

学 位 論 文 題 名

ボンディング材がヒト白血球の細胞機能に与える影響

学位論文内容の要旨

一般に、歯科材料は基本的毒性試験、特殊毒性試験、使用試験などの生物学的評価を経て臨床に供される。従来、基本的毒性試験のうち特に細胞毒性試験では、主に細胞の生死、増殖能、形態あるいは溶血性を指標としてなされてきた。しかし、この細胞毒性試験と使用試験との間には整合性が得られていない。その理由として、細胞の機能試験の欠落にあると思われる。そこで今回、細胞機能の一つ情報伝達系を利用して、歯髄為害性の問題となっているボンディング材について、ヒト好中球の生理活性物質の動態について調べた。

〔材料と方法〕

I 被検材 1. ボンディング材はキャタリスト、ベータからなる2液性のライトフィルボンド[®]を用いた。2. 溶出液の分析 1) 溶出試験：表面が3.8cm²のボンディング材硬化試料をハンクス液19mLに浸漬、37℃で1, 3, 5及び7日間振盪させ、各期間における溶出重量を測定した。測定は溶出液をミリポアフィルター（ポアサイズ0.45μm）で濾過し、凍結乾燥より求めた。2) 溶出成分の同定：HPLCにて、Zorbax ODS[®]カラムを使用し、溶出はMeOH:H₂O（7:3, V/V）の混合溶媒で流速1mL/minで行い、A₂₁₅で検出した。基準液として、トリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDMA）、ジメタクリロキシエチルヘキサメチレンジウレチン（UDMA）を用いた。3) 溶解度試験：キャタリスト、ベースの溶解度は各々1gをハンクス液100mLに浸漬、37℃、スターラーで24時間攪拌後、濾過したものを溶解原液とし、凍結乾燥し、溶解重量として求めた。硬化試料の主要溶出成分であるTEGDMA, UDMAについても同様に行った。

II 細胞機能試験 1. 細胞：健常人（25～39才）抹消血より採血し、好中球を分離した。ハンクス液をコントロールとし、上記溶出液および溶解原液をハンクス液で5倍、50倍希釈した液に好中球（2.0～3.0×10⁶cells/mL）を浸漬し、情報伝達系における生理活性物質を測定した。2. 生理活性物質の測定：ホルボールミリスチン酸アセテート（PMA）およびカルシウムイオ

ノホア A23187 (A23187) 刺激による好中球の O_2^- , PGE_2 産生量をそれぞれチトクローム C 還元法, PGE_2 [^{125}I] -RIA KIT で測定した。3. 細胞生存率の算定: 色素排除法により全細胞数に対する生細胞数で求めた。4. 乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出の測定: 乳酸基質・ジアホラーゼ法で比色定量した。5. 好中球の形態学的観察: 硬化試料溶出液およびキャタリスト, ベース, TEGDMA, UDMA 各溶解液における好中球の形態は各溶液に $37^{\circ}C$, 1 時間浸漬後、通法に従い走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

[結 果]

I 溶出液の分析 1. 溶出量: 硬化試料のハanks液への溶出量は, 1 日目で $322.5 \pm 239.0 \mu g/mL$ を示し, 3, 5, 7 日においても同程度であった。2. 溶出成分の同定: HPLC 溶出パターンにおいて, 溶出液とキャタリストと溶解液は同じ傾向を示した。また, 硬化試料の溶出成分は TEGDMA, UDMA 各溶解液の HPLC 分析から, 主にキャタリスト成分の TEGDMA と UDMA であることが解った。3. 溶解度: Hanks液に対するキャタリストの溶解度はベースの約 27 倍を示した。また, TEGDMA の溶解度は UDMA の 17 倍であった。

