

〔原著〕 松本歯学 17 : 182~188, 1991

key words : 形状記憶ポリマー — 生体親和性 — 寒天重層法 — 細胞毒性試験

ウレタン系形状記憶ポリマーの生体親和性について 第1報 寒天重層法による毒性試験

崔 峻宇, 鈴木和夫

松本歯科大学 口腔解剖学第2講座 (主任 鈴木和夫 教授)

鷹股哲也, 福与碩夫

松本歯科大学 歯科補綴学第1講座 (主任 鷹股哲也 助教授)

Biocompatibility of the Urethane Shape Memory Polymer
[1] Toxicity test on the agar overlay test

JOONWOO CHOI and KAZUO SUZUKI

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental College
(Chief : K. Suzuki)*

TETSUYA TAKAMATA and SEKIO FUKUYO

*Department of Complete and Partial Denture Prosthodontics, Matsumoto Dental College
(Chief : T. Takamata)*

Summary

In-vitro testing methods using cell culture have become common in the evaluation of the biologic effects of dental material. One of these tests is described in this paper. It is an in-vitro test using culture to determine the general cytotoxic effect of the urethane shape memory polymer. The Agar Overlay Test (AOT) was used for the cytotoxicity screening of the urethane shape memory polymer and heat-polymerized denture base polymers.

A 24-hour culture of human Hela cells was used in this test. Finings of C. C. P. and Asb were used as controls in comparing interpreting the results.

In conclusion about 20% of the cells were disintegrated by the heat-polymerized denture base polymer in the decolorized area. However, the urethane shape memory polymer produced no discoloration in areas surrounding or directly underneath it. There were also no disintegrated cells in these areas.

When evaluated, these tests showed that the heat-polymerized denture base polymer has some effect on the culture cells. However the urethane shape memory polymer is valuable for dental materials.

緒 言

歯科医療に種々なる新しい材料が使用されるようになり、歯科医療は大きく進歩している。これにともない、歯科医療に使用されるこれらの材料が生体に対しての為害性や生体適合性について問題視されている。

最近では、形状記憶効果をもつ素材としてチタン・ニッケル合金をはじめとして、金・カドミウム系、銅・亜鉛系等多くの合金が知られている。チタンは酸化されやすく、容易に酸化膜が表面につくられる。この酸化膜を介して周囲組織と接しているため、組織親和性が高められている。このため、チタン・ニッケル形状記憶合金は細胞毒性が少なく、良好な生体親和性を有しており、現在形状記憶インプラントに利用されている¹⁻⁴⁾。さらにこの合金は超弾性を示すことから歯科矯正治療のためのワイヤーに応用されている⁵⁻⁷⁾。

近年、金属材料とともに合成高分子材料の歯科領域での利用が大きくクローズアップされてきている。しかし、一部の高分子材料では生体親和性が劣るとされ、細胞培養による毒性試験や動物実験による生体安全性が明らかにされなければならない。

今回著者らは、チタン・ニッケル合金と同様の形状記憶効果を有する高分子材料の歯科利用を目的として、三菱重工製ウレタン系形状記憶ポリマーの生体親和性を追求した。この材料の生体親和性を確認するために、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞を使用して寒天重層法により細胞毒性試験を行なった。この結果、ウレタン系形状記憶ポリマーは生体親和性に優れており、今後歯科領域に応用する可能性があることが知れたので、報告する。

材料および方法

1. 実験材料

使用材料はウレタン系形状記憶ポリマー（三菱重工製）（以下S.M.P.と称する）、熱重合性歯科用アクリル樹脂（以下M.M.A.と称する）、アスベスト（以下Asbと称する）、細胞培養用プラスチック（以下C.C.P.と称する）をそれぞれ厚さ1mm, 10mm平方角の小片を試験材料とした。

