

## 代謝活性因子を含めた *in vitro* 発生毒性評価法の開発

今井 弘一<sup>1)</sup>、中村 和昭<sup>2)</sup>、田上 昭人<sup>2)</sup>

### Development of *in vitro* embryotoxicity test with the metabolic factor

Koichi Imai<sup>1)</sup>, Kazuaki Nakamura<sup>2)</sup>, Akito Tanoue<sup>2)</sup>

#### 1. 緒言

バイオマテリアルを開発する場合、生体安全性の指標となる材料の評価法が十分に信頼できるものでなければならない。そのため、生物学的適合性の評価基準となる正確な試験法の開発が重要となる。新生児の誕生に障害となる催奇形性リスクは、材料の生物学的安全性の重要な試験項目の1つである。生殖・発生毒性リスクの評価法は従来からの動物実験に頼っていた。しかし、動物実験に必要な経済的問題に加え、新規に合成される多量の化学物質の評価に時間のかかる動物実験では、新規化学物質の開発速度に応じきれない。さらに、動物愛護の観点からも *in vitro* スクリーニング試験法の登場が望まれていた。

そこで、ES細胞の分化能を利用した *in vitro* 発生毒性試験法である EST (Embryonic Stem cell Test) 法が1997年にドイツで開発された<sup>1)</sup>。この方法は欧米を中心とした国際バリデーション試験の結果、未知物質でも十分にその発生毒性リスクを予知できる評価法であることが示されている<sup>2,3)</sup>。我々はこの方法を用いて歯科材料やその成分をはじめ数多くの材料について評価を行ってきた<sup>4,22)</sup>。しかし、発生毒性は全身毒性であることから、肝臓などによる化学物質の代謝物を評価できなければ、得られた結果の信頼性に影響

すると考えられる。そこで、我々は化学物質を溶解した培地でラット肝由来の hepatocyte を使用した培養システム (TEST LIVER<sup>TM</sup>、東洋紡、大阪)<sup>23,24)</sup> を利用し、代謝活性された化学物質を含む培地に ES 細胞用添加剤を加えて、ES 細胞を分化させることを考えた。

実験には hepatocyte の前培養による代謝処理を行った場合と行わなかった場合で、ES 細胞から分化した心筋の鼓動率を調べた。さらにインプラントの上部構造にも用いられる歯科用金属組成元素である Ag, Pd, Cu および In を添加・培養して心筋の鼓動率を比較した。

#### 2. 材料と方法

##### 1) TEST LIVER<sup>TM</sup>

ラット肝由来の hepatocyte をセルローストリアセテート製中空糸 (内径 285  $\mu\text{m}$ 、外径 387  $\mu\text{m}$ ) 内腔にラット肝細胞を約  $5 \times 10^5$  cells 詰め、遠心力を加えた後に培養することで、アルブミン産生やアンモニア代謝能を始めとする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<sup>23,24)</sup>。

##### 2) 代謝処理

Ag, Pd, Cu および In (Wako、大阪) の原子吸

1) 大阪歯科大学歯科理工学講座

2) 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部

1) Dept. of Biomaterial, Osaka Dental Univ.,

2) National Res. Inst. for Child Health and Development

光用標準試薬 (1,000ppm) を DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose, Gibco, NY, USA) で 100ppm に溶解し、TEST LIVER™ 用専用培養液 (東洋紡、大阪) でさらに 50 倍に希釈し、最終的に各イオン濃度を 2ppm とした。その後、0.2 μm のメンブランフィルター (IWAKI、旭硝子、東京) で濾過滅菌して試験液を作製した。

マルチウェル (12well, BD Falcon, NJ, USA) に各試験液を 0.8mL 分注し、TEST LIVER™ を各ウェル内に入れた (図 1)。炭酸ガス恒温器内 (5% CO<sub>2</sub>, 37℃、タバイエスベック、大阪) で 2 日間巡回培養し、代謝処理した各試験液を得た。各試験液にあらかじめ 57℃ で 1 時間加熱処理した容積比 20% FBS (Lot, AVH78915, HyClone, Thermo, UT, USA) を添加し、さらに、NAA, β-mercaptoethanol, L-glutamine, Penicillin / Streptomycin をそれぞれ添加し、再度濾過滅菌した。なお、対照群は hepatocyte の前培養を行っていないものとした。

