

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者	堀 美喜
論文題目	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

メタクリロイロキシ基を基本骨格とするモノマーは歯科臨床において日常的に使用されており、近年でも様々な官能基をもつメタクリレート誘導体が臨床現場の要求に対応するために開発されている。メチルメタクリレート (MMA) は比較的生体親和性がよく、歯科領域のみならず、医科の整形外科領域の骨セメントなど高度管理医療機器としての生物学的安全性が要求される材料にも応用されている。メタクリロイロキシ基を含むモノマーは、構造に炭素の二重結合を含み、ラジカルの生成により急速に重合、硬化する特長をもつ。このため、有機材料系の歯科材料として、歯科充填用コンポジットレジン、歯科接着用レジンセメント、義歯床用硬質裏装材、さらに生物学的親和性がきわめて重要な覆髄用材料としても多用されている。しかしながら、それらの硬化体には 3~5%の残留モノマーが存在することが指摘されており、その残留モノマーは生体組織及び細胞に傷害を与えることが報告されている。生物学的に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。

我々はこれまでに、解毒代謝系第二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、評価してきた。その結果、ヒドロキシル基により修飾されたメタクリレート誘導体は、細胞内で求電子的な物質として働き、細胞傷害性が上昇することが示唆さ

れた。本研究では ARE ルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを用いて (メタ) アクリレート誘導体及び製品 (歯面処理材) の生物学的安全性に関する更なる基本情報を得ることを目的として検討を進めた。

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)、官能基として極性のある分子構造をもつレジンモノマーとして、ヒドロキシル基を付加した HEMA、ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA)、アミド基を含むアクリルアミド (AA)、メタクリルアミド (MA)、ヒドロキシル基とアミド基を両方もつヒドロキシエチルメタクリルアミド (HEAA)、ジメタクリレートのモノマーである親水基を複数構造にもつ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、クラレノリタケ) の全 11 種類を用いた。

上記の各種モノマーの ARE 活性化率の測定において、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用いた。ヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞を用いて ARE 遺伝子配列をタンデムにもち、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター配列としてもつベクター (pGL4.24-2E-Neo) を導入したステーブルクローン細胞 (HepG2-AD13 細胞) を用いた。細胞の維持は 80%コンフルエントで継代を行い、培養液の交換は 2 日毎に行なったものを用いた。HepG2-AD13 細胞を 24 ウェルプレートの各ウェルに 3.0×10^5 cells/well となるように播種し、24 時間 CO₂ インキュベーターにて培養し

た。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し、さらにインキュベーター内で6時間培養した。培養後、PBSにて細胞を洗浄し、位相差顕微鏡にて細胞観察を行なった。PBSを除去し、各ウェルに100 μ LのPassive Lysis Bufferを添加し、15分間室温にて攪拌し、細胞溶解液を作製した。Single-Luciferase Reporter Assay Systemの基質を発光測定用のチューブに50 μ L分注し、細胞溶解液を10 μ L添加直後にルミノメータ(AB-2200 Ver. 2.61D、ATTO Corporation)にてルシフェラーゼ活性を測定した。測定はマニュアルモードで10秒間の積算値とした。また、ARE活性化率はモノマー非添加で得られた対照値で除した値(ベースラインは1)とする。測定回数は4回で、測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

歯科領域で頻用される有機材料である(メタ)アクリロイロキシ基を基本骨格とするモノマーは、構造内にエステル結合を含んでいるため、わずかではあるが極性をもつ。非極性モノマーは極性をもつ部分がエステル基ひとつのみであるが、ヒドロキシル基、アミド基、リン酸基などの極性をもつ構造を含むモノマーは構造全体として電荷の偏りを複雑にもつ。

本研究で用いた全11種類の試験材料で濃度依存的なARE活性化率の上昇を認めた。このことから、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傷害を与えているものと推定される。実験結果のグラフの形状は大きくふたつに分類できた。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。

