

培養細胞からみた生体内金属材料の 細胞毒性に関する実験的研究

——特に窒化チタンの適合性について——

檀 上 達

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：工藤 啓吾教授)

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座*

(指導：名和橙黄雄教授)

[受付：1993年7月12日]

[受理：1993年7月29日]

Abstract : This experimental study was designed to investigate the cytotoxicity of pure titanium, titanium nitride, titanium alloy and stainless steel in vitro using an MC840106 cell line established from mouse calvarial bones. The cytotoxicity evaluation in this study was based on the cell growth rate, incorporation of ^3H -thymidine and cell morphological changes by light microscopic and scanning electron microscopic observations.

The results may be summarized as follows : 1. Pure titanium, titanium nitride, titanium alloy and stainless steel had no significant cytotoxic action on cell morphologies and extensions. 2. In cell growth rates in the presence of the metals, there were no significant differences compared with the control. However, titanium alloy and stainless steel tended to decrease the cell growth rate. An excellent growth rate was obtained with titanium nitride. 3. Pure titanium, titanium nitride and the control produced no significant differences in incorporation of ^3H -thymidine into DNA. However, the incorporation of ^3H -thymidine was significantly inhibited by titanium alloy and stainless steel compared to control. 4. On examining the elution of metallic elements from the metal plates into a culture medium, titanium elements were detected in the culture medium containing pure titanium, titanium nitride or titanium alloy. However, the elution of titanium elements from titanium nitride was negligible compared with pure titanium and titanium alloy. Aluminum or a ferrous element was detected on titanium alloy and stainless steel. Other elements were less than the limits of detection. The above results may suggest that titanium nitride is a very useful biomaterial.

Key words : titanium nitride, cytotoxicity, in vitro, biomaterial

緒 言

口腔外科領域では腫瘍、骨髄炎、骨折、顎変形症など、種々の疾患によって顎骨の変形や欠損を後遺することが多い。このような患者に対

し、顔貌の審美的、機能的回復を図り、社会復帰を容易にする目的で骨片の固定や骨欠損の再建が施行されている。その術式は、従来よりワイヤー固定や自家骨移植が行われてきたが、近年は生体材料として種々の金属プレートの単独

Experimental study on cytotoxicity of biomaterials in vitro ; with special reference to cellular adaptation to titanium nitride.

Tatsushi DANJO

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

(Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan*)

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3 - 27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 18 : 89 - 103, 1993

使用しないしは骨移植との併用が行われるようになった。

歯科領域で使用されている金属材料は、その金属元素の溶出による毒性、耐蝕性、組織親和性などの生体適合性が問題となり、これらに関する *in vitro*¹⁻³⁾ および *in vivo*^{4,5)} での基礎的追究が行われてきた。その中でも、チタンは組織親和性及び適合性に優れ、かつ金属材料特有の機械的特性などの点から種々の金属プレートとして多用されるようになった⁶⁻⁸⁾。当科においても、チタン製プレートをこのような目的に使用してきたが⁹⁾、純チタンは他の金属材料に比べて強度が小さく¹⁰⁾、また微量ながらも Ti 元素の溶出が確認されている⁴⁾。その後、チタン材料に対する表面窒化処理はその強度を向上させ^{11,12)}、かつ Ti 元素の溶出を抑制する¹³⁾ことから、窒化処理を施したチタン製プレートの臨床応用が行われるようになった¹⁴⁾。しかしながら、なお窒化チタンの細胞毒性に関する詳細な報告はみられない現状にある。

そこで、本研究は純チタンおよび窒化チタンの細胞毒性と細胞親和性について、マウス頭蓋冠由来の株細胞を用いて、チタン合金、316 L ステンレス鋼、銅鉄合金等を対照例として比較検討を試みた。

