新規 HAP bioceramics, Kobeceram[®]の 変異原性ならびに抗原性

大 住 伴 子・東 泉・小 住 佳 子
勝 田 高 史・黒 木 賀代子

九州歯科大学歯科薬理学講座 (主任: 黒木賀代子教授)

平成 7 年 6 月 26 日受理

Mutagenicity and Antigenicity of a Newly Developed HAP Bioceramics, Kobeceram[®]

Tomoko Ohsumi, Sen Higashi, Keiko Ozumi,
Takahumi Katsuta and Kayoko Kuroki

Department of Dental Pharmacology (Chief: Prof. Kayoko Kuroki)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Kobeceram[®] (KC) has many characteristic advantages in chemical composition, shape, solubility behavior on the osteoconduction and stability of hydroxyapatite (HAP) granules, and is known to be useful for osteoplasty and dental implantation.

In this paper mutagenicity and antigenicity of KC are described. A mutation test was carried out by observing reverse mutation with use of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 strains, and 2-aminoanthracene was provided for positive control. Moreover, it was tried to develop active sensitization to KC and Sudan I, a positive control material, in guinea pigs by the adjuvant and patch test method. Then, neither mutagenicity nor skin sensitizing potential of KC was detected. From the above, it might be surmised that KC scarcely shows carcinogenicity and antigenicity in the human beings, even though much difficulty is pointed out in evaluating safety by extrapolation from bacterial or animal evidence.

Key words : HAP / Bioceramics / Mutagenicity / Antigenicity

緒 言

hydroxyapatite (HAP) を焼結して作られたリン酸カルシウム系 ceramics (以下 HAP-C) の生体材料としての試用は二十数年前に始まり, その生物学的特性として, 極めて局所為害性が低く, 組織親和性に優れていること¹⁻³⁾が注目されてきた. 高橋ら (1981)⁴⁾ は HAP-C を硬組織代替材料として整形外科領域に応用し, 有用性の高いことを報告した. 一方, 鴨井ら (1984)⁵⁾ は歯

周領域で骨欠損部への応用を検討し, また, 中川 (1983)⁶⁾, 有泉 (1985)⁷⁾ らは, 歯髓組織ならびに根端部周囲組織において良好な癒着治癒, 骨性閉鎖, 歯槽骨再生・添加の機転を招来することを認めている.

HAP-C が備えているこのような特性を bioceramics として活用できるように, 歯科領域では根管充填材, 骨欠損補填材, 骨移植材料, 歯科インプラント材などへの応用に向けて, 新しい材品の開発研究が行われてきた.

Kobeceram[®] (以下 KC) は歯科用骨増量材として開

発、製品化された新規の HAP-C[®] である。すなわち、インプラント時の歯槽堤造成、顎切除時の再建への適応性を拡大し、歯周疾患の歯槽骨欠損部の補填、歯根膿胞や良性腫瘍摘出腔の骨修復への応用を始め、歯周、保存、補綴、口腔外科での骨欠損部の補填を目的としたもので、商品としては歯科用骨補填材に分類される。

一般に HAP-C は、HAP の純度、添加物や温度などの焼結条件により、性状や品質の上で種々のものが生成される。それが生体適合性の良否や生理活性の強弱に影響する可能性があり、実際に焼結温度の異なる材品間で局所作用に差異が認められ、高温焼結の方がやや優れているという報告⁷⁾もある。また、KC の場合、焼結時に β -calciumphosphate を添加するが、無添加のもの、あるいは他の化合物 (calcium oxide など) を添加したものに比べて、骨複合体の形成が良好であることが明らかにされている⁸⁾。

従来、HAP-C の生体に及ぼす影響については、このように応用部位の局所組織反応を中心に検索されてきた。全身作用についての詳しい報告を見出せないが、その物理化学的な性状からみて、KC を含めて HAP-C の生理活性はいずれも弱く、例えば経口投与による急性毒性に関しても、おそらく極めて低い範疇 (slightly toxic⁹⁾) に分類されるのではないかと考えられる。

