

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592202

研究課題名（和文）iPS/ES細胞による歯科用モノマーの発生毒性スクリーニング試験

研究課題名（英文）*In vitro* embryotoxicity tests of dental monomers by iPS/ES cells

研究代表者

今井 弘一（IMAI KOICHI）

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90103100

研究成果の概要（和文）：歯科用モノマーの発生毒性スクリーニング試験法を検討するために *in vitro* 発生毒性試験法の Embryonic Stem Cell Test (EST) 法の改良を試みた。難溶性のモノマーでも溶媒を使用せずにモノマーに細胞を直接接触させることが可能な3次元培養法も実施した。ガラス繊維の3次元培養法への活用は、コラーゲンゲルと同じくスキャフォールドとして用いることができた。さらに12種の市販歯科用接着材の発生毒性を調べた結果、すべて“non embryotoxicity”の範囲であった。

研究成果の概要（英文）：To evaluate embryotoxicity screening tests for various dental monomers, we improved the protocol of the embryonic stem cell test (EST), which is an *in vitro* embryotoxicity test. We performed the three-dimensional culture technique, by which cells can come into direct contact with insoluble monomers without using solvents. Glass fibers could be used as scaffolds for three-dimensional cultivation, as well as collagens. Furthermore, as the results of investigating the embryotoxicity of 12 types of commercially available dental adhesive, all were within the level of “non-embryotoxicity”.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：発生毒性、EST、ES細胞、歯科用モノマー、3次元培養、コラーゲン、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、歯科用接着性モノマーの開発がさかんに行われ、新規合成されたモノマーとその市販品が数多く登場している。歯科用接着性モノマーはコンポジットレジン修復や補綴物の接着において歯質との間隙に細菌が容易に侵入することを防ぎ、修復材料の信頼性向上と相まって、歯科医療の質の向上に重要な役割を果たしている。歯科材料の基本的な生物学的性質については本邦では数多くの試験項目で評価された後に市販される。しかし、ヒトの催奇形性に関係する生殖・発生毒性試験は必ずしも義務

化はされていないが、胎児に及ぼす発生毒性への影響の評価は最優先事項の1つである。

(2) 新規開発されるモノマーは数多いが、経済的に大量のスクリーニングができる可能性がある *in vitro* 発生毒性試験法は1997年にドイツ連邦で開発されたマウス由来のES細胞等を使用した Embryonic Stem Cell Test (EST) 法がある。EST法は欧米を中心としたバリデーションにより発生毒性の高い予知性がすでに確認されている。しかし、水に難溶性のモノマーや市販材料のような複数材料の混合物ではESTプロトコルをそのまま適用しにくいことが知られている。

2. 研究の目的

(1) 難溶性のモノマー類はとくに培養液への溶解性などの問題があり、モノマーの発生毒性データを得る場合に使用する溶媒量に制限のあるEST法の基本プロトコルをそのまま用いることが難しい場合が多い。そのためコラーゲンゲルやガラス繊維などのスキャフォードを介して接触させた状態でのいわゆる3次元培養法を応用することで *in vitro* 発生毒性スクリーニング試験を行うことを目的とした。

(2) EST法で使用されているマウス由来のES細胞であるES-D3細胞だけではなく、マウス由来のiPS細胞を用いて実験し、*in vitro* 発生毒性試験法にiPS細胞が利用可能かどうかを調べた。すなわち、複数の胚性幹細胞によるデータによる評価系を構築できればさらに高い予知性が確保できる可能性がある。さらに、マウスiPS細胞を活用できれば、特定の疾患に罹患したマウスや遺伝子改変されたマウスによって、発生毒性レベルの変動も検討可能となるためEST法の応用の幅が広がるものと考えられる。また、他のES細胞の可能性も探った。

