等은 軟骨細胞의 器官培養에서 內因性的 存在를 肯定하고 있다.

本實驗에서 나타난 軟骨細胞의 基質形成抑制的 所見으로 미루어 볼 때 下顎顎頭에서의 成長發育의 役割은 增殖帶에서 肥大帶에 걸쳐 나타나는 것으로 思料된다.

## V. 結 論

著者は cyclophosphamide가 白鼠下顎顎頭の 成長에 어떠한 影響을 미치는 가를 觀察하기 위하여 cyclophosphamide 20mg/kg, 40mg/kg 및 60mg/kg을 投與한 實驗群을 各各 5日, 10日, 및 15日이 경과한 후 犧牲시켜 toluidine blue, alcian blue, PAS反應과 H-E染色을 통하여 對照群과 比較檢鏡하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 投與量의 增加에 따라 下顎顎頭軟骨의 厚徑이 減少되는 傾向이었으며 특히 增殖帶에서 肥大帶에 걸쳐 軟骨細胞의 數的 減少와 變性이 觀察되었다.

2. 增殖帶와 肥大帶에서 基質에 對한 toluidine blue의 變色性이 減少하고 PAS 및 alcian blue에 依한 反應은 彌漫性으로 미약한 소견이 觀察되었다.

3. 骨髓腔에서 骨梁形成方向은 對照群과 달리 不規則한 排列을 하고 또한 骨髓腔은 狹少해지는 傾向을 보였다.

## REFERENCES

- 1) Adatia, A.K.: The effects of cyclophosphamide on odontogenesis in the rats, Archs. Oral Biol., 20:141-144. 1975.
- 2) Asling, I.S., Nakaiye, R. and Asling, C.W.: Roentgen cephalometric studies on skull development in rats. Gigantism versus acromegaly: Age differences in response to prolonged growth hormone administration, Anat. Rec., 196:9-21. 1980.
- 3) Bagley, C.M., Jr., Bostick, F.W. and DeVita, V.T., Jr.: Clinical pharmacology of cyclophosphamide, Cancer Res., 33:226-233, 1973.
- 4) Bernabei, R.L. and Johnston, L.E.: The

- growth in situ of isolated mandibular segments, *Amer. J. Orthod.* 73:24-35, 1978.
- 5) Blackwood, H.J.: Growth of the mandibular condyle of the rat studied with tritiated thymidine, *Archs. Oral Biol.*, 11:493-500, 1966.
  - 6) Bernick, S. and Patek, P.Q.: Postnatal development of the rat mandible, *J. Dent. Res.* 48:1258-1268, 1969.
  - 7) Choi, J. K.: The experimental study on the effect of cyclophosphamide on the healing process of extraction socket in rats, *J.K.D.A.* 20:347-358, 1982.
  - 8) Cho, B.W.: Experimental studies in the effect of cyclophosphamide on the rat maxillary glands in rats, *J.K.D.A.* 19:45-52, 1981.
  - 9) Diewert, V.M.: Differential changes in cartilage cell proliferation and cell density in the rat craniofacial complex during secondary palate development, *Anat. Rec.*, 198:219-228. 1980.
  - 10) Friedman, O.M.: Recent biologic and chemical studies of cyclophosphamide (MSC-26271), *Cancer Chemother. Rep.*, 51:327-333, 1967.
  - 11) Foley, G.E., Friedman, O.M. and Drolet, B.P.: Studies on the mechanism of action of cytoxan evidence of activation *in Vivo* and *in Vitro*, *Cancer Res.*, 21: 57-63, 1961.
  - 12) Folke, L.E. and Stallard, R.E.: Condylar adaptation to a change in intermaxillary relationship, *J. Perio. Res.*, 1:79-89, 1966.
  - 13) Hansen, T.M.: Cyclophosphamide and collagen, *Danish Medical Bulletin*, 26:45-57, 1979.
  - 14) Horikoshi, T., Kawasaki, T., and Hara, K.: Endocrine influence on growth of mandibular condyle, *Bull. Tokyo Med. Den. Univ.*, 21:75-77. 1974.
  - 15) Hart, L.G. and Adams, R.H.: Effect of microsomal enzyme modifiers on toxicity and therapeutic activity of cyclophosphamide in mice, *J.Pharm. Sci.*, 62:391-401. 1969
  - 16) Hwang, Y.M.: Experimental studies on the effect of cyclophosphamide on the odontogenesis in rats, *J.K.D.A.* 19:53-57, 1981.
  - 17) Im, C.J.: Effects of 5-Fluorouracil on the postnatal development of the condyle in mice, *J.K.D.A.*, 14:285-295, 1976.
  - 18) Kim, M.K.: Craniofacial growth, *K.J.D.A.*, 20:311-319, 1982.
  - 19) Kogiso, I.: An Inquiry into temporo-mandibular joints of muridae and urotrichus talpoides in comparative anatomy, *aichi-Gakuin, J. Dent. Sci.*, 15:245-266, 1977.
  - 20) Koppang, H.S.: Autoradiographic investigations on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor, *Scand. J. Dent. Res.*, 81:397-405, 1973.
  - 21) Leblond, C., Belanger, D.E. and Grealich, F.: Formation of bones and teeth as visualized by radioautography, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 60:631-638, 1955.
  - 22) Luke, D.A., Tonge, C.H. and Reid, D.J.: Histology of mandibular bone from normal, protein deficient and calorie deficient pigs, *Anat. soc. G.B. & J.*, 859-865, 1980.
  - 23) Meikle, M.C.: *In vivo* transplantation of the mandibular joint of the rat; An autoradiographic investigation into cellular changes at the condyle, *Archs. Oral Biol.* 18:1011-1020, 1973.
  - 24) Moss, M.L.: The role of the functional maturity in mandibular growth, *Angle Orthod.*, 38:95-103, 1968.
  - 25) Nakamoto, T. and Bean, J.W.: Differences in growth pattern of bone and incisor of rats exposed to O<sub>2</sub> atmospheric and high pressure, *Archs. Oral Biol.*, 17:799-810. 1972.
  - 26) Pimenidis, M.Z. and Gianelly, A.A.: The effect of early postnatal condylectomy on the growth of the mandible, *Amer. J.*

