

学 位 論 文 題 名

Dental Material Research

－ Approach from biochemical point of view on
oxidative stress caused by dental materials －

（保存修復材料の研究

－材料が生体に及ぼす酸化ストレスの分子レベル的解析－）

学位論文内容の要旨

第1部 修復材料の審美障害

審美修復材料である光重合型コンポジットレジンの表面着色について、着色を引き起こすと考えられるコーヒー、ウーロン茶、赤ワインについて調べた。これらの飲料と人工唾液中に交互にコンポジットレジン試験片を浸漬することにより、どのような着色効果が見られるか、さらにブラッシング、クロルヘキシジン浸漬の影響について検討した。着色の比較検討にはデジタル画像を用いた独自の評価法を考案した。この結果、人工唾液のみの浸漬によっても着色が見られたが、この着色はブラッシング、クロルヘキシジン浸漬によって解消されたことから、唾液のムチンが着色を起こし、ブラッシングあるいはクロルヘキシジン浸漬によってレジン表面の唾液の膜が洗い流されたことにより着色が解消されたと考察した。コーヒー、ウーロン茶が比較的着色しなかったのは唾液の膜でレジン表面がコーティングされていたため、ブラッシングやクロルヘキシジンが膜を除去し、コーヒーに含まれる着色分子がレジン表面に結合できるようになり着色が起こったと考えられた。赤ワインによる強い着色は以前に報告のあるアルコールのレジン侵食作用により表面性状が変化したためではないかと考察した。結論として、それぞれの飲料で異なる着色のメカニズムを持つことが明らかとなり、飲料と唾液との着色に対する相乗効果が確認された。さらに機械的、化学的清掃による唾液の性状の変化も着色の増減に影響していることが示唆された。

第2部 修復材料の治療効果

（1）コンポジットレジン重合照射光による活性酸素種(ROS)の発生：光硬化型コンポジットレジンの重合に用いられる400-500 nmの照射光が様々な生体変化を引き起こす可能性が示唆され、なかでも癌細胞が顕著に障害を受けるという実験結果が報告される。その原因としてReactive Oxygen Species(ROS)の関与

が強く示唆されている。本研究では、光照射により細胞内外にROSが発生しミトコンドリア活性(SDH活性)が低下するのではないかという仮説をたてた。口腔上皮の正常細胞と癌細胞を用い、10秒から4分間の照射後、特殊試薬添加後の蛍光度を測ることにより、細胞内外のROSレベルを測定した。照射後の各細胞のSDH活性を、ペルオキサイドを加えたポジティブコントロールと比較した結果、正常細胞で30秒の照射により約20%、癌細胞では照射時間10秒で約60%の顕著な活性低下が認められた。この活性低下がROS発生によるものかどうかを調べるため、それぞれの細胞内外ROSを測定した。細胞内ROSは両細胞で照射時間の増加に従い、顕著な増加が認められ、細胞外ROSは細胞培養液あるいはハラムZ溶液内にポジティブコントロールの20分の1程度のROS発生を認めた。つまり照射光によって発生した細胞内外のROSは癌細胞で顕著にミトコンドリア活性を低下させることが明らかとなった。

(2) **金化合物の細胞毒性とROSの関係**：金化合物によっても細胞内にROSが発生し、それがミトコンドリア活性低下につながるのではないかという仮説を立て、以下の実験を行った。リウマチ性関節炎治療剤である1価の金化合物2種と、比較として3価の金化合物1種について、免疫応答にかかわるヒト単核球細胞のSDH活性に与える影響を調べた。1価の金化合物としてオーラノフィン、GSTMを、3価の金化合物としてその塩化物を使用した。細胞と金化合物を共に0から72時間培養した後に、SDH活性と細胞内ROSレベルを測定した。また、ROSの関与も検討するため、酸化促進剤および抑制剤を添加した場合の各種金化合物がSDH活性に与える影響を解析した。各種金化合物と24時間培養後のミトコンドリア活性を測定した結果、オーラノフィンが1 μ Mで、塩化金は100 μ M以上で顕著な活性低下を及ぼした。ところが細胞内ROSの上昇がみられたのは塩化金のみであり、添加直後から1時間まででそれ以上のROS発生は認められなかった。つまり各種金化合物は細胞活性を低下させるものの、その要因はROSではないことが明らかにされた。

