

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592272

研究課題名（和文） ヒトの代謝活性因子を導入した歯科生体材料の発生毒性試験

研究課題名（英文） Embryotoxicity test of dental biomaterials including human metabolic factor

研究代表者

今井 弘一（IMAI KOICHI）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90103100

研究成果の概要： ヒトの発生毒性への歯科生体材料の影響を評価する場合に、ヒト代謝活性因子の影響は無視できない。ヒト由来 ES 細胞の使用は発生毒性試験には倫理上難しいため、各種金属イオンとモノマー等を、ヒト由来肝細胞で培養した後、マウス由来の ES 細胞の分化を指標として評価することを考案した。Ag とサリドマイドで分化率が有意に低下し、ヒトの発生毒性スクリーニング試験結果の予知性が代謝活性化でさらに高められた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科理工学

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，細胞分化，発生毒性，EST，ES細胞，ヒト肝細胞，歯科用金属，歯科用モノマー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの新生児が問題なく生まれてくることは母親や父親のみならず人類全体にとって最も大きな関心事である。人類の発生に影響を及ぼす化学物質は我々の生活環境からは最低限排除する必要がある。しかし、その化学物質を十分に特定できる方法が開発することができないなら人類の生存に将来にわたって大きなリスクを背負うことになる。医療用として医薬品や生体材料あるいは器材のほかに生活環境に広く存在し日常触れているような化学物質も日々新しく合成されている。その数は把握困難なほど多種多量

であり、それらの種類や組合せを1つ1つ動物実験でヒトの発生に対する影響を把握することが、時間的、経済的にも不可能に近い状況である。さらに、例えばマウスで影響が認められなかったとしてもウサギでは問題が見つかるような事例も多く、種差や環境による影響が多岐にわたって存在する可能性も大きいと考えられ、動物実験によるリスク判定結果がそのまますべてヒトへ外挿できない可能性も多い。動物の種差によるバラツキはヒトと動物の代謝活性が異なることが不幸なサリドマイド事件を引き起こす要因の1つとなった可能性もある。そのため、有効な発

生毒性スクリーニング法の開発は人類の長年の悲願であった。

In vitro 発生毒性試験法としては、必ずしも完全な非動物実験の範疇ではないが、全胚培養法は New らによって 1970 年に現在数多く用いられている培養機器が開発され、最も古くから用いられている方法である。ラットやマウスを用いることが多いこの方法は発生毒性試験法として数多く用いられている。しかし、中胚葉の形成が開始される器官形成初期から、四肢の指が形成される器官形成後期に実験時期がある程度限定されることや、培養液がラットやマウスの血清が主体であり、組成が判明した合成培養液が使用できないなどの欠点もある。また、器官培養法も存在するが器官形成期以後の発生段階の実験となる。全胚培養以外の *in vitro* 発生毒性試験スクリーニング法の試みは、1979 年にコンカナバリン A のレセプターとの結合阻害効果を指標にした試験法を Braun らによって考案され、1981 年に Yoneda らはヒト胎児由来の human embryonic palatal mesenchyme cell (HEPM) の細胞増殖の抑制から発生毒性レベルを評価した。さらに、1982 年に Trosko らはチャイニーズハムスター由来の V79 株細胞の野生株と変異株を用いた試験法を報告し、1983 年に Flint らは、胎生 13 日のラット胎仔脳および枝芽をトリプシンで解離して培養し、それぞれの分化の程度から発生毒性を推測する micro mass culture 法を報告している。

一方、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; 以後 ES 細胞) の活用は発生毒性試験に新たなページを開く大きな進歩とも言える技術開発となった。すなわち、生体外で理論上すべての組織に分化する分化多能性を保つ ES 細胞が、化学物質か何かの外的因子で分化障害が存在したなら、発生毒性の存在が疑われる可能性が考えられるためである。1981 年に Evans と Kaufmann によってマウス由来の ES 細胞の未分化状態での培養が最初に報告されて以来、ES 細胞の利用はノックアウトマウスの作製など発生生物学分野で広く活用されはじめている。1997 年に、Spielmann らによって開発された *in vitro* 発生毒性試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST) は、従来の動物実験による方法と比較すると、スクリーニングテスト法として有用性が大きく、短時間で原因物質の特定や解析が容易である。すでに、ヨーロッパ各国の研究機関でバリデーションテストが終了し、全胚培養と同様レ