3. 研究の方法

(1) モノマー単体の発生毒性

①培養液: Non-Essential Amino Acids (NAA, Invitrogen, USA)、 β -mercaptoethanol (Invitrogen)、L-glutamine (Invitrogen)、Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (Gibco, USA)に、57°Cで1時間処理した Fetal calf serum (FCS, Hyclone, USA) を容積比 20%添加した培地を用いた。なお、分化誘導抑制のため 1,000U/mL の LIF(cytokine leukemia inhibiting factor, Invitrogen) を培地へ追加しているが、Assay medium は LIFのみ無添加の培地を用いた。

②細胞培養: マウス由来 iPS 細胞、マウス ES 細胞の EL M3 細胞ならびに ES-R1-EGFP B2/EGFP 細胞 (図1) は、それぞれプラスチック製培養フラスコ (IWAKI、旭硝子、東京) に滅

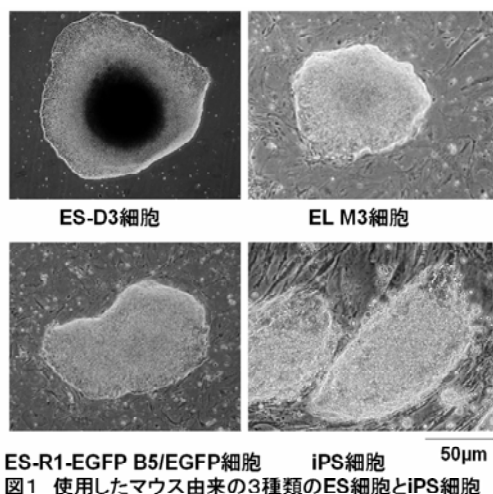


図1 使用したマウス由来の3種類のES細胞とiPS細胞

菌した 0.1%ゼラチン液 (Specialty Media, Millipore, USA) を2mL入れて37°Cの炭酸ガス恒温器中で1時間静置後、余分なゼラチン液を捨てPBS(-)で洗浄した。MEF細胞 (RCHEF0003 & RCHEF0001、リプロセル、神奈川) をフィーダー細胞として播種し、24時間後に倒立位相差顕微鏡で細胞形態や細胞数が正常であることを確認した。容積比10%添加DMEMのMEF用培地を取り出し、PBS(-)でフィーダー細胞を洗浄し、直ちに 3.75×10^4 cells/mLの細胞数に調整したマウス由来iPS細胞、EL M3細胞、ES-R1-EGFP B2/EGFP細胞をそれぞれ播種した。なお、ES-D3細胞はフィーダー細胞を用いないため、同数に調整した細胞を直接播種した。

4種の細胞を直径10cmのプラスチックディッシュ (IWAKI) の蓋内面を利用して、それぞれピペットで25µLを蓋内面に細胞懸濁液を50~60個ずつ滴下した。別途、プラスチックディッシュ内部に約20mLのPBS(-)を入れた。細胞懸濁液を滴下したディッシュ蓋を静かに反転してディッシュ底部に被せた後、細胞懸濁液が流れ落ちないように静かに37°Cの炭酸ガス恒温器に入れ、3日間懸滴培養した。

さらに、ピペットを用いて各細胞懸濁液をプラスチック製の50mL容量の遠沈管 (BD Falcon, USA) に集め、遠沈器で800rpmで5分間、細胞を軽く遠心沈殿させ、細胞層以外の培養液を新液と取り替えた後、遠沈管をバイブレータで軽く振動させて均質な細胞懸濁液とした。ディッシュ底面で細胞が接着・伸展しないように、無コーティングの細菌培養用ディッシュ (IWAKI) に移し替えた。なお、この時点で球形の細胞集団を形成していた。このディッシュをさらに2日間にわたり assay medium に作用させ、球形細胞塊であるEB (Embryoid Body) を製作した。

