

クロムイオンが口腔由来上皮細胞株(Ca 9-22)の生細胞数および サイトカイン産生に及ぼす影響

横瀬 勝美¹ 桑田 文幸^{1,2}

Effects of chromium ion on cell viability, IL-1 α and IL-8
production by an oral epithelial cell line, Ca 9-22

Katsumi Yokose¹ and Fumiyuki Kuwata^{1,2}

Abstract

The present study investigated the effects of chromium ion on cell viability, interleukin (IL)-1 α and IL-8 production by an oral epithelial cell line, Ca 9-22. The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. The cultures having 100% confluent cells were serum starved for 24 h, and then 1 mM of CrCl₃ were added for the 10 min, 30 min, 1 h, 3 h or 6 h, respectively. After the incubation for 24 h, the cell viability was assessed by colorimetric assay using a LDH Cytotoxic Test. And also IL-1 α and IL-8 production by these cells were examined using specific ELISA kits for IL-1 α and IL-8.

By the addition of 1 mM chromium ion did not alter cell viability within 1 h. However, 1 mM chromium ion induced cell death more than 6 h. Little effect was observed by the addition of chromium ion on IL-1 α and IL-8 production of these cells. These results indicate that additions of 1 mM chromium ion induce epithelial cell death rather than cytokine production.

Key words: chromium ion, cell viability, IL-1 α production, IL-8 production, oral epithelial cell

緒 言

歯科用金属には様々な金属が使用されているが、それらの多くは合金として歯科用歯冠修復物、矯正用材料等に使われている。合金中の金属の割合は使用される治療部位や治療目的によって異なり、近年では、歯科用金属の開発が進み、多種多様な金属が含有されている。治療に使用された歯科用金属は口腔内でいろいろな環境を受け、とくに唾液、血液、リンパ液に接触し、生体内の pH, 体温, 酸素分圧, 繰り返し

し荷重負荷などの各種環境要因に曝露され、これらの要因によって金属は腐食、分解、摩擦などを引き起こすと考えられる。とくに歯科用金属の腐食によって有害な腐食産物を生じるほか、摩擦によって微粒子となる¹⁻⁴⁾。このように生体との接触が密接である歯科用金属は、局所的為害作用に加え全身的为害作用までに至っていると考えられる。また、ヒト体内で、体液、正常組織、病的組織と接触して使用されるため、生体内環境の影響を受けていると考えられ、歯科用金属が生体内動態における為害作用

¹ 日本大学歯学部化学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究所顎口腔機能研究部門

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

(受理: 2003 年 9 月 25 日)

¹ Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry

² Division of Oral and Craniomaxillofacial Research, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

とも密接に関係するため、その動態を知ることは安全性を考えるうえで不可欠であると思われる。本研究で検討を行ったクロムは歯科用金属合金中に含まれており、又ヒト生体内のクロムは必須微量元素であり、生体内の生理的役割として、糖質、脂質、タンパク質代謝や結合組織代謝に関与しているといわれている⁵⁻⁷⁾。

著者らは、歯科用金属の金属イオンが口腔軟組織、とくに上皮組織におよぼす影響を解明する第一ステップとして、すでに歯科補綴物の成分であるチタンおよびニッケル、歯科修復物の合金中に存在する亜鉛について、ヒト口腔由来上皮細胞株(Ca 9-22)のコンフルエント後の生細胞数およびDNA合成能におよぼす影響について報告した^{8,9)}。そこで本研究では、矯正用ワイヤーや歯冠修復の金属合金として使用され、ヒト生体内の必須微量元素であるクロムについて生細胞への経時的变化を調べ、さらに、インターロイキン-1 α (IL-1 α)およびIL-8¹⁰⁾の2種類のサイトカイン産生に及ぼすクロムイオンの経時的变化も併せて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