本実験ではS.M.P.とM.M.A.を試験資料と

し、さらにAsbは陽性対照資料およびC.C.P.は陰性対照資料とした。

また本実験に使用したウレタン系形状記憶ポリマーは図1に示す如き直鎖構造を持つ高分子材料で⁸⁾、表1に示す特性を有している⁹⁾。

2. 細胞毒性試験

細胞はヒト子宮頸部癌由来、HeLa細胞の培養細胞を用いた。

通法に従い、HeLa細胞の浮遊液（ 3×10^5 個/ml）を作り、90mmシャーレのEagle培地に子牛血清10%添加した培養液10ml加えたものを10枚作製し、37°Cに調節した5%炭酸ガス培養器中にて24時間培養した。

今回は、陰性対照試料と陽性対照試料の他に対照試験試料として現在日常臨床に義歯床用材料として使用されているM.M.A.（アクリル樹脂）を、試験試料としてのS.M.P.の4試料について生体親和性を比較検討した。

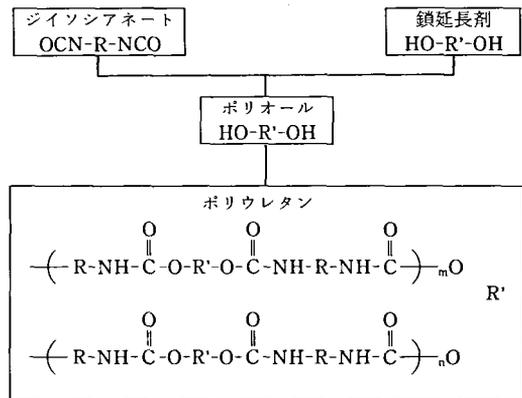


図1：ポリウレタン重合過程
(林 俊一論文より)⁸⁾

表1：形状記憶ポリマーの特性

項 目	実 測 値
ガラス転移点 (T_g)	-30~+70°C
弾性率比 (E/E')	20~180
耐 熱 性	98% ^{a)}
耐 候 性	98% ^{b)}
繰返し作動性	なし ^{c)}
成形性	射出成形可能

注 a) 75°C×500 hr 後の弾性率保持率

b) 屋外暴露2年相当後の弾性率保持率。

c) 5,000回後の T_g の変化。

(林 俊一論文より)⁹⁾

単層に細胞培養したシャーレから培養液を取り除き、Eagle 寒天培養液を各シャーレ上に10ml ずつ加え、室温にて固化させた。固化した寒天培地にニュートラルレッド溶液10 ml を加え、15分後過剰の染色液を除去し、各シャーレの寒天培地に4 試料を密着させるように載せ、37℃に調節された5%炭酸ガス培養器内にて24時間培養後、観察した¹⁰⁾。

3. 評価方法

10枚の培養後シャーレを白紙上に置き、陰性対照試料直下および周辺が均一に桃色になっているものと陽性対照試料直下および周辺が脱色しているシャーレを評価対照とした。逆に陰性対照試料で脱色していたり、陽性対照試料で桃色に着色しているシャーレは評価対照から棄却することとした。しかし、今回の実験ではすべてのシャーレは前記の問題がみられず、10枚シャーレが評価対象となった。脱色域の範囲の広さや脱色域内で融解した細胞の割合により、それぞれゾーン指数、融解指数として評価し、細胞融解がみられる時のみ毒性があるとした。評価基準は表2に示す寒天重層法による評価基準に従った¹⁰⁾。

結 果

試料を寒天にのせ、炭酸ガス培養器内にて、37℃で24時間細胞培養を行なった10枚のペトリ皿を白紙上に置き、評価方法に従って観察した。陰性対照試料であるC.C.P.の周辺脱色がみられたり、陽性対照試料であるAsbの周辺が桃色のままあるペトリ皿は観察対象から除外することとした。本実験ではこのような除外とするペトリ皿はなく、培養細胞による細胞毒性試験を10枚のペトリ皿について倒立顕微鏡による観察で判定した(図2)。