③3次元培養: オートクレーブ滅菌したガラス繊維 (日本板硝子、大阪) を Cell culture insert (12 well 用, フィルター孔径1µm, BD Falcon) 内に入れ、さらに Assay medium を加えた。他方、Type I-A コラーゲン (新田ゼラチン、大阪) と Type III コラーゲン (新田ゼラチン) を容積比 4:1 に混合した。DMEM 濃縮培養液 (10×, Sigma-Aldrich, USA) および Reconstruction buffer (新田ゼラチン) を氷冷下で混合し Cell culture insert 上に300µL分注した。各 Cell culture insert を12 well multi-dish にはめ込み、Cell culture insert 外側に Assay medium を2mLずつ分注した。37°C炭酸ガス恒温器内で2時間静置してコラーゲンをゲル化させた。ゲル上の培養環境を整えるために、ゲル上に50µLの Assay medium をピペットで分注した後、各EBをガラス繊維またはコラーゲンゲル上に置いた。なお、EBはゲル内に若干埋入された状態となる。

Bis-GMA、Bis-MEPP、UDMA は高粘度のため60°Cに加温した後、小型ガラスピペットで吸引した。なお、HEMA、EGDMA、TEGDMA、4-META、4-AETA、4-MET、4-AET は常温で

同ピペットで吸引し 0.5mL を Cell culture insert とディッシュとの間隙の Assay medium に加え、上記 37°C の炭酸ガス恒温器内で 24 時間静置培養した。その後、新鮮な Assay medium を入れたディッシュに Cell culture insert を移して上記恒温器内で最大 7 日間培養した。

(2) 各種市販歯科用接着材の発生毒性

12 種類の市販接着材 (図 2) を用いた。表 1 にメーカー添付文書記載の組成を示す。

表 1 市販接着材の組成 (製品添付文書記載)

番号コード	組成
1 KTS	Bis-GMA, MDP, HEMA, その他のメタクリル酸モノマー, シリカ系マイクロフィラー, エタノール, 光重合触媒, 化学重合促進剤, 精製水, フッ化ナトリウム, 他
2 TBF	リン酸モノマー, Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, アルコール, 精製水, カンファーキノン, 他
3 TLB	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, MAC-10, カンファーキノン, 他
4 TOA	リン酸モノマー, MAC-10, Bis-MPEPP, MMA, 他
5 TOB	HEMA, MMA, 精製水, カルシウムアルミノシリケートガラス, ポレート系触媒, 他
6 TMB	Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, MAC-10, カンファーキノン
7 SSD	MMA, ジメタクリレート, HEMA, 4-META, 他
8 SAQ	アセトン, メタクリル酸エステル類 (4-META, その他), アクリル酸エステル類, 水, 他
9 GGB	水, 4-メタクリロキシエチルトリメリット酸, メタクリル酸エステル, アセトン
10 SBB	アセトン, 精製水, Bis-GMA, カルボン酸系モノマー, TEGDMA, ホスホン酸系モノマー, 他
11 SFB	ガラス粉, UDMA, 2-HEMA, TEGDMA, 微粒子けい酸, 他
12 SIB	UDMA, TEGDMA, 重合触媒, 2-HEMA, 他



図 2 使用した市販材料

① EST 法準拠による発生毒性試験

ES-D3 細胞ならびに Bulb c/3T3 細胞 (以下 3T3 細胞) による EST 法を準拠し、市販接着材を DMSO を溶媒として各細胞用培養液で倍数希釈し各試験液とし、EST 法プロトコルの 2 次元培養法における発生毒性試験を実施した。

a. 細胞培養: EST 法に準拠してマウス由来の ES 細胞である ES-D3 細胞ならびに 3T3 細胞を使用した。両細胞用にそれぞれ assay medium を製作した。実験(1)と同様に、ES-D3 細胞用には NAA (Invitrogen)、 β -mercaptoethanol (Invitrogen)、L-glutamine (Invitrogen) 添加 DMEM (Gibco) に加熱処理した容積比 20% FCS (Hyclone) を添加した。3T3 細胞用には L-glutamine (Invitrogen) を添加した DMEM に容積比 10% FCS (Hyclone) を添加した。なお、ES-D3 細胞用 Assay medium は実験時以外は mLIF を添加することによって自然な細胞分化を抑制した。