ベル以上のヒトの発生毒性データとの高い相関性や再現性についても確認された。

しかし、EST 法にもいくつかの改良すべき以下の問題点が存在する。

- (1) 代謝活性の影響が反映されない。(とくにヒトの代謝活性について)
- (2) エンドポイントが ES 細胞より分化した心筋の拍動のみによる。
- (3) 培養液に溶解しない、あるいは難溶性の化学物質については実験が難しい。
- (4) 単一の化学物質を対象とし、混合された条件でのプロトコルはない。
- (5) 気体あるいはガス状の化学物質についてのプロトコルはない。

その他にも、化学物質の比重や極性の問題も存在する。

(3) から最後までは EST 法単独の問題点ではなく、一般的な培養液を使用する 2 次元培養法による *in vitro* 実験における共通の欠点である。これらについては Scaffold を使用した 3 次元培養法や、それらの改良法によって解決されると考えられる。また、(2) についても、心筋の拍動の観察のみならず、各種のバイオマーカーや遺伝子発現などを指標とする方法も世界中で考案されつつある。これらの方法を使用することによって、心筋への分化障害のみならず、他の臓器や器官あるいはさらに高次元の分化障害に対応可能となる可能性が大きい。すなわち評価エンドポイントとしてさらに信頼性が高くなるとともに、時間的にも短い評価で十分対応可能になると考えられる。これらは再生医療や発生の研究にも役立つ情報源となる可能性が大きい。

しかし、(1) の代謝活性の影響が反映されない点の改良については報告例がなく、EST 法プロトコルでは陽性対象として代謝活性の影響が少ない代謝拮抗剤である 5-Fluorouracil (5-FU) である。一般的に代謝活性化はバクテリアを用いた染色体異常試験であるエームス試験など用いられる S-9 mix を用いる。ラット肝臓を粉砕した上澄み液である S-9 mix は、チトクローム P-450 などの肝臓の酸化酵素系に補酵素やエネルギー源などを加えて培地に添加するが、酸化酵素系に限られており抱合が考慮されていないことや、ヒトとラットの種差による影響も推測の域を出ない。そのため、最も適当と考えられるのはヒト肝臓細胞を利用することであると結論で実験に臨んだ。

2. 研究の目的

ヒトの代謝活性因子導入の目的からヒト

肝細胞と同種であるヒト由来の ES 細胞を化学物質の発生毒性に利用することは倫理上そぐわないと考えられる。また、ヒト ES 細胞の分化制御は現在まだ開発段階といえる。

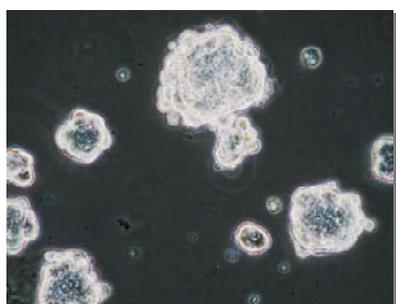


図1 マウス由来 ES-D3 細胞

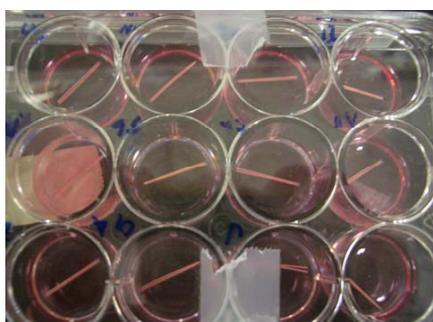


図2a TEST LIVER™-human-



図2b 中空糸内の hepatocyte

そこで、マウス由来の ES 細胞 (図1) を用いてヒトの代謝活性の影響を含められる方法を考案した。すなわち、ヒトの肝機能を維持しながら長期間培養ができる市販のヒト由来の TEST LIVER™-human- (TOYOBO, 図2 a, b) を用いて培養した培養液を使用し、マウス ES 細胞用新鮮培養液と等量混合し、FBS ならびに各種添加剤を加えた培養液でマウス由来の ES-D3 細胞を分化させることを考案した。また、同時にラット由来の TEST LIVER™ (TOYOBO) も比較のため使用した。

