

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19592239  
 研究課題名（和文） 両生類試験法による歯科材料の内分泌攪乱作用評価に関する研究

研究課題名（英文） Study on endocrine disruptors of dental materials using an amphibian system

研究代表者  
 野村 雄二（NOMURA YUJI）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：80218370

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、甲状腺ホルモンおよびエストロゲン作用攪乱化学物質の *in vitro* および *in vivo* バイオアッセイを両生類（アフリカツメガエル）を使って確立し、歯科材料として用いられる可塑剤および重合開始剤、紫外線吸収剤、歯科用消毒剤について実験を行った。その結果、両生類試験法は内分泌攪乱作用評価にとってきわめて有効な試験法であることが判明した。本試験法によって、歯科用レジンに含まれる重合開始剤および紫外線吸収剤、さらに、仮封材およびティッシュコンディショナーに含まれる可塑剤の中には、エストロゲン活性および甲状腺ホルモン様作用を示す化学物質の存在が明らかにされた。

## 研究成果の概要（英文）：

Risk assessment of EDCs have gradually been clarified by the screening test that used a yeast and bacteria such as competitive estrogen receptor-binding assay and reporter assay of genes containing estrogen-responsive promoters about these chemical substance. However, bioassay systems are also needed to elucidate direct effects of the compounds on animals and humans because environmental compounds may be metabolically transformed into estrogenic or non-estrogenic substances in the body or cells. Therefore, the screening test of estrogen and thyroid hormone activities is needed and we developed the new system using an amphibian system. By this system we evaluated the estrogen and thyroid hormone activities of dental materials. As the result, some of dental materials indicated the estrogen and thyroid hormone activities.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：生体材料、環境ホルモン、両生類、歯学、安全性評価

## 1. 研究開始当初の背景

本研究が開始された時期、歯科材料に内分泌攪乱作用のある化学物質が含まれていることが報じられ、社会的な問題となった。歯科材料は、妊婦や子供を含め、広く一般に使用されるため、その安全性について、社会的関心を集めている。化学物質の内分泌攪乱作用は、きわめて少量で発現し、また、次世代への影響が懸念されることから、歯科材料より溶出し、歯髄や口腔粘膜、消化管より吸収された歯科材料が、体内での代謝を経て内分泌攪乱作用を発揮する可能性があるか否かは、きわめて重要な事項と考えられる。これまで我々は、歯科材料のエストロゲン作用の評価として、酵母のツーハイブリッドシステム、マウス骨芽細胞様細胞やカエル培養肝細胞などの *in vitro* 試験系を用いた結果を報告してきた (Y. Nomura et al., Estrogenic Activity of Phthalate Esters by *in vitro* VTG assay using primary-cultured *Xenopus* hepatocytes, Dental Materials Journal, 25, 533-537, 2006, Y. Nomura et al., Effects of Dental Resin Metabolites on Estrogenic Activity *in vitro*, The Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14, 307-310, 2003)。しかしながら、エストロゲンとならんで、ヒトの発育、発達に重要な役割を果たす甲状腺ホルモン作用については、歯科材料と生物学的影響を関連付ける報告はなく、今後の研究課題となっている。

また、日焼け止め剤などに含まれる、紫外線吸収剤 MBC (4-methylbenzylidene-camphor) が、エストロゲン作用を持つとともに、体内の甲状腺ホルモンレベルに影響を及ぼすことが報告され (Schmutzler et al., 2004)、甲状腺ホルモン攪乱作用が疑われる物質として関心が寄せられているが、歯科用コンポジットレジンの中には、これとよく似た構造を持つ紫外線吸収剤 HMBP (2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone) が添加されている。この HMBP については、これまでエストロゲン作用を持つことが報告されている (Wada et al., 2004)、甲状腺ホルモン作用については調べられていない。

甲状腺ホルモン作用については、哺乳類をはじめとして、適したアッセイ系の開発

が困難であるとされてきたが、OECD (経済協力開発機構) では、脊椎動物を代表するモデルとして両生類を用いた、甲状腺ホルモンに対する化学物質の作用を評価するための「Amphibian Metamorphosis Assay (変態アッセイ)」の開発が進められている。変態アッセイでは、甲状腺ホルモンによって制御されている、無尾両生類に特有の“変態”に着目し、尾の退縮や肢芽の伸長等をエンドポイントとし、化学物質の暴露によって生じる個体レベルの変化に基づいて、甲状腺ホルモン攪乱作用の評価を目指している。変態アッセイは、国際的なリングテストによって、甲状腺ホルモン作用を評価するための *in vivo* 試験法としての、妥当性・有効性が確認されつつある。本研究において、この試験法を実施することにより、歯科材料からの溶出物質が、*in vivo* で甲状腺攪乱作用を持つか否かを明らかにするとともに、脊椎動物への甲状腺ホルモン作用評価試験法として、大きく貢献できる位置づけとなると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯科材料から溶出する内分泌攪乱化学物質については、酵母や細菌を使ったエストロゲン受容体(ER)に対する活性を評価する *in vitro* 試験が実施されており、個々の化学物質の安全性が検討されている。一方、エストロゲン活性としてとらえられてきた内分泌攪乱物質の人体への影響は、最近の研究により、脳の発達に影響を与える甲状腺ホルモンの異常がより重大視されるようになってきた。甲状腺ホルモン作用の評価試験法についても、甲状腺ホルモン受容体(TR)や甲状腺ホルモン輸送タンパク(TTR)やTRとヘテロダイマーを形成するレチノイド X 受容体(RXR)に対する活性を評価する *in vitro* の試験系が開発されている。しかしながら、口腔内のように、より高度な安全性が求められる場合には、*in vivo* 試験での検討が不可欠となる。