b. 各試験液の調整: 12 種類の歯科用接着材 100 μ L に、それぞれ等量の DMSO (Sigma-Aldrich, USA) を入れ、卓上バイブレータで十分に攪拌した後、シリンジと孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (Milipore, USA) で濾過滅菌を行った。この溶液 10 μ L を、あらかじめ 37°C にしておいた ES-D3 発生毒性用ならびに ES-D3 細胞と 3T3 細胞用の 2 つの細胞毒性用の Assay Medium 990 μ L に入れ、卓上バイブレータを使用して十分に攪拌した。なお、対照群は DMSO のみとし、計 26 種類の試験用原液を製作した。

c. 細胞分化培養: 実験(1)同様に、対照群を含め 13 種類の ES-D3 発生毒性試験用原液を、さらに Assay medium で倍数希釈し、最終濃度 128 倍までの各試験液を作成した。それぞれの試験液で ES-D3 細胞を 3.75×10^4 cells/mL の細胞数に調製した。細胞懸濁液を直径 10cm のプラスチックディッシュ (IWAKI) の蓋内面を利用して 37°C の炭酸ガス恒温器中にて懸滴培養した。なお、乾燥を防ぐためにディッシュ内部に 20mL を PBS(-) を分注した。炭酸ガス恒温器よりディッシュを取り出し、蓋内部の細胞滴をピペットですべて集め、プラスチック製の 50mL 容量の遠沈管 (BD Falcon) に入れ、実験(1)と同様に培養液を新液と取り替えた。ディッシュ底面で細胞が接着・伸展しないように、無コーティングの細菌培養用ディッシュ (IWAKI) に入れた。ディッシュをさらに 2 日間にわたり各試験液に作用させ、各試験液で球形細胞塊である EB を製作した。

つぎに、あらかじめシリンジと孔径 0.22 μ m のメンブレンフィルター (IWAKI) で濾過滅菌を行った各試験液の新液 1mL を 24 well の培養用ディッシュ (BD Falcon) にピペットで分注し、その中にそれぞれの試験液で製作した EB 各 1 個をピペットで静かに投入し、37°C の炭酸ガス恒温器で 5 日間培養した。

d. 評価: EST 法に準拠した評価法とした。すなわち、24 well の各 well を倒立位相差顕微鏡で EB から分化して well 底面に増殖・分化したテラトーマ状の細胞を注意深く観察し、テラトーマ内部で分化した心筋の鼓動が観察できた well 数を全体の well 数の百分率をそれぞれ求めた。なお、各倍数希釈した試験液から ID50 値を求めた。

e. 細胞毒性値の比較: ES-D3 細胞と 3T3 細胞の細胞毒性試験用原液を、さらに Assay medium で細胞分化培養同様に倍数希釈し、最終濃度 128 倍までの各試験液を作成した。それぞれの試験液で 2 種の細胞をそれぞれ 1×10^4 cells/mL の細胞数に調製した。2 種の細胞懸濁液を 96 well dish (BD Falcon) にそれぞれ 50mL/well 分注し、37°C 炭酸ガス恒温器中にて 3 日間培養した。各試験液をピペットで吸引し、細胞を剥離しないように注意しながら新しい試験液と交換しさらに 7 日間培養した。細胞分化培養と同じく培養 10 日目に MTT 法によって各 well の吸光度 (OD = 570nm) を測定し、それぞれの細胞の IC50 値を求めた。

