

〔原著〕 松本歯学 20 : 64~69, 1994

key word : 純金属 — ヒト唾液 — 溶出イオン濃度 — 細胞毒性

歯科用金属の安全性試験
——金属イオンの細胞障害性について——

田坂裕子, 洞沢功子, 高橋重雄

松本歯科大学 歯科理工学講座 (主任 高橋重雄 教授)

上松隆司, 長谷川貴史

松本歯科大学 口腔外科学第2講座 (主任 山岡 稔 教授)

Biological Evaluation of Dental Metals
——Toxic effect of metal cations——

YUKO TASAKA, NORIKO HORASAWA and SHIGEO TAKAHASHI

Department of Dental Technology, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. S. Takahashi)

TAKASHI UEMATSU and TAKAFUMI HASEGAWA

Oral and Maxillofacial Surgery Department II, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. M. Yamaoka)

Summary

Toxic effects of four metal cations released generally from dental casting alloys were evaluated by corrosion test and in vitro cytotoxicity.

Corrosion tests were conducted on four pure metal plates (Cu, Zn, Ag, Pd), and immersed in human resting saliva for 3 weeks at 37°C. Quantitative analysis of the metal cations released into the saliva was performed by the I. C. P. (inductively coupled plasma emission spectrometry) method.

In vitro cytotoxicity was examined using L-929 cell lines. The cell line to be tested was adjusted to 2×10^4 cells/ml in growth medium containing copper and zinc ions at various concentrations. Cytotoxicity was determined to have occurred if a 50% inhibitory concentration was found when compared to controls (IC_{50}).

The results obtained were as follows.

1. The amount of copper ion released into human saliva was $274 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. This was equal

with the amount of nickel ions released from some Ni-Cr alloys.

2. The amount of zinc ions released was $14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. The release was restrained by white matter deposited on the surface of the metal plate, 3 days later.

3. Silver and Palladium were excellent for the inhibition of corrosion to human saliva.

4. The IC_{50} of the copper ion was 1.28 ppm ($20.2 \mu\text{M}$) and of the zinc ion was 10.6 ppm ($159 \mu\text{M}$) in the case that the surface area of metal restraint was 1 cm^2 , and the quantity of saliva was 1L/day.

5. The amount of copper ions to the IC_{50} reached immediately after metal restraint was set, and all cells died in a day.

6. The amount of zinc ions to the IC_{50} reached in 2~3 days. However, no increase of concentration occurred after that, and did not reach the concentration at which all cells died.

緒 言

歯科用合金による修復は、機械的性質に優れ、さらに生体に対する為害性が他の材料に比較して少ないことなどから多用されている。しかし、歯科用金属の安全性についての評価はその使用を後追いつる形で、現在安全性の基準作りが急速に行われている^{1,2)}。

口腔内は弱酸性の電解質溶液である唾液に絶えずさらされ、飲食物による大きな温度変化やpH変化も毎日幾度となく繰り返される、歯科用材料にとって過酷な環境である。

歯科用金属の口腔内での溶出量は非常に少ないものであるが、生体にとっては異物であり、その為害性には充分な注意が払われなければならない。また今日、溶出金属による金属アレルギー問題は極めて重要なものと認識されているが、その因果関係は必ずしも立証されていない。

ニッケルクロム合金や金銀パラジウム合金などの耐食性試験³⁻⁷⁾はこれまで多くの研究がなされているが、唾液中に溶出する金属イオンについては唾液収集の困難さなどからあまりなされておらず、塩酸や乳酸溶液で代用されている。また、金属片による毒性試験の研究⁸⁾は以前から行われているが、金属イオンの毒性試験⁹⁻¹¹⁾は今のところ試験方法もまちまちである。

本研究ではヒト唾液中への純金属から溶出する金属イオン濃度を測定し、また、金属イオンの細胞毒性を生じる用量段階を明かにして、生体に対する歯科用金属の安全性を検討した。

実験方法

1 溶出濃度の測定

(1) 試料

使用金属を Table 1 に示す。試験片は $15 \times 20 \times 1 \text{ mm}$ に調節し、#320, #400, #600, #800のエメリー紙を用い流水下で研磨した。研磨後直ちに99%メタノール中で10分間超音波洗浄し、70%メタノールに移して24時間浸漬し滅菌した。各金属5試料ずつ調整し試験片とした。