実験にはヒューマンサイエンス資源バンク(大阪)から供与されたヒト歯肉癌由来細胞株Ca 9-22(JCRB 0625)¹¹⁻¹⁴⁾を使用した。Ca 9-22細胞は、Dullbecco's modified Eagle medium (DMEM, 旭テクノグラス)に、10% ウシ胎児血清(FBS, 旭テクノグラス)、50 U/ml ペニシリンおよび50 μ g/ml ストレプトマイシン(Sigma)を加えた培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の湿潤条件下で培養を行った。

2. 細胞障害率(経時的变化)

生細胞へのクロムイオンによる経時的变化の影響を調べるために、I型コラーゲンをコートした24穴プレート(住友ベークライト)にCa 9-22細胞 1×10^5 個/cm²を播種し、500 μ lの

DMEM(10% FBS および抗生物質を含有)で培養を開始した。細胞が24穴プレート内に100%コンフルエントに達した培養3日目に、それぞれ無血清のDMEM(抗生物質を含有)に培地を交換して24時間血清飢餓を行い、その後、クロムイオン(CrCl₃)を含む無血清のDMEMと交換した。生細胞へのクロムイオンの経時的变化の影響を調べるためにその作用時間をそれぞれ10分、30分、1時間、3時間および6時間とし、培養を行った。なお、培地中に添加したクロムイオン(CrCl₃)の濃度は1.0 mMとした。クロムイオンを作用させた後、培地を無血清のDMEMにそれぞれ交換し、24時間培養し、上清を回収をした。回収した上清は3000 rpm、5分遠心し、LDH-Cytotoxic Test(WAKO)を用いて比色測定し、細胞障害率を算出した。本研究で使用した24穴プレートは、上皮細胞の成長因子に対する反応性がマトリックス依存性であるという報告¹⁵⁾を参考にして、I型コラーゲンがコートされたものを用いた。また、実験は3連で行い、結果は平均値で示した。クロムイオンの経時的变化を比較するため、クロムイオン無添加の場合をコントロールとした。またクロムイオン作用時間ごとの細胞形態を観察し、写真撮影した(図2~7)。

3. IL-1 α および IL-8 産生

材料および方法の2.と同様に、I型コラーゲンをコートした24穴プレートにCa 9-22細胞を播種し、100%コンフルエントに達した培養3日目に24時間血清飢餓を行った後、クロムイオン(CrCl₃)の濃度、1.0 mMを含む無血清のDMEMと交換し、10分、30分、1時間、3時間および6時間作用させ培養を行った。その後、それぞれ新たに無血清のDMEMと交換し、さらに24時間培養後、培養上清を回収して、IL-1 α 定量用ELISAキット(BioSource)およびIL-8定量用ELISAキット(BioSource)を用いて上清中のサイトカイン産生量をそれぞれ

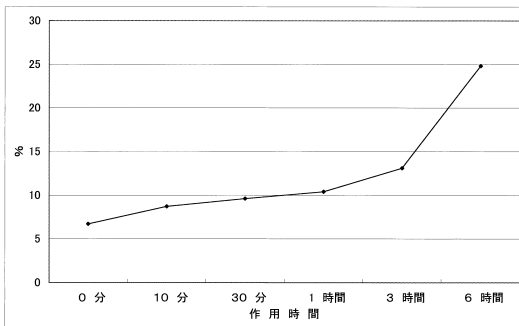
定量した。

成 績

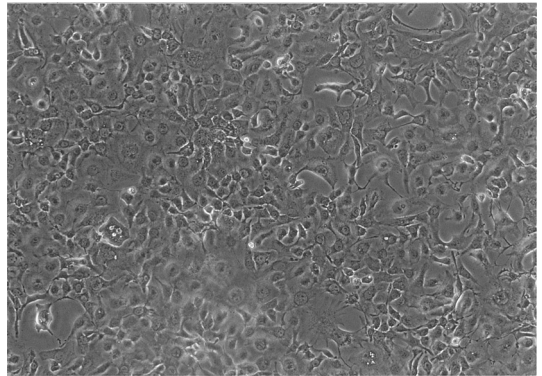
1. 細胞障害率(経時変化)

