

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	堀 美喜
論文審査 委員氏名	主査 副査	河合 達志 金森 孝雄 中田 和彦 千田 彰	
論文題名	レジンモノマーの構造の差異による抗酸化剤 応答配列 (ARE)エンハンサーの活性化と細胞 毒性の関係		

インターネットの利用による公表用

(論文審査の要旨)

No.1.....

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

メタクリロイロキシ基を含むメチルメタクリレート (MMA) を主とするモノマーは有機材料系の歯科材料として頻用され、これらはラジカルの生成により急速に重合、硬化する特長をもつ。しかし、それらの硬化体には数%の残留モノマーが存在し、生体組織および細胞に傷害を与えることが報告されている。生物学的安全性を担保する歯科材料を開発するにあたって、残留モノマー、すなわち各種メタクリレート誘導体の生細胞に対する影響を明確にしておくことは重要である。これまでに、解毒代謝系第2相に関与している抗酸化剤応答配列 (ARE) -ホタルルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを MMA およびヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) の細胞毒性試験法として用い、評価がされてきた。申請者は、この試験法を用いて (メタ) アクリレート誘導体及び製品の生物学的安全性を評価するための基本情報の蓄積を行っている。

試験材料は MMA、エチルメタクリレート (EMA)、プロピルメタクリレート (PMA)、ブチルメタクリレート (BMA) (これらを非極性モノマーと呼ぶ)、HEMA、ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA)、アクリルアミド (AA)、メタクリルアミド (MA)、ヒドロキシエチルメタクリルアミド (HEAA)、トリエチレングリコールメタクリレート (TEGDMA)、そして市販品の歯面プライマー (PANAVIA V5 Tooth Primer) の 11 種類を用いている。

ARE の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター配列として組み込んだベクター (pGL4. 24-2E-Neo) をヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞に

導入して得られたステーブルクローン細胞 (HepG2-AD13 細胞) を用いている。HepG2-AD13 細胞を培養後、各濃度に調整したレジンモノマーおよびプライマーを含む培養液、対照群として新しい培養液を用意し、培地をそれぞれ交換後、さらに 6 時間培養している。細胞溶解液を作製し、発光基質に細胞溶解液を添加直後にルミノメーターにて発光活性を測定している。

全試験材料で濃度依存的な ARE 活性化率の上昇を認めている。すなわち、歯科で用いられるモノマーの多くは細胞内で酸化ストレスとして障害を与えているものと推定している。実験結果のグラフの形状は大きくふたつに分類され、ひとつは非極性モノマーの刺激によって得られた単純増加曲線、もうひとつは官能基に極性を持つモノマー刺激によって得られたベル型の曲線である。

前者のグラフは、低濃度における立ち上がりの濃度および勾配も全て同様の傾向を示している。低濃度領域から ARE 活性化率が上昇を開始し、BMA は 5 mM まで、PMA は 10 mM まで、そして MMA、および EMA は測定を行った最高濃度である 30 mM まで徐々に上昇した。PMA、BMA はそれぞれ 10、5 mM を超えて刺激を行なった時、多くの細胞が培養皿から剥離し、生細胞数の減少を認めた。つまり、PMA および BMA は高濃度領域において、本実験における酸化ストレスの経路とは別に、細胞の接着性の低下による細胞死を起こすことを証明している。

後者のグラフはいずれも細胞の接着性の低下を起こすことなく、ある濃

度を超えると急激に ARE 活性化率が低下し、ベル型の曲線を描いている。HPMA では、ARE 活性化率-濃度曲線の立ち上がりの濃度、ピークに至る濃度、ベースラインまで下がる濃度、全てにおいて HEMA と同様の結果が得られ、HPMA は HEMA 同様の細胞内傷害性があることを示唆している。

AA と MA の ARE 活性化率は HEMA と比較して 10 分の 1 程度であり、アミド基を含むモノマーによる細胞死については酸化ストレス以外の大きな要因が存在しているものと推定している。HEAA においては、HEMA と比較した場合、ベル型の頂上のピークに達する濃度は HEAA の方が高く、HEAA は HEMA よりも細胞傷害性が低いものと推定している。

TEGDMA は、立ち上がりおよびピークを示す濃度に本研究の中では一番低濃度で到達していることから、低容量で細胞に強い酸化ストレスを与え、細胞内への障害性が高い物質であることを示唆している。

MDP を主要なモノマーとして使用している市販品の PANAVIA においても ARE 活性化率の濃度依存的な測定が可能であり、かつベル型の曲線を示している。HEMA と比較し、ピークに至る濃度が低いことから、細胞障害性は高いことを示唆している。

以上を総括し、歯科用各種アクリレートの濃度変化に伴う細胞応答情報を精査することが可能となったことを示している。非極性モノマーは低濃度領域における ARE 活性化率の立ち上がりが類似しており、細胞内への酸化ストレスの影響は炭素鎖を延ばすことによって大きな変化はないのに対

(論文審査の要旨)

No.4.....

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

し、低濃度から ARE 活性化率を上昇させ、ピークに達する濃度も低い TEGDMA、PANAVIA などの材料は細胞傷害性が高いことを示唆している。これらの情報は、今後アクリレート関連歯科材料開発の基礎データとなるものと思われる。

以上、本研究は、今後の歯科理工学、口腔生化学、歯科保存学並びに関連諸学科に寄与するところが多い。よって、本論文は独創的かつ新規性があり、博士（歯学）学位を授与するに値すると判断した。