- Orthod., 62:42-47, 1972.
- 27) Park, T.S. and Ryu, Y.K.: An experimental study on the effects of removal of the masticatory muscles on the growth of the mandible in the guinea pig. *Kor. J. Orthod.*, 11:25-29, 1981.
  - 28) Reichart, V.P., Althoff, J., und Rippel, W.: Cyclophosphamid-Nitrosomethylharnstoff-induzierte Veränderungen an Rattenincisivi, *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 35:93-95, 1980.
  - 29) Schneider, B.J., Meyer, J.: Experimental study on the interrelations of condyle growth and alveolar bone formation, *Angle Orthod.*, 35:187-199, 1965.
  - 30) Sarnat, B.G. and Muchnic, H.: Facial skeletal changes after mandibular condylectomy in growing and adult monkeys, *Amer. J. Orthod.*, 60:33-45, 1971.
  - 31) Sladek, N.E.: Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of inhibition of its metabolism, *Cancer Res.*, 32:1848-1854, 1972.
  - 32) Collis, C.H., Wilson, C.M. and Jones, J.M.: Cyclophosphamide-induced lung damage in mice.: Projection by a small preliminary dose, *Br. J. Cancer*, 41:901-907, 1980.
  - 33) Vahlsing, H.L., Feringa, E.R., Britten, A.G. and Kinning, W.K.: Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide, *Cancer Res.*, 35:2199-2202, 1975.
  - 34) Vahlsing, H.L., Kim, S.K. and Feringa, E.R.: Cyclophosphamide-induced abnormalities in the incisors of the rat, *J. Dent. Res.*, 56: 809-816. 1977.
  - 35) Wright, D.M. and Moffett, B.C., Jr.: The postnatal development of the human temporomandibular joint, *Am. J. Anat.*, 141:235-250. 1980.
  - 36) Weinmann, J.P. and Sicher, H.: Bone and bones, 2nd ed. Mosby Co. (St. Louis), 108, 1955.

# EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTS ON THE GROWTH OF MANDIBULAR CONDYLE FOLLOWING CYCLOPHOSPHAMIDE ADMINISTRATION IN RAT

Byung Tae, Rhee., D.D.S., M.S.D.

*Dept. of Orthodontics, Graduate School, Seoul National University  
(Directed by Prof. Cheong Hoon Suhr, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)*

..... > Abstract < .....

In this study, effects of cyclophosphamide on the growth of the mandibular condyle head were investigated with Sprague-Dawley rats of the 28 days of age.

Rats were divided into four groups. Three were used as experimental groups, and one as control. Each rat in experimental group was injected intraperitoneally with cyclophosphamide repeatedly three times, 20mg/kg for the first group, 40mg/kg for the second, and 60mg/kg for the third each time. Rats in control group were injected with physiological saline in the same method.

Rats in each group were sacrificed at 5, 10, and 15 days following the last injection. The specimens were stained with H-E, toluidine blue, PAS, and alcian blue.

The results were as follows;

1. In experimental group, with increasing the injection doses, the thickness of the condylar cartilage from the transitional zone to the hypertrophic zone became thinner than in control group.
2. Weaker metachromasia to toluidine blue and less positive reaction to PAS were seen.
3. In primary marrow cavity the fewer trabecular was formed, the direction of trabecular formation became obscurer, and the lower density of bone was resulted in.

.....

## 사진부도 설명

- 사진 1 : 20mg/kg投與 5日經過例의 對照群, H-E 染色.
- 사진 2 : 20mg/kg投與 10日經過例의 實驗群, H-E 染色.
- 사진 3 : 40mg/kg投與 5日經過例의 對照群, toluidine blue 染色.
- 사진 4 : 40mg/kg投與 10日經過例의 實驗群, toluidine blue 染色.
- 사진 5 : 60 mg /kg投與 5日經過例의 對照群, alcian blue 染色.
- 사진 6 : 60mg/kg投與 15日經過例의 實驗群, alcian blue 染色.
- 사진 7 : 60mg /kg投與 5日經過例의 對照群, PAS反應.
- 사진 8 : 60mg/kg投與 15日經過例의 實驗群, PAS反應.

李炳泰 論文 寫真附圖