100%コンフルエントに達した後のCa 9-22細胞に及ぼすクロムイオン(CrCl_3)1mM濃度の経時変化の影響を調べた結果を第1図に示した。

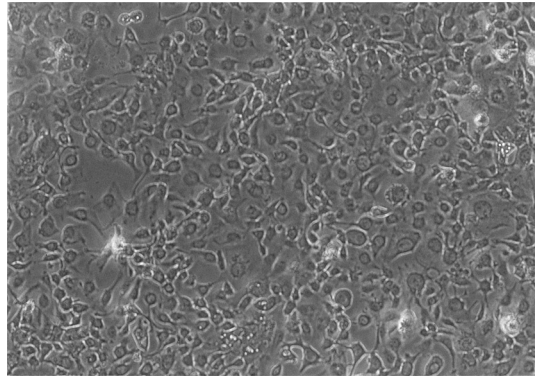
クロムイオン(CrCl_3)濃度1mM、作用時間0分、10分、30分、1時間、3時間および6時間として培養を行った結果、細胞障害率は作用時間に依存して増加した。コントロール(作用時間0分)と比較して、クロム作用時間10分間で+2%、30分間で+2.9%、1時間で+3.7%、3時



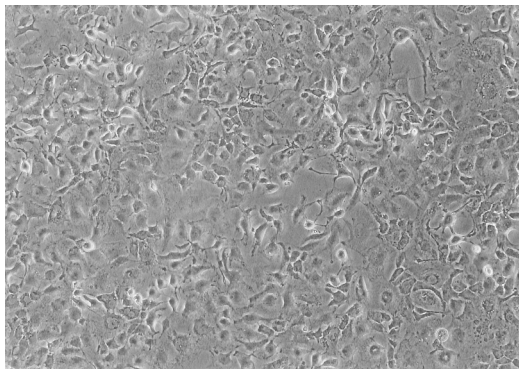
第1図 Ca 9-22細胞の細胞障害率に及ぼすクロムイオンの影響



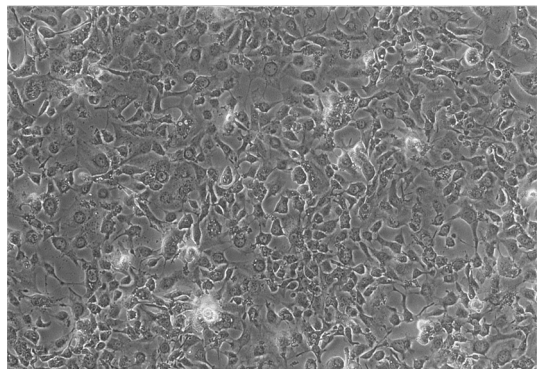
第3図 クロムイオン1mM10分間作用させたときの細胞形態



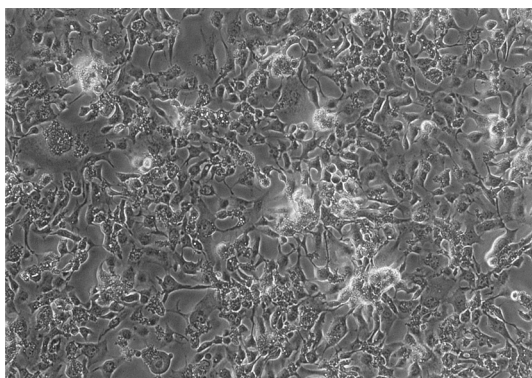
第4図 クロムイオン1mM30分間作用させたときの細胞形態



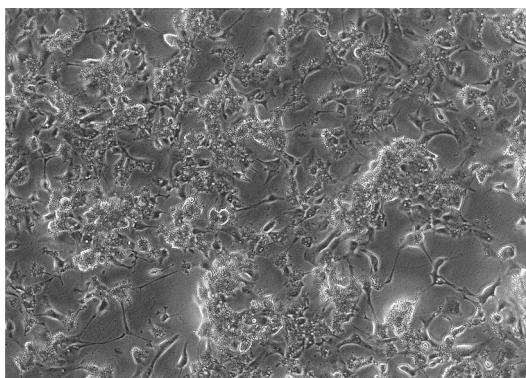
第2図 Ca 9-22細胞 control 形態(クロムイオン作用時間、0分)