(2) 浸漬液

男女学生32人より採取したヒト安静時混合唾液を混合攪拌により均一として、50 ml 容遠沈管に20 ml ずつ分注し、オートクレーブで滅菌した。

(3) 溶出試験方法

滅菌処理したヒト唾液20 ml 中に試験片を無菌的に全漬させ、 37°C の恒温器内で100回/分のゆるやかな振とうを与えた。3日目、1週間目、2週間目、3週間目ごとに浸漬液3 ml を採取し、3000 rpm 5分間遠心分離してその上澄をICP(高周波誘導結合型プラズマ発光分析装置: ICPV1012 島津製作所製)にて溶出イオン濃度を定量した。

3週間目に試験片を遠沈管より取りだし、流水下で洗浄した後濾紙乾燥して表面性状を観察した。

Table 1: Metals used

	Purity %	Mfg.
Cu	99.9999	NILACO
Zn	99.99	NILACO
Ag	99.99	ISHIFUKU
Pd	99.99	ISHIFUKU

Table 2: Metal ion concentrations and sources

Metal ion	Conc. Range Tested		Source Obtained from atomic absorption standard solution	Lot No.
	ppm	μM		
Cu^{2+}	0 ~ 5	0 ~ 75	CuSO_4 in 0.1 mol/L HNO_3	L 3174
Zn^{2+}	0 ~ 25	0 ~ 375	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ in 0.1 mol/L HNO_3	L 2716

2 細胞毒性試験

(1) 試料

高濃度のイオン溶液が必要なことから原子吸光分析用標準液（ナカライテスク社製）を用いた。まず、ICP法によりイオン強度を測定しオートクレーブ後もイオン強度が変化しないのを確認した。各金属イオン1000 ppm溶液をオートクレーブで滅菌し、実験直前に超純水と培養液で希釈した。このとき、各金属イオン濃度で培養液が同量になるように希釈した。（Table 2）

(2) 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の測定

マウス結合組織由来 L-929細胞を使用した。継代培養および実験には10%牛胎児血清 (filtron Pty Ltd #37395), 4 mM L-グルタミン, 7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ セファメジン を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いた。

2×10^4 cells/ml に調整した細胞浮遊液を24ウェルマルチディッシュに各ウェル1 ml ずつ分注し、炭酸ガス恒温器(37°C 5% CO_2 -95%air)で静置培養した。24時間後に各濃度に調整した金属イオンを含む培養液と交換して、さらに72時間培養した後、金属イオンを含まない対照細胞数に対する実験群の細胞数より生存率をBürker

-Türk型血球計算板で各濃度3回の実験の平均を算定し、濃度-反応曲線より IC_{50} を求めた。

結 果

1 溶出試験

各金属からの溶出イオン濃度を Fig. 1, 2 に示す。

銅は4種類の金属の中で一番顕著に溶出した。浸漬液である唾液は3日目には青緑色の着色が観察され、それは経時的に濃くなっていった。ICP法による測定値も経時的に高くなり、3週間後には274 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の溶出量が認められた。この数値は、いくつかのニッケルクロム合金の1%乳酸溶液へのニッケル溶出量³⁾に匹敵するものであった。3週間後の試験片は青緑色の酸化銅の著しい付着が確認され、著しい腐食の起こったことがわかった。現在口腔内で銅合金は使用されていないが、銅合金を使用した場合、着色だけでなく著しい腐食によるイオンの溶出が起きていたことが確認された。

次に溶出量が多かったのは亜鉛であったが、銅の溶出量に比較して少なく、3週間後で14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。しかし、その溶出傾向は特徴的で、3日目には溶出したイオン濃度のほとんどがす

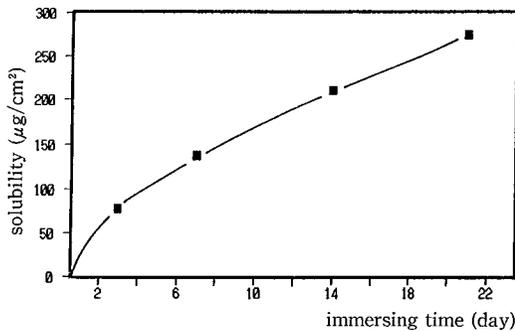


Fig. 1: The soluble concentration of Cu^{2+} to human saliva.