歯科用金銀パラジウム合金、金合金、銀合金および歯科用アマルガムの組成として使用される金属元素を中心に、Ag, Au, Cu, Hg, In, Pd, Sb, Ti, V, Zn について調べた。また、歯科用モノマーの 2HEMA, EDMA, UDMA, Bis-GMA について調べた。さらに、実際の歯科用材料であるコンポジットレジジンとグラ

スアイオノマーセメントについてもそれぞれの影響を検討するとともに、サリドマイドについても影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料および方法

① TEST LIVER™-human- (TOYOBO, Lot. RQ0-7371, Lot. 762700, Lot. 910100)

ヒト肝由来の hepatocyte をセルローストリアセテート製中空糸 (内径 285 μm、外径 387 μm) 内腔にヒト肝細胞を詰め、遠心力を加えた後に培養することにより、CYP3A4 活性誘導、アンモニア代謝等の肝機能を維持しながら長期間の培養が可能なシステムである。

② TEST LIVER™ (TOYOBO, Lot. 762800)

上記、ヒト同様にラット肝由来の hepatocyte を用い、CYP3A4 活性誘導、アンモニア代謝等の肝機能を維持しながら長期間の培養ができる。

(2) 試料作製と代謝活性の付与

① 歯科用金属イオン

10 種 (Ag, Au, Cu, Hg, In, Pd, Sb, Ti, V, Zn) の原子吸光用標準試薬 (1,000ppm) を DMEM (Gibco) でまず 100ppm に溶解し、0.2 μm のメンブランフィルターで濾過滅菌した後、TEST LIVER™ 用無血清培養液 (TOYOBO) でさらに 50 倍に希釈した。

② 歯科用モノマー

2HEMA, EDMA, UDMA, Bis-GMA をそれぞれ等量の DMSO を溶媒として TEST LIVER™ 用培養液 10mL に 100 μL 添加し 0.2 μm のメンブランフィルターで濾過滅菌した。なお、Bis-GMA および UDMA の溶解については粘稠度を下げするため約 60°C に湯煎によりあらかじめ加温して作業を行った。なお、MMA についても当初検討したが揮発性が高いためプラスチックディッシュが溶解し実験できなかった。

③ コンポジットレジジンとガラスアイオノマーセメント

市販光重合型コンポジットレジジン (CLEARFIL AP-X, KURARAY MEDICAL INC., Lot. 0986AA, 記号 CR) を直径 8mm、厚さ 1mm のプラスチック管に充填し、20 秒間ハロゲンタイプの光照射器で照射して重合し試料とした。また、市販ガラスアイオノマーセメント (HY-BOND Glasionomer-F, SHOFU INC., Lot. 050753, 記号 GI) を同様にメーカー指定条件で練和し同上のプラスチック管に充填し試料とした。いずれも充填後 24 時間経過後に実験を行った。

12well マルチディッシュに歯科用金属イオンならびにモノマーの試験液をそれぞれ 0.8mL 注入した。また、コンポジットレジジン

とガラスアイオノマーセメントは1wellに試料1個を投入した。セルローストリアセート製中空糸をディッシュに入れ炭酸ガス恒温器内で2日間静置培養した。一方、陽性対照としてサリドマイドおよび5FUについては、DMSOを溶媒として10mLのTEST LIVER™用無血清培養液に1mg溶解し倍数希釈した。なお、陰性対照については中空糸を入れない条件をあてた。

(3) Differentiation assay

代謝活性後の培養液にそれぞれ加熱処理したFBS (Hyclone)を10%添加し、さらにNAA, β -mercaptoethanol, L-glutamine, Penicillin/Streptomycinをそれぞれ添加した。なお、予備実験から試料無添加群の細胞分化率を60%以上とするために、通常のES-D3用培養液をさらに50%添加して各試験液とした。