第5図 クロムイオン1mM1時間作用させたときの細胞形態



第6図 クロムイオン1 mM 3時間作用させたときの細胞形態



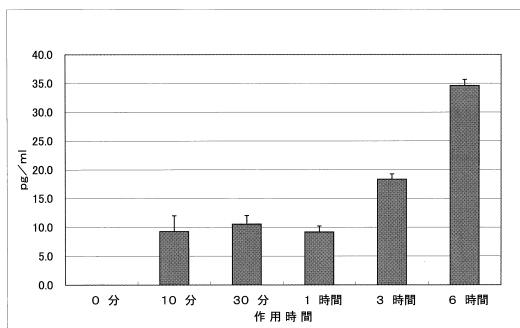
第7図 クロムイオン1 mM 6時間作用させたときの細胞形態

間で+6.4%, 6時間で+18.1%の細胞障害率の増加がみられた。また, クロム作用時間(0分, 10分, 30分, 1時間, 3時間, 6時間)ごとの細胞形態を観察した(第2図~第7図)。1時間までは細胞の形態にクロムの影響がみられないが, 3時間作用させた場合, 細胞の萎縮がみられ, 6時間ではその萎縮が広がって行く傾向がみられた。

2. IL-1 α 産生

コンフルエントに達した後のCa9-22細胞のIL-1 α 産生に及ぼすクロムイオン(CrCl_3)1 mM濃度の経時的变化の影響を調べた結果を第1表および第8図に示した。

クロムイオンの作用時間とともにIL-1 α の



第8図 Ca9-22細胞のIL-1 α の産生に及ぼすクロムイオンの影響

産生量は増加した。10分間クロムイオン作用させた場合, 9.3 pg/mlであり, 30分間で10.6 pg/ml, 1時間で9.2 pg/ml, 3時間で18.3 pg/ml, 6時間で34.6 pg/mlであった。

3. IL-8 産生

コンフルエントに達した後のCa9-22細胞のIL-8産生に及ぼすクロムイオン(CrCl_3)1 mM濃度の経時的变化の影響を調べた結果を第2表および第9図に示した。

クロム作用時間とともにIL-8の産生量は増加した。コンフルエントに達した後のCa9-22細胞のIL-8産生量はコントロールでは19.6 pg/ml, クロムイオン(CrCl_3)濃度1 mM 10分間作用させ培養した場合29.2 pg/ml, 30分間で

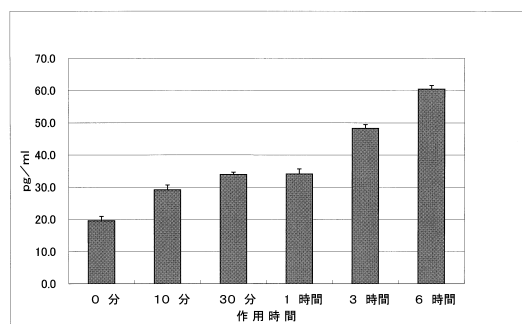
第1表 Ca9-22細胞のIL-1 α の産生に及ぼすクロムイオンの影響

作用時間	平均 pg/ml			
0分	*	*	*	*
10分	10.8	10.9	6.15	9.3
30分	10.2	9.3	12.2	10.6
1時間	9.38	10.1	8.1	9.2
3時間	17.8	17.8	19.4	18.3
6時間	33.8	35.8	34.2	34.6

*検出限界以下

第2表 Ca 9-22 細胞の IL-8 産生に及ぼすクロムイオンの影響

作用時間	平均 pg/ml			
0分	20.4	18	20.3	19.6
10分	29.3	27.6	30.6	29.2
30分	34.7	33.3	33.9	34.0
1時間	34.2	32.5	35.6	34.1
3時間	49.5	47.2	48.2	48.3
6時間	61.2	59.2	61.1	60.5