II 細胞機能試験 1. O_2^- : 各浸漬期間の硬化試料溶出液において, PMA 及び A23187 刺激の好中球 O_2^- 産生量はコントロールの Hanks液 (2.82 ± 0.17 ; $1.57 \pm 0.17 nmol/min/10^6 cells$) に比べ濃度に依存して有意 ($p < 0.05$) に低下した。キャタリスト溶解液の O_2^- 産生量は溶出液と同様な結果を示した。しかし, ベース溶解液では A23187 刺激のみ濃度に依存して低下した。一方, TEGDMA と UDMA の O_2^- 産生量は両刺激とも, 濃度に依存して低下した。従って, 溶出液の O_2^- 産生は刺激の種類により抑制機序が異なり, O_2^- 産生能の抑制因子はキャタリスト成分に含まれている TEGDMA と UDMA であることが解った。2. PGE_2 産生: 硬化試料溶出液における PGE_2 産生は濃度に大きく左右され, 無刺激ではコントロール ($83.44 \pm 24.86 pg/10^6 cells/30min$) とほぼ同程度で, 溶出液の希釈により増加した。一方, PMA 刺激では A23187 刺激と異なり、溶出濃度に依存して抑制された。なお, TEGDMA と UDMA は抑制度の違いはあるが, 共に PGE_2 産生を抑制した。3. 細胞生存率: 硬化試料溶出液とベース溶解原液における細胞生存率はコントロールに比して有意差はなかったが, TEGDMA と UDMA の溶解原液には有意差が認められた。しかしながら, 希釈することによりこの有意差はなくなった。従って, キャタリスト成分の TEGDMA と UDMA の溶解度が大きい場合は細胞毒性を示すことが解った。4. LDH の漏出: 硬化試料溶出液における好中球の LDH 漏出は, いずれも濃度においてもコントロールと有意差はなかった。他の溶解原液については有意差が認められたが,

希釈するに従って有意差はなくなった。5. 好中球の形態学的観察：溶出液とキャタリスト溶解液における好中球のSEM像ではコントロールに比べ、細胞表面、特に突起の形態変化が認められた。

[考 察]

好中球は種々の刺激に対して、 O_2^- 、 PGE_2 等の様々な生理活性物質を産生・放出するが、その細胞応答の情報伝達系の主軸の一つが Ca^{2+} /リン脂質依存性のプロテインキナーゼCである。即ち、刺激による好中球の O_2^- 、 PGE_2 産生には細胞内の Ca^{2+} の移動、プロテインキナーゼCの活性化が必要となる。著者はこの情報伝達系に注目して、ボンディング材の為害性についての新しい生物学的評価法について検索した。その結果、硬化試料溶解液は細胞生存率やLDH漏出に大きな変化を与えなかったが、 O_2^- 、 PGE_2 産生を抑制した。一般に、 O_2^- 産生は細胞膜中のNADPHオキシダーゼが細胞内への Ca^{2+} 流入、プロテインキナーゼCにより活性化されて惹起されるものと考えられている。従って、その抑制機序はプロテインキナーゼCを直接活性化するPMAの作用抑制、あるいはプロテインキナーゼC、NADPHオキシダーゼ活性の阻害に基づくものと思われる。一方、 PGE_2 産生の律速酵素であるフォスホリパーゼ A_2 は細胞膜に存在し Ca^{2+} 流入、プロテインキナーゼCより活性化されると考えられているが、今回は、細胞膜が硬化試料溶出液によって形態変化することがSEM像解析より明らかになった。このことから、溶出液の PGE_2 産生の抑制は溶出成分TEGDMA、UDMAが細胞膜を修飾し、A23187の Ca^{2+} 流入の抑制あるいは様々な刺激の情報伝達系を仲介をするプロテインキナーゼCの阻害を反映しているものと考えられる。

[結 論]

ボンディング材はハanks液中に溶出し、その溶出成分は主にTEGDMAとUDMAであった。溶出液はヒト好中球の細胞生存率、LDH漏出検査において大きな変化を与えなかったが、 O_2^- 、 PGE_2 産生能には影響を及ぼした。この変化はSEM像解析の細胞表面突起の形態変化と相関していた。従って、今後、従来の歯科材料の為害性に対する生物学的評価に情報伝達系を介した試験法を加えることは、細胞機能の情報を得ることができ、細胞毒性試験と使用試験の相関性を明らかにする一手法として寄与できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下河辺 宏 功

副 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 松 本 章

歯科材料は基本的毒性試験、特殊毒性試験、使用試験などの生物学的評価を経て臨床に供される。従来、基本的毒性試験のうち特に細胞毒性試験では、主に細胞の生死、増殖能、形態あるいは溶血性を指標としてなされてきた。しかし、この細胞毒性試験と使用試験との間に相関性を得るには至っていない。その理由として、細胞の機能試験についての適切な評価がなされていないことが考えられる。本研究は細胞機能の1つ、細胞刺激応答の情報伝達系に着目し、歯科材料がこの系にどのような影響を与えるものかを調べ、細胞機能試験としての可能性を検討したものである。研究成果は次の通りである。

