

Title	N-acetyl cysteine erases cellular damage and oxidative stress by PMMA on oral epithelial cells
Author(s)	西宮, 紘子
Journal	, (): -
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3415">http://hdl.handle.net/10130/3415</a>
Right	

氏名	西宮 紘子
学位	博士（歯学）
学位記番号	第2035号（甲 第1269号）
学位授与年月日	平成26年 3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
論文審査委員	主査 井上 孝 教授 副査 櫻井 薫 教授 副査 小田 豊 教授 副査 石原 和幸 教授 副査 山本 仁 教授
学位論文名	N-acetyl cysteine erases cellular damage and oxidative stress by PMMA on oral epithelial cells

## 学位論文内容の要旨

### 1. 研究目的

ポリメタクリル酸メチル（PMMA）を主成分とした歯科用常温重合レジン（補綴処置に必須の材料である一方で、口腔粘膜や皮膚に対する、接触性の炎症が懸念される。それらの発症や進行に、レジン共重合体から溶出する残留 MMA（メタクリル酸メチル）やその分解産物による酸化ストレスが関与する。抗酸化アミノ酸誘導体 N-アセチルシステイン（NAC）は、レジン材料による為害性を軽減することが知られている。本研究の目的は、PMMA 共重合体に NAC を添加することで、口腔粘膜上皮細胞に対する PMMA 溶出液の細胞傷害性を消去できるかどうか評価し、その機序を検証することである。

### 2. 研究方法

NAC 含有もしくは非含有の常温重合 PMMA 歯科用レジン（UnifastIII、GC）を重合後、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 もしくは Oral Keratinocyte Medium 中で7日間浸漬し、溶出培養液を作製した。ラット口蓋粘膜より抽出した口腔粘膜上皮細胞もしくはヒト口腔粘膜上皮細胞をそれぞれポリスチレン上に播種し、一定期間の前培養で単層状にした後、溶出液非含有培養液、PMMA 溶出液含有培養液もしくは NAC 添加 PMMA 溶出液含有培養液で1日間培養した。培養後に、細胞構成要素の破壊程度の評価として、接着細胞数、乳酸脱水素酵素（LDH）放出量および E カドヘリン量を定量した。酸化ストレスの評価として、細胞内の活性酸素種（ROS）レベル、総グルタチオンおよび酸化型グルタチオン量を定量した。炎症反応性の評価として、マルチプレックス解析による炎症性サイトカイン産生量を定量した。また、外来性物質の細胞内侵入程度の評価として、細胞内ホルムアルデヒド量およびライソゾーム量を定量した。

加えて、溶出液中の化学物質溶出の程度および抗酸化能の評価として、ホルムアルデヒド量および DPPH ラジカル消去活性を測定した。統計解析として、一元配置分散分析後に、Bonferroni 検定を行った ( $\alpha=0.05$ )。

### 3. 研究成績および結論

PMMA 溶出液含有培養液中のラット口腔粘膜上皮細胞では、非含有培養液中の細胞と比べて、接着細胞数の減少、LDH 放出量の上昇ならびに E カドヘリン量の減少を認めたが、NAC 添加 PMMA 溶出液含有培養液中の細胞では、非含有培養液中の細胞の値と同程度であった。PMMA 溶出液含有培養液中のヒト口腔粘膜上皮細胞では、細胞内 ROS レベルの上昇と総グルタチオンおよび酸化型グルタチオン量の低下を認めた。一方、NAC 添加 PMMA 溶出液含有培養液中の細胞では、非含有培養液中の細胞と比べて、細胞内 ROS レベルは低く、また、総グルタチオン量は高かったが、酸化型グルタチオン量に差はなかった。PMMA 溶出液含有培養液中の細胞は、非含有培養液中の細胞よりも、GM-CSF、M-CSF、IL-1 $\beta$ 、IL-8、MCP-1 および MCP-3 といった炎症性サイトカインの産生量は増加したが、NAC 添加 PMMA 溶出液含有培養液中の細胞では、それらの産生増加は抑えられた。細胞内ライソゾーム量および細胞内ホルムアルデヒド量は、PMMA 溶出液含有培養液中の細胞で増加したが、NAC 添加 PMMA 溶出液含有培養液中の細胞では増加しなかった。PMMA 溶出液中にはホルムアルデヒドが検出されたが、PMMA 共重合体に NAC を添加することでその量は減少した。NAC 添加 PMMA 溶出液のみ DPPH ラジカル消去活性を認めた。これらのことから、常温重合 PMMA 共重合体の溶出液は、MMA やホルムアルデヒドを含有し、それらが細胞中に入り込むことにより、口腔粘膜上皮細胞に対して、酸化ストレスを介した細胞死や細胞構成要素の破壊および炎症性サイトカイン産生増加といった細胞傷害を引き起こした。また、NAC を PMMA 共重合体へ添加することで、その起炎性は消失することが示された。その機序として、共重合体からの NAC 溶出に伴う細胞の酸化ストレスに対する耐性向上よりもむしろ、重合体からのホルムアルデヒド溶出の減少が示唆された。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1269号	氏名	西宮 紘子
最終試験担当者	主 査	井上 孝	教 授
	副 査	櫻井 薫	教 授
		小田 豊	教 授
		石原 和幸	教 授
		山本 仁	教 授
最終試験施行日	平成26年 1月28日		
試験科目	歯科補綴学		
試験方法	口頭試問		
試験問題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

## 学位論文審査の要旨

本研究は、溶出試験と細胞培養試験を用いて、歯科治療で頻用されている常温重合ポリメタクリル酸メチル（PMMA）共重合体による口腔粘膜上皮細胞に対する為害性を、抗酸化作用のある N-アセチルシステイン（NAC）を PMMA 共重合体に添加することで減弱できるかどうか、また、その機序について検討したものである。

本審査委員会では研究方法の妥当性や得られた結果の解釈と意義などを中心に以下のような質疑が行われた。①共重合体からの溶出成分の量、②PMMA 溶出液が上皮の細胞接着と細胞間結合に与える影響、③各炎症性サイトカインの検出レベルと予想される生体への作用、④NAC のもつ官能基と PMMA のもつ上皮細胞為害性の減弱との関連性、⑤本研究結果が歯科臨床に与える影響の予想などの質問がなされた。これらの質問に対する回答として、①実験で得られた実測値は類似した実験系を用いた参考文献中の値と同等以上の溶出量が検出されたこと、②PMMA 溶出液は細胞の剥離と細胞間結合の喪失をもたらす細胞傷害性を示されたこと、③上皮組織中および上皮結合組織中において、炎症反応の起点となる免疫細胞の活性化を促す可能性があること、④NAC のもつ抗酸化作用を示す官能基が PMMA 共重合体成分の溶出を抑え、PMMA の上皮細胞為害性の消去に寄与したこと、⑤義歯床の粘膜面やプロビジョナルレストレーションのマージン部など口腔粘膜上皮細胞に直接接触する部位において、直接法応用時での口腔粘膜の炎症反応を予防できる可能性があること、などが説明された。また、その他の質問に対しても妥当な回答が得られた。さらに、タイトル、方法、結果および考察中の専門用語や文章表現、図表の最適化に関して指摘があり、訂正が行われた。

その結果、本研究で得られた知見は歯学の発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。