C.C.P.は強い細胞親和性をもつとして通常の組織・細胞培養器材の材料に使用されている。このことから、本実験では陰性対照試料として比較検討のために行った。

C.C.P.の脱色域の範囲をみると、試料直下あるいは周辺に脱色はみられず、ゾーン指数は0と判定された。またC.C.P.試料の直下および周辺の培養細胞を観察すると、総ての細胞の細胞質はニュートラルレッドに染色され、核の染色質の凝集もなく、明るい核網構造を呈する球形の核が細胞中央に存在している。これら細胞の状態は融解やその他細胞変性を示さない細胞である(図3, 4)。この結果からC.C.P.は良好な細胞親和性をもつ材料と思われた。

最近、細胞毒性が強いとして問題視されているアスベスト(Asb)を陽性対照試料として比較検討を行った。



図2：ニュートラルレッド染色イーグル寒天培地上の試料

C.C.P.	M.M.A.
S.M.P.	Asb

表2：寒天重層法における評価基準

ゾーン指数	脱色域の範囲	融解指数	細胞融解の程度 (顕微鏡観察)
0	試料直下あるいは周辺に脱色域なし	0	融解なし
1	試料直下のみ	1	脱色域内の20%以下
2	試料の周囲0.5 cm 以内	2	脱色域内の40%以下
3	試料の周囲1.0 cm 以内	3	脱色域内の60%以下
4	試料の周囲1 cm 以上だが、全面でない	4	脱色域内の80%以下
5	全面が脱色	5	脱色域内の80%以上が融解

(今井庸二論文より引用)¹⁰⁾

Asb について脱色域の範囲をみると、試料の直下および周辺では全面が脱色され、ゾーン指数は 5 と判定された。この脱色域内の培養細胞をみると、試料直下の細胞群のうちには核周囲にニュー

トラルレッドに染色される細胞質がみられる細胞が僅かに観察されるが、大部分の細胞では細胞質はニュートラルレッドに染色されていない。また、これら細胞は膨化して細胞辺縁は不規則な波濤状



図 3 : C. C. P. 周辺の細胞に染色性が認められ、細胞融解はみられない。×200



図 6 : Asb 直下細胞のほとんど融解し、染色性は認められない。×200



図 4 : C. C. P. 直下の細胞の染色性はよく、C. C. P. は細胞親和性を示す。×200



図 7 : M. M. A. 周辺に強い染色性が認められ、細胞の融解はみられない。×200



図 5 : Asb 周辺細胞の染色性が認められず、細胞の融解がみられる。×200



図 8 : M. M. A. 直下大部分の細胞は染色性を認められるが、一部細胞では染色性は認められず、細胞融解がみられる。×200

を示したり、細胞が癒合して塊状に集るなど細胞融解の様相がうかがわれる(図5, 6)。この細胞様相および染色状態を示す細胞率から融解指数5と判定した。

適正な操作で作られたレジン床義歯中にも約0.5%のモノマーが残留し、これが通常刺激成分として指摘されている。しかし、アクリルレジンに対するアレルギー反応は口腔内では殆ど起こらないとされている。

本実験では、熱重合性歯科用アクリル樹脂を適法に従い熱重合した M. M. A. 試料を比較対照として検討した。M. M. A. における脱色域の範囲をみると、試料の直下および周辺に脱色域はみられず、ゾーン指数は0と判定された。また M. M. A. 直下の培養細胞を観察すると殆ど細胞は細胞質がニュートラルレッドに染色されるが、細胞質が染色されない細胞が一部みられた。試料直下に集る細胞のうちニュートラルレッドに染らない細胞は

