



歯冠用硬質レジン  
安全性試験レポート

Vol.4

「ルナウイング」の生物学的評価

## 目 次

1. はじめに	2
2. 試験概要	3
3. 試験方法	11
4. 試験結果	19
5. 考察	25
6. 結論	26

# 「ルナウイング」の生物学的評価

山本貴金属地金株式会社  
生体科学安全研究室

## 1. はじめに

歯科材料には、金属、セラミック、レジン等の材料が用いられているが、その具備すべき条件として、口腔内の厳しい環境の中において安定で、しかも、生体に対して安全で、かつ、機能性であることが求められる。技術革新の進歩とともに生体への新しい素材開発が進められ、医療従事者や患者にとっては多くのメリットが提供されている。しかし、新規化学物質や新技術を生かして製品開発に着手する際には、当然のことながら、安全性に十分配慮しなければならない。事実、2005年4月の改正薬事法では歯科材料を含めた医療機器は、従来よりも安全性、有効性評価が強化された。

当社では、新しい素材開発として歯冠用硬質レジンの基礎研究を手がけ、モノマーと無機フィラーに関する物理化学的性質、機械的性質などに関して多くの研究報告を行ってきた。<sup>1~8)</sup> さらに、安全性を提供するメーカーとして優れた理工学的性質に加え安全性を強化した製品開発へシフトするため、2003年からは高知大学医学部腫瘍病態学講座口腔腫瘍制御学との共同研究に取り組むとともに、2005年には同大学医学部内に生体科学安全研究室を設置した。ここでは、生物学的安全性試験として国際基準のISO 10993「医療機器の生物学的評価」に準じた試験や細胞・組織・遺伝子工学を基礎にした独自の試験を行っている。

硬質レジンのモノマー主成分であるウレタン系ジメタクリレート（UDMA）トリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDMA）は、一部では細胞毒性が報告されているものの<sup>9~10)</sup>、長年の臨床実績があることから、市販品のほとんどにおいて主成分として使用されている。さらに、硬質レジンに使用されている高分子の一部には、内分泌攪乱物質作用のあることが報告されている。<sup>10)</sup> したがって、新製品の開発においては常に生体に及ぼす影響を考慮しなければならない。

当社において基礎的研究成果を基に開発を進めた硬質レジンには、前述の安全性情報を十分考慮し、ナノ技術を最大に活用し、さらには、保険適用としては最も充填率の高いナノコンポジットレジンである。このレジンには、レジンマトリックス中に20nmサイズの球状フィラーを配合し、さらに100nmサイズの球状フィラーと複合化させることで強度や耐摩耗性を大きく向上させ、その結果、基本硬質レジンとしての条件を満たすものとすることができた。開発コンセプトとして、“生体に対して安全である硬質レジン”を基本に掲げており、そのため、基本硬質レジンの安全性確保のためにISO 10993に準拠した①マウスを用いた急性毒性試験、②培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験（細胞毒性試験）、③細菌を用いた復帰突然変異試験（変異原性試験）、④モルモットを用いた皮膚感作性試験、⑤ハムスターを用いた口腔粘膜刺激試験を行い、生体に対し安全であることを確認した。

歯冠用硬質レジンとして完成した『ルナウイング』は、基本硬質レジンに天然歯の色調調整として微量の着色顔料、蛍光顔料の化合物を添加して最終開発品とした。添加剤の種類は特性の違いにより、

様々であるが、生物学的評価の報告例が見当たらないのが現状であり、基本の硬質レジンが生体に対して安全であっても、添加剤が影響を示すなら、たとえ微量でも歯冠用硬質レジンそのものは、安全ではないことになる。これらの安全性をさらに追求するために、大学との共同研究で着色顔料、蛍光顔料、プライマーを中心にISO 10993に準拠した試験と細胞・組織・遺伝子工学の独自の試験を行った。

今回は、これらの共同研究の試験結果をまとめて“安全性シリーズVol4”の『歯冠用硬質レジン（ルナウイング）の生物学的評価』としてレポート化した。これらの安全性情報は、歯科医療従事者や患者の安心につながるものと確信している。

## 2. 試験概要

### 2.1 急性毒性試験

試験の目的

全身毒性試験の目的は人体により近い環境下において検体の安全性を予測することである。

なお毒性の現れ方には急性（急激に示される毒性）と、慢性（時間をかけて現れる毒性）があり、今回行った試験は急性の毒性試験である。

試験の要約

I. 産まれてから4週目のマウスを購入し、1週間飼育する。



飼育ケージ内の様子



飼育ケージの様子

II. マウスに通常1回（目的に合わせて複数回与えることもある）胃ゾンテという道具を使って強制的に検体の懸濁液を服用させる。



胃ゾンテによる強制経口投与の様子

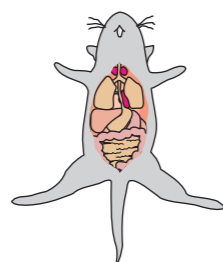
Ⅲ. 服用後14日間、体重やその他の健康状態を観察する。

毒性のある場合は、体重の減少や衰弱がみられる。毒性の強い場合においては死亡する例もある。



健康状態の観察

Ⅳ. 観察終了後、試験で使った全てのマウスの解剖を行い、臓器の形状変化、質量変化を観察する。



解剖による臓器の形状変化観察

## 2.2 コロニー形成阻害試験（細胞毒性試験）

試験の目的

試験の目的は細胞レベルで毒性を評価することである。本試験では細胞を用いた毒性評価方法の中から、コロニー形成阻害試験と言われる試験方法を選択した。本試験の特徴としては毒性に対しシビアな反応が示される事である。またISO 10993-5においても推奨されている。

試験の要約

I. V79（チャイニーズハムスター肺）細胞を培養増殖させる。



細胞の培養操作

Ⅱ. その細胞を細胞実験用のプレート上1個の穴につきそれぞれ約100個づつ入れる。



細胞実験用プレートへの細胞懸濁液の播種

Ⅲ. 培養液を用いて検体から、24hで溶出成分の抽出を行う。細胞の上に成分抽出液を添加し、約6日間培養する。



被験物質からの成分抽出液



6日間の細胞培養

Ⅳ. コロニーの数をカウントする。播種した細胞数に近いコロニーが形成されれば毒性無し。

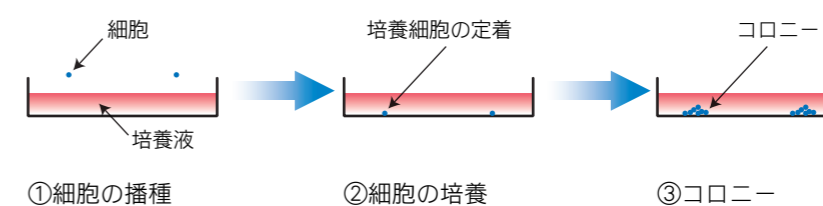


図1 細胞の添加からコロニー形成まで

### 2.3 復帰突然変異試験 (変異原性試験)

#### 試験の目的

製品の成分がDNAに影響を与えるとするなら、様々な問題を引き起こすこととなる。生後DNAが影響を受けるようなことがあれば発がんを引き起こし、生殖細胞のDNAに影響があれば子供、または孫の代、さらにはもっと先にまで奇形を引き起こすことに繋がる。このため、製品の成分がDNAに与える影響力の把握は必要不可欠である。