そこで、本研究は、甲状腺ホルモンおよびエストロゲン作用攪乱化学物質の *in vivo* バイオアッセイを両生類(アフリカツメガエル)を使って確立し、口腔内で溶出する内分泌攪乱物質の安全性の評価に応用するものである。

### 3. 研究の方法

#### ① 歯科材料から溶出する化学物質の定性、定量

コンポジットレジン、仮封剤、ボンディング剤等の各歯科材料のバルク体を作製し、口腔内を想定した70%エタノール液に浸漬する。歯科材料から溶出した化学物質の定性、定量を本学大学院医歯薬学総合研究科中央研究室のガスクロマトグラフ/マススペクトル(QP1100, SHIMADZU)およびLCMS(Profile, SHIMADZU)で行う。

#### ② アフリカツメガエル幼生を用いた変態アッセイによる、歯科材料の甲状腺ホルモン作用検出

本研究では、まず、①で検出された化学物質の溶出濃度を含む4濃度で、アフリカツメガエル変態アッセイに準じた試験を実施する。暴露試験は、薬液用定量ポンプおよび水用定量ポンプを用いて、流水式にて行う。各濃度において形態学的データ(全長、頭同長、発生段階)および組織学的データ(甲状腺組織)を取得し、甲状腺ホルモンに対する影響を評価する

#### ③ アフリカツメガエル幼生の性分化に対する、エストロゲン作用の検出(*in vivo*)

アフリカツメガエルは、エストロゲン物質により雄から雌あるいは中間体へ性転換を起こすことが知られている(Oka et al., 2006)。②で実施した試験において、変態完了まで暴露した個体の性比を判定することにより、性分化への影響すなわち、用いた溶出歯科材料のエストロゲン作用の評価を行う。変態完了時には、各個体の肝臓もサンプリングし、エストロゲン作用により肝臓で誘導されたビテロジェニン量を測定する。

#### ④アフリカツメガエル肝細胞培養試験によるエストロゲン作用の検出(*in vitro*)

①で検出された化学物質の溶出濃度でカエルの肝細胞による代謝後、ビテロジェニンの検出を行う。灌流用送液ポンプを用いた灌流法によって、アフリカツメガエルより調製した肝細胞を96穴プレートに播き、低温インキュベータで培養する。2日後にプレートに接着した初

代培養肝細胞を培養倒立顕微鏡を用いて観察・評価し、溶出化学物質の暴露を行い、8日後にELISA法により、ビテロジェニンの測定を行う。

#### (1) 新しく開発された試験方法と従来の試験方法の比較

酵母や培養細胞による内分泌攪乱化学物質に対する従来のバイオアッセイ法と新しく開発された試験方法の検出感度等の比較検討を行う。

#### (2) 性ホルモンと甲状腺ホルモンを示す化学物質の比較

以上のバイオアッセイにより得られた性ホルモンと甲状腺ホルモンを示す化学物質の比較を行い、共通に示す化学物質およびどちらか一方だけ示す化学物質の統計処理を行う。

#### (3) 構造活性による歯科材料の安全性の評価

(2)において見出されたエストロゲン活性物質および甲状腺ホルモン様化学物質のデータベース化により、化学物質の構造活性から歯科材料の安全性の評価を行う。現在、構造活性が明らかにされているのは、アルキルフェノール類だけであり、その他のエストロゲン活性物質や甲状腺ホルモン様化学物質に関してはなされていない。

(4) *in vivo*および臨床データとの照合による歯科材料の安全性の評価  
以上の試験系により見出された内分泌攪乱化学物質に対して*in vivo*による動物実験および臨床データとの照合により、各化学物質の最終的な安全性の確認を行う

### 4. 研究成果

従来、エストロゲン活性を主体に検討されてきた環境ホルモン問題に対し、本研究により、脊椎動物の発育、発達、繁殖行動において重要な役割を果たす甲状腺ホルモン様作用を示す化学物質の影響を検出、評価することが可能となった。脊椎動物においては、現在まで、甲状腺ホルモン様作用をスクリーニングする試験法が開発されておらず、かつ困難であるとされていたため、甲状腺ホルモン作用に対する化学物質の影響を評価するスクリーニング法として、両生類を用いたスクリーニング試験法は、世界的に最も注目されている。