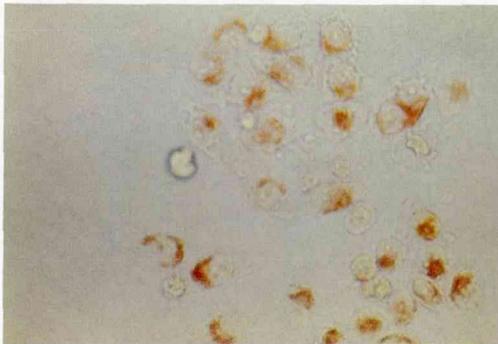


図9：S. M. P. 周辺細胞は強い染色性が認められ、細胞融解はみられない。

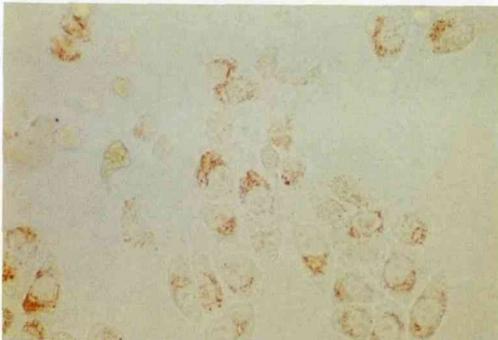


図10：S. M. P. 直下細胞は強い染色性が認められ、細胞融解はみられない。

全細胞の32%から38%程度であり(図8)、融解指数は4と判定された。しかし、試料周辺では細胞融解の程度は低く、染色性のみられない細胞は全細胞の約10%程度であり(図7)、融解指数は1と判定された。M. M. A. では、試料周辺の培養細胞は試料直下の細胞と比較して形態的に正常な形態を示す細胞が多くみられた。この結果からこの細胞融解は残留モノマーの刺激によるものと考えられたが、確かなことについては不明である。

ウレタン系形状記憶ポリマー(S. M. P.)について細胞毒性をみると、試料の直下あるいは周辺には全く脱色域がなく、ゾーン指数は0と判定された。また培養細胞を観察すると、試料の直下および周辺の細胞はニュートラルレッドに細胞質が強く染色され、核網構造の明るい球形に核が細胞中央にみられ、正常な HeLa 細胞の形態を示していた(図9, 10)。これは殆どの細胞に細胞融解はないものとされ、融解指数は0と判定した。この HeLa 細胞培養寒天重層法による毒性試験では S. M. P. は細胞毒性はなく、生体親和性は強いと考えられた。

本実験で試験した各試料のゾーン指数および融解指数については、試料の直下および周辺に分けて表3に示す。

考 察

歯科医療に使用されている材料は大別して金属材料、高分子材料を主とした有機材料とセラミックスなどの無機材料に分けられる。これら材料には生体内で全く反応しない生体不活性であるもの

表3：寒天重層法による結果

試料周辺		
	ゾーン指数	融解指数
C. C. P	0	0
Asb	5	5
M. M. A	0	1
S. M. P	0	0
試料直下		
	ゾーン指数	融解指数
C. C. P	0	0
Asb	5	5
M. M. A	0	2
S. M. P	0	0

か、生体内で溶解や組織と反応を起こす生体活性のものがある。

人体に使われる材料は生体に対して絶対に毒性があってはならない。口腔内に用いられる材料は軟組織に対して無害でなければならないし、循環器系に吸収されて全身的に毒物反応を起こすような毒性のある拡散性物質を含んでいてはならない。材料を生体を使用するには、培養試験による毒性試験や動物実験による生物学的安全性を確かめられたものでなければならない。

現在、歯科材料の生物学的評価のために用いられている試験法は3段階に分けられている。第1段階は、細胞毒性、刺激性、抗原性、発癌性について評価するスクリーニングテストである。第2段階は、臨床使用下で動物実験を行ない安全性を確かめる使用試験であり、第3段階は臨床的状況のもとでヒトの反応と臨床成績を得る臨床試験である¹¹⁾。

