

Title	コンポジットレジンの女性ホルモン様作用発現に関するリスク評価
Author(s)	和田, 浩
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44016
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	和田 浩 ^{ひろし}
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 17730 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	コンポジットレジン ^{レジン} の女性ホルモン様作用発現に関するリスク評価
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之 (副査) 教授 高橋 純造 助教授 増田 裕次 講師 中村 隆志

論文内容の要旨

コンポジットレジン (CR) は、無機ガラスフィラーと二官能性モノマーを主成分とし、配合されたモノマーが重合することによって硬化するが、立体障害などの理由によりモノマーの 100%の重合は生じない。そのため、CR 硬化体からはモノマーを中心とした主要構成成分が溶出することが知られており、これまで、細胞を用いた毒性試験や変異原性試験、動物を用いた歯髄反応試験などによりその生体親和性の確認が行われてきた。しかしながら、CR の構成成分は多種多様であり、主要成分以外に微量添加されているさまざまな化学物質も硬化体から溶出する。細胞に対する毒性などと異なり、女性ホルモン様作用がごく微量の濃度で発現することを考えると、CR の生体安全性を内分泌攪乱作用という観点から検討することも重要であると言えるが、現在まで CR 構成成分の女性ホルモン様活性を詳細に検討した報告は見あたらない。

そこで本研究では、国内で入手可能な市販 CR 24 種を用いて、その硬化体および構成成分の女性ホルモン様活性をレポータージーンアッセイにて検討した。また、CR 硬化体から溶出する成分を分析し、CR の女性ホルモン様活性発現に関与する化学物質を同定した。さらに、女性ホルモン様活性を示す化学物質の *in vivo* での作用発現量をラット子宮肥大反応試験にて検討し、CR 充填が人体に女性ホルモン様作用を誘導するリスクの総合的評価を行った。

まず、直径 5 mm、厚さ 1.5 mm の硬化 CR ディスクを、10%ウシ胎児血清を加えた Dulbecco's-Minimum Essential Medium (D-MEM) 2 mL 中に 37℃下で 24 時間浸漬して溶出試料を採取し、その女性ホルモン様活性をレポータージーンアッセイにて検定した。アッセイには、エストロゲンレセプター応答配列を挿入したレポータープラスミド、 β -ガラクトシダーゼおよびヒトエストロゲンレセプター α 発現プラスミドを導入したヒト腎由来細胞株 293T を使用した。溶出試料を用いて遺伝子導入を終えた細胞を培養した後、基質溶液を加えた際に生じる発光量を求め、女性ホルモン様の転写活性を測定した。その結果、被験した 24 種の CR 溶出試料のうち、6 種のものに女性ホルモン様活性が認められた。

次に、ガスクロマトグラフィー質量分析によって被験した 24 種の CR に配合されていることが確認された 18 種類の化学物質 (モノマー 5 種、光増感剤 2 種、紫外線吸収剤 3 種、重合禁止剤 2 種および重合促進剤 6 種) の女性ホルモン様活性を検定した。各化学物質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、D-MEM にて 100 nM~100 μ M の濃度に調整し、硬化ディスクからの溶出試料の場合と同様にして、レポータージーンアッセイによる女性ホルモン様活性の測定を行った。その結果、18 種類の CR 構成成分のうち、紫外線吸収剤 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone

(HMBP) と光増感剤 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) が 1 μ M 以上の濃度で、重合禁止剤 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) が 50 μ M 以上の濃度で、女性ホルモン様活性を示した。

さらに、CR 硬化体からのこれらの成分の溶出性を調べるため、直径 5 mm、厚さ 1.5 mm の硬化ディスクを 2 mL の蒸留水中に 1 から 90 日間浸漬し、高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った結果、HMBP の溶出が 12 種の CR から、DMPA の溶出が 2 種の CR から確認された。しかも、女性ホルモン様活性が認められた 6 種の CR のうち、4 種ではレポータージーンアッセイにおける最小活性発現濃度 1 μ M を超える HMBP の溶出が、他の 2 種で最小活性発現濃度 1 μ M を超える DMPA の溶出が起きていることが判明し、CR 硬化体からの溶出試料における活性の発現は HMBP あるいは DMPA の溶出によるものと推察された。なお、BHT は、いずれの CR からも検出限界を超える濃度での溶出は認められなかった。また、硬化 CR ディスクからの HMBP および DMPA の溶出は、ともに浸漬 3 日目までは確認されたが、いずれの CR においても 4 日目以降には認められなくなった。

これらの *in vitro* での結果を踏まえて、続いて、HMBP と DMPA の *in vivo* における女性ホルモン様作用をラット子宮肥大反応試験にて検討した。9 週齢の卵巢摘出ウイスターラットに、DMSO に溶解した HMBP あるいは DMPA を 100~600 mg/kg/day の量で 3 日間腹腔内に連続投与した。そして、試験開始 4 日目に子宮を摘出し、重量の測定を行うとともに組織切片を作製して HE 染色を施し、子宮内膜の肥厚の有無を観察した。その結果、ポジティブコントロール(エストラジオール 17 β 10 μ g/kg/day 投与)では子宮重量がネガティブコントロール(DMSO 1 mL/kg/day 投与)の 2 倍以上に増加したのに対し、HMBP あるいは DMPA 投与群ともすべての投与量において重量の変化は認められなかった。また、ポジティブコントロールでは明らかな子宮内膜の肥厚が観察されたが、HMBP あるいは DMPA 投与群では組織学的変化は全く認められなかった。さらに、先の溶出実験において検出された硬化 CR ディスクからの HMBP や DMPA の 3 日間の最大積算溶出量は、本実験における最大投与量をヒトの体重を 50 kg として換算した数値の 5000 万分の 1 以下であることから、CR から溶出する HMBP および DMPA が生体内で女性ホルモン様作用を発現する可能性は極めて低いものと考えられた。

以上の結果より、レポータージーンアッセイを用いた *in vitro* 実験系では、CR からの HMBP および DMPA の溶出によって女性ホルモン様活性が発現されることが分かった。しかしながら、ラット子宮肥大反応試験の結果から、これらの物質の溶出量は *in vivo* においては全く活性を発現しないレベルであることが明らかとなり、CR 充填が生体内において女性ホルモン様作用を引き起こすリスクは無視できるほど低いことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯科臨床において頻用されているコンポジットレジン (CR) の生体親和性を、市販されている 24 種の CR について女性ホルモン様作用という観点から検討したものである。その結果、CR に添加されている 3 種の化学物質に女性ホルモン様の転写活性が確認された。このうち 2 種は、重合硬化後の CR から溶出し、*in vitro* での女性ホルモン様活性発現に関与することが明らかとなった。しかし、ラットを用いた動物実験では、これらの化学物質による影響は認められず、CR が生体において女性ホルモン様作用を誘導するリスクは無視できるほど低いことが示された。

以上の研究成果は、CR の女性ホルモン様作用を *in vitro* と *in vivo* の両面から詳細に検索することにより、CR の生体親和性について重要な知見を提供したものであり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。