本試験は、このような危険性を予測することを目的としている。

#### 試験の要約

I. 細菌 (サルモネラ菌及び大腸菌) を 8 時間、37℃の環境下で浸透しながら培養を行う。



菌入り培養液

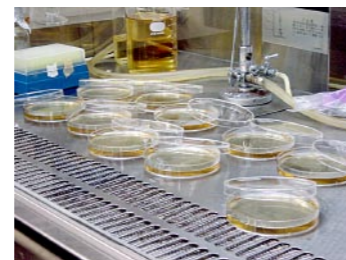


恒温オートシェイカー

II. 培養させた菌と試験物質を混合し、栄養成分のほとんど無い寒天培地に添加する。48h放置する。

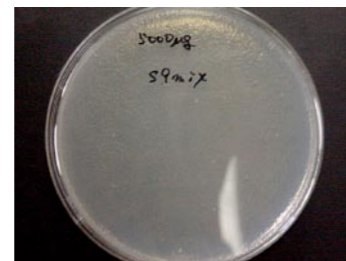
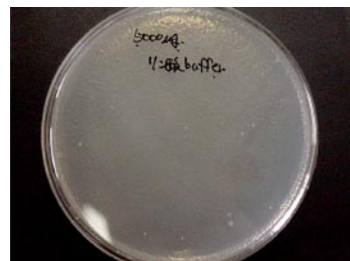


菌と試料を混合



寒天培地に菌を播種する

III. 48h後、細菌のコロニー数をカウントする。検体がDNAに異常を与えていたら、コロニーの数が数百個から千個以上形成される。



細胞実験用プレートへの細胞懸濁液の播種

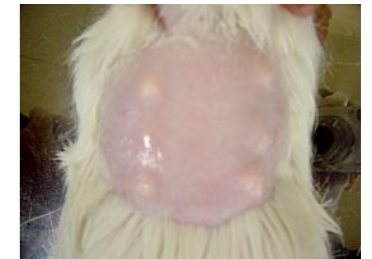
### 2.4 皮膚感作性試験

#### 試験の目的

検体がアレルギーを引き起こすリスクがどれ程であるか予測することを目的としている。

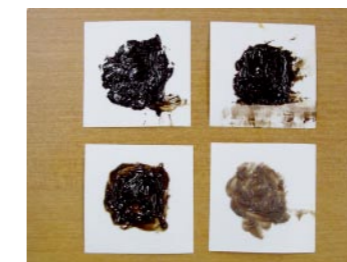
#### 試験の要約

I. モルモットの体質をアレルギーに対し敏感にするため、試薬を皮下注射する。



皮下注射後の様子

II. 検体をモルモットの側腹部にパッチテストの要領で貼り付け、48時間放置。

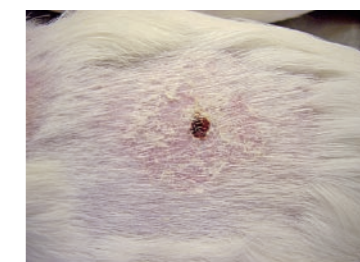


検体の適用

III. 48時間後貼り付けている検体を取り、アレルギー反応の有無を観察する。アレルギー反応が無い場合は左下の写真のように皮膚の変化がなく (赤くなっている部分はテープによる被れ)、アレルギー反応がある場合は炎症が見られ、右下のように痂皮が形成される。



アレルギー反応無し



アレルギー反応あり

## 2.5 口腔粘膜刺激性試験

### 試験の目的

様々な毒性を示す物質には、摂取することで体内に吸収され悪影響を与えるものが多い。しかし、中にはタバコのタールのように表面組織に異状を引き起こすことで、悪影響を与えるものがある。本試験では、口腔内の表面組織に与える影響力について検討することを目的としている。

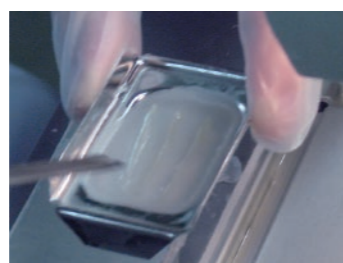
### 試験の要約

I. ハムスターの頬袋に試料を詰め、2週間放置する。その後切除する。

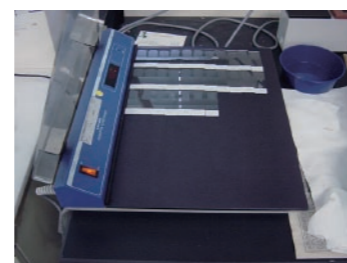


麻酔をかける。

II. 頬袋の永久標本を作製。



パラフィンで頬袋を包み、パラフィンブロックというものを作製する。



永久のプレパラート作製。

III. 作製した永久標本の染色を行う。

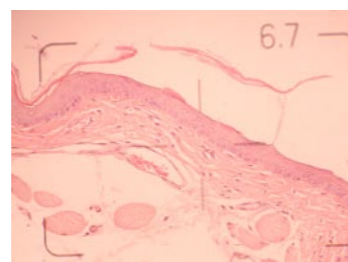


カバーガラスをかけプレパラート状の永久標本を完成させる。



組織染色を行う。

IV. 組織観察を行う。検体が口腔内に悪影響を及ぼす物質でないならば、組織の厚さや組織の並びに規則性がたもたれており、異常が発生している場合は組織が厚くなり、免疫細胞（好中球、好酸球、好塩球、マクロファージ）などの集まりが見られるようになる。



正常組織写真

## 2.6 細胞増殖阻害試験

### 試験の目的

この試験の目的はコロニー形成阻害試験と同様に、細胞レベルで毒性を評価することである。特徴としては最もポピュラーな細胞毒性試験方法の1つであり、細胞の増殖率で毒性の評価を行う。

### 試験の要約

I. 細胞を試験プレートに入れる。

II. 検体からの成分抽出液を細胞の上に添加する。48時間培養。

III. 細胞の増殖率を測定する。

評価方法は、成分抽出液を添加しない場合の細胞増殖数を基準として、成分抽出液を添加した後の細胞増殖数を比較することにより評価をする。

## 2.7 DNA合成試験

### 試験の目的

人の体を構成する細胞は、日々分裂を繰り返し、そして古くなった細胞は体外に排出される。

本試験では、この分裂の際に、必ず細胞内で行われるDNAの複製と合成に着目し、この反応が正常に行われているかを観察することで、検体の毒性の有無を評価することを目的としている。

### 試験の概要

I. 細胞を試験用のプレートに添加。

II. 検体からの成分抽出液を細胞の上に添加する。42時間培養する。

III. 42時間後DNA合成の際に合成部位と反応する試薬を添加する。

IV. さらに6時間培養を続ける。

V. 反応した試薬量を測定機器により測定する。成分抽出液を添加しない場合のDNA合成量を基準にし、添加後のDNA合成量がどう変化したかを見ることで評価する。

## 2.8 細胞傷害性試験

### 試験の目的

細胞が死を迎える方法は、大きく2つに分けることができる。1つはアポトーシス、もう一つがネクローシスである。アポトーシスとは胎児の手や足の水掻きが、ある一定の時期を境に無くなるように、DNAの中で最初から決められている細胞死であり、ネクローシスは火傷のような外的要因により強制的に引き起こされる細胞死である。

本試験ではこの両細胞死の誘発の有無を明らかとすることを目的としている。

### 試験の要約

I. 細胞を試験プレートに添加。6時間培養。

II. 培養後培養液を取り除く。

III. 検体からの成分抽出液を細胞の上に添加する。48時間培養。

IV. アポトーシス及びネクローシス細胞を確認するため発色液を加え10分間放置する。

V. 正常細胞、死細胞数のカウントが出来る機器（フローサイトメトリー）で細胞数をカウントする。

## 2.9 DNA断片化試験

### 試験の目的

この試験でDNAの断片化（DNAの分裂状況）を調べることで、アポトーシス（プログラム死）誘発の有無を明らかにすることを目的としている。

### 試験の要約

- I. 細胞を試験プレートに添加，6時間培養.
- II. 培養細胞上に試験液を添加，48時間培養.
- III. DNAを取り出す作業を行う.
- IV. DNAを染色する.
- V. DNAを電氣的に分離する.
- VI. DNAの分離状態からアポトーシス誘発の有無を判断する.