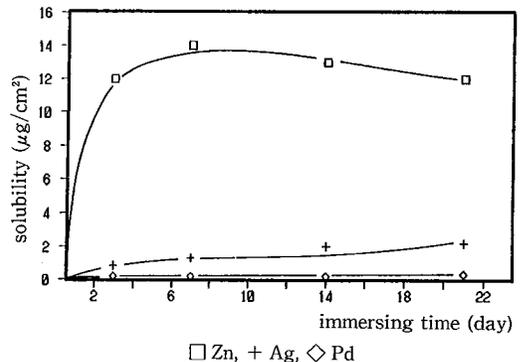


Fig. 2: The soluble concentration of Zn^{2+} , Ag^+ , Pd^{2+} to human saliva.

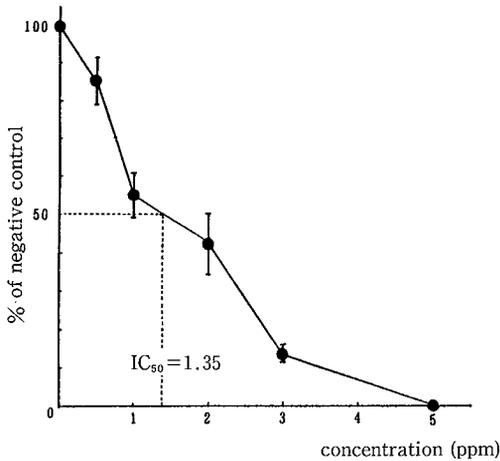


Fig. 3: The response-concentration plot exposed copper ion.

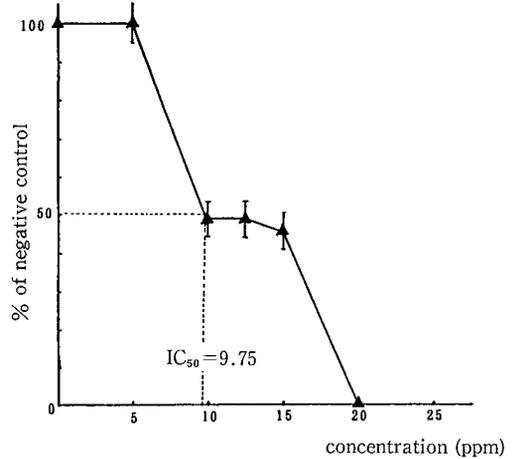


Fig. 4: The response-concentration plot exposed zinc ion.

に溶出し、それ以後は恒常的であった。3週間目に取り出した試験片の表面は、タンパク質あるいは酸化亜鉛と考えられる白色の物質が付着しており、亜鉛の特徴的な溶出傾向はこの白色物質の金属表面への沈着によりそれ以降のイオンの溶出が抑制されたことによると考えられた。

銀とパラジウムの溶出量は非常に微量なもので、3週間後の溶出量は、銀が $2.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、パラジウムが $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。取り出した試験片は、銀では一部硫化による黒変がわずかに観察されたが、パラジウムにおいては表面性状や色、光沢などに少しの変化もみられなかった。この2種類の金属の唾液に対する耐食性は優れたものであった。

2 細胞毒性試験

溶出量の多かった銅と亜鉛について細胞毒性試験を行った。

銅と亜鉛の金属イオン濃度と細胞生存率の関係を Fig. 3, 4 に示す。ここから求めた銅の IC_{50} は $1.15 \sim 1.35 \text{ ppm}$ (平均 1.28 ppm , $20.2 \mu\text{M}$)、亜鉛の IC_{50} は $9.75 \sim 11.5 \text{ ppm}$ (平均 10.6 ppm , $159 \mu\text{M}$) であった。亜鉛イオンは濃度が高いため培養液に添加したとき pH の低下がみられたが、培養液の緩衝作用によりフェノールレッドの赤色が回復するまで20分程度の時間をおいてから細胞に作用させた。

また、初期細胞濃度が細胞毒性に大きく影響するという報告^{9,11)}があるが、予備実験で求めた細胞

増殖曲線より、96時間培養時では対数増殖期であったこと、および細胞密度は semiconfluent の状態であったことから初期細胞濃度は適当であったと判断した。