しかしながら、全身作用を現さない程度の用量であっても発癌性や遺伝毒性を呈することは有りうる。また、長期にわたる接触、曝露により薬物アレルギーを起こすことも危惧される。生体材料として上述のように優れた特性を備えている KC の有用性を確立するためには、こうした観点からも安全性評価が必要である。本論文では微生物を使用した遺伝子突然変異試験を行って変異原性の検索を行い、また、モルモットを使用した皮膚感作性試験を行って抗原性の検索を行い、KC の安全性について検討を加えた。

方 法

A. 供試材料

KC は日本歯科薬品より提供されたものを使用した。

B. 変異原性の検討

細菌を用いて次の復帰突然変異試験を行った。

1. 試験菌

Salmonella typhimurium TA 98 および TA 100 株 (IFO 14193 および IFO 14194, 発酵研究所)

2. 用量段階

KC は水および dimethyl sulfoxide (以下 DMSO)

のいずれにも不溶であるので、乳鉢中で粉碎したものを実験の直前に DMSO (Infinity pure, 和光純薬工業) で懸濁液を調製した。

まず、予備実験としてできるだけ高濃度の懸濁液 (1 g/ml) を調製して抗菌性を調べたところ、陰性であった。抗菌性を示さない場合は 5 mg/plate が用量の限度とされているところから¹⁰⁾、5, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3 mg/plate で試験を行うことにした。

3. 対照

実験ごとに陰性および陽性の対照をおいた。陰性対照は溶媒の DMSO のみとし、陽性対照として既知変異原物質の中から 2-aminoanthracene (試薬, 和光純薬工業) を選定し^{10,11)}、DMSO に溶解して用いた。用量は予備実験結果から 0.5 μ g/plate とした。

4. 試験方法

Ames 原法¹²⁾に液体法の preincubation 法を導入した矢作 (1975)¹³⁾の方法に従った。すなわち、試料懸濁液 0.1 ml, 菌懸濁液 0.1 ml, S9 mix 0.5 ml を混和し、37°C で 20 分間 preincubation した。用いた S9 mix は、phenobarbital と 5,6-benzoflavone 誘導ラット肝 S9 分画 (オリエンタル酵母) と cofactor I (オリエンタル酵母) を 1:9 の比率で混和して調製した。この割合は、予め S9 添加量を求めたところ、最終濃度 50 μ l/plate が最適条件であったことに基づいて決定した。preincubation 終了後、L-histidine (和光純薬工業) 0.5 mM および biotin (和光純薬工業) 0.5 mM を添加して 45°C の恒温槽に保温しておいたソフトアガー (Difco Lab. 製の Agar noble を用いて調製) 2 ml を混和し、平板に調製した最少 glucose 寒天培地 (直径 90 mm, 厚さ 5 mm, テスメディア[®]-AN, 日清製粉) 上に重層した。各用量の plate 数は 6 枚とし、37°C で 48 時間倒置培養後、His⁺ 復帰変異コロニー数を測定した (Fig. 1)。

陽性判定の基準は、plate 当たりの復帰変異コロニー数が自然コロニー数 (陰性対照) の 2 倍以上に増加し、かつ、用量依存性が認められた場合とした¹⁴⁾。

C. 抗原性の検討

動物皮膚において接触感作を惹起する危険性を次の方法で試験することにより抗原性を検討した。

1. 試験動物

若齢白色モルモット (Hartley 系, クリーン, 雄性, 月齢約 1 か月, 九動) を購入し、1 週間の予備飼育により、健康状態のチェックと環境馴致を行ったのち、使用した。実験開始時体重は平均値 367.2 g, 標準偏差は 7.4

Fig. 1 The preincubation-method by Yahagi¹³⁾.

gであった。

2. 試験群および動物数

KC感作群5匹、陽性対照感作群5匹および陰性対照群（下記の基剤および免疫増強剤による処置のみを行ったもの）5匹の計15匹を使用した。

3. 陽性対照

陽性対照にはSatoら（1981）¹⁵⁾の報告を参考にして、Sudan I（メーカー一級規格品、和光純薬工業）を使用し、感作誘導には0.1%，感作誘発には0.0001，0.001，0.01，0.1%をそれぞれ用いた。