各試験液で 3.75×10^4 cells/mLのES-D3細胞を調整し、炭酸ガス恒温器内で2日間懸滴培養した。さらに、細胞がdish底面に伸展しないように直径6cmの無コーティングの細菌培養用dishで2日間にわたり各試験液を作用させ、球形細胞塊である(Embryoid Bodies, EBs)を作成した。Type I-AおよびIIIコラーゲン(新田ゼラチン)、濃縮培養液およびReconstruction buffer(新田ゼラチン)を氷冷下で混合し、直径10mmのCell culture insert (Falcon)上に混合液を分注した。各Cell culture insertを12wellマルチディッシュに入れ、Cell culture insert外側に各試験液を2mL分注した。炭酸ガス恒温器内で2時間静置してコラーゲンを十分ゲル化させ、EBsを1ウエルあたり各2個をゲル上に置き、恒温器内で1週間静置培養した(図3)。

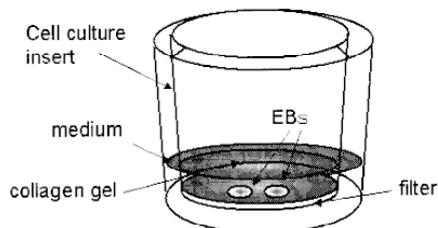


図3 EBsの3次元培養

4. 研究成果

あらかじめ代謝活性処理を行った場合と行わなかった場合では、陰性対照群の細胞分化率はともにヒト肝細胞の場合、ラット肝細胞の場合ともに66.7%の心筋鼓動率を示した。なお、代謝活性しなかった場合の陰性対照群の心筋鼓動率は72.0%を示した。

ヒト肝細胞の場合と代謝活性しない場合

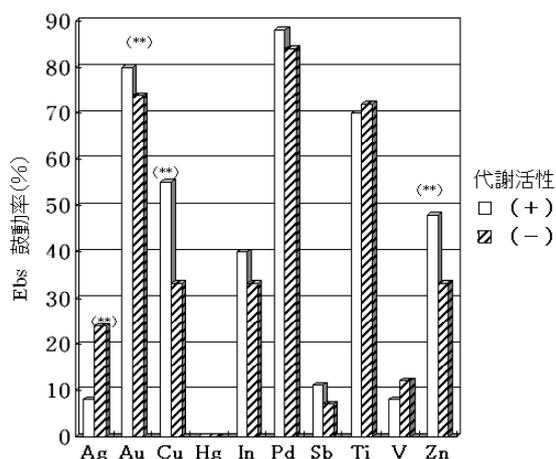


図4 ヒト肝細胞の場合と代謝活性しない場合の各種金属イオンにおけるEBsからの心筋分化率の比較

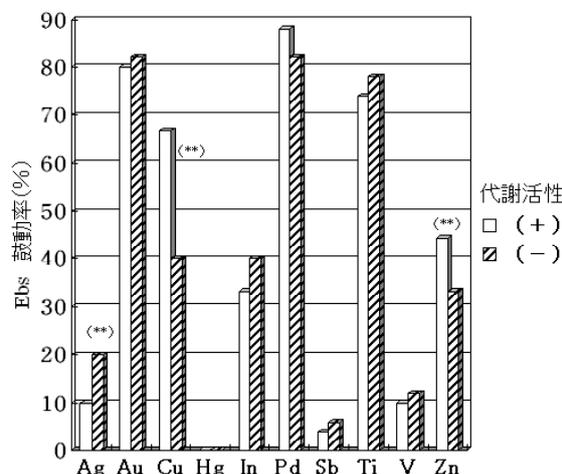


図5 ラット肝細胞の場合と代謝活性しない場合の各種金属イオンにおけるEBsからの心筋分化率の比較(代謝活性しない場合は図4と同様の実験を繰り返した。)