考 察

純金属の細胞毒性については、1963年川原⁹⁾により、元素の周期律表の族性や原子量に密接な関連のあることが報告されている。金属材料を生体内で使用するとき、イオン化や酸化皮膜の形成、不動態化などが起こる。さらにこれらの現象は生体のタンパク質と反応することにより一層複雑な様相を呈している。歯科領域で金属材料はインプラント材や骨プレートとして直接組織内に埋入して使用されているものもあり in vivo での研究が進んでいる¹²⁾。

今回の報告は、口腔内における修復物としての金属材料の毒性に観点を置いた。組織内と口腔内の環境の相違が指摘されており¹³⁾、人工唾液での試験報告¹⁴⁾もあるが、口腔内でも組織内と同様にイオン化や酸化、不動態化などが起きている。ヒト唾液に対する溶出量をみてみると、銅はイオン化傾向が低いにもかかわらず非常に高い溶出量を呈し、アミノ酸の存在下で SH 化合物とのキレート結合により腐食が著しく促進されるという報告¹⁵⁾が口腔内でも適応されると考えられる。亜鉛については、酸化亜鉛の皮膜により腐食を防止する技術があるが、今回亜鉛表面に生成された白色

物質が酸化亜鉛であるのか、または、川原の報告⁸⁾にあるタンパク沈殿物であるのか確認はとれていないが、この物質の沈着によりイオンの溶出が抑制されたことは明かである。

歯科用金属はそのほとんどが合金として使用されているが、高橋ら¹⁰⁾及び永沢ら¹⁷⁾によれば、化学的に安定といわれている高カラット金合金において、鑄造方法や合金の繰り返し鑄造により、酸化第一銅が生成され、ニッケルクロム合金からのニッケル溶出量と同等の銅が溶出すると報告されており、今回の実験で純銅から唾液にやはりニッケル溶出量と同等の銅の溶出がみられたことで、その安全性に注目した。

溶出試験と細胞毒性試験の結果より、金属修復物表面積を1 cm²、唾液流量を1L/dayと仮定すると、銅では修復物装着後直ちにIC₅₀に達し、1日で細胞が死滅してしまうほどの毒性を発揮することとなり、亜鉛では2～3日でIC₅₀に達するがその後は溶出濃度が上昇しないため、全ての細胞が死滅する濃度には至らないことが明かとなった。

細胞毒性については、銅が細胞の増殖を完全に抑制するという報告⁸⁾や銅を毒性試験の陽性対照に用いる報告^{13,14)}があり、その毒性の強さをうかがわせる一方、50% toxicity concentrations (TC₅₀)では銀や亜鉛の方が毒性が強いという報告¹⁰⁾もある。亜鉛においても5～20 ppmの間で毒性の報告^{10,18,19)}にバラツキがみられ、細胞の種類はもちろんのこと、培地組成、初期細胞濃度などの種々の条件の差異が細胞の感受性に大きく関与していることを示している。したがって、動物代替法としての細胞毒性試験は、口腔内の歯肉や粘膜の上皮組織や結合組織から分離した細胞本来の性質を維持している初代継代細胞での毒性試験の必要性が考えられる。さらに、リンパ球の初代継代細胞に対する毒性を検討し、アレルギーや扁平苔癬などの難治性疾患との関連を追求したい。

結 論

歯科用合金の主要構成成分である、銅、亜鉛、銀、パラジウムについてヒト唾液への溶出試験と細胞毒性試験を行いその安全性について検討した結果、以下の結論が得られた。

1. 銅のヒト唾液への溶出量は3週間で274

μg/cm²で、これはNi-Cr合金からのNi溶出量と同等であった。

2. 亜鉛のヒト唾液への溶出量は3週間で14 μg/cm²であったが、白色物質の沈着により3日目以降の溶出は抑制された。

3. 銀とパラジウムの耐食性は優れたものであった。

4. 金属表面積1 cm²、唾液流量1L/dayと仮定すると、溶出量の多かった銅と亜鉛のL-929に対するIC₅₀は銅1.28 ppm 亜鉛10.6 ppmであった。