第9図 Ca 9-22 細胞の IL-8 産生に及ぼすクロムイオンの影響

34.0 pg/ml, 1 時間で 34.1 pg/ml, 3 時間で 48.3 pg/ml, 6 時間で 60.5 pg/ml まで増加した。

考 察

クロムは歯科用金属に含有されている金属の一つであるため、口腔内の様々な環境の影響を受けるとともに生体との接触は密接であり、局部的為害作用に加え全身的為害作用までに至っていると考えられる。すなわちヒト体内で、体液、正常組織、病的組織と接触して使用されるため、生体内環境の影響を受けていると考えられる。しかしクロムは生体において必須微量元素であり、特定組織や器官に多いということではなく、低濃度で広く分布している。ラットのグルコース耐性障害はグルコース耐性因子(glucose tolerance factor:GTF)と呼ばれる新しい栄養素の欠如によると提唱されたが、1959年に

なって Schwarz と Melz によって GTF の活性成分は 3 価クロムであり、3 価クロム化合物がグルコース耐性障害を回復させるのに十分効果のあることが示された。しかし GTF の構造は未だ決定されておらず、クロムのほかにニコチン酸やグリシン、グルタミン酸、システイン残基を含んでいる。また、厳しいクロム欠乏症条件下では、高血糖や糖尿の症状がラットやネズミで観察されるが、飲料水中に 2 または 5 ppm のクロムを加えることにより、これらの症状は急速に回復する。これらのことからクロム欠乏により動物では成長障害、短命、糖質、脂質、タンパク質代謝異常、角膜疾患(視力障害、角膜混濁、虹彩血管のうっ滞)等が起き、クロム欠乏による耐糖能低下には 3 価のクロム含有グルコース耐性因子(GTF)が関与している。すなわち、クロムは生理的役割として、糖質、脂質、タンパク質代謝および結合組織代謝に関与しているといわれている^{4,7)}。

ヒトのクロム欠乏による疾患として、糖尿病または耐糖能異常、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症の可能性が高いと考えられている⁵⁾。また、クロムはウシの肝臓から抽出された RNA 中に高濃度で存在することが報告されており、核酸の分子構造を維持するためにクロムはなんらかの役割を果たすであろうという報告もある⁶⁾。通常 6 価クロム化合物は生体膜を容易に通過し、細胞内でグルタチオンやアスコルビン酸などにより 5 価、4 価を経て最終的には 3 価クロムとなり、そのほとんどが低分子タンパク質と特異的に結合し、毒性は低下して、腎臓から速やかに排出される。3 価クロム化合物や金属クロムの発癌性は IARC (International Agency for Research on Cancer) の最近の評価でも認められていない。しかし、DNA に結合した 3 価のクロムが、DNA 複製過程において誤りを生じさせる可能性を報告している⁷⁾。さらに細胞内で 4 価クロムはフリーヒド

ロキシリオンおよびDNA損傷の可能性が報告されている¹⁶⁻²⁰⁾。このようにクロムは生体内で様々な作用をしていると考えられる。

本研究ではヒト生体内必須微量元素であるクロムイオンについて口腔粘膜由来上皮細胞の生細胞数への経時的変化について調べた。前報^{8,9)}において亜鉛の検討を行ったが、亜鉛濃度を0, 0.01, 0.1, 1 mMとし作用時間を各濃度1時間, 6時間, 24時間とした場合、低濃度(0.01, 0.1 mM)では時間による生細胞数に変化が少なく、高濃度(1 mM)では6時間作用させると生細胞数が減少した。そこで本研究では、クロムイオン濃度を1 mMにして、その作用時間を前報^{8,9)}より短時間(10分, 30分, 1時間, 3時間, 6時間)に設定した。本測定はLDH-Cytotoxic Testは細胞毒性を簡便に測定できるばかりでなく、細胞が細胞膜に障害を受けて細胞から遊離したLDH(乳酸脱水素酵素)活性を測定することから、生理活性物質による細胞障害や細胞性免疫による細胞障害、補体依存性細胞障害、抗体依存性細胞障害の他、細胞の生存率にも利用できるため、この方法を用いて生細胞障害率を測定した。

