学位論文題名

Colloidal platinum nanoparticles increase mitochondrial stress induced by resin composite components

(白金ナノコロイドはコンポジットレジン成分により生じる
細胞内ストレスを増大する)

学位論文内容の要旨

近年、光重合型コンポジットレジン(光 CoR)の歯質接着力は飛躍的に向上し、優れた審美性材料として歯科領域で広く用いられている。実際には、460nm 付近の光を 40 秒程度照射して、重合開始剤のカンファーキノン(CQ)と 3 級アミンのジメチルアミノエチルメタクリレート(DMAEM)によって生じるラジカルを利用して重合する。しかしながら、光 CoR の構成成分が、細胞に様々な影響を与えることも明らかにされている。さらに、重合反応に利用されるラジカルが、細胞毒性や酸化ストレスとなることが示唆されている。

白金ナノコロイド(CPN)は抗酸化作用を持つ物質であり、医療や工学の分野で様々な利用法が注目されている。歯科領域では、象牙質接着システムに応用することで、接着力が向上することが報告されている。

本研究では、CPN の抗酸化作用により、光 CoR 重合時に発生するラジカルへの影響を調べることで、重合開始剤の CQ と 3 級アミンの DMAEM 由来のラジカルに関与する細胞ストレスを軽減できるかを検討した。

37°C5%CO₂条件下、10%FBS 添加 RPMI1640 培地にて培養したヒト単球由来 THP-1 細胞(ATCC TIB202, American Type Culture Collection)に、毒性を示さない濃度の CQ と DMAEM および 0~20ppm の CPN を添加した後、0~60 間光照射を行った。細胞毒性・酸化ストレスは、0・6・24 時間後に CellTiter-Glo®(Promega)を用いて細胞内 ATP レベルを、GSH-Glo®(Promega)を用いて細胞内グルタチオン(GSH)レベルを測定して評価した。得られた結果は、ANOVA 及び Tukey にて、棄却率 5%で検定を行った。

CQ, DMAEM, 光照射および CPN を加えない状態の細胞をコントロールとした。光照射のみでは、細胞活性に変化は認められず、CQ と DMAEM

のみ添加した場合は、ATP レベルは 6 時間では 25%上昇し、24 時間では 125%まで上昇した。20 秒間の光照射を行うと、ATP レベルはコントロールと同程度であった。40 秒照射では、6 時間までは、コントロールと同程度であったが、24 時間後には 10~15%活性は低下した。60 秒照射では、6 時間で 40%、24 時間で 75%低下した。

CPN を添加したとき、光照射なしで、24 時間後には CPN 無添加よりも 50%上昇した。20 秒間の光照射では、24 時間まで、CPN 無添加と同程度であった。照射時間が 40、60 秒と増えると、ATP レベルはより強く抑制され、40 秒照射では、CPN 無添加よりも 24 時間で 60%減少した。

細胞内 GSH 濃度に関しては、CPN 無添加、40 秒光照射のみでは 0 時間で減少した細胞内 GSH 濃度は 24 時間で回復する傾向にあった。

CQ と DMAEM のみ添加した場合、光照射あり、なしの両群で、0 時間で細胞内 GSH 濃度は 20%低下していたが、24 時間後では、コントロールと比較して有意差は認められなかった。

10ppm の CPN を添加した場合、照射なしでは、0 時間では細胞内 GSH 濃度を抑制していたが、24 時間経過後は、回復傾向にあった。照射による統計学的な有意差は認められなかったが、抑制傾向はみられた。

CPN 濃度が 20ppm に増えた時、光照射でラジカルが発生すると、細胞内 GSH 濃度は CPN 10ppm の時よりも、さらに抑制された。光照射がない場合、CPN10ppm と 20ppm では有意差は認められなかった。

以上より、CPN はヒト単球由来 THP-1 細胞において、細胞毒性、酸化ストレスを緩衝するかもしれないという仮説は成立しなかった。むしろ、CPN がない状態で細胞の ATP レベルの増加または減少が認められ、光照射のある場合、ない場合で、酸化的リン酸化におけるストレスの増加が示唆された。CQ、DMAEM、CPN、光照射ある場合の変化はゆっくりだったが、24 時間で、顕著に表れ、フリーラジカルによる影響は短時間で表れるものではなく、長期的に変化するものであることが示唆された。

GSH レベルは、光照射なしの条件下で CQ と DMAEM を加えると、ATP レベルのような増加は見られず、40 秒の光照射で、ATP レベルのように減少した。ATP レベルとは異なり、CQ、DMAEM、光照射後直ちに、大きく減少し、短時間でラジカルの影響を与えるものだということが示唆された。最も大きな変化が認められたのは、光照射 24 時間後で、CPN がある場合だった。

CQ と DMAEM は光照射されない時、された時の 2 つの条件下で実験を行っている。光照射なしで、CPN もない場合、CQ と DMAEM は刺激されない状態で、その相乗効果でミトコンドリア活性は増加した。レジンによって、ミトコンドリア活性が上昇するのは、以前に報告されている。20 秒間の光照射では、CQ と DMAEM はフリーラジカルの形へと変化するた