## 2.10 蛋白合成阻害試験

### 試験の目的

本試験は細胞がRNAにより，合成するタンパク質を染色することで，蛋白合成量の観察を行い合成量の増減を観察することで毒性の評価を行う。

### 試験の要約

- I. 細胞を試験プレートに入れる，6時間培養.
- II. 培養後培養液を取り除く.
- III. 検体からの成分抽出液を細胞の上に添加する，48時間培養.
- IV. 蛋白質を抽出する.
- V. 蛋白質を着色する.
- VI. 吸光度を測定する機器で吸光度を測定する.

## 3. 試験方法

### 3.1 試験試料

本試験で用いた試料を表1にまとめた。

表1 試験で用いた検体

試料名	主成分又は性状
蛍光顔料	ユーロピウム付活アルカリ土類リン酸塩
着色顔料	無機顔料 (TiO <sub>2</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub> 等) 有機顔料
プライマー	チオール系プライマー
レジン (試作品)	デンティン (A3 シェード) 硬化物
UDMA	ウレタンジメタクリレート
TEGDMA	トリエチレングリコールジメタクリレート

※レジン（試作品）の基本レジンは，既にISO 10993に準拠した試験を行っている為，独自の試験により評価を行った。独自の試験により評価を行った。合わせて比較として，UDMA及びTEGDMAを追加した。

### 3.2 急性毒性試験

#### 3.2.1 試験動物

4週齢のICR系雌雄マウスを購入（試験及び，対照群に対し雌雄それぞれ10匹）し，約1週間の予備飼育を行って一般状態に異状のないことを確認した後，試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ケージに各5匹収容し，室温23℃±2℃，照明時間14時間/日に設定した飼育室において飼育した。

#### 3.2.2 試験液の調整

蛍光顔料，着色顔料，プライマーをそれぞれ純水に懸濁させ，100mg/mlの試験液を調製した。

#### 3.2.3 試験方法

投与前に約4時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後，試験群には雌雄ともに検体投与量として2g/kgの用量を胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。対照群には雌では0.6ml，雄では0.7mlの純水を同様に投与した。

観察期間は14日間とし、投与日は頻回、翌日から1日1回の観察を行った。投与後7及び14日に体重を測定し、t検定により有意水準5%で群間の比較を行った。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。

### 3.3 コロニー形成阻害試験（細胞毒性試験）

#### 3.3.1 使用細胞

V79細胞（チャイニーズハムスター肺細胞）

#### 3.3.2 試験液の調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

検体0.1gに対しMO5培地を1mLの割合で加えて37°Cで24時間抽出し、これを試験原液（100%）とした。この試験原液を0.22μmのフィルターでろ過滅菌後、MO5培地を用いて以下のように希釈した。

蛍光顔料：3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 及び100%

着色顔料：3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 及び100%

##### プライマー

プライマーにおいては、MO5培地を用いて希釈し、これを試験原液（1000μg/mL=100%）とした。

この試験原液を0.22μmのフィルターでろ過滅菌後、MO5培地を用いて以下のように希釈した。

プライマー：3.13, 6.25, 12.5, 25, 50及び100%

#### 3.3.3 試験方法

単層に増殖したV79細胞（チャイニーズハムスター肺細胞）をトリプシン処理によりはく離し、MO5培地を用いて200個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウエルに0.5mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。

培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験、陰性対照試験液及び空抽出試験液を各々4個のウエルに0.5mLずつ加え、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウエルを10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1%メチレンブルー溶液で15分間染色して、コロニー数を計数した。なお、検体については試験を2回繰り返して行った。

### 3.4 復帰突然変異試験（変異原性試験）

#### 3.4.1 使用菌株

今回実験で使用した菌株は変異性サルモネラ菌（TA100, TA98, TA1535, TA1537）及び、大腸菌（WP2 uvrA）を使用した。

#### 3.4.2 試験液の調整

蛍光顔料、着色顔料及びプライマーと、ジメチルスルホキシド（以下DMSO）を50mg/mLの割合になるように遠沈管内で混合し、試験管ミキサーによる攪拌を行い試験原液（100%）とした。さら

にこの試験原液をDMSOを用いて以下のように希釈した。

蛍光顔料・着色顔料・プライマー：3130, 6250, 12500, 25000及び50000μg/mL

陰性対象群にはDMSOを用いた。

#### 3.4.3 試験方法

ブレインキュベーション法（検体の代謝活性処理を行わない場合及び、代謝活性処理を行う場合の両条件）により試験を行った。

所定の濃度に希釈した試験液0.1mL, S9Mix又は0.1mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5mL及び菌懸濁液0.1mLを順次滅菌チューブに加えた。37°Cの恒温槽中で20分間振とう（ブレインキュベーション）した後、これにトップアガー2mLを加え混合して、最小グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37°Cの恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

### 3.5 皮膚感作性試験

#### 3.5.1 試験動物

試験群は9匹、陰性対照群及び陽性対照群（既知感作性物質処置群）はそれぞれ6匹のモルモットを使用した。

#### 3.5.2 試験方法

試験群では蛍光顔料、着色顔料、プライマーの10, 1及び0.1%ワセリン混合物、陰性対照群ではワセリン並びに検体の10, 1及び0.1%ワセリン混合物（検体の試験結果がエラーでないことを確認するため、検体の試験と同様の条件を陰性対象でも行う）をそれぞれ0.1mLずつ2cm×2cmのろ紙に塗布し、あらかじめ剪毛及び剃毛した側腹部に閉鎖適用した。また、陽性対照群はDNCB（2,4-dinitrochlorobenzene）の0.1%（w/v）アセトン溶液を0.01mLずつ開放適用した。

### 3.6 口腔粘膜刺激性試験

#### 3.6.1 試験動物

5週齢の雄シリアンハムスター（ゴールデンハムスター）を購入し、約2週間の予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認した後、各検体に対し15匹ずつ試験に使用した。

試験開始時の体重範囲は69.5～109.7gであった。試験動物はポリカーボネイト製ケージに2～3匹ずつ収容し、室温23°C±2°C、照明時間14時間/日に設定した飼育室において飼育した。

#### 3.6.2 試験方法

試験動物の体重を測定した後、ペントバルビタールナトリウムを40mg/kgの用量で腹腔内投与し、全身麻酔した。頬袋粘膜を傷つけないように慎重に引き出し、生理食塩液で十分洗浄した後、粘膜に炎症などの異常がないことを確認した。キムワイプで水分をふき取った後、頬袋を元に戻し、すべての試験動物の片側頬袋に検体、他側の頬袋に溶媒対照を適用した。適用後、検体および溶媒対照を保持するため頬袋の縫合を行った。

適用期間は2週間とし、適用期間終了後エーテル麻酔下で動物を放血致死させ、頬袋を取り出した。



頬袋を肉眼的に観察した後、ホルマリン系の固定液で固定した。常法に従い、組織を脱水、透徹、パラフィン包埋し、薄切り後ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施した。作製された標本は光学顕微鏡を用いて病理組織学的に観察した。