②3次元培養による ES-D3 細胞分化への影響

a. 細胞培養: マウス由来の ES 細胞である ES-D3 細胞を使用した。実験1同様に、ES-D3 細胞用には NAA (Invitrogen)、 β -mercaptoethanol (Invitrogen)、L-glutamine (Invitrogen) 添加 DMEM (Gibco) に加熱処理した容積比 20% FCS (Hyclone) を添加した。

b. 細胞分化培養: EST 法準拠による発生毒性試験(2)における各試験液の調整項目でフィルターで濾過滅菌した後、Assay medium で 16 倍まで希釈したものを試験原液とし、対照群を加えて計 13 種類の各試験原液を製作した。実験(1)と同様にプラスチックディッシュ内部に約 20mL の PBS(-) を入れ、蓋内面を利用して各試験液で懸滴培養を3日間行った後、各試験液で2日間の静置培養を行って各試験原液の EB を得た。

c. 3次元培養: Type I-A と Type III コラーゲン (新田ゼラチン) を容積比 4:1 に混合し、10 倍濃度の DMEM 培養液および Reconstruction buffer (新田ゼラチン) を氷冷下で混合し Cell culture insert 上に 300 μ L ずつ分注した後、各 Cell culture insert を 12 well multi-dish に入れ、Cell culture insert 外に各試験用原液 2mL を加えた。ゲル上に 50 μ L の各試験原液をゲル上にピペットで分注した後、各 EB をゲル上に置いた。上記 37°C の炭酸ガス恒温器内で7日間培養した。

d. 評価: EST 法準拠による発生毒性試験同様に各 well を倒立位相差顕微鏡でゲル内のテラトーマ状の細胞集団を注意深く観察し、分化した心筋の鼓動が観察できた well 数を全体の well 数の百分率をそれぞれ求めた。

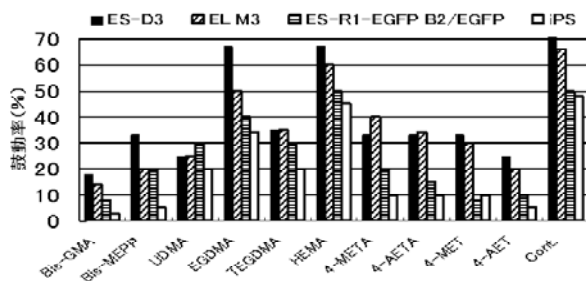


図3 コラーゲンゲルにおける心筋の鼓動率

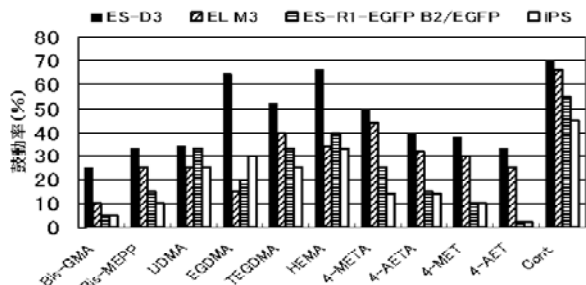


図4 ガラス繊維における心筋の鼓動率

4. 研究成果

(1) モノマー単体の発生毒性: 対照群でのコラーゲンゲルとガラス線維における心筋の鼓動の経時的比較では、コラーゲンゲルの場合、

ES-D3 細胞では 70%、EL M3 細胞では 68%、ES-R1-EGFP B2/EGFP 細胞では 55%、iPS 細胞では 45% であった。ガラス繊維の場合、ES-D3 細胞では 74%、EL M3 細胞では 66%、ES-R1-EGFP B2/EGFP 細胞では 50%、iPS 細胞では 48% であった。コラーゲンゲルよりガラス繊維で若干高い細胞が見られたが大きな差は確認できなかった。なお、コラーゲンゲルとガラス繊維では共に心筋の鼓動発生から終了までの時間についても差はいずれの細胞でも確認できなかった。各モノマーにおけるコラーゲンゲルでの心筋の鼓動率は図 3 に、ガラス繊維での心筋の鼓動率は図 4 に示す。各細胞を通じて、対照群に近い最も高い値を示したのは HEMA で、次に EGDMA であった。逆に 4-AET では各細胞で最も低い値を示し、同じ接着性モノマーの 4-MET、4-AETA でも比較的低い値であった。また、接着性モノマーでない Bis-GMA、UDMA、Bis-MEPP でも低い値を示した。