め、活性の値は標準値となった。20秒照射で、CQとDMAEMから発生したフリーラジカルは、GSHレベルの短時間での減少の原因となった。しかし、ATPレベルには影響を及ぼさなかった。24時間後、GSHレベルはもとに戻り、フリーラジカルの影響をあまり受けないことが考えられた。60秒間光照射された時、フリーラジカルは6、24時間後にATPレベルを大きく抑制した。

細胞ストレスを悪化させるCPNの効果は、光照射なし、ありの条件で明らかだった。光照射がない状態で、CPNはATPレベルを6、24時間で上昇させた。光照射ある状態では、CPNによってATPレベルの減少は顕著になった。20秒照射では目立った変化がないのと、光照射なしで上昇した事の両方において、CPNとCQ、DMAEM間の相互作用を示唆されたが、今回の結果からでは、これらの相互作用の性質については、明らかではない。さらに、光照射はどういうわけか、CPN自体の構造や化学的性質を変えているのではないかと考えられる。

今回の実験結果からでは、CPNは、CQとDMAEMと光照射で生じる細胞毒性や酸化ストレスを緩衝することはなかった。抗酸化剤のCPNをより効果的に光重合型レジンに使うことは、CPNとCQ、DMAEM間での生化学的な相互作用について、さらに研究が必要と思われた。

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
副査 教授 野田 守 (岩手医科大)

学位論文題名

Colloidal platinum nanoparticles increase mitochondrial stress induced by resin composite components

(白金ナノコロイドはコンポジットレジン成分により生じる
細胞内ストレスを増大する)

審査は審査担当者が一同に会して約1時間半かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、その後に口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【緒言】

歯科領域で、光重合型コンポジットレジン(CR)は広く用いられ、CRの構成成分が、細胞に様々な影響をされると言われている。さらに、重合反応に利用されるラジカルが、毒性や酸化ストレスとなることが示唆されている。抗酸化作用をもつ白金ナノコロイド(CPN)を、未重合のCRに添加することで、細胞ストレスを軽減させることが可能となるかもしれない。そこで、本研究ではCRの構成成分である、カンファーキノン(CQ)とジメチルアミノエチルメタクリレート(DMAEM)を用いて発生させたラジカルによる細胞毒性、あるいは酸化ストレスをCPNによって緩衝できるかどうか検討した。また、ラジカルによるアポトーシスへの影響についても検討した。

【材料と方法】

ヒト単球由来 THP-1 細胞に、毒性のない濃度の 0.4mM CQ と 0.5mM DMAEM, 0~20ppm の CPN を添加後、光照射(0~60 秒)によりラジカルを発生させた。細胞毒性・酸化ストレスは、0・6・24 時間後に CellTiter-Glo®(Promega)を用いて ATP レベルを、GSH-Glo®(Promega)を用いて GSH

レベルを、カスパーゼ活性(Caspase 3/7 Glo, Caspase 8 Glo, Caspase 9 Glo, Promega)を測定することで評価した。得られた結果については、ANOVA 及び Tukey にて、棄却率 5%で検定を行った。

【結果及び考察】

(1)細胞代謝活性 CPN はラジカル発生の有無に関わらず細胞活性を低下させた。従って、CPN は細胞内代謝経路に影響を与えていると考えられた。CQ, DMAEM と照射により生じたラジカルも細胞活性を低下させたが、CPN により緩衝されなかった。従って、CPN はラジカルを除去しない事が分かった。

(2)細胞内 GSH 濃度 ラジカル発生、非発生時ともに、時間が経過すると、GSH 濃度は上昇した。ラジカル発生時、0 時間で GSH 濃度に変化はなかったが、6, 24 時間後では、CPN 濃度に依存して GSH 濃度は低下した。従って、ラジカルは CPN の細胞防御系へ影響を及ぼす事が示唆された。

(3)Cas 活性 ラジカル非発生時、CPN 濃度依存的に Cas 3/7 活性は低下したが、Cas 8,9 活性の変化は認められなかった。ラジカル発生時、Cas3/7 活性は顕著に上昇したが、Cas8, 9 には変化は認められなかった。CPN による影響も認められなかった。従って、ラジカルは細胞内に侵入し、Cas8,9 を介さない経路でアポトーシスを誘導する事が示唆された。

以上より、今回の実験結果からでは、CPN は、CQ と DMAEM と照射で生じるラジカルの細胞毒性や酸化ストレスを緩衝することはなかった。抗酸化剤の CPN をより効果的に CR に使うことは、あまり効果的ではなさそうだが、CPN と CQ, DMAEM 間で生化学的な相互作用や関係性の性質には、さらなる研究が必要である。

各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) カンファーキノンについて
- 2) ラジカルについて、またその発生量、作用時間との関係性について
- 3) THP-1 細胞を使用した理由について
- 4) 照射器から発する青い光の細胞への影響について
- 5) Caspase 活性のテスト法、Caspase 酵素について
- 6) THP-1 細胞の食能との関係性について
- 7) 細胞内の CPN の動向について
- 8) グルタチオン(GSH)について
- 9) Caspase 以外の方法でのアポトーシス誘導の検出について

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得ら

れ、さらに今後の研究の発展性についても明確な方向性を持っていると判定した。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。