### 3.7 細胞増殖抑制試験

#### 3.7.1 使用細胞

3T3 Cells (マウス線維芽細胞)

#### 3.7.2 試験液の調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

0.1gに対し細胞培養用培地を1 mLの割合で加え、37°Cで24, 48及び168時間抽出し試験液とした。

##### プライマー, UDMA, TEGDMA

プライマー, UDMA, TEGDMAは培地に難溶であったため、あらかじめDMSOに溶解させた後、以下に示すように培地で段階希釈を行った。

プライマー: 62.5, 125, 500, 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

U D M A: 470 (1,000), 235 (500), 117.5 (250), 58.8 (125)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\mu\text{M}$ )

TEGDMA: 286 (1,000), 143 (500), 71.5 (250), 35.75 (125)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\mu\text{M}$ )

尚この時の試験液中のDMSO濃度は培養細胞への為害性の無い1%以下に調製した。従って、これらの試験液については、希釈した時と同濃度のDMSO希釈液をコントロールとした。

##### レジジン (試作品)

レジジン (試作品) については、検体を水道水、日本薬局方 注射蒸留水 [光製薬株式会社] で順次洗浄し乾燥させた後、クリーンベンチ中で表裏30分間ずつ紫外線照射滅菌を行った。この検体の表面積  $5\text{ cm}^2$  に対し培地を1 mLの割合で加えて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24, 48 及び168時間抽出しこれを試験液とした。

これらすべての試験液を0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過滅菌し、試験に適用した。

#### 3.7.3 試験方法

単層に増殖した3T3細胞をトリプシン処理によりはく離し、培地を用いて  $5 \times 10^4$  個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウェルに1 mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各検体の試験液を1 mLずつ添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養した。

各ウェルの培地を除き、MTT溶液を100  $\mu\text{L}$  ずつ添加した後、37°C、2時間熟成し、100  $\mu\text{L}$  のDMSOを加え、室温で5分間熟成した。

細胞生存率 (Viability) は、マイクロプレートリーダー (THERMOmax: Molecular Devices社) で570nmの吸光度を測定し、コントロールを100%とした時の吸光度比から求めた。なお、全ての試験は繰り返し3回行った。

### 3.8 DNA合成試験

#### 3.8.1 使用細胞

3T3 Cells (マウス線維芽細胞)

#### 3.8.2 試験液の調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

0.1gに対し細胞培養用培地を1 mLの割合で加え、37°Cで24時間抽出し試験液とした。

##### プライマー, UDMA, TEGDMA

プライマー, UDMA, TEGDMAは培地に難溶であったため、あらかじめDMSOに溶解させた後、以下に示すように培地で濃度調整を行った。

プライマー: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

U D M A: 286 (1)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (mM)

TEGDMA: 470 (1)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (mM)

尚この時の試験液中のDMSO濃度は培養細胞への為害性の無い1%以下に調製した。従って、これらの試験液については、希釈した時と同濃度のDMSO希釈液をコントロールとした。

##### レジジン (試作品)

レジジン (試作品) については、検体を水道水、日本薬局方 注射蒸留水 [光製薬株式会社] で順次洗浄し乾燥させた後、クリーンベンチ中で表裏30分間ずつ紫外線照射滅菌を行った。この検体の表面積  $5\text{ cm}^2$  に対し培地を1 mLの割合で加えて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間抽出しこれを試験液とした。

これらすべての試験液を0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過滅菌し、試験に適用した。

#### 3.8.3 試験方法

単層に増殖した3T3細胞をトリプシン処理によりはく離し、培地を用いて  $2 \times 10^5$  個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウェルに100  $\mu\text{L}$  ずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各被験物質の試験液を100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養した。培養終了6時間前に3H-チミジンを1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  加え、取り込まれた3Hの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

### 3.9 細胞傷害性試験

#### 3.9.1 使用細胞

3T3 Cells (マウス線維芽細胞)

#### 3.9.2 試験液の調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

0.1gに対し細胞培養用培地を1 mLの割合で加え、37°Cで24時間抽出し試験液とした。

##### プライマー、UDMA、TEGDMA

プライマー、UDMA、TEGDMAは培地に難溶であったため、あらかじめDMSOに溶解させた後、以下に示すように培地で濃度調整を行った。

プライマー：500  $\mu$ g/mL

U D M A：286 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

TEGDMA：470 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

尚この時の試験液中のDMSO濃度は培養細胞への為害性の無い1%以下に調製した。従って、これらの試験液については、希釈した時と同濃度のDMSO希釈液をコントロールとした。

#### 3.9.3 試験方法

細胞増殖抑制試験と同様に細胞浮遊液の調整を行い、組織培養用ディッシュに3 mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各検体の試験液(100%)を3 mLずつ添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養した。

培養後、浮遊細胞を含めた培養液を遠心チューブ(15 mL)に回収し、PBS(-) 5 mLでディッシュを洗浄し、同じチューブにPBS(-)を回収した。このディッシュに、トリプシン溶液を加え、37°Cで5分間保存し、細胞を遊離させた後、遠心チューブに入れ1,200rpmで5分間遠心し、上清を吸引除去した。この細胞を、蒸留水で10倍に希釈した1×Binding bufferで、細胞密度が1×10<sup>6</sup>個/mLになるように濃度調整を行った。次に、濃度調整を行った細胞浮遊液500  $\mu$ Lをフローサイトメトリー用チューブに入れ、Annexin V-FITC原液5  $\mu$ Lと、Propidium iodide 溶液10  $\mu$ Lを加え、穏やかに混和し、氷水中、暗所で10分間インキュベートし、フローサイトメトリー用試料とした。これとは別に、フローサイトメーターの感度調整及び蛍光補正用として、コントロールの細胞浮遊液を用い、Annexin V-FITC 5  $\mu$ Lのみ、Propidium iodide 溶液10  $\mu$ Lのみを添加したサンプルチューブを用意した。これらの試料についてフローサイトメーターで解析を行った。

### 3.10 DNA断片化試験

#### 3.10.1 使用細胞

3T3 Cells (マウス線維芽細胞)

#### 3.10.2 試験液調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

0.1gに対し細胞培養用培地を1 mLの割合で加え、37°Cで24時間抽出し試験液とした。

##### プライマー、UDMA、TEGDMA

プライマー、UDMA、TEGDMAは培地に難溶であったため、DMSOに溶解させた後、以下に示すように培地で濃度調整を行った。

プライマー：500  $\mu$ g/mL

U D M A：286 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

TEGDMA：470 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

尚この時の試験液中のDMSO濃度は培養細胞への為害性の無い1%以下に調製した。従って、これらの試験液については、希釈した時と同濃度のDMSO希釈液をコントロールとした。

##### レジジン(試作品)

水道水、日本薬局方 注射蒸留水[光製薬株式会社]で順次洗浄し乾燥させた後、クリーンベンチ中で表裏30分間ずつ紫外線照射滅菌を行った。この検体の表面積5 cm<sup>2</sup>に対し培地を1 mLの割合で加えて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間抽出しこれを試験液とした。

これらすべての試験液を0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌し、試験に適用した。

#### 3.10.3 試験方法

単層に増殖した3T3細胞をトリプシン処理によりはく離し、培地を用いて1×10<sup>5</sup>個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用ディッシュに3 mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。培養後、細胞がディッシュの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各検体の試験液を3 mLずつ添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養した。