(2) 各種市販歯科用接着材の発生毒性

①EST法準拠による発生毒性試験: 12種類の市販接着材のそれぞれの ID50 値と IC50 値を図5に示す。各製品間で結果が大きく異なり、Bis-GMA、TEGDMA、HEMA、MAC-10、カンファキノン他を含む TLB と TMB で 128 倍希釈でも鼓動率は 10% を下回った。また、アセトン、メタクリル酸エステル類他を含む SAQ でも同様な値を示した。反面、GGB、SBB、SFB ならびに SIB では ID50 値が比較的高い値であった。

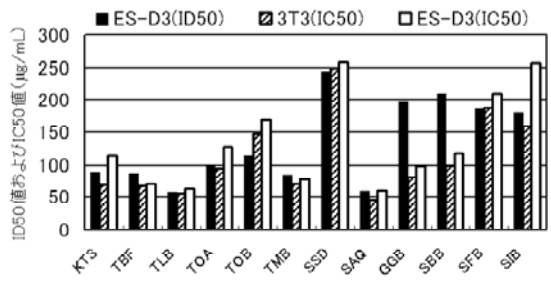


図5 ES-D3細胞によるID50値、ならびに2種の細胞によるIC50値 (SD \leq 20%)

他方、2種の細胞の IC50 値は ID50 値と同様に両細胞共に各製品間で結果が大きく異なった。両細胞を比較すると 3T3 細胞の結果が ES-D3 細胞より全体的にやや感度が低い結果であった。ほぼ ID50 値と類似した結果を示したが、水、4-メタクリロキシエチルトリメリット酸、メタクリル酸エステル、アセトン他からなる GGB、アセトン、精製水、Bis-GMA、カルボン酸系モノマー、TEGDMA、ホスホン酸系モノマー他からなる SBB がそれぞれ IC50 値がやや低い傾向を示した。組成に Bis-GMA が含まれるものは細胞毒性が強い傾向であった。MMA 系の組成を有するものでは逆に細胞分化に影響が少なく、さらに細胞毒性が比較的低い傾向であった。

今回の ID50 値から、例外的にアセトン、Bis-GMA、カルボン酸系モノマー、TEGDMA、

ホスホン酸系モノマー等のSBBでBis-GMAが組成中に混入されているにもかかわらず細胞分化への影響や細胞毒性が比較的少なかった製品も存在したが相対的な混入比率が低かった可能性や、従来から指摘されているBis-GMAの純度の関係(歯科材料・器械 13、563-567、1994)の影響も考えられる。

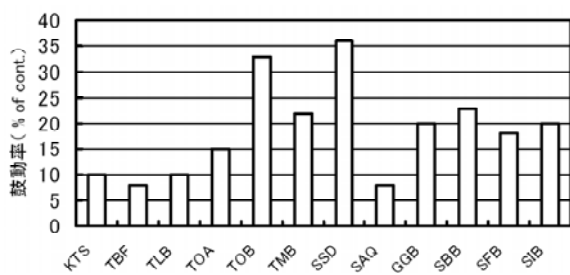


図6 コラーゲンゲルによる3次元培養での心筋鼓動率 (SD ≤ 20%)