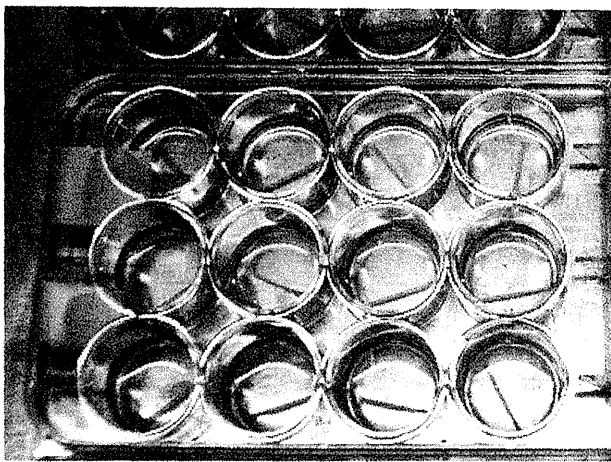
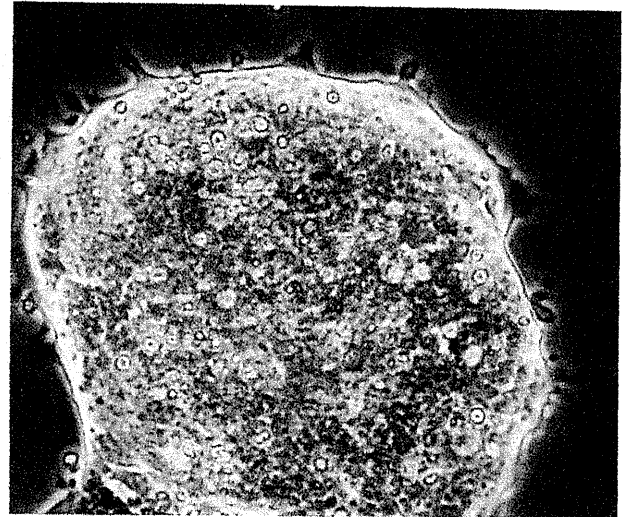


図 1 : TEST LIVER™  
マルチウェル底面の針状物 (セルローストリアセテート製中空糸、内部に hepatocyte が充填されている)

### 3) ES 細胞の分化

ES 細胞はマウス由来の ES-D3 細胞 (図 2) を使用した。また、代謝処理した各試験液をさらに濾過滅菌後の ES 細胞用新鮮培養液で 8 倍まで倍数希釈し、最終試験液とした。これらの各最終試験液で  $3.75 \times 10^1$  cells/mL の ES-D3 細胞を調整し、3 日間懸滴培養した (図 3)。細胞がディッシュ底面に伸展しないように細菌培養用無処理ディッシュ (直径 10cm、旭硝

子、東京) を用いた。ディッシュに各最終試験液 5mL を分注し、2 日間にわたり静置培養し、球形細胞塊である EB (Embryoid Body) を作製した。最終試験液 1mL をマルチウェル (24well, BD Falcon, NJ, USA) に分注し、EB を各 1 個投入し、5 日間静置培養した。