この培養細胞を、cell scraper を用いてエッペンドルフチューブに集め、2,000rpmで5分間遠沈し、TRIZOLReagentを1 mL加え、細胞を溶解させた。この細胞溶解液に0.2 mLのクロロホルムを加え、15秒間攪拌し、室温で2～3分間保持した後、12,000rpmで15分間(4°C)遠沈した。透明な上清を吸引除去し、残った懸濁層に100%エタノールを300  $\mu$ L添加し、2～3分間保持した後、2,000rpmで5分間遠沈した。上清を吸引除去し、0.1M sodiumu citrate (in 10% ethanol)を500  $\mu$ L添加し、30分間室温放置後、再び2,000rpmで5分間遠沈し、上清を除去した。再度0.1M sodiumu citrate (in 10% ethanol)を500  $\mu$ L添加し、同様に上清を吸引除去した後、75%ethanolを1 mL添加した。これを、20分間放置した後、2,000rpmで5分間遠沈し、上清を除去することによりDNAを抽出した。

DNAの定量は、TEバッファーを20  $\mu$ L添加し、DNAを溶解させた後、260nmの吸光度から計算した。

この定量結果をもとに、DNA量が一定(0.05  $\mu$ g)になるように、DNA溶解液を採取し、泳動用バッファーと混合した(DNA溶解液：泳動用バッファー=6：1)。電気泳動用アガロースゲルはSeaKem ME agaroseを、TAEバッファーで1.8%に希釈して使用した。電気泳動は、Mupid-2plusを用い、定電圧100Vで1時間行った。DNAの検出は、Ultraspec 3000にて行った。

### 3.11 蛋白合成阻害試験

#### 3.11.1 使用細胞

3T3 Cells (マウス線維芽細胞)

#### 3.11.2 試験液調整

##### 蛍光顔料・着色顔料

0.1gに対し細胞培養用培地を1mLの割合で加え、37°Cで24時間抽出し試験液とした。

##### プライマー、UDMA、TEGDMA

プライマー、UDMA、TEGDMAは培地に難溶であったため、あらかじめDMSOに溶解させた後、以下に示すように培地で濃度調整を行った。

プライマー：500  $\mu$ g/mL

U D M A：286 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

TEGDMA：470 (1)  $\mu$ g/mL (mM)

尚この時の試験液中のDMSO濃度は培養細胞への為害性の無い1%以下に調製した。従って、これらの試験液については、希釈した時と同濃度のDMSO希釈液をコントロールとした。

##### レジン (試作品)

レジン (試作品) については、検体を水道水、日本薬局方 注射蒸留水 [光製薬株式会社] で順次洗浄し乾燥させた後、クリーンベンチ中で表裏30分間ずつ紫外線照射滅菌を行った。この検体の表面積5cm<sup>2</sup>に対し培地を1mLの割合で加えて、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間抽出しこれを試験液とした。

#### 3.11.3 試験方法

DNA合成試験と同様に細胞浮遊液の調整を行い、1mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各検体の試験液(100%)を1mLずつ添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で48時間培養した。

培養後、各ウエル中の試験液をエッペンドルフチューブに移し、2,000rpmで5分間遠沈し、上清を吸引除去した。このチューブに、Phenyl methyl sulfonyl fluoride の2-プロパノール溶液(0.2mM)5  $\mu$ LとTNEバッファー1mLの混合溶液100  $\mu$ Lを加え、十分にピペッティングを行った後、元の各ウエルに内容を戻し、氷水上で15分間保持した。各ウエルの細胞をピペッティングにより剥離させ、チューブに回収後、12,000rpmで15分間遠沈し、上清を新しいチューブに移した。

この上清2.5  $\mu$ Lと、BCA Protein Assay Reagent (PIERCE) 200  $\mu$ Lを混合し、570nmでの吸光度を測定し、蛋白定量を行った。

## 4. 試験結果

### 4.1 急性毒性試験

#### 4.1.1 死亡例

雌雄ともに観察期間中に死亡例は認められなかった。

#### 4.1.2 一般状態

雌雄ともに観察期間中に異常は認められなかった。

#### 4.1.3 体重変化

投与後7及び14日の体重測定で雌雄ともに、いずれの試験群も対照群との間で、体重増加に差は認められなかった(図1)。

#### 4.1.4 剖検所見

観察期間終了時の剖検では、雌雄ともに全ての試験動物の主要臓器に異常は認められなかった。

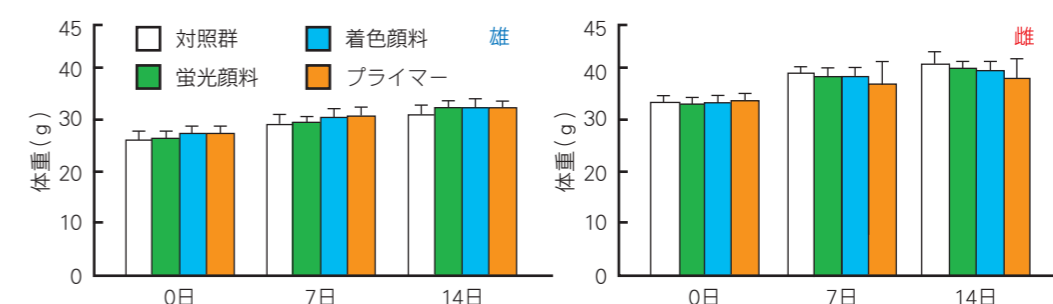


図1 急性毒性試験結果 (体重の変化)

### 4.2 コロニー形成阻害試験

蛍光顔料抽出液では、いずれの濃度の試験液においてもコロニー数の減少は認められなかった(図2)。この時の陰性対照試験液におけるコロニー形成率は、空抽出液に対して低下は認められなかった。着色顔料抽出液では、試験液濃度の増加に伴いコロニー数の減少が見られ、50%抑制濃度は約39%であった。