4. 試験方法

外用医薬品の接触感作性の危険性を予測する方法は数種類あるが、免疫増強剤使用の有無により大別される。免疫増強剤を用いた方法は感度がより高いと考えられることより、本研究ではその中からAdjuvant and patch test法を選んだ^{15, 16)}。手順は次の3段階から成り、概要をFig. 2に示す。

1) 感作誘導

実験開始第1日目に電気バリカンで刈毛後、さらに剃毛したモルモットの頸部背側皮膚（約2×4 cm）の四隅に、蒸留水と免疫増強剤Freund's complete adjuvant（Difco Lab.）を容積比1:1で混和した油中水型乳化

Fig. 2 Adjuvant and patch test schedule.

物（E-FCA）を0.1 mlずつ皮内注射した。次に注射部位に角質層に留まる程度の井型の傷をつけた。黄色ワセリン（日本薬局方）を基剤として、乳鉢で粉碎したKCを50%の割合で含む軟膏剤を調製し、その0.1 gを各井型傷上に閉塞適用した。閉塞にはpatch test用絆瘡膏（直径15 mm，鳥居薬品）と外科用ドレープ材（Steri-Drape, 3M）を用い、適用時間は24時間とした。第2日目、第3日目も第1日目と同一部位に同一方法で再度井型傷をつけ、KCの24時間閉塞適用を行い、第4日目にその適用を終了した。

第8日目に至り、上記の皮内注射部位に黄色ワセリンを基剤とした10% sodium lauryl sulfate（メーカー一級規格品、和光純薬工業、以下SLS）の適量を塗付し、次に適用するKCの経皮吸収促進を図った。第9日目に黄色ワセリンを基剤とした50% KC 0.2 gをろ紙（2.5×4 cm, Advantec Co）に塗付し、外科用テープ材（Blenderm, 3M）で48時間閉塞適用を開始、第11日目にその適用を解除して感作誘導処置を終えた。

2) 感作誘発

実験開始第22日目にKCの開放適用を行った。すなわち、モルモットの側腹部を刈毛し、剃毛後KCの懸濁液0.01 mlを直径15 mmとなるように直接塗付して、乾燥するまで動物を保定した。懸濁液中のKC濃度は2.5，10，25，50%の4段階とした。

3) 判定

Table 1 Evaluation of skin reaction
(scale for scoring)

(1)Erythema formation	
No erythema	0
Very slight erythema	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema to slight eschar formation	4
(2)Edema formation	
No edema	0
Slight edema	1
Moderate edema	2
Severe edema	3

$$\text{Mean response(MR)} = \frac{\sum_{i=1}^n [(1)+(2)]}{\text{Total number of animals}}$$

実験開始第 23 日目と 24 日目, すなわち, 感作誘発後 24 時間及び 48 時間における皮膚反応を判定表 (Table 1) によって評価し, 評点から Mean response (MR) 値を求めた。また, 試験期間を通して動物の全身状態について観察するとともに, 試験第 1, 8, 15, 22 および 24 日目に体重測定を行った。

実験結果

A. 変異原性

復帰突然変異試験の結果を Table 2 に示す。

陽性対照 2-aminoanthracene では復帰変異株コロニー数の平均値は供試菌 TA98 では 154, TA100 では

428 であり, 陰性対照 DMSO のそれを 1 とした比較値を求めると, それぞれ, 6.0, 2.0 であった。KC の場合は用量 5.0, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3 mg/plate において DMSO に対する比較値がそれぞれ, TA98 では 1.0, 1.2, 1.1, 1.2, 1.2, TA100 では 1.2, 1.1, 1.1, 1.1, 1.0 となっており, いずれも 2.0 に満たない値であった。また, KC の各用量における復帰変異株コロニー数平均値はいずれも, DMSO の値と比較して有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

B. 抗原性

Adjuvant and patch test 法で KC の皮膚感作性を検索した結果は Table 3 に示す通りであった。陽性対照 Sudan I では感作誘発によって 24 時間後に明瞭な紅斑と浮腫を生じたが, KC では, 陰性対照と同様に全く変化が認められなかった。