(3) **金化合物の治療効果**：金化合物の治療メカニズムを調べる目的で、我々は細胞の酸化ストレスに対する防御システムのひとつチオレドキシンスシステムに着目した。チオレドキシシン還元酵素(TrxR)は、細胞内の酸化還元バランスに寄与し、DNA合成やレドックス関連遺伝子の調節に関与している。そこで様々な金化合物が哺乳類細胞に影響を与えない濃度でチオレドキシシン還元酵素を抑制するのではないかと考え、各種金化合物がTrxRを抑制する濃度と、単核球細胞、口腔上皮癌細胞のSDH活性を抑制する濃度とを比較検討した。その結果、金化合物は、細胞活性を抑制しない濃度で、哺乳類細胞質のTrxRの効果的な抑制剤となる可能性が示唆された。結論として様々な種類の金化合物が細胞活性に影響のない濃度で哺乳類TrxRを抑制することが明らかとなった。以上の研究により合金による酵素の抑制メカニズムを知る契機となり、新規薬剤の開発の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 英 彦

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 亘 理 文 夫

学 位 論 文 題 名

Dental Material Research

– Approach from biochemical point of view on
oxidative stress caused by dental materials –

(保存修復材料の研究

– 材料が生体に及ぼす酸化ストレスの分子レベル的解析 –)

審査は佐野、柴田および亘理審査委員全員が出席のもとに、まずは学位申請者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、提出論文の内容に関する審査委員の口頭試問を行った。以下に、その要旨と審査の内容を述べる。

提出論文の要旨

修復材料の研究にあたり、口腔内環境におけるその変質と、さらに発展してその生体に与える影響から治療応用まで生化学的な手法にて研究を行った。

第1部 修復材料の審美障害 審美修復材料である光重合型コンポジットレジンの表面着色について、デジタル画像を用いた独自の評価法を考案し、赤ワイン、ウーロン茶、コーヒーを用いて比較検討した。その結果赤ワインが強い着色を起こし、アルコール成分が表面着色に影響していることが考えられた。ブラッシングやクロロヘキシジン浸漬などの他の物理的、化学的因子も着色の増減に影響していることが示唆された。

第2部 修復材料の治療効果 (1)コンポジットレジン重合照射光による活性酸素種(ROS)の発生: 光硬化型コンポジットレジンの重合に用いられる400-500nmの照射光が様々な生体変化を引き起こす可能性が示唆され、癌の治療効果までも指摘されている。そこで本研究では照射光が、細胞内外にROSを誘起することで癌細胞のミトコンドリア活性(SDH活性)を抑制するのではないかと想定し、口腔上皮の正常細胞と癌細胞を用い、細胞内外のROSレベルを測定した。その結果、光照射により癌細胞内に有意にROSが誘起された。(2)金化合物の細胞毒性とROSの関係: レジン以外の修復材料として金属修復があげられる。金化合物は従来から生体親和性が優れており、医療用材料としても用いられる。そこで本研究ではリウマチ性関節炎治療剤である1価の

金化合物2種と、比較として3価の金化合物1種について、ヒト単核球細胞のSDH活性に与える影響を調べた。また、ROSの関与も検討するため、酸化促進剤および抑制剤を添加した場合の各種金合金がSDH活性に与える影響を解析した。その結果、全ての金化合物がSDH活性を抑制した。顕著なROS発生は3価の金化合物のみで、1価の金化合物ではROSとの関連性は認められなかった。(3)金化合物の治療効果: チオレドキシン還元酵素(TrxR)は、細胞内の酸化還元バランスに寄与し、DNA合成やレドックス関連遺伝子の調節に関与している。各種金化合物の癌、免疫疾患への治療応用も、このTrxRを介してのROSに影響を及ぼして効果を発揮していると示唆される。そこで本研究では、各種金化合物がTrxRを抑制する濃度と、単核球細胞、口腔上皮癌細胞のSDH活性を抑制する濃度とを比較検討した。その結果、全ての細胞でSDH活性が影響を受けない微量濃度で、TrxRが抑制されることが明らかとなった。このことから金化合物は、細胞活性を抑制しない濃度で、哺乳類細胞質のTrxRの効果的な抑制剤となる可能性が示唆された。

審査委員からの質問として、

- 1) コンポジットレジンの色を評価法について
- 2) コンポジットレジンの構成成分について
- 3) 着色を抑制できる将来のコンポジットレジンの発展について
- 4) 歯科用照射光の特性について
- 5) 活性酸素種の測定法について
- 6) ミトコンドリア活性を測定するためのSDHの役割について
- 7) 金製剤として使われている金化合物の特性について
- 8) リウマチ性関節炎の発生機序について
- 9) リウマチ性関節炎の治療機序について
- 10) チオレドキシンシステムと活性酸素種のかかわりについて
- 11) チオレドキシンの抑制剤の必要性について
- 12) 今後の研究の展望と発展性についての質問があったが、論文提出者はそれぞれに的確に解答した。

本研究は、いまだに多くの問題点をもちながら、発展し続ける保存修復材料についてその問題点の真髄と治療応用への発展性を探ることにより、今後の研究に大いに役立つ基礎データを貢献することとなった。

よって、学位申請者は歯学博士の学位授与に値するものと判断し、主査ならびに副査は合格と判定した。