の各種金属イオンにおけるEBsから心筋分化率を比較した場合は図4に示すようにAg, SbならびにサリドマイドでEBsの分化率が有意に低下した、逆にCuならびにZnではEBsの分化率はやや高くなった。またラット肝細胞の場合と代謝活性しない場合の比較は図5に示すようにヒト肝細胞の場合とそれぞれ有意差が認められず分化率に差がなかった。一方、歯科用モノマーならびにコンポジットレジンとガラスアイオノマーセメントでは、ヒト肝細胞ならびにラット肝細胞の場合と代謝活性しない場合の比較はいずれも有意差は認められなかった(図6)。

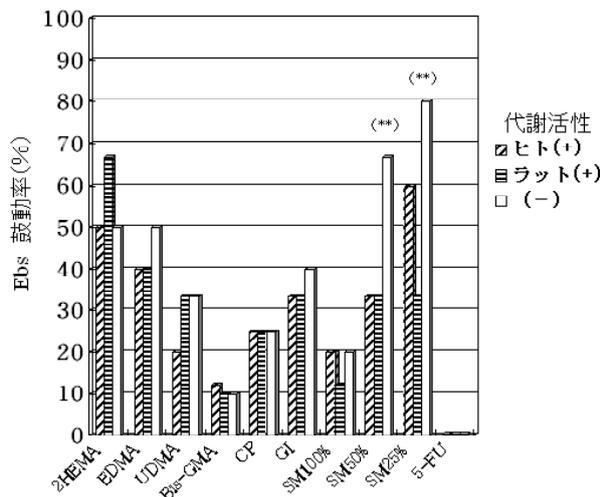


図6 代謝活性の有無による歯科用モノマー、コンポジットレジン(CP)、ガラスアイオノマー(GI)、3段階に倍数希釈したサリドマイド(SM)による心筋分化率の比較

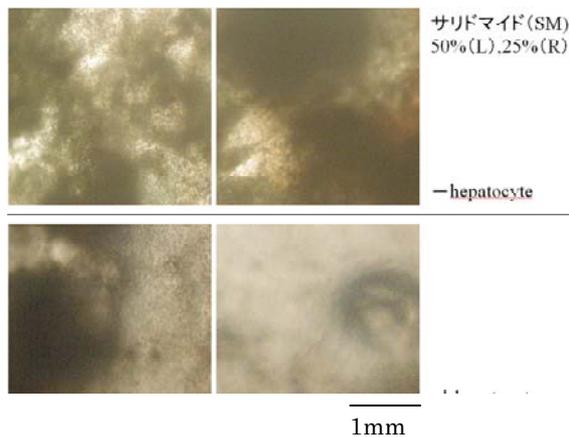


図7 分化したEBsの倒立位相差顕微鏡像

なお、金属イオンの中で細胞分化を大きく障害したのは、Hg, Sb, Vであった。Au, Pd, Tiは対照群と有意差が認められなかった。一方、モノマーはBis-GMAが細胞分化を大きく障害した。また、UDMAは中等度の細胞分化障害であった。他のモノマーは大きな影響は認められなかった。市販コンポジットレジンとガラスアイオノマーセメントでは僅かな細胞分化障害にとどまった。サリドマイドでは図6に示すように、代謝活性化しなかった場合と比べてヒトならびにラット由来の代謝活性化によってさらにEBsの分化率が低下した。また、培養後のEBsの分化した後における倒立位相差顕微鏡像(図7)からも、代謝活性化した場合にテラトーマの大きさが小さい所見が得られた。

また、陽性対照の5-FUではいずれもEBs

を形成せず細胞分化実験ができなかった。

サリドマイドは臨床的に強い発生毒性が指摘されており、代謝活性化しなかった場合と比べてヒトならびにラット由来の代謝活性化によってさらにEBsの分化率が低下したことは、代謝活性化で一層に臨床データに近づいた結果が得られた。肝細胞を用いて代謝活性化を行うことによって、発生毒性スクリーニング試験法結果のヒトへの予知性がさらに高められる可能性が大きく、発生毒性試験開発へのインパクトは大きいものと考えられる。