試験期間中の体重変化を Table 4, 5 に示す。KC 感作群と陰性対照群との間に差異は見られなかった。陽性対照群では体重増加量が陰性対照群よりもやや少ない傾向が見られたが, 感作誘導後も感作誘発後も陰性対照群との間に有意差を認めるには至らなかった ($p > 0.05$)。また, モルモットの全身状態の観察では, いずれの群も特記すべき変化は見られず, 運動性の変化も見られなかった。

考 察

A. 変異原性について

Salmonella Typhimurium TA1537, TA1538, TA98 などは histidine 生合成酵素系を支配している DNA 上に frameshift 変異の起こった変異株であり, TA1535,

Table 2 His⁺ revertant colonies of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

	Concentration Dose/plate	No. of His ⁺ revertant colonies	
		TA98	TA100
Kobeceram [®]	5.0mg	26 ± 7	246 ± 39
	2.5mg	30 ± 12	227 ± 39
	1.3mg	29 ± 5	228 ± 40
	0.6mg	30 ± 7	226 ± 46
	0.3mg	30 ± 4	220 ± 27
2-aminoanthracene	0.5μg	154 ± 43	428 ± 92
Control	0.1ml	26 ± 7	213 ± 29

Values are mean ± S. D. (n=6).

No significant difference is found between Kobeceram[®] and DMSO ($p > 0.05$) in each strain in any dose.

Table 3 Score on antigenicity

Concentration(%)			24 hrs			48 hrs		
			FR		MR	FR		MR
			Erythema	Edema		Erythema	Edema	
Induction Challenge								
Kobeceram [®]	50.0	2.5	0/5	0/5	0	0/5	0/5	0
	50.0	10.0	0/5	0/5	0	0/5	0/5	0
	50.0	25.0	0/5	0/5	0	0/5	0/5	0
	50.0	50.0	0/5	0/5	0	0/5	0/5	0
Sudan I	0.1	0.0001	1/5	0/5	0.2	0/5	0/5	0
	0.1	0.001	2/5	0/5	0.6	1/5	0/5	0.2
	0.1	0.01	4/5	1/5	2.0	4/5	2/5	1.8
	0.1	0.1	5/5	4/5	3.4	5/5	2/5	2.6
Control			0/5	0/5	0	0/5	0/5	0

FR ; Fractional response = Positive/Total MR ; Mean response

Table 4 Body weight of guinea pigs during the sensitization test (g)

Sample	Day		
	1st	22nd	24th
Kobeceram [®]	367.0±8.4	492.4±29.3	500.2±31.0
Sudan I	366.6±7.4	468.0±19.4	467.2±20.9
Control	368.0±7.0	489.6±21.2	498.0±21.5

Values are mean ±S.D. (n=5)

Table 5 Body weight gain of guinea pigs in the sensitization test (g)

Sample	Term	
	1st~22nd day	1st~24th day
Kobeceram [®]	125.4±29.0	133.2±30.7
Sundan I	101.6±17.4	101.0±19.1
Control	121.6±23.3	130.0±23.8

Values are mean ±S.D. (n=5)

No significant difference is found between Kobeceram[®] and control (p>0.05).

TA100などは basesubstitution 変異の起こった変異株である。とくに今回使用した TA98と TA100は薬剤耐性 plasmid が組み込まれて、突然変異に対する感受性の高くなった試験株である¹⁷⁾。また、今回用いた試験方法では、微生物が哺乳類と同様の化学物質代謝活性化機能を持たないことを考慮し、薬物代謝系の誘導処理を

行ったラット肝ホモジネートから調製した S9 mix¹³⁾を加えた。さらに、preincubation 段階を導入することによって、被検物質の代謝効率と代謝産物の菌への浸透性を高めた。これらのことから、今回の方法は、微生物を使用した変異原性試験法としては極めて感度の高い方法であると言える。

この試験において、今回 KC 群で histidine 要求性から非要求性に復帰した細菌数は、陰性対照 DMSO 群で観察された自然復帰コロニー数と差異がないことが判った。すなわち、変異原性は陰性であると判定された。