50 μm

図 2 : 培養 4 日後の ES-D3 細胞のコロニー

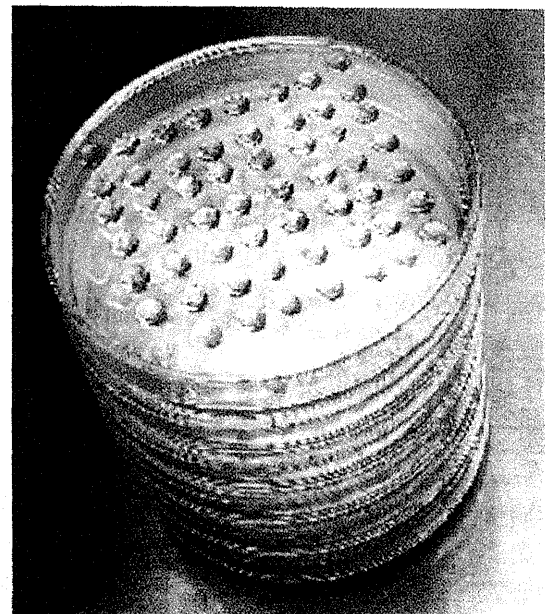


図 3 : ES-D3 細胞の懸滴培養

#### 4) 評価

倒立位相差顕微鏡 (IX70、オリンパス、東京) で観察した。培養5日後のEBはマルチウェル底面で細胞の増殖と分化を認めた。分化したEBはそれぞれテラトーマ状態となり、その中で心筋の鼓動が鏡見的に容易に認められた。EST法のプロトコルに基づいて各ウェルで心筋の鼓動が認められたウェルを有意差検定した。

### 3. 結果

#### 1) 無代謝処理群

EB細胞のみの培養21日後までの心筋鼓動率を図4に示す。培養8日後では20%の心筋鼓動率であったが、経時的に大きくなり、培養10日で67%に達し、培養14日までとほぼ同程度となった。その後は培養18日では60%、21日で44%と徐々に低下傾向を示した。また、倒立位相差顕微鏡では培養10日のディッシュ底面の80%程度にEBが増殖し、いわゆるテラトーマ状態を形成した (図5)。

Ag, Pd, Cu および In の試験液での培養10日における心筋鼓動率を図6に示す。各イオン濃度2ppmの原液では、Agが10%、Pdが34%、Cuが26%、Inが12%であった。また、希釈率が大きくなるにしたがって心筋鼓動率も大きくなった。

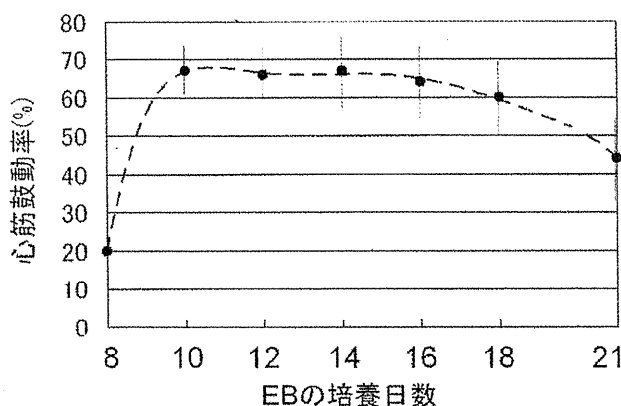


図4: 対照群のEBを培養した場合の心筋鼓動率 (縦棒はN=4における標準偏差)

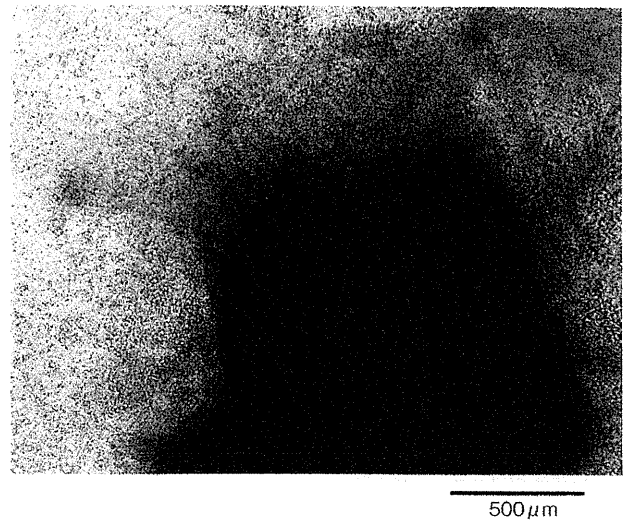


図5: 対照群のEBを10日間培養したディッシュ底面のテラトーマ

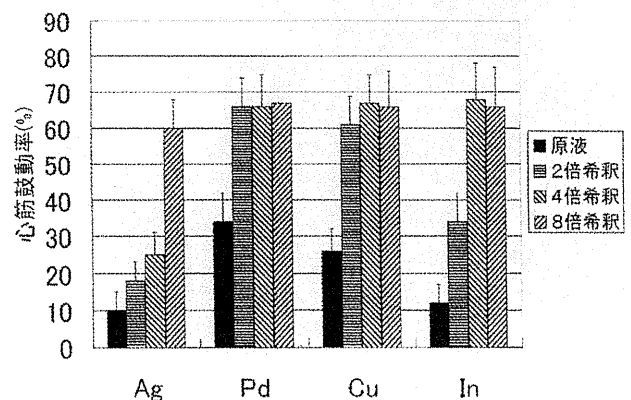


図6: 各金属元素試験液における培養10日後の心筋鼓動率 (縦棒はN=4における標準偏差)