*in vitro*での細胞毒性と刺激性によるスクリーニングテストでは主にマウス L-929線維芽細胞およびヒト HeLa 細胞を用いた細胞培養法がある^{12,13)}。細胞培養のうち単層細胞培養寒天被覆法を行なった。この方法の特色は、培養細胞と検体の間に寒天層があり、検体が培養細胞に直接接触していないことである。ニュートラルレッドで細胞を生体染色しておく、障害を受けた細胞は脱色したり、細胞融解をしたりするので、評価基準については評価方法で示した如く、表2に示す寒天重層法における評価基準に従っている^{10,14)}。

著者らは、S. M. P.の歯科領域への応用を目的として寒天重層法により毒性試験を行ない、S. M. P.の生体親和性を確かめた。同時に従来より義歯床用材料として使用されている M. M. A.について比較検討を行なった。

ポリメタクリル酸メチルは毒性あるいはアレルギー反応を起こさせる性質があるといわれている。また加熱重合アクリルレジンより常温型重合型レジンの方が多量のホルムアルデヒドが遊離するとされている¹⁵⁾。しかし歯科用レジンがヒトに全身的な影響を与えるという指摘はされていない。口腔粘膜を通して循環器系に入り込むメタクリル酸メチルモノマーの量は極めて僅かである。37℃の血液中のメタクリル酸メチルの半減期は20分から40分の範囲内であり、その除去はメタクリル

ル酸の加水分解によって行なわれる¹⁶⁾。

田岡(1989)¹⁷⁾は、歯科充填材料の歯髓由来培養に対する細胞毒性の報告において、コンポジットレジンではモノマーや第3アミン類の細胞毒性により未硬化のコンポジットレジンでは細胞毒性があらわれるが、重合反応の進行につれて細胞毒性も減少し、硬化後試料では細胞毒性はほぼなくなると述べている。黒木ら(1988)¹⁸⁾はコンポジットレジン¹⁹⁾の定量的細胞毒性試験で試験したところ、指示条件下で硬化させた Pyrofil Light Bond U が細胞毒性が低く、Pyrofil Light Bond G が細胞毒性が高い結果を報告している。

本実験での市販熱重合性歯科用アクリル樹脂は一部細胞融解がみられ、融解指数は検体周辺では指数1を示し、検体直下では指数2であり、脱色域内では細胞融解の程度は40%から20%以下であった。残留モノマーの刺激によって細胞親和性が抑制され、一部細胞融解が起きたものと考えられた。しかし義歯床などで使用する範囲においては粘膜刺激性において安全性があるものとみられる。

本実験に使用した S. M. P.は熱可塑性ポリマーであり、ペレット状の成形素材を予備乾燥後ペレットの水分を0.03%以下とし、樹脂温度214℃、射出圧力60~100 kg/cm²にて得られた S. M. P.製品を使用した。この試験では S. M. P.は、脱色も細胞融解も全く無く、陰性試料として比較使用した C. C. P.と同様に強い生体親和性をもつものと考えられる。この S. M. P.の特徴は従来の熱可塑性プラスチックと同じく、射出・押し出し、ブロー等の成形法が使用でき、複雑な形状が得られる。また形状記憶温度(Tg)は-30~70℃の範囲で自由に選択することができる⁹⁾。形状回復量が大きく、実質は軽量であるとともに透明であり、着色も自由である。今後、歯科領域をはじめとして、医学領域への応用の可能性が十分考えられる¹⁹⁾。形状記憶効果をもつ純粋のノーソレックスを圧縮成形により成形した固体は、室温では任意の形状に変形されたままであり、約40℃以上でもとの形状に復元する。この Tg 点を利用して形状記憶効果を種々に目的に使用している。ポリノルボネン系形状記憶ポリマーの成形条件は、150℃前後で10分程度の圧縮成形を要し、通常のプラスチックで使用される成形は困難としている²⁰⁾。

結 論

ウレタン系形状記憶ポリマーの歯科材料としての適応性を検討するために、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞培養、寒天重層法により細胞毒性試験から次のことが明らかになった。