材料および方法

1. 金属試験片の調整

使用した金属試験片は JIS 規格 2 種の純チタン (Ti - 0.25% Fe - 0.20% O - 0.05% N - 0.013% H)、純チタンの表面に窒化処理を施した窒化チタン、チタン合金: Ti - 6 Al - 4 V (Ti - 6.13% Al - 4.17% V - 0.16% Fe - 0.16% O - 0.015% C - 0.012% N - 0.002% H)、ステンレス鋼: SUS 316 L (Fe - 18% Cr - 12% Ni - 2.5% Mo - 低 C)、50 wt% の銅鉄合金 (50% Cu - 50% Fe) である。これらの金属を 10 × 6 × 1 mm の試験片 (株式会社オハラ製) に鑄造作製した。さらに #120、#600、#800、#1000 の耐水研磨紙で粗研磨を行った後、0.3 ミクロン純アルミナ粉末および琢磨布

No.101, No.751 を用いて最終研磨を行い、鏡面に近い状態にまで仕上げた。調整した各種金属試験片はアセトン、99% アルコールで各 10 分間超音波洗浄器で脱脂、洗浄し、オートクレーブで高圧滅菌して使用した。

窒化チタンの金属試験片は純チタンを研磨後、窒化処理 (株式会社オハラ)¹⁵⁾ を施し、実験に供した。

2. 培養方法

培養細胞は MC 840106 株細胞を使用した。この MC 840106 株細胞はマウスの胎仔 (BALB/c) の頭蓋冠から分離された株細胞である¹⁶⁾。

使用培地はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, ニュスイ) にウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) を 10% の割合で加え、さらに L-Glutamine (ナカライテスク株) 0.584 g/l, 硫酸カナマイシン (萬有) 60 mg/l を添加して用いた。

実験は炭酸ガス培養器で 37°C, 5% 炭酸ガスの混合気相、湿度飽和状態の条件下に行った。

3. 金属試験片との接触部位における細胞増殖状態の観察

純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼、銅鉄合金の各種金属試験片をエポキシ樹脂系接着剤ハイスーパー 5 (セメダイン株式会社) で径 60 mm のプラスチックシャーレ (CRONING®) の底に固定し、樹脂の硬化と滅菌操作を十分に行わせるために 62°C の恒温器に 24 時間放置後、エチレンオキサイドガスにて滅菌を行って用いた。

上記 MC 840106 株細胞を 0.01% EDTA 処理を行ったのち、ピペッティングを行い、十分に細胞を分散遊離させた。1,000 rpm で 10 分間遠沈し、上清を捨て細胞浮遊液に調整した。金属試験片を固定した上記プラスチックシャーレに 2×10^5 個の細胞を播種し、全量 7 ml の培養液を添加して 6 日間培養を行った。金属試験片に接触した部位まで細胞が増殖し、confluent な状態に至るまでをニコソ万能培養倒立顕微鏡で経日的に観察した。対照は同個数の細胞のみを

播種したものとした。

4. 金属試験片上における細胞形態の観察

プラスチックシャーレ (CRONING®) の底に純チタン, 窒化チタン, チタン合金, ステンレス鋼, 銅鉄合金の各種金属試験片を静置した。1 × 10⁵ 個の細胞を播種し, 全量 7 ml の培養液を添加して, 24, 48 時間培養を行った。培養後, 細胞の付着した金属試験片を取り出し, 0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4) で洗浄した。同液で 2.5% に調整したグルタルアルデヒドにて 4°C, 3 時間前固定し, 1% オスミウム酸にて 1 時間後固定を行った後, エタノール系列で脱水を行った。第 3 ブチルアルコールで置換・凍結後, 凍結乾燥器 (Eiko ID-2) にて試料を乾燥させ, イオン Sputter (E-1030 型) で Au-Pd の蒸着を施した。走査型電子顕微鏡 (日立 S-2300) を用いて金属試験片上で培養された細胞の形態観察を行った。