#### 2) 代謝処理群

hepatocyteで培養したES細胞群の培養21日後までの心筋鼓動率を図7に示す。経時的に心筋鼓動率が大きくなり、培養10日から培養16日までは60%であった。その後、培養18日で44%、培養21日で心筋鼓動率は36%と低下した。鏡見結果でも無代謝処理と同様にEBは培養10日後でディッシュ底面の80%程度に増殖した (図8)。

各試験液の心筋鼓動率の結果は原液で、Agが7%、PdとCuが32%、Inが15%であった。無代謝処理と比べて、AgとInの鼓動率がやや低下し、Cuではやや増加し、Pdは同様の結果であった。

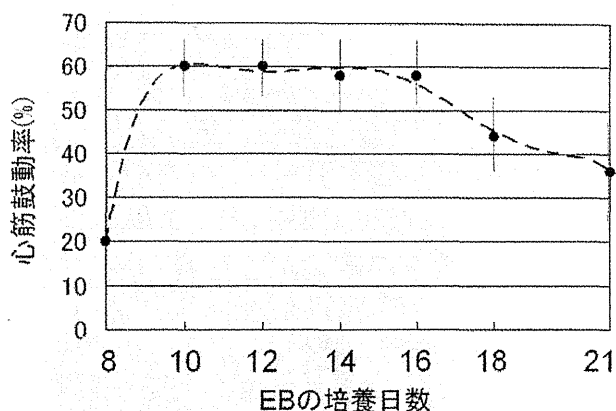


図7: hepatocyte で前処理した対照群による心筋鼓動率 (縦棒は N=4 における標準偏差)

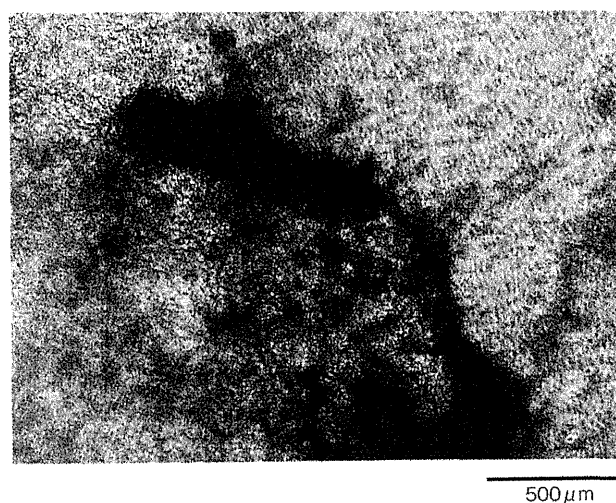


図8: hepatocyte で前処理した対照群を 10 日間培養したテラトーマ

#### 4. 考 察

歯科生体材料の溶出物は肝臓や腸内細菌によって代謝を受ける。これにより、化学構造が変化し、生成した活性代謝物がタンパク質や核酸など生体内分子と不可逆的に共有結合して、全身毒性、発生毒性、変異原性やがん原性の原因となることが知られている。従来からこのような代謝活性の試験法は、酵素誘導したラットやマウスの肝臓を摘出・粉碎し、さらに遠心分離処理した S9mix 処理が主に用いられてきた。しかし、アルブミン産生やアンモニア代謝能を始めとする肝機能を維持しながら培養可能な市販品も存在することから、今回は保存性や安定性などの点から S9mix