プライマーについては、試験液濃度の増加に伴いコロニー数に減少が認められたが、IC<sub>50</sub>値は求められなかった。

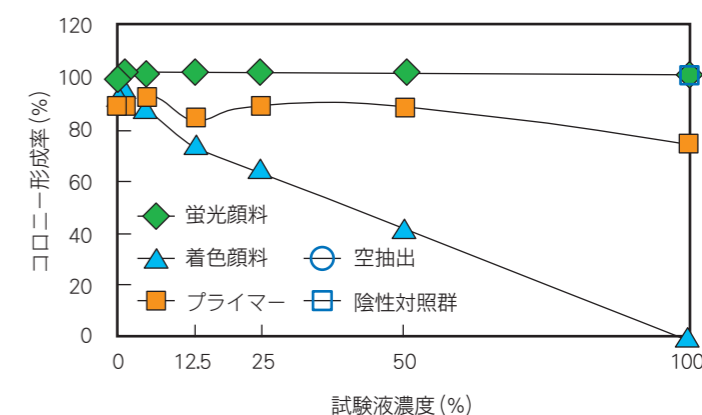


図2 コロニー形成阻害試験結果

### 4.3 復帰突然変異試験

全検体では陰性対照に比べて、用量依存的もしくは2倍以上の復帰変異コロニー数の変化は認められなかった(図3)。

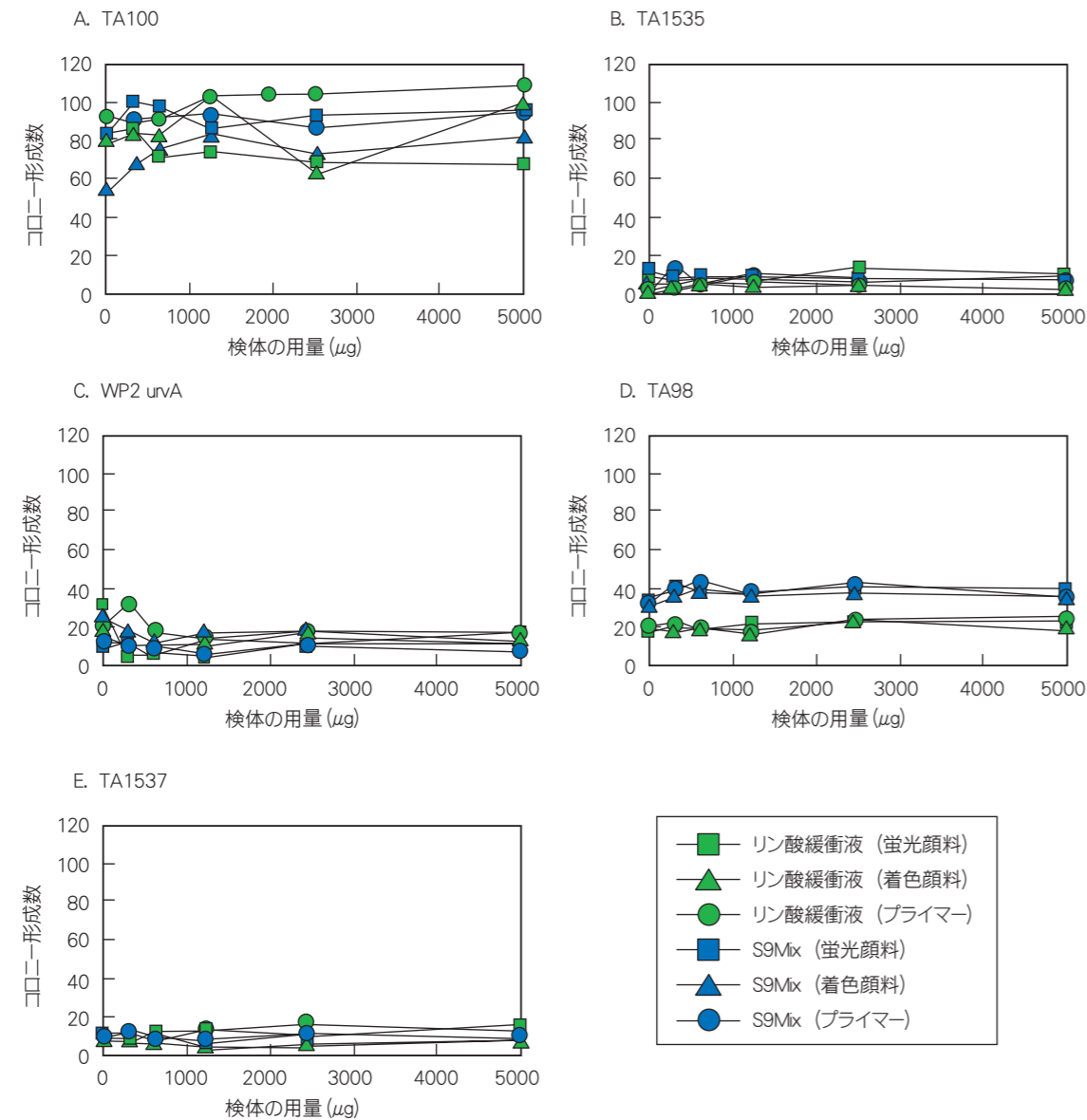


図3 細菌を用いた復帰突然変異試験結果

### 4.4 皮膚感作性試験

試験群では、適用後48及び72時間において、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められず、陽性率は誘発後48及び72時間のいずれも0%であった(表3)。

陰性対照群においても、誘発後48及び72時間においていずれの適用部位においても皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照群では誘発後24時間にはっきりした紅斑が見られ、48時間に中程度紅斑ないし高度紅斑が見られた。また72時間には壊死及び痂皮形成が認められた。陽性率は誘発後24, 48, 及び72時間後でいずれも100%であった。

表3 皮膚感作性試験結果

郡	試験動物数	適用濃度	観察時間(時間)	陽性率(%)	郡	試験動物数	適用濃度	観察時間(時間)	陽性率(%)				
蛍光顔料	9匹	10%	48	0	陰性対照群	9匹	10%	48	0				
			72	0				72	0				
		1%	48	0			0.1%	48	0				
			72	0				72	0				
		着色顔料	9匹	10%			48	0	陽性対照群	6匹	0.1w/v %	24	100
							72	0				48	100
1%	48			0	72	72	100						
	72			0		72	100						
プライマー	9匹			10%	48	0	陰性対照群	9匹			0%	48	0
					72	0						72	0
		1%	48	0	10%	48			0				
			72	0		72			0				

### 4.5 口腔粘膜刺激性試験

①角質層及び、上皮の肥厚化②腫瘍の形成③炎症性細胞の浸潤④血管拡張は、全ての検体に対して示されなかった(写真1~3)。

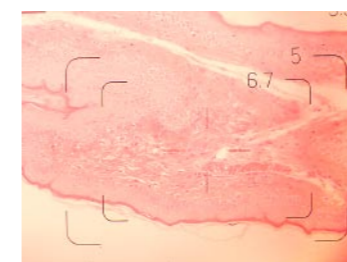


写真1 蛍光顔料

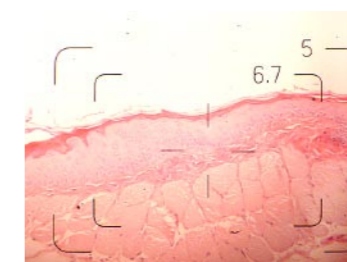


写真2 着色顔料

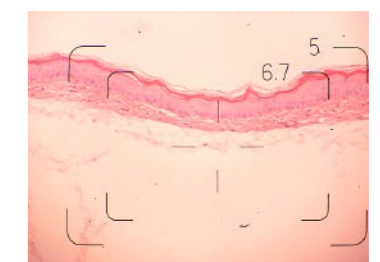


写真3 プライマー

#### 4.6 細胞増殖抑制試験

蛍光顔料は、抽出時間による細胞増殖抑制効果は認められなかった。レジン（試作品）は、抽出時間168時間でわずかな細胞生存率の低下が見られた。着色顔料では、抽出時間とともに細胞生存率の低下が見られ、抽出時間168時間では、細胞生存率が約30%にまで低下した。この時の細胞生存率が50%となる抽出時間は、約95時間であった。

プライマーについては、すべての試験液濃度で細胞増殖抑制効果は認められなかった。TEGDMAにおいては約30%、UDMAでは約15%にまで細胞増殖率が低下した。

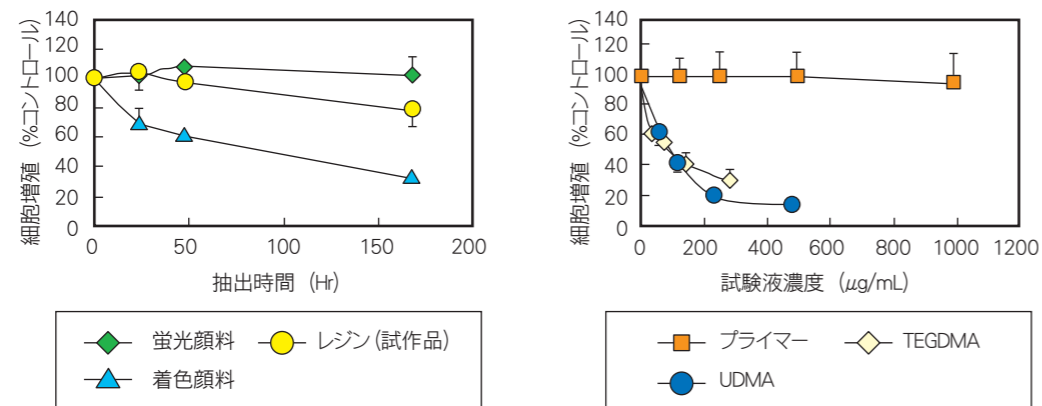


図4 細胞増殖阻害試験結果

#### 4.7 DNA合成試験

放射線活性量は、コントロールに対してレジン（試作品）は同等であったが、蛍光顔料では約78%上昇し、着色顔料では逆に約38%低下した。プライマーにおいては約23%の上昇を示し、UDMA及びTEGDMAにおいては98%以上の低下を示した。