カバーガラス上での細胞の形態を対照として観察した。

5. 細胞増殖度

実験に供した各種金属試験片の細胞増殖度におよぼす影響を量的に把握するため, 試験片を浸漬した培養液内で培養した細胞数を算定した。金属試験片との接触が細胞数に変動を与えることを懸念して indirect な方法を用いた。その方法は 6-well メンブランフィルター式培養カップ (Transwell™ COSTAR®) を使用し, その膜上部に 10 × 6 × 1 mm の純チタン, 窒化チタン, チタン合金, ステンレス鋼, 銅鉄合金の各種金属試験片を 3 枚ずつ静置し, 膜下部に 1 × 10⁵ 個の細胞を播種し, 全量 6 ml の培養液を添加し, 上記条件下で培養を行った。培養 3, 5 日目に金属片と培養液を除去した後, 0.01% EDTA 溶液で細胞を処理し, ラバーポリスマンでシャーレの底から細胞を剝離回収し, さらにピペットで細胞分散を行った。回収した細胞数は血球計算版で算出し, 培養液 1 ml 中の細胞数で示した。各金属試験片について 5 回算定してその平均値を細胞数とした。また, 対照は細胞のみを播種したものとした。

6. ³H-thymidine の取り込みによる DNA 量の測定

各種金属片の細胞に与える影響を DNA 合成の指標である ³H-thymidine の取り込みによって評価を行った。方法は上述した 6-well メンブランフィルター式培養カップを使用し, その膜上部に各種金属試験片を 3 枚ずつ, 下部に 5 × 10⁴ 個の細胞を播種し, 全量 6 ml の培養液を添加し, 上記条件下に 5 日間培養した。培養後, 金属試験片を除去し, ³H-thymidine を 2 μCi / well の濃度に加え, 2 時間パルスラベルを行った。次に, 培養カップ内で細胞を Handy sonic (model UR-20 TOMY 精工) を用いて破碎し, その 1 / 4 量 (500 μl) を取り出し, 水中 (4°C) で 100% Trichloro acetic acid (TCA) 26.3 μl を加え振盪後, 12,000 rpm で 5 分間遠沈した。上清を除去後, 5% TCA 1000 μl 加え, 再度破碎し, 12,000 rpm で 5 分間遠沈した。この操作を 2 回繰り返す, 遊離している ³H-thymidine を十分に除去した。最終濃度 5% TCA にて沈澱させた沈澱物に 0.2 N-NaOH 250 μl を加え, 沈澱物を溶解させた。これをミニバイアルに移し, ACS-II シンチレーター (New England Nuclear 社製) を加え, 液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-903) にて放射活性の測定を行った。また, 同一 well から等量の 1 / 4 量 (500 μl) を取り出し同様に処理を行い, 最終濃度 5% TCA で沈澱させた。これを 0.2 N-NaOH 200 μl で溶解し, DNA サンプルとした。

ジフェニルアミンによる比色定量法で知られる Burton の変法にしたがって, DNA サンプルに試薬 [1.5 g ジフェニルアミンを 100 ml 氷酢酸に溶解し, 1.5 ml conc. H₂SO₄ を加え, 使用前に 20 ml に対し 0.1 ml のアセトアルデヒド水溶液 (16 mg/ml) を加える] を加え, water bath 内で温度 30°C の条件で 16 時間加温し呈色させ, 600 nm の吸光度で測定した。DNA の定量は Calf thymus DNA の標準曲線から算出し, 単位 DNA 量 (1 μg) における ³H-thymidine の放射活性 (dpm / μg) で表した。なお,

各金属試験片群について8回の測定を行い、対照は同数の株細胞のみを播種したものとした。

7. 溶出金属元素の測定

実験は10×6×1mmの純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼、銅鉄合金の5種の金属試験片について行った。これらの金属試験片は実験に際して上述同様に研磨後、超音波洗浄し、オートクレーブで高圧滅菌して使用した。