②3次元培養によるES-D3細胞分化への影響: 12種類の市販接着材の鼓動率を図6に示す。2次元同様に各製品間で結果が大きく異なった。しかし、その差は2次元の場合より小さかったが傾向は類似していた。すなわち、Bis-GMA、MDP、HEMA等のKTS、リン酸モノマー、Bis-GMA、TEGDMA等のTBFとTLBで低い値を示し、2次元のID50値と同様にBis-GMAが含まれるものは比較的細胞分化への影響が大きい傾向が認められた。逆にMMA系の組成を有するものでは影響が少ない傾向があった。しかし、例外もあることから、実際の製品に含まれる量についても検討しなければならないと考える。個別の成分については各メーカーが公表しているものの、成分の細かい含有量については公表がされていない。また、当初予定していた一部の原料モノマーについてはメーカー側から提供が断られたため、それらの組成を含む実際の製品を試験に組み込むこととした。

今回の市販品について、EST法ではすべてID50値ならびにIC50値にはそれぞれの濃度を代入する必要がある。しかし、今回の市販品の場合にはすべて単独の化学物質ではなく混合した複数の化学物質の集合体である。したがって、今後はさらに細かな成分量を含めた解析が必要である。今回のID50値ならびにIC50値をEST法プロトコルの計算式から、すべての製品の発生毒性レベルは“non embryotoxicity”の範疇を示した。

以上のことから各材料成分モノマーの結果とそれらを使用した実際の製品の*in vitro*発生毒性結果について判明した。

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11件)

① Imai K, Nakamura K, Tanoue A, Suese K, Ogawa F, Takashima H, Comparison between

the two endpoints of the embryotoxicity test using the contracting myocardial cells and the alkaline phosphatase (ALP) activity, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、10巻、(2012)、82-88

② Imai K, Uemura T, Tanoue A, Nakamura K, Suese K, Takashima H, An attempt to study of mouse ES cell differentiation using collagen derived from tilapia scale, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、10巻、(2012)、89-94

③ Imai K, Nakamura K, Tanoue A, Suese K, Nishikawa T, Tanaka A, Watanabe C, Ohmukai H, Takashima H, Cell viability of mouse cells by exposure to the dental adhesives using cell recovery test with 3D culture, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、10巻、(2012)、42-47

④ Imai K, Akasaka T, Watari F, Tanoue A, Nakamura K, Suese K, Takashima H, Nishikawa T, Tanaka A, Takeda S, *In vitro* study of cell differentiation by two type mouse embryo stem cells on mono- and multilayer nanocarbon tubes, *Appl Surf Sci*, 査読有、258巻、(2012)、8444-8447

⑤ 今井 弘一, 中村 和昭, 田上 昭人, 代謝活性因子を含めた*in vitro*発生毒性評価法の開発, *J Bio-integ*, 査読有、2巻、(2012)、91-96

⑥ Imai K, Suese K, Tanoue A, Nakamura K, Takashima H, Development of *in vitro* embryotoxicity testing by differentiation of mouse ES cells using glass fiber, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、9巻、(2011)、81-87

⑦ Imai K, Watari F, Nishikawa T, Tanaka A, Tanoue A, Nakamura K, Takashima H, An attempt to study of the C60 fullerene on differentiation of mouse ES cells, *Nano Biomed*, 査読有、3巻、(2011)、288-293

⑧ Imai K, Akasaka T, Watari F, Tanoue A, Nakamura K, Suese K, Takashima H, Nishikawa T, Tanaka A, Takeda S, Study of *in vitro* embryotoxicity potential by two type nano titanium dioxide, *Nano Biomed*, 査読有、3巻、(2011)、224-230

⑨ Imai K, Takeda S, Tanoue A, Nakamura K, Suese K, Watari F, An attempt to cell differentiation in three-dimensional culture system using non-feeder ES-D3 cells and feeder layer type ES cells, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、8巻、(2011)、203-211

⑩ Imai K, Evaluation of *in vitro* embryotoxicity

by differentiation of embryonic stem cells into contracting cardiac myocytes, J Oral Tissue Engin, 査読有、8 巻、(2010)、80-85