細菌での変異原性試験結果がヒトにおける発癌性の予測に用いられているのは、細胞の突然変異を発癌の原因とする仮説に基づいている。一方、Ashby ら (1991)¹⁸⁾ は今回のような細菌を用いる変異原性試験とげっ歯類を用いる発癌試験とで成績を比較した結果、両者間に必ずしも高い相関性は認められないことを明らかにしている。このことは発癌性の確認には他の試験方法を併用する必要性を強く示唆している。しかしながら、前述のように、この変異原性試験法は、元来発癌物質検出の有力な手段として開発されたものであり、スクリーニングテストとしての貢献度が大であることは明らかである。これらの背景から、今回の実験成績のみによって KC に発癌性がないと断定はできないが、発癌性を示す可能性は低いことが推測される。

ところで本来、変異原性は遺伝毒性を示すものである。化学物質により惹起された DNA の傷害が先天性異常として後世代へ伝わっていくことは重大な問題であり、遺伝毒性の検索に用いられる方法としては、すでに伴性劣性致死試験、特定座位試験、優性致死試験、染色体異常試験、不定期 DNA 合成試験などがある。しかしながらそれらの成績と今回のような細菌を用いる変異原性試験の成績との相関性は明らかではない。*in vitro* 変異原性試験にはその他に酵母や培養細胞を用いて DNA 傷害性を短期間に検出する方法があるが、やはり、遺伝毒性との相関性は未詳である。ヒトにおける遺伝病の多くは常染色体性劣性である。遺伝毒性は表現型として認識されないまま、後世代へと受け継がれることが多いので、特にヒトにおけるその発現を変異原性試験成績から予測することは困難な状態である。したがって KC について今回の成績からヒトにおける遺伝毒性の評価に関して結論を導くことは発癌性の場合よりもはるかに困難である。現状では遺伝毒性試験には多くの動物、時間、経費を要するので、そのスクリーニング段階だけでも微生物を用いる変異原性試験が活用されるようになることが望まれる。

B. 抗原性について

免疫毒性とは、生体にとって、薬物などの異物質であるものと免疫系との相互作用の結果、望ましくない効果をもたらす性質であると定義されている¹⁹⁾。免疫毒性には免疫機能に対する薬物の影響が本体をなす狭義の免疫

毒性と、薬物アレルギーを引き起こす性質、すなわち抗原性とが包含されている。抗原性を発現する過程には薬物やその代謝産物が抗原となる場合、あるいは薬物やその代謝産物により変性して生じた自己抗原が原因となる場合があり、その他に抗体産生は生じずに histamine 遊離等を起こす aspirin のような場合²⁰⁾もある。

このような免疫毒性全般に関する試験方法の確立は不十分であって、現在、厚生省の医薬品毒性試験法ガイドラインでは抗原性試験だけが取り上げられている状況である。今回 KC について行った皮膚感作性試験は、皮膚光感作性試験とともにそのガイドラインに収められている方法であり、この試験方法によってすでに多くの薬物の抗原性が検出されており、現状ではベストな方法の一つである。また、この方法は抗原性の有無を検索するのが目的であるため、hapten-carrier は使用せず、感度を上げるために adjuvant を併用した。

ただし、今回試験に用いた動物はモルモットであり、免疫学的には、ヒトとの種差を考慮しなければならない。また、モルモットによる皮膚感作性試験成績とヒトにおけるアレルギー発症との相関性を求めることは非常に困難である。すなわち、ヒトでは遺伝学的、微生物学的な制御が困難であり、栄養状態も生活環境も様々であって、ヒトにおける個体差の問題は免疫機能に関しては格別に大きい。さらに薬物アレルギーの発生頻度自体が非常に低いことが、動物実験成績との相関について検討することを一層困難にしている。たとえば、臨床に提供されている医薬品の副作用で薬物アレルギー発症の頻度は 10,000 例に 1 例ということがしばしばである²⁰⁾。