非極性モノマーで得られた曲線は、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た。低濃度領域の 1 mM 付近から 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 は測定を行なった最高濃度である 30 mM まで徐々に上昇した。MMA (30 mM) の ARE 活性化率は 166.5 ± 5.6 倍、EMA のそれは 30 mM において 99.3 ± 9.0 倍であった。PMA (10 mM)、BMA (5 mM) の ARE 活性化率はそれぞれ 36.0 ± 9.5 倍、 17.4 ± 6.0 倍であった。BMA および PMA はそれぞれ 5、10 mM を超えて試験を行なうことが不可能であった。PMA、BMA をそれぞれ 20 mM 添加した時、培養 6 時間で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が判明した。以上のことから、非極性モノマーの ARE 活性化率は低濃度領域における立ち上がりが類似しており、ARE 活性化率も同程度であることから、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ことが示唆された。これらのモノマーがもつ極性部分はエステル結合 1 カ所のみであることから、構造全体として極性の偏りの変化が少ないものと考えられる。

一方、官能基に極性をもつモノマー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た。HEMA、HPMA 刺激において、いずれも 5~10 mM の間でピークを示し、20 mM 時点ではほぼベースラインまで急激に低下した。5 mM では HEMA、HPMA はそれぞれ 54.8 ± 2.1 倍、 45.8 ± 3.1 倍を示した。さらに、0.5~5 mM の低濃度領域において、ヒドロキシル基を付加したモノマーは炭素鎖を付加した非極性モノマーより ARE 活性化率が高い値を示したことから、ヒドロキシル基を含むことにより、細胞傷害性が上昇することが示唆された。

AA と MA で得られたグラフによると ARE 活性化率が HEMA と比較して 10 分の 1 程度であり、細胞に対する酸化ストレスの影響はヒドロキシル基よりも少ないことが示唆された。しかしながら、AA は一般的に毒性が高いとの報告が多く、単一細胞への酸化ストレスとしての影響は少ないものの、細胞死に至る濃度は低く、結果として毒性は高いことが示唆された。すなわち AA の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される。一方、HEAA においては、先に示したアミド基のみを含む AA、MA と比較し、ARE 活性化率が高い値を示したことから、細胞に対する酸化ストレスの影響は大きくなったことが示唆された。しかしながら、HEMA と比較した場合、HEAA の ARE 活性化率が上昇を示す最低濃度は高く、高負荷により初めて細胞への傷害が生じることが分かった。またベル型の頂上のピークに達する濃度は HEAA の方が大きく、このことから HEAA は HEMA よ

りも細胞傷害性が低いものと推定される。

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た。また、細胞死が生じる濃度が 10 mM と低いことから TEGDMA は低容量で細胞に強い酸化ストレスを与え、細胞内への傷害性が高い物質であることが示唆される。TEGDMA の親水性を高めている部分である酸素原子の電気陰性度は大きく、極性の偏りが大であることが原因として考えられる。

MDP を主要なモノマーとして使用している市販品の PANA VIA V5 Tooth Primer 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すことが判明した。このプライマーは低濃度領域から高い活性を示し、ピークを示す濃度も 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 以下で到達し、HEMA と比較してもピークに至る濃度が低いことから、細胞傷害性は高いことが示唆された。プライマーにはカンファーキノンなどの光重合開始材やアルコールなどの溶媒、微量な重合禁止材などを含む複合材であるが、単一モノマーの評価と同様に、本実験の方法によって、混合物の総合的な評価を行うことが可能であることが判明した。本実験結果から PANA VIA の細胞への負荷は比較的大きいことから、この材料を構成する有機成分の構成を検討することにより、製品の更なる改善が可能かもしれない。

本実験では、実験した全ての試料に関して濃度依存的な ARE 活性化率の曲線が得られた。したがって、本手法を他のモノマーさらにはセラミック

ス、金属などに展開することにより、更に幅広い細胞傷害性に関する基礎情報を得ることが可能となると考えられる。しかしながら、本実験で用いたステーブルクローン細胞は非分泌型ルシフェラーゼを用いており、細胞溶解液の作製を必要とすることから、ある特定の培養時間での評価しかできないという弱点を有する。これは、レポーター遺伝子を分泌型に改良することにより解決できると考えられる。さらに、分泌型のシステムが構築された場合には細胞の経時的な変化を追跡することも可能となり、分析情報はさらに拡大される。このように本実験手法は、汎用的に歯科材料の生物学的安全性を評価する指標となるポテンシャルを内包し、将来的には歯科材料の細胞毒性試験法の一翼を担うことが期待される。