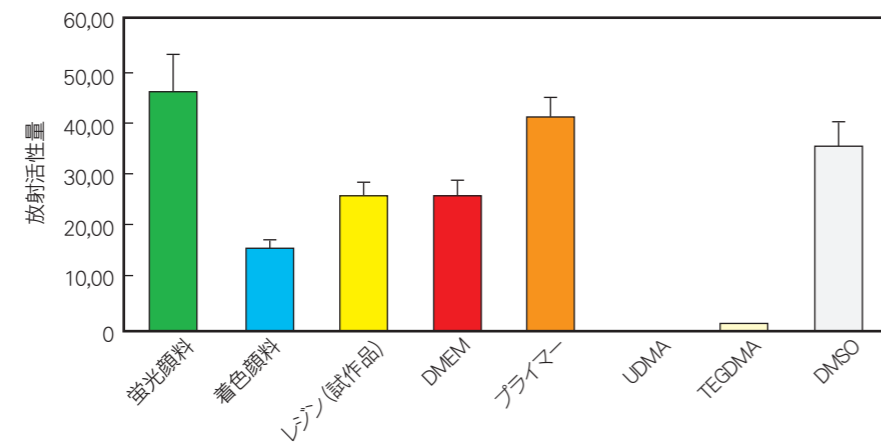


図5 DNA合成試験結果

#### 4.8 培養細胞を用いた細胞傷害性試験

本試験においては、全ての検体において特筆すべき細胞死の誘発は見られなかった。

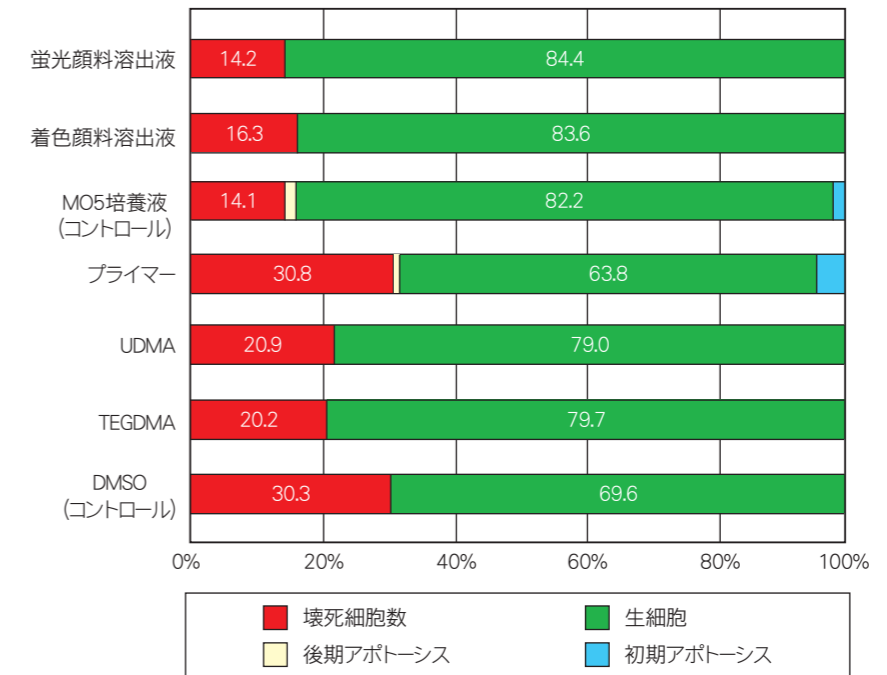


図6 細胞傷害性試験結果

#### 4.9 DNA断片化試験結果

全ての検体でDNAの分解は認められたものの、コントロールのものとの間に差は認められず、さらにアポトーシスに特徴的なDNA断片化は見られなかった（写真4）。

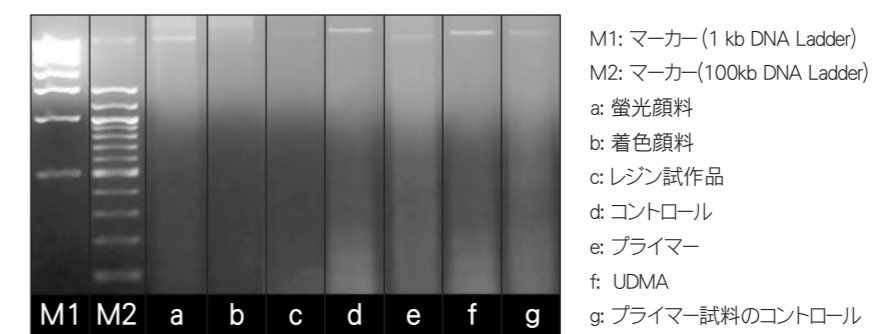


写真4 DNA断片化試験結果

#### 4.10 蛋白合成阻害試験

蛍光顔料及びレジン（試作品）においてはコントロールに比べ、蛋白合成量の低下は認められなかった（図7）。しかし、着色顔料では、コントロールに比べ、約23%の低下がみられた。プライマーがコントロールに対して約6%の低下であった。更に、UDMAが約52%の低下、TEGDMAが約25%の低下となった。

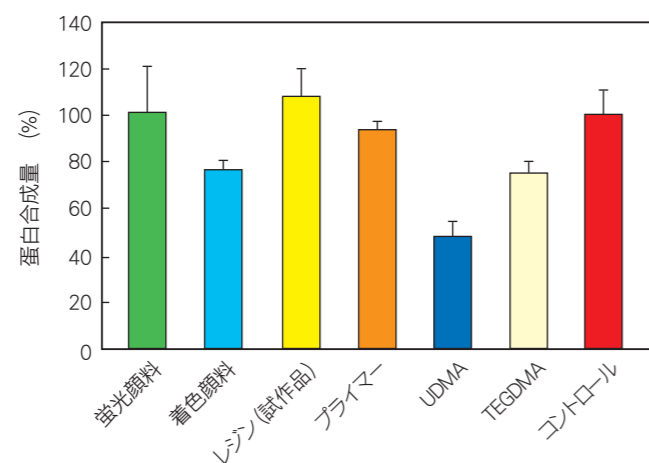


図7 蛋白合成阻害試験結果

## 5. 考察

### 5.1 急性毒性

マウスの体重変化及び、臓器の形状変化は、いずれの検体においても見られなかったことから、急性的な毒性を有さない物質であることが明らかとなった。

### 5.2 細胞毒性

レジン系材料の生物学的評価報告としては、UDMA、TEGDMAの細胞毒性報告がある。報告によればIC<sub>50</sub>値はそれぞれ0.12~0.26mM, 0.06~0.47mMとされている。<sup>11~12)</sup>