ヒトの催奇形性の原因は複雑であり、その大部分は多因子遺伝によるものとされており、化学物質が原因であると考えられるものは先天異常全体の2%程度にすぎないとされている。しかし、生殖細胞の障害や不妊症の発生が増加の傾向を示していることは、薬物や環境化学物質の影響も従来から指摘されており、母体へ入った化学物質が胎児に影響を及ぼす機構に数多くの過程が介在すると考えられ、さらにヒトの代謝活性を導入した今回の実験がさらに今後の発生毒性スクリーニング精度の向上に寄与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6件)

- ① Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima H, An attempt to cell recovery factor in the cell differentiation culture with the embryonic stem cell test (EST), *J Oral Tissue Engin.* 6, 152-158, 2009, 査読有
- ② Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima H, *In vitro* embryotoxicity testing of mercury vapour by differentiation of ES-D3 cells, *AATEX*, 13, 118-122, 2009, 査読有
- ③ Imai K, Nakamura M, Effects of experimental alloys containing indium for dental use *in vitro* embryotoxicity test, *AATEX*, 14, 655-658, 2008, 査読無
- ④ 今井弘一, 再生歯科医学と生存学との接点, *再生歯誌*, 6, 1-8, 2008, 査読無
- ⑤ Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Nakamura M, Effects on ES-D3 cell differentiation of three-dimensional cell culture system using collagen gel derived from chum salmon sources, *J Oral Tissue Engin.*, 5, 81-86, 2007, 査読有

⑥ Imai K、Hayakawa T、Nakamura M、Evaluation of *in vitro* embryotoxicity of dental monomers by differentiation of embryonic stem cells into contracting cardiac myocytes、*AATEX*、12、171-178、2007、査読有

[学会発表] (計9件)

① 今井弘一、田上昭人、草川森士、武田昭二、生体内の代謝活性を考慮した金属イオンの発生毒性、第53回日本歯科理工学会学術講演会、2009年4月11日、東京都江戸川区・タワーホール船堀

② Imai K、Kusakawa S、Tanoue A、Embryotoxicity test of dental materials using ES-D3 cells with 3D culture system、Sino-Japanese Conference on Stomatology 2008、2008年9月28日、中国・西安

③ 今井弘一、田上昭人、草川森士、細胞分化障害の回復度から評価する *in vitro* 発生毒性試験法の開発について、第52回日本歯科理工学会学術講演会、2008年9月20日、大阪府豊中市・千里ライフサイエンスセンター

④ 高島宏昌、桑形麻樹子、瀬沼美華、吉田由香、高岡 裕、根倉 司、今井弘一、小島幸一、歯科用金属曝露による胎児発生への影響、第52回日本歯科理工学会学術講演会、2008年9月20日、大阪府豊中市・千里ライフサイエンスセンター

⑤ 今井弘一、中村正明、ヒトの代謝活性の影響を考慮したマウス由来のES細胞を用いた発生毒性試験法の開発、日本組織培養学会第81回大会、2008年5月20日、茨城県つくば市・文部科学省研究交流センター

⑥ 今井弘一、中村正明、ヒトの代謝活性因子を導入した *in vitro* 発生毒性試験法の開発、第51回日本歯科理工学会学術講演会、2008年4月27日、鶴見大学

⑦ Imai K、Goto S、Ogura H、Kuwagata M、Senuma M、Furuya M、Takashima H、Nakamura M、Evaluation of the Embryotoxicity of Dental Alloys Containing Indium、International Dental Materials Congress 2007、2007年11月23日、タイ・バンコク

⑧ 今井弘一、中村正明、マウス由来ES細胞を用いた細胞分化誘導因子スクリーニング法の開発—懸滴液量ならびにEBs数について—、第5回日本再生歯科医学会学術大会、2007年9月22日、東京都千代田区・東京歯科大学

⑨ Imai K、Nakamura M、Effects on ES-D3 cell differentiation of three -dimensional

cell culture system using collagen gel derived from chum salmon sources、6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences、2007年8月23日、東京都・江東区、ホテルイースト21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 弘一 (IMAI KOICHI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90103100

(2) 研究分担者

中村 正明 (NAKAMURA MASAOKI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50067055

(分担期間：2007年度)

(3) 連携研究者

中村 正明 (NAKAMURA MASAOKI)
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：50067055(連携期間：2008年度)