実験方法は6mlのDMEM培養液を15mlの遠沈管内に分注し、その中に各種金属片を3枚ずつ浸漬した。さらに密栓をして37℃の恒温器内に純チタン、窒化チタン、チタン合金は30、60日間、ステンレス鋼は5、10、30日間、銅鉄合金は5、10日間静置した。金属片を除去した後、残った培養液をケルダールフラスコに入れ、原子吸光分析用過塩素酸（Cica-Merk）を5ml加えて沸騰させ、有機物を水溶液中で加熱・灰化した。冷却後、Na5Bの濾紙を用いて濾過し、25mlに定容したものを分析用試料溶液とした。元素分析には、シーケンシャル形高周波プラズマ発光分析装置ICPS 1000型（島津社製）を用い、定量分析を行った。また、未使用のDMEM培養液を同様に処理しブランクとした。

8. 統計学的処理

すべての統計学的処理は、Student's *t* testを用いた ($p < 0.05$)。

実験結果

1. 金属試験片との接触部位における細胞増殖状態の観察

MC 840106株細胞の純チタン、窒化チタン、ステンレス鋼、銅鉄合金の金属試験片との接触部における細胞増殖状態と対照群での増殖状態を位相差倒立顕微鏡で観察した。培養6日目のconfluentになった状態を確認した後、写真撮影を行った (Fig.1)。

銅鉄合金以外の純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属試験片においては、対照群と同様に経日的な細胞の分裂、増殖

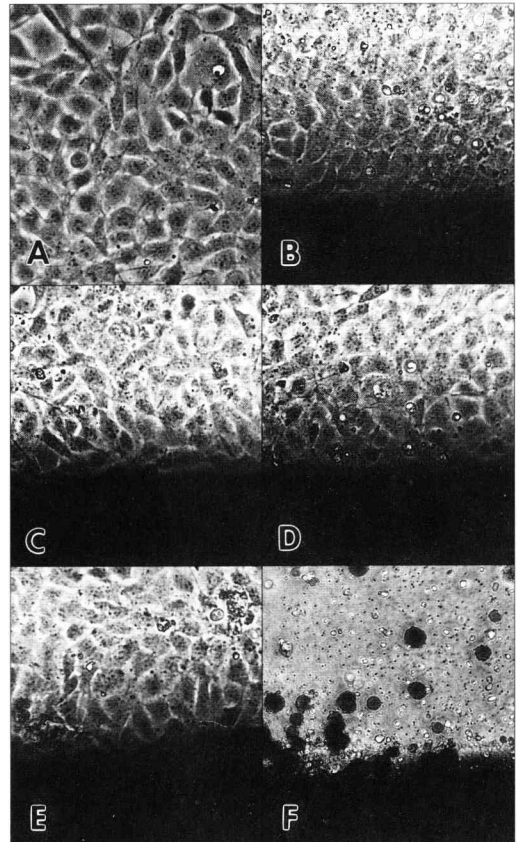


Fig.1 Phase contrast micrographs of contact surfaces between cells and metals after 6 days of cultivation. Almost all, except for F, show an excellent growth of cells at the contact surface as A (control). F shows degeneration of cells and elution of metal.

Abbreviations : A : control,

B : Pure titanium, C : Titanium nitride,

D : Titanium alloy, E : Stainless steel,

F : Cu-Fe alloy

がみられた。金属試験片に隣接した部位においても均一の細胞増殖が認められた。培養6日目にはmonolayer cell sheetをつくり、金属試験片に張り詰めるまで敷石状に増殖するが、とくに金属片との接触面では、金属による著しい接触障害は認められなかった (Fig.1A-E)。対照群と純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼群とを比較すると、金属面における接触阻止による分裂停止が起こるまでの時間的な

差異は特に認められなかった。

一方、銅鉄合金群の金属試験片の近接部位では、第1日目においてすでに細胞は球状化して、細胞の伸展は認められなかった。初期には、金属試験片より遠位部位で、わずかに紡錘形の細胞の生育がみられたが、培養6日目には全ての細胞が死滅していた。銅鉄合金からの金属粒子の溶出も経日的に増大し、肉眼的にも培養液中に浮遊している状態が確認できるほどであった (Fig.1F)。