本試験法によって、歯科材料として用いら

れる重合開始剤および紫外線吸収剤、さらに、仮封材およびティッシュコンディショナーに含まれる可塑剤の中には、エストロゲン活性および甲状腺ホルモン様作用を示す化学物質の存在が明らかにされた。

本研究で対象とした歯科材料については、甲状腺ホルモンに対する影響を明確に評価した事例はなく、本研究の推進は、歯科材料の安全性に新たな知見を与えるのみならず、両生類を用いた甲状腺ホルモン作用のスクリーニング試験法の妥当性を評価し、その有用性を提示することに大きく寄与することから、国際的に重要な貢献となると考えられる。これらの成果は、歯科医療においても大きく貢献するものと考えられる。

#### 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10件)

① K. Nomiya, Y. Nomura, T. Takahashi, Y. Uchiyama, K. Arizono, R. Shinohara, Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) induce vitellogenin through estrogenic activity in primary-cultured hepatocytes of the *Xenopus laevis*, *Chemosphere*, 78, 800-806, 2010. 査読有

② Y. Nomura, U. K. Bhawal, R. Nishikiori, M. Sawajiri, T. Maeda, M. Okazaki, Effects of high-dose major components in oral disinfectants on the cell cycle and apoptosis in primary human gingival fibroblasts *in vitro*, *Dental Materials Journal*, 29, 175-183, 2010. 査読有

③ R. Nishikiori, Y. Nomura, M. Sawajiri, K. Masuki, I. Hirata, M. Okazaki, Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts, *J Dent*, 36, 993-998, 2008. 査読有

④ U. K. Bhawal, M. Sugiyama, Y. Nomura, H. Kuniyasu, K. Tsukinoki, Loss of 14-3-3 Sigma Protein Expression and Presence of Human Papillomavirus Type 16 E6 in Oral Squamous Cell Carcinoma, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 134, 1055-1059, 2008. 査読有

⑤ I. Hirata, Y. Nomura, M. Ito, A. Shimazu and M. Okazaki, Acceleration of bone

formation with BMP2 in frame-reinforced carbonate apatite-collagen sponge scaffolds. *J Artif Organs*, 10, 212-217, 2007. 査読有

⑥ K. Masuki, Y. Nomura, U. K. Bhawal, M. Sawajiri, I. Hirata, Y. Nahara, and M. Okazaki, Apoptotic and necrotic influence of dental resin polymerisation initiators in human gingival fibroblast cultures, *Dental Materials Journal*, 26, 861-869, 2007. 査読有

⑦ S. Shibata, I. Hirata, Y. Nomura, K. Shirai, M. Fujitani, H. Shintani, M. Okazaki, Immobilization of Simulated Reducing Agent at the Surface of SiO<sub>2</sub> fillers in Dental Composite Resins, *Dental Materials Journal*, 26, 568-574, 2007. 査読有

⑧ M. Sawajiri, S. Takinami, T. Uchida, Y. Nomura, J. Mizoe, S. Banik, K. Tanimoto, Expression of MMP-13 in osteoblast cells and rat tibia after exposure to gamma rays or accelerated carbon ions, *Physica Medica*, 23, 73-79, 2007. 査読有

⑨ U. K. Bhawal, M. Sugiyama, Y. Nomura, M. Sawajiri, K. Tsukinori, M. Ikeda, H. Kuniyama, High-risk human papillomavirus type 16 E7 oncogene associates with Cdc25A over-expression in oral squamous cell carcinoma, *Virchows Arch*, 450, 65-71, 2007. 査読有

⑩ A. Otsubo, U. K. Bhawal, Y. Nomura, Y. Mitani, K. Ozawa, H. Kuniyasu, and M. Sugiyama, UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) induces apoptosis and G1 arrest of both primary and metastatic oral cancer cell lines *in vitro*, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 103, 391-397, 2007. 査読有

[学会発表] (計2件)

① 林田知美, 野村雄二, 錦織良, 平田伊佐雄, 岡崎正之, 紫外線吸収剤の内分攪乱作用に関する研究, 第53回日本歯科理工学会, 2009年4月12日, 東京

②錦織良，野村雄二，増木恒平，園田喜子，平田伊佐雄，岡崎正之，感染薬の細胞障害性とアポトーシスに関する研究，第52回日本歯科理工学会，2008年9月21日，大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 雄二 (NOMURA YUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80218370

(2) 研究分担者

澤尻 昌彦 (SAWAJIRI MASAHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20325195

岡崎 正之 (OKAZAKI MASAYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30107073

高橋 徹 (TAKAHASHI TOHRU)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70369122

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：