⑩ Imai K, Suese K, Akasaka T, Watari F, *In vitro* study of cell differentiation by mouse embryo stem cells on nanocarbon tubes, Nano Biomed, 査読有、2 巻、(2010)、47-51

[学会発表] (計 14 件)

① 今井 弘一、再生医療における胚性幹細胞の有用性、応用と将来展望、第 319 回北海道歯学会例会/大学院歯学研究セミナー、2013.1.31、北海道大学

② 今井 弘一、武田 昭二、中村 和昭、田上 昭人、ヒト肝細胞とマウス ES 細胞のハイブリッド培養における *in vitro* 発生毒性試験法の開発、日本動物実験代替法学会第 25 回大会、2012.12.9、慶應義塾大学

③ Imai K, Watari F, Nakamura K, Tanoue A. Study of the C60 fullerene on differentiation of mouse embryonic stem cells. 24th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (ISCM 2012)、2012.10.23、九州大学

④ 今井 弘一、武田 昭二、中村 和昭、田上 昭人、西川 哲成、益野 一哉、田中 昭男。ヒト肝細胞とマウス ES 細胞による *in vitro* 発生毒性試験法の開発 - 歯科用モノマーの検討 -、第 6 回日本再生歯科医学会シンポジウム、2012.10.7、十勝歯科医師会館

⑤ 今井 弘一。細胞培養の本当の問題点 - 再生とインプラント臨床家のために -。日本再生歯科医学会設立 10 周年記念セミナー、2012.9.2、ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター

⑥ 今井 弘一、武田 昭二、中村 和昭、田上 昭人、西川 哲成、益野 一哉、田中 昭男。ハイブリッド 3D 培養による新しい *in vitro* 発生毒性試験システムの開発。第 10 回日本再生歯科医学会、2012.9.2、ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター

⑦ 今井 弘一、武田 昭二、中村 和昭、田上 昭人、西川 哲成、益野 一哉、田中 昭男。歯科用モノマーの発生毒性試験法における新しい 3次元足場材料の活用。第 10 回日本再生歯科医学会、2012.9.2、ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター

⑧ 今井 弘一、武田 昭二。 *In vitro* 発生毒性試験への細胞分化の回復因子導入の試み。日

本組織培養学会第 85 回大会、2012.5.17、京都大学

⑨ 今井 弘一、ES 細胞など胚性幹細胞の再生歯科医学への応用、第 5 回日本再生歯科医学会シンポジウム、2011.12.11、鶴見大学

⑩ 今井 弘一、武田 昭二、ES 細胞を用いた発生毒性試験法における 3次元足場材料としてのガラス繊維素材の活用、第 58 回日本歯科理工学会学術講演会、2011.10.22、奥羽大学

⑪ 今井 弘一、亘理 文夫、高島 宏昌、武田 昭二、*In vitro* 発生毒性試験法における 3 種類の ES 細胞による心筋への分化の比較について、第 56 回日本歯科理工学会、2010.10.10、長良川国際会議場

⑫ Imai K, Takeda S, Tanoue A, Senuma M, Takashima H, Compare with three kinds of ES cells using two and three-dimensional culture system, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 2011.8.24、Fairmont The Queen Elizabeth Hotel (カナダ)

⑬ Imai K, Takashima H, Tanoue A, Nakamura K, Takeda S, Development of an *in vitro* embryotoxicity screening system include the human metabolic factor, 57th General Session of The Japanese Society for Dental Materials and Devices, 2011 Annual Meeting of The Korea Research Society for Dental Materials、2011.5.28、延世大学校(韓国)

⑭ 今井 弘一、武田 昭二、草川 森士、田上 昭人、Embryonic Stem Cell Test 法への細胞分化障害からの回復因子導入の試み 第 37 回日本トキシコロジー学会、2010.6.18、沖縄コンベンションセンター

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・准教授
研究者番号：90103100

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

武田 昭二 (TAKEDA SHOJI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20067185