以上のような諸点を検討した結果、今回、KC についての抗原性試験成績が陰性であったことをもって、KC を臨床で使用した場合に薬物アレルギーを引き起こす可能性が皆無であるという断定はできないものの、その可能性はかなり低いと推測しても差し支えないと考える。

結 論

HAP-C 系骨増量材 KC について、*Salmonella Typhimurium* TA98 および TA100 を使用した遺伝子復帰突然変異試験を行い、また、モルモットを使用した皮膚感作性試験を行った結果、変異原性、抗原性のいずれも陰性と判定された。これにより KC がヒトにおいて発癌性を示す可能性と、薬物アレルギーを起こす可能性はいずれも低いことが推測された。

引用文献

- 1) 青木秀希, 加藤一男, 小木曾 誠, 田畑恒雄: 新しい歯科インプラント材料としてのアパタイト焼結体. 歯理工誌 18: 86-89, 1977.
- 2) 青木秀希, 加藤一男, 赤尾 勝: 歯科用無機材料と組織培養. 組織培養 6: 42-46, 1980.
- 3) 小木曾 誠: Apatite 焼結体埋入による顎骨組織の経時的推移変化. 口病誌 45: 170-221, 1978.
- 4) 高橋 忍, 丹羽滋郎, 澤井一彦, 田賀井秀夫, 尾野幹也, 福田恭淋: 人工移植骨材としての合成水酸アパタイト. 医学のあゆみ 116: 156-157, 1981.
- 5) 鴨井久一, 那波明夫, 米山武義, 林 英昭, 西澤和利, 渡辺是久: 歯周治療における骨移植の研究 (第2報). 日歯周誌 26: 523-531, 1984.
- 6) 中川寛一: 歯内療法領域における生体材料の応用に関する臨床病理学的研究, 特にハイドロキシアパタイトの応用価値に関する検討. 歯科学報 83: 501-527, 1983.
- 7) 有泉祐吾: リン酸カルシウム系セラミックの根管充填材としての応用価値に関する実験的研究. 日歯保誌 28: 567-607, 1985.
- 8) 梅田正博, 岩田耕三, 栄田 和, 武 宣昭, 内藤 勲, 高橋伸彰, 島田勝弘, 栗岡一人, 川本博男, 寺延 治, 島田桂吉: 各種 HAP 顆粒の骨伝導性と HAP-骨複合体の安定性について. 日口科誌 41: 258-267, 1992.
- 9) Deichmann, W. D. and Gerarde, H. W.: Toxicology of drugs and chemicals. Academic Press., New York, 1969, Inside of the front cover.
- 10) 厚生省薬務局新医薬品課: 医薬品非臨床試験ガイドライン解説. 薬事日報社, 東京, 1994, 39-41, 105-106.
- 11) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 5135-5139, 1975.
- 12) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res. 31: 347-364, 1975.
- 13) 矢作多貴江: 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について. 蛋白質核酸酵素 20: 1178-1189, 1975.
- 14) 宮腰 護, 早川ゆみ子, 永山富雄: 化粧品用アゾ系色素の変異原性に関する研究. 衛生化学 29: 212-220, 1983.
- 15) Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F. and Ohta, S.: A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. Contact Derm. 7: 225-237, 1981.
- 16) 厚生省薬務局新医薬品課: 医薬品非臨床試験ガイドライン解説. 薬事日報社, 東京, 1994, 61-65, 110-113.
- 17) 石館 基編: 毒性試験講座 12. 地人書館, 東京, 1991, 31-33.
- 18) Ashby, J. and Tennant, R. W.: Definitive relationships among chemical structure, mutagenicity to *Salmonella*, and carcinogenicity to rats and mice among 301 chemicals tested by the U. S. NTP. Mutat. Res. 257: 229-306, 1991.
- 19) 石館 基編: 毒性試験講座 10. 地人書館, 東京, 1991, 3-12.
- 20) 岡田陽子, 足立 満, 国分二三男, 高橋昭三, 田部陽子, 前田昌子, 辻 章夫: アスピリン喘息に関する一考察 — スルピリン吸入負荷試験時の血漿ヒスタミンの変動 —. アレルギー 38: 334-338, 1989.