処理は用いなかった。

今回の結果から、代謝処理群と無代謝処理群を比較すると、Ag と In では細胞分化への影響がやや大きく、Pd もわずかに大きかった。代謝処理は ES 細胞に対する分化への影響がやや認められたことから、Ag, In, Pd のイオン添加によってさらにその影響が増加した可能性がある。一方、Cu では代謝処理による細胞分化への影響が小さくなった。この理由は肝臓に多く発生するメタルチオネインの作用<sup>25,27)</sup>による可能性が大きい。メタルチオネインは生体防御物質としての過剰な重金属の解毒作用がある。今回の結果もメタルチオネインは 20 残基のシステインを有することから、容易に Cu イオンと結合し排除されたと考えられる。なお、Ag との反応の可能性も考えられるが、今回の結果からは認められなかった。

今回の代謝活性化によって心筋の鼓動率に差が生じたことは、代謝活性化がさらに異なった発生毒性となる可能性も大きい。今後、代謝活性化によるデータの変動が臨床的な結果にどのように反映されるか大変興味深い。さらに、今回の代謝活性化はラット由来の肝細胞とマウス由来の ES 細胞との組み合わせであることから、今後はヒト由来の肝細胞とマウス由来の ES 細胞との組み合わせについて可能であると考えられる。この方法が全身毒性の予知に従来の方法よりも有用であることが示唆された。さらに、今回の結果は新しい EST 法への応用への道を開くものと考えられる。すなわち種特異的な代謝活性処理ができるような EST 法への改良によって、歯科生体材料の発生毒性スクリーニングの新たな展開をも望めるものと思われる。

#### 5. 謝 辞

我々は EST 法について直接ご教授頂いたドイツ連邦ベルリン自由大学客員教授 Dr. Horst Spielmann に深甚の謝意を示します。本研究の一部は成育医療研究開発費 (22 指 -6)、ならびに JSPS 科学研究費補助金 (No.22592202) による。本研究は大阪歯科大学中央歯学研究所を利用した。

文 献

- 1) Spielmann H, Pohl I et al.: The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicol* 10: 119-127, 1997.
- 2) Spielmann H, Genschow E. et al.: Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim* 32: 245-274, 2004.
- 3) Spielmann H, Seiler A, et al.: The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests. The report and recommendations of an ECVAM / ZEBET workshop (ECVAM workshop 57). *Altern Lab Anim* 34: 527-538, 2006.
- 4) Imai K, Spielmann H. et al.: In vitro embryotoxicity testing of embryonic stem cells into contracting cardiac myocytes. *AATEX* 6: 153-154, 2000.
- 5) Imai K, Spielmann H. et al.: In vitro embryotoxicity testing of polymeric substances for dental use by differentiation of embryonic stem cells. *AATEX* 8: 31-39, 2001.
- 6) 今井弘一、中村正明: 動物実験代替法におけるES細胞利用の新しい展開、*日本薬理学雑誌* 125: 335-342, 2005.
- 7) Imai K and Nakamura M: In vitro embryotoxicity testing of metals for dental use by differentiation of embryonic stem cell test. *Congenital Anomalies* 46: 34-38, 2006.
- 8) Imai K: The relationship between mechanical reciprocating motions and differentiation of mouse ES-D3 cells under three-dimensional culture in collagen gel matrix. *J Oral Tissue Engin* 3: 131-138, 2006.
- 9) Imai K, Hayakawa T. et al.: Evaluation of in vitro embryotoxicity of dental monomers by differentiation of embryonic stem cells into contracting cardiac myocytes. *AATEX* 12: 171-178, 2007.
- 10) Imai K and Nakamura M: Effects of experimental alloys containing indium for dental use in vitro embryotoxicity test. *AATEX* 14 (Special Issue): 655-658, 2007.
- 11) Imai K, Kusakawa S. et al.: Effects on ES-D3 cell differentiation of three-dimensional cell culture system using with collagen gel derived from chum salmon sources. *J Oral Tissue Engin* 5: 81-86, 2007.
- 12) Imai K, Kusakawa S. et al.: In vitro embryotoxicity testing of mercury vapour by differentiation of ES-D3 cells. *AATEX* 13: 118-122, 2008.
- 13) Imai K, Kusakawa S. et al.: An attempt to cell recovery factor in cell differentiation culture with the embryonic stem cell test (EST). *J Oral Tissue Engin* 6: 152-158, 2009.
- 14) Imai K, Takeda S. et al.: An attempt to include the human metabolic factor into the em-bryotoxicity test by mouse ES-D3 cells. *ALTEX* 26(Spec. Issue):116, 2009.
- 15) Imai K, Takeda S. et al.: Effects of cell recovery factor in cell differentiation culture with the embryonic stem cell test. *ALTEX* 26(Spec. Issue): 116, 2009.
- 16) Imai K, Suese K. et al.: Comparison of the cell differentiation level of mouse iPS cells and ES-D3 cells using the embryonic stem cell test (EST) protocol attempting to develop a new in vitro embryotoxicity test. *J Oral Tissue Engin* 7: 38-43, 2009.
- 17) Imai K, Takeda S. et al.: In vitro embryotoxicity test of four plasticizers by embryonic stem cell test (EST). *AATEX* 14: 947-953, 2009.
- 18) Imai K: In vitro embryotoxicity testing of nanomaterials by improvement of embryonic stem cell test. *Nano Biomed* 1: 176-185, 2009.
- 19) Imai K, Suese K, et al.: In vitro study of cell differentiation by mouse embryo stem cells on nanocarbon tubes. *Nano Biomed* 2: 47-51, 2009.
- 20) Imai K : Evaluation of in vitro embryotoxicity by differentiation of embryonic stem cells into contracting cardiac myocytes. *J Oral Tissue Engin* 8: 80-85, 2009.
- 21) Imai K, Takeda S. et al.: 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* 8: 203-211, 2011.
- 22) Imai K, Akasaka T. et al.: Study of in vitro embryotoxicity potential by two type nano titanium dioxide. *Nano Biomed* 3: 224-230, 2011.
- 23) Funatsu K, Ijima H. et al.: Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs* 25: 194-200, 2001.
- 24) Funatsu K and Nakazawa K: Novel hybrid artificial liver using hepatocyte organoids. *Int J Artif Organs* 25: 77-82, 2002.
- 25) Frieden E: Perspectives on copper biochemistry. *Clin Physiol Biochem* 4: 11-19, 1986.
- 26) Ballatori N: Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes. *Drug Metab Rev* 23: 83-132, 1991.
- 27) Laloti V, Muruais G. et al.: Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci* 14: 4878-4903, 2009.