5. 銅は装着後直ちにIC₅₀に達し、1日で細胞が死滅してしまうほどの毒性を発揮する。

6. 亜鉛は2～3日でIC₅₀に達するがその後は溶出濃度が上昇しないため全ての細胞が死滅する濃度には至らない。

なお、本実験の一部は平成5年度文部省科学研究費補助金奨励研究(A)を用いて行った。

謝 辞

稿を終えるに臨み、細胞を御提供下さった東京医科歯科大学第二歯科理工学講座、佐藤温重教授に謹んで感謝の意を表わします。また、本実験に対し御支援、御協力いただきました本学口腔外科第二講座、山岡稔教授、ならびに医局員の皆様に心より深謝いたします。

文 献

- 1) 佐藤温重, 桜井靖久編 (1987) 医・歯科用バイオマテリアルの安全性評価法. 36—39. サイエンスフォーラム. 東京.
- 2) 佐藤温重他 (1985) 歯科材料の安全性評価法の確立に関する研究. トキシコロジーフォーラム, 8 : 486—499.
- 3) 辻 楠雄, 菊池 寛 (1983) ニッケルクロム合金の溶出試験法. 昭和58年度厚生科学研究報告. 53—61.
- 4) 堀部 隆 (1985) 歯科材料の溶出試験法. 昭和60年度厚生科学研究報告. 57—64.
- 5) 洞沢功子, 杉江玄嗣, 伊藤充雄, 高橋重雄 (1987) 歯科材料の電気化学的安定性に関する研究—その1各種ニッケルクロム合金の溶出元素について—。歯材器, 6 : 124—132.
- 6) 洞沢功子, 伊藤充雄, 高橋重雄 (1987) 歯科材料の電気化学的安定性に関する研究—その2各種歯科用合金の溶出元素について—。歯材器, 6 : 762—767.
- 7) 洞沢功子, 綿谷 晃, 永沢 栄, 伊藤充雄, 高橋重雄 (1989) 歯科材料の電気化学的安定性に関する

- る研究—その3金銀パラジウム合金の腐食傾向について—。松本歯学, **15**: 182—187.
- 8) 川原春幸 (1963) 歯科材料の生物学的考察 L株細胞に対する純金属の影響 (in vitro). 歯理工誌, **4**: 65—75.
- 9) 滝本知彦, 武田昭二 (1991) 細胞毒性評価における初期細胞数, 作用時間および判定法の影響. 歯材器, **10**: 431—442.
- 10) Wataha, J. C., Hanks, C. T. and Craig, R. G. (1991) The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. J. Biomed. Mater. Res. **25**: 1133—1149.
- 11) Wataha, J. C., Hanks, C. T. and Craig, R. G. (1993) The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys. Dent. Mater. **9**: 172—176.
- 12) 川原春幸監修. 石木哲夫他編集 (1991) 口腔インプラント学 上巻, 131—161. 医歯薬出版, 東京.
- 13) 今井弘一, 中村正明, 孙 皎, 薛 森 (1992) 細胞回復度からみた各種金属イオンの細胞毒性について (in vitro). 歯材器, **11**: 1—8.
- 14) 今井弘一, 中村正明, 孟 愛英, 張 彩霞 (1992) 人工唾液による歯科用金属の溶出と細胞回復度 (in vitro). 歯材器, **11**: 特別号19: 246—247.
- 15) 武田昭二, 川原春幸 (1983) 塩基性アミノ酸溶液中での銅の溶出について. 第5回日本バイオマテリアル学会論文集: 53.
- 16) 高橋重雄, 吉田隆一, 宮坂 平, 大熊一夫, 諏訪恵子, 永沢 栄, 洞沢功子 (1991) カラットメタルをテストする. DE, **93**: 15—30.
- 17) 永沢 栄, 綿谷 晃, 洞沢功子, 高橋重雄 (1991) 18K 金合金の耐食性に関する研究. 松本歯学, **17**: 60—78.
- 18) Jowett, A. K., Forguson, M. W. J. and Combe, E. C. (1988) In vitro biocompatibility testing: A new organ culture model. J. Dent. **16**: 55—65.
- 19) Leirskar, J. and Helgel, K. and (1981) Mechanism of toxicity of dental materials. Int. Endod. J. **14**: 42—48.