コントロールはクロムイオンを作用させていないが、クロムイオンを作用させた細胞と同様、血清飢餓状態24時間後、新たに無血清培地を交換したのち、24時間培養後上清を回収した。LDH活性測定において、コントロールでも6.7%の障害率を示している。これは48時間無血清で培養しているためであると考えられる。クロムを10分作用させるとコントロールと比較して、+2%であり、30分で+2.9%、1時間で+3.7%、3時間で+6.4%、6時間で+18.1%細胞障害率であった。これらのことから作用時間が長くなれば細胞障害率も大になるが、作用時間1時間まではクロムイオンが細胞に対してこの条件下では大きな影響がなかったと考えられる。クロムイオンの作用時間(10分, 30分,

1時間, 3時間, 6時間)に伴う細胞形態の観察では、1時間までは細胞形態に変化がないが、3時間作用させた場合、細胞の萎縮が見られ、6時間ではその萎縮が広がって行く傾向が観察された。1時間までは細胞の形態変化は見られないが、それを超えると、クロムの細胞毒性による細胞死の誘導を引き起こすと考えられた。

次でサイトカイン産生に及ぼすクロムイオンの経時的変化を検討した。インターロイキン-1 α (IL-1 α)は創傷治癒において重要な役割を果たしており、皮膚の創傷治癒においても、活性化されたケラチノサイトからIL-1 α が放出される。そして、それらが線維芽細胞やケラチノサイトの増殖、線維芽細胞のコラーゲン合成およびケラチノサイトのケモタキシスを促進させることが報告されている²¹⁾。クロムイオンがCa 9-22細胞のIL-1 α の産生量を促進するかどうかを調べるため、クロムイオン濃度を高濃度の1 mMにし、作用時間を前報^{8,9)}より短時間で検討した。クロムイオン1 mMの濃度で、作用時間10~60分では、IL-1 α の産生量は9~10 pg/mlであり(表1)、作用時間1時間以内ではIL-1 α の産生にはクロムイオンが影響していないことがわかった。クロムイオンを3~6時間作用させた場合、IL-1 α 産生量が増加し、6時間で34.6 pg/mlで、IL-1 α 産生量は、クロムイオン作用時間10分の約4倍の産生量を示した。

外来の異物の侵入に対して、創傷部位には多数の好中球が遊走する。活性化上皮細胞によって産生されるIL-8は、好中球に対する主要な走化性因子(ケモカイン)の一つである^{21,22)}ため、クロムイオンがCa 9-22細胞のIL-8産生を促進するかどうかを調べた。その結果、コンフルエントに達した後のCa 9-22細胞のIL-8産生量は、コントロールでは19.6 pg/ml、クロムイオン(CrCl₃)濃度1 mM作用時間10分で29.2 pg/ml、30分で34.0 pg/ml、1時間で34.1

pg/ml, 3時間で48.46 pg/ml, 6時間で60.2 pg/mlと増加した。これらのことから、クロムイオンは上皮細胞のIL-8産生量を促進させ、好中球の遊走を促して異物の侵入に対処できる可能性が示唆された。しかしながら炎症性サイトカインであるIL-1 α 産生量とIL-8産生量ではクロムイオンの作用時間によって産生量の増加が異なり、その詳細を検討しなければならない。

以上のことから、修復および歯科補綴物の金属由来のクロムイオンによる歯肉上皮細胞への影響は、サイトカイン産生量を増加させ、細胞死への誘導を左右する因子の一つであることが判明した。とくに、細胞増殖期に対する高濃度、短時間で影響が大であったことから、歯肉や口腔粘膜上皮の創傷治癒時にみられる上皮細胞の増殖に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