今回試験した蛍光顔料、着色顔料、レジン（試作品）及び、プライマー、UDMA、TEGDMAに対する細胞毒性試験において、特に着色顔料で細胞増殖抑制作用が認められた。このような細胞増殖抑制作用は、細胞が死滅することで引き起こされるか、あるいは、細胞周期の進行に遅れが生じるためではないかと考えられる。これらの可能性を明らかにするため、細胞障害性試験により、アポトーシス及び、ネクローシス誘発の有無を検討したが、どちらも誘発されていなかった。このことから、今回示されたコロニー形成阻害作用などは、着色顔料により細胞死が引き起こされたのではなく、細胞周期に何らかの形で影響を与え、遅延化した為に起こった可能性が高いと考えられた。

更に、これまでにレジンの細胞毒性試験報告で、未重合は顕著な細胞増殖抑制を示すのに対し、重合後の硬化物ではほとんど増殖抑制を示さなくなる事が報告されている。<sup>13)</sup>今回用いたレジン（試作品）も重合後の硬化物試料として用いた。その結果いずれの細胞毒性試験においても、異常が認められず、これまでのレジン系材料の生物学的評価報告と同様の結果であり、今回細胞増殖抑制が見られた着色顔料についても、安全性面において影響は無いものと考えられる。

### 5.3 遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異原性試験において、全ての検体で陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異性は陰性であると考えられ、発がんなどDNAの変異により引き起こされる病気のリスクは、特筆すべきレベルではないと考えられる。

### 5.4 皮膚感作性

モルモットを用いた皮膚感作性試験結果において、試験群では適用後48及び72時間で、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められず、陽性率は0%であった。これらの試験結果と陰性対照群及び、陽性対象群の試験結果を比較すると陰性対象群では試験群と同様にいずれの適用部位においても皮膚反応は認められず、陽性率は48及び72時間のいずれも0%であったことから、本試験で用いた物質は特筆すべき感作リスクを示さない物質であると考えられる。

### 5.5 口腔粘膜刺激性

肉眼的観察では検体及び溶媒対照適用頬袋のすべての例で刺激反応は見られなかった。病理組織学的観察では、蛍光顔料、プライマー検体及び溶媒対照適用頬袋すべての例で刺激反応が見られなかった。着色顔料においては、検体適用頬袋で15例中8例で角質層の肥厚が見られた。ただし、反応の

範囲は局所的で、程度もごく弱いものであった。

以上のことから、本試験で用いた物質はハムスター口腔粘膜に刺激性を示さないものと考えられた。

## 6. 結論

*in vitro* における試験結果では、着色顔料で主に細胞増殖抑制が示された。しかしながら、細胞傷害性試験においてはアポトーシス及びネクローシスの誘発は見られなかった。これらのことから、コロニー形成阻害試験及び、細胞増殖阻害試験で見られた細胞増殖抑制は、着色顔料による細胞死の誘発に起因するものでは無く、着色顔料の影響を受けて、細胞周期の進行が遅くなっているためではないかと考えられる。

また細菌を用いた復帰突然変異試験において、コロニー形成が見られず、細菌のDNA変異を誘発しないことが明らかとなった。このことから発がん性などDNAの変異に関連した疾患の発病のリスクはないと考えられる。

モルモットを用いた皮膚感作静試験では感作性を示さなかった。このことから、今回試験に用いた物質は、感作のリスクが標準レベル以下であると考えられる。

本試験は、高知大学医学部 腫瘍病態学 口腔腫瘍制御学講座との  
共同研究で実施されたものである。

## 《参考文献》

- 1) 西本由美子, 星川 武, 安楽照男, 山本裕久. 歯冠用硬質レジンにおけるSiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub>系フィラーの屈折率と光透過性, 日本歯科技工学会雑誌22; 106-111, 2001
- 2) 岸本吉則, 星川 武, 山本裕久, 安楽照男. ゾル-ゲル法を用いた歯冠用硬質レジンの開発 I. 機械的性質について, 日本歯科技工学会雑誌23; 88-92, 2002
- 3) 宮崎 愛, 岸本吉則, 星川 武, 山本裕久, 安楽照男. ゾル-ゲル法によるフィラーを用いた歯冠用硬質レジンの開発 II. オパール特性について, 日本歯科技工学会雑誌23; 88-92, 2002
- 4) 岸本吉則, 星川 武, 安楽照男, 山本裕久. 歯科用硬質レジンの開発-歯ブラシ磨耗特性-, 日本歯科技工学会雑誌24; 61-66, 2003
- 5) 岸本吉則, 星川 武, 山本裕久, 安楽照男. 動的粘弾性測定による歯冠用硬質レジンの評価, 日本歯科技工学会雑誌24; 67-71, 2003
- 6) 小池宏典, 岸本吉則, 安楽照男, 山本裕久. チオール化合物を用いた硬質レジン用プライマーの開発, 日本歯科技工学会雑誌24; 79-83, 2003
- 7) 岸本吉則, 山崎啓嗣. チオール化合物を用いた硬質レジン用プライマーの開発, 日本歯科技工学会雑誌25; 71-79, 2004
- 8) Hirohisa Yamamoto, Takahiro Kato, Ai Miyazaki, Takeshi Hoshikawa and Teruo Anraku. Syntesis of SiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> Fillers by Emulsion Method and Optical Properties of Composite Resins with Fillers, PROCEEDINGS OF THE 19TH KOREA-JAPAN INTERNATIONAL SEMINAR ON CERAMICS 21~23; 304-308, 2002
- 9) 新谷明喜, 五味治徳, 陶材に比肩する最近の硬質レジン, 歯科技工; 32, 263-268, 2004
- 10) 田仲持朗, 高橋英和, 中村正明, 鈴木一臣. 内分泌攪乱物質を含まない高強度・高弾性・高靱性歯科用レジンの開発, 日歯医学学会誌; 23, 70-75, 2004
- 11) Angelika Rzanny, Dr, Roland Gobel, Dr, Dieter Welker, Prof, Dr. 今日の前装用レジン-科学的研究, QDT; 29, 75-83, 2004
- 12) 今井庸二, 平林 茂, 西山典宏. 21世紀における, 歯科材料の生物学的安全性について -とくに内分泌攪乱作用に関して-, 歯科・材料器機; 21, 220-260, 2004
- 13) 今井弘一, 上田明博, 中村正明. 光造形用レジンの細胞生存率について, 歯科材料・器機; 23, 148, 2004

## 《安全性試験レポート 既刊》

---

- Vol.1 国際水準の品質と安全を求めて(2004年12月)
- Vol.2 「ZEO METAL」シリーズ 溶出試験と*in vitro*による細胞毒性試験(2005年6月)
- Vol.3 メタルセラミック修復用貴金属合金及び金合金 溶出試験と*in vitro*による細胞毒性試験(2005年12月)
- Vol.4 「ルナウイング」の生物学的評価(2006年6月)
- Vol.5 高カラット金合金の物性・安全性レポート(2007年10月)
- Vol.6 歯科材料の物性から生物学的影響まで 硬質レジン、メタルセラミック修復用合金、金合金における検討(2008年5月)
- Vol.7 金合金「ネクシオキャスト」の物性・安全性レポート(2008年10月)

編集者 安楽 照男  
発行者 山本 隆彦  
印刷所 株式会社 ウラノ 大阪  
発行年月日 2006年6月1日



## YAMAKIN株式会社

本社：〒543-0015 大阪市天王寺区真田山町3番7号 TEL.(06)6761-4739(代) FAX.(06)6761-4743  
生体科学安全研究室：〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部 歯科口腔外科学講座研究室内  
東京・大阪・名古屋・福岡・仙台・高知・生体科学安全研究室  
<http://www.yamakin-gold.co.jp>