歯科材料として市販のキャタリスト、ベース2液からなるボンディング材（ライトフィルボンド®）を用いた。最初にキャタリスト、ベース、硬化試料およびこれらの主な成分トリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDMA）とジメタクリロキシエチルトリメチルヘキサメチレンジウレタン（UDMA）のハックス液への溶解（出）液を種々の濃度で希釈したものを試験試料とした。なお、キャタリスト液は、主にTEGDMAとUDMAであり、ベースはTEGDMAである。細胞機能試験としては、ヒト好中球にホルボールミリスチン酸アセテート（PMA）及びカルシウムイオノホアA23187（A23187）刺激を与えた場合の O_2^- 、 PGE_2 等の生理活性物質を産生する系を用い、溶解（出）液を加えた場合のこれらの物質の変動を調べた。細胞の乳酸脱水素酵素（LDH）漏出、生存率、形態変化についても合わせて調べた。

その結果、硬化試料からの溶出及びキャタリスト、TEGDMA、UDMA溶解液における O_2^- 産生量は両刺激ともに濃度依存的に有意に低下した。しかし、ベース溶解液ではA23187刺激のみ濃度に依存して低下した。従って、TEGDMA、UDMAが O_2^- 産生の抑制因子として作用し、異種刺激材により反応の抑制機序が異なることがわかった。 PGE_2 産生量は、硬化試料溶出液では無刺激の場合は希釈により増加したのに対し、PMA刺激では溶出濃度に依存して抑制された。一方、A23187刺激では大きな差を示さなかった。TEGDMAとUDMAでは抑制精度の違いはあるが、共に PGE_2 産生を抑制した。また、溶出度の細胞生存率・LDH漏出は試験試料を加えない場合（コントロール）に比べ有意差はなかったが、TEGDMAとUDMAの溶解原液

は有意に細胞生存率の低下、LDH 漏出の増加をもたらした。しかし、希釈するに従いこの有意差はなくなった。走査型電子顕微鏡 (SEM) 像観察において、溶出度とキャタリスト溶解液の好中球はコントロールに比べ、細胞表面、特に突起の形態変化が認められた。以上の成績から、硬化試料溶出液は細胞生存率や LDH 漏出に影響を及ぼさず、 O_2^- 、 PGE_2 産生を抑制することが明らかになった。

一般に、 O_2^- 産生は細胞内への Ca^{2+} 流入やプロテインキナーゼ C (PKC) により NADPH オキシダーゼが活性化されて惹起されるものと考えられている。従って、その抑制機序は PKC を直接活性化する PMA の作用抑制、あるいは PKC、NADPH オキシダーゼ活性の阻害に基づくものと思われる。一方、 PGE_2 は細胞膜のフォスホリパーゼ A_2 活性に依存し、 Ca^{2+} 流入、PKC により活性化されると考えられている。このことから、溶出液の PGE_2 産生の抑制は溶出成分 TEGDMA、UDMA が細胞膜を修飾し、A23187 の Ca^{2+} 流入の抑制或い様々な刺激の情報伝達系の仲介をする PKC の阻害を反映したものと考えられる。

〔結論〕 硬化試料からの溶出液はヒト好中球の細胞生存率、LDH 漏出検査において影響を与えなかったが、 O_2^- 、 PGE_2 産生能に大きく影響を及ぼした。この変化は SEM 像の細胞表面突起の形態変化と関連していた。従って、本実験に用いた細胞機能試験は従来の試験法に加えて、今後細胞毒性試験と使用試験の関連性を明らかにする一手法として寄与することが示唆された。

審査は審査員全員によって口頭でなされた後、二審査員より筆答試験によって基礎歯学の能力テストがされた。

口頭試験では、最初に論文の概要の説明を求め、続いて本細胞機能試験の情報伝達系、試験試料の濃度と毒性に対する考え方、細胞としてヒト白血球を選んだ理由など個々の内容について、関連事項と合わせて質疑応答がなされた。

これに対して学位論文申請者、いずれも明快かつ適切な回答を示した。また、図表の訂正を求めたところ、これを理解し後刻、改訂図表を各審査員に提示し、了承を得た。また、基礎能力テストについても合格的を獲得した。

審査の結果、本論文の細胞機能試験は今までになされていない新しい材料の生物学的評価法であり、今後また適切な材料の評価法を確立する上で大きな意義を有するものであると認められた。

以上の結果、審査員全員によって、本論文は学位論文として十分値し、論文申請者は専門および関連領域について十分な学識と理解があり、博士 (歯学) の授与に値する者と認定された。