本研究の一部は、平成15年度日本大学歯学部佐藤研究費によって行われたことを付記する。

文 献

- 1) Brune, D. : Metal release from dental biomaterials ; Biomaterials, 7, 163-167, 1986.
- 2) 井上昌幸, 山中秀夫編著 : 歯科と金属アレルギー ; デンタルダイヤモンド社, 東京, 1993.
- 3) 佐藤温重編 : 歯科材料の副作用と安全性 ; 学健書院, 東京, 1997.
- 4) John, C. W. : Biocompatibility of dental casting alloys : A review ; J. Prosth. Dent., 83(2), 223-234, 2000.
- 5) 五島孜郎, 糸川嘉則 : 生体内金属元素 ; 光生館(東京)155-156, 1994.
- 6) 不破敬一郎 : 生体と重金属 ; 講談社(東京)52-53, 1982.
- 7) Bridgewater, L.C., Manning, F.C., Woo, E.S. and Patierno, S.R. : DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium ; 9, 3, 122-133, 1994.
- 8) 横瀬勝美, 桑田文幸 : 口腔由来細胞株(Ca 9-22)の生細胞数およびDNA合成能に及ぼす金属イオンの影響 ; 研究紀要 日本大学歯学部(一般教養), 29, 37-44, 2001.
- 9) 横瀬勝美, 桑田文幸 : 亜鉛イオンが口腔由来上皮細胞株(Ca 9-22)の生細胞数, DNA合成能およびサイトカイン産生に及ぼす影響 ; 研究紀要 日本大学歯学部(一般教養), 30, 49-58, 2002.
- 10) Li, J., Ireland, G. W., Farthing, P. M. and Thornhill, M.H. : Epidermal and oral keratinocytes are induced to produce RANTES and IL-8 by cytokine stimulation ; J. Invest. Dermatol., 106, 661-666, 1996.
- 11) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫 : 人の歯肉癌由来の株細胞の樹立第一報 ; 日口腔外科会誌, 20, 100-106, 1974.
- 12) Gamou, S. and Shimizu, N. : Change in metabolic turnover is an alternate mechanism increasing cell surface epidermal growth factor receptor levels in tumor cells ; J. Biol. Chem., 262, 6708-6713, 1987.
- 13) Hirai, M., Gamou, S., Minoshima, S. and Shimizu, N. : Two independent mechanisms for escaping epidermal growth factor-mediated growth inhibition in epidermal factor receptor-hyperproducing human tumor cells ; J. Cell Biol., 107, 791-799, 1988.
- 14) Hirai, M. and Shimizu, N. : Purification of two distinct proteins of approximate Mr 80000 from human epithelial cells and identification as proper substrates for protein kinase C ; J. Bio. Chem., 270, 583-589, 1990.
- 15) Dunsomore, S.E., Rubin, J.S., Kovacs, S.O., Dheed, M., Parks, W.C. and Welgus, H.G. : Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production ; J. Biol. Chem., 271, 24576-24582, 1996.
- 16) Kawanishi, S., Inoue, S. and Sano, S. : Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen

- peroxide ; J. Biol. Chem., 261, 5952-5958, 1986.
- 17) Aiyar, J., Berkovits, H. J., Floyd, R. A. and Wetterhan, K. E. : Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione—reaction intermediates and resulting DNA damage—; Chem. Res. Toxicol. 3, 595-603, 1990.
- 18) Shi, X., Sun, X., Gannett, P. M. and Dalal, N. S. : Deferoxamine inhibition of Cr (VI)—mediated radical generation and deoxyguanine hydroxylation—ESR and HPLC evidence ; Archiv. Biochem. Biophys., 293, 281-286, 1992.
- 19) Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K. and Kawanishi, S. : 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin ; J. Biol. Chem., 268, 13221-13227, 1993.
- 20) Sugiyama, M., Tsuzuki, K. and Haramaki, N. : DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines ; Mutat. Res. 299, 95-102, 1993.
- 21) Sauder, D. N., Kilian, P. L., McLane, J.A., Quick, T. W., Jakubovic, H., Davis, S. C., Eaglestein, W.H. and Mertz, P. M. : Interleukin-1 enhances epidermal wound healing ; Lymphokine Res., 9, 465-473, 1990.
- 22) Kupper, T.S. : The activated keratinocyte : A model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses ; J. Invest. Dermatol., 94, 146 s-150 s, 1990.