## 抄 録

1997年に *in vitro* 発生毒性試験法である EST (Embryonic Stem cell Test) 法がドイツで開発され、国際バリデーション試験で未知の化学物質でも十分に発生毒性リスクを予知できる評価法であることが示された。しかし、発生毒性は全身毒性であるため、化学物質の代謝因子を結果に反映させる必要がある。そこで我々は、ラット肝由来の hepatocyte の培養システムを用いて化学物質を代謝させ、その培地でマウス由来の ES 細胞を分化させた。

今回評価に用いたのは、歯科用インプラントの上部構造にも用いられる歯科用金属組成元素である Ag, Pd, Cu および In で、これらの代謝の有無で ES 細胞から分化させた心筋の鼓動率を比較した。その結果、Ag, Pd, In は細胞分化への影響が大きくなったが、Cu は細胞分化への影響が小さくなった。肝臓のメタルチオネインが作用した可能性が大きいと考えられ、*in vitro* 発生毒性試験法に代謝因子を導入することの意義は大きいと考えられる。

## Abstract

In 1997, an embryonic stem cell test (EST) for *in vitro* embryotoxicity was developed in Germany. This test could accurately predict the embryotoxicities of unknown chemicals, as demonstrated by an international validation test. However, the metabolic factors of chemicals should be considered because their embryotoxicities cause systemic effects. In the present study, chemicals were metabolized using a culture system of rat liver hepatocytes. Then, the culture medium was used to differentiate mouse ES cells.

Myocardial pulse rates were compared using Ag, Pd, Cu, and In, metal elements used in the upper structure of dental implants, depending on the presence or absence of metabolism.

As a result, Ag, Pd, and In had significant effects on cell differentiation, while Cu had reduced effects due to metabolism. These results may be explained by the effects of metallothionein in the liver. Thus, metabolic factors should be considered for the embryotoxicity test.