本実験においては、陰性対照試料として細胞培養用プラスチック、陽性対照試料としてアスベストを試料とするとともに、熱重合性歯科用アクリル樹脂を比較検討した。

1. ウレタン系形状記憶ポリマーは細胞培養用プラスチックと同様に脱色や細胞融解がみられず、細胞親和性があった。

2. 熱重合性歯科用アクリル樹脂は通法の熱重合をしたものでは、一部に細胞融解がみられた。

3. ウレタン系形状記憶ポリマーは生体材料として優れた生体親和性を有する材料と考えられた。

文 献

- 1) 福与碩夫 (1985) 形状記憶インプラント。日本医療文化センター，東京。
- 2) 福与碩夫編 (1987) 新形状記憶インプラント。日本医療文化センター，東京。
- 3) 神谷光男，鷹股哲也，福与碩夫，橋本京一 (1985) 形状記憶効果をもつ骨内インプラントの臨床治験例及びその評価。松本歯学，11：129—135。
- 4) 福与碩夫 (1989) 形状記憶インプラント，関根 弘，津留宏道編 インプラントの基礎と臨床，216—229，デンタルダイヤモンド社，東京。
- 5) 浜中人士 (1989) チタン合金および Ni-Ti 合金の歯科応用。口病誌，56：453—463。
- 6) 岡本安生 (1987) 超弾性型 NiTi 合金角型ワイヤーの歯科矯正学的研究 第1報 機械的特性について。口病誌，54：57—67。
- 7) 岡本安生 (1988) 超弾性型 NiTi 合金角型ワイヤーの歯科矯正学的研究 第2報 超弾性発現領域における荷重の可逆的コントロールについて。口病誌，55：5—14。
- 8) 林 俊一 (1989) ポリウレタン系樹脂。プラスチックエージ，35：169—172。
- 9) 林 俊一 (1988) ポリウレタン系形状記憶ポリマー (ダイアリイ[®]) の物性とその用途。三菱重工技報，25：236—240。
- 10) 今井庸二 (1987) 寒天重層法。医歯用バイオマテリアルの安全性評価法，83—85。サイエンスフォーラム，東京。
- 11) Autian, J. (1974) General toxicity and screening tests for dental materials. *Int Dent. J.* 24: 235—250.
- 12) Spangberg, L. (1973) Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg.* 35: 389—401.
- 13) Tronstad, L., Wennberg, A and Hasselgren, G. (1978) Screening tests for dental material. *J. Endo.* 4: 304—307.
- 14) Imai, Y., Watanabe, A., Chang, P. I. and Masuhara, E. (1982) Evaluation of the Biologic effects of dental material using a new cell culture technique. *J. Dent. Res.* 61: 1024—1027.
- 15) Ruyter, I. E. (1980) Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odont. Scand.* 38: 17—27.
- 16) Corkill, J. A., Lloyd, E. T., Hcyle, P., Crout, D. H. G., Ling, R. S. M., James, M. L. and Piper, R. J. (1976) Toxicology of methylmethacrylate: The rate of disappearance of methyl methacrylate in human blood in vitro. *Clinica Chemica Acta.* 68: 141—146.
- 17) 田岡 謙 (1989) 歯科充填材料の歯髄由来初代培養細胞に対する細胞毒性 (in vitro)。歯科材料・器械，8：763—782。
- 18) 黒木賀代子，内山長司，岡 知子，井上勝一郎，寺下正道 (1988) コンポジットレジンの定量的細胞毒性試験法。歯科材料・器械，7：545—551。
- 19) 木村 博，寺岡文雄 (1986) 形状記憶ポリマーの歯科材料への応用 第1報 物性について。歯科材料・器械，5：317—320。
- 20) 山本英輔 (1985) ポリノルボルネン系形状記憶ポリマー 高分子，34：654。