2. 金属試験片上における細胞形態の観察

実験に用いた株細胞が、金属試験片上を足場として付着し、伸展していく様相を経時的に観察した。

培養24時間後における純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属試験片上ならびに対照群(カバーガラス)上の細胞は、いずれも球状に盛り上がり、偽足を出して金属試料表面あるいはガラス表面に付着していた (Fig.2A-E)。

純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属試験片上の細胞は数本の太い細胞質突起を細胞外に出していたのに対し (Fig.2B-E)、対照群(ガラス上)では太い突起の他に多数の微細な突起を出しているものが多くみられた (Fig.2A)。

銅鉄合金の金属試験片上の細胞は、腐食した金属粒子や変性細胞の残渣と思われる粗像な面に囲まれ、一部に微細な突起が認められるものの、不明確な形態を呈していた (Fig.2F)。

培養48時間後における純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属試験片上ならびに対照群上の株細胞は24時間後に比べると全体的に細胞質を伸展させ扁平に付着している様相を呈していた (Fig.3A-E)。核に相当する細胞質は大きく膨隆し、その周囲に伸展した平滑な細胞体 (ruffled membrane) を有し、先端には多数の微細な突起を出して、細胞が各種金属試験片上で十分に生着している状態が確認された。

一方、銅鉄合金の金属試験片上の細胞は紡錘

形を呈し、細胞体の伸展は認められず、むしろ細胞は萎縮して変性に陥っていた。金属試験片の表面は腐食によると思われる金属様粒子が蓄積し、粗造な像を呈していた (Fig.3F)。

3. 細胞増殖度 (Fig.4)

培養液内で金属試験片が細胞の増殖にどのような影響を与えるかをメンブランフィルターを介した indirect な状態で実験を試みた。実験開始時に培養カップ内に播種した 1×10^5 個/7 ml の細胞は経日的に分裂、増殖を繰り返し、対照群では培養3日後、5日後にそれぞれ $(1.35 \pm 0.22) \times 10^5$ 個/ml, $(3.55 \pm 0.31) \times 10^5$ 個/ml と増殖した。純チタンでは3日後、5日後がそれぞれ $(1.32 \pm 0.11) \times 10^5$ 個/ml, $(3.51 \pm 0.29) \times 10^5$ 個/ml と対照群と類似した増殖傾向を示した。窒化チタンは培養3日後では $(1.22 \pm 0.23) \times 10^5$ 個/ml, 5日後では $(3.72 \pm 0.44) \times 10^5$ 個/ml と対照群と比べ、やや高い増殖傾向がみられた。チタン合金とステンレス鋼の培養3日後、5日後は、それぞれチタン合金が $(1.09 \pm 0.23) \times 10^5$ 個/ml, $(3.11 \pm 0.44) \times 10^5$ 個/ml, ステンレス鋼が $(0.97 \pm 0.23) \times 10^5$ 個/ml, $(3.01 \pm 0.42) \times 10^5$ 個/ml と対照群に比べ、やや低い増殖傾向が示された。中でも、ステンレス鋼の3日目は対照群と比較して有意に抑制されていた。培養5日目には窒化チタンは増殖の増大傾向がみられるものの、上記実験群と対照群の間には有意差は認めなかった。一方、銅鉄合金では培養3日後、5日後にそれぞれ $(0.05 \pm 0.02) \times 10^5$ 個/ml, $(0.03 \pm 0.01) \times 10^5$ 個/ml と増殖が有意に抑制された。

4. ^3H -thymidine の取り込みによる DNA 量の測定 (Fig.5)

細胞増殖度実験と同様な手法で行い、DNA 合成の際に実際に取り込まれた ^3H -thymidine 量を単位 DNA 量当りの放射活性量として検索した。実験には細胞の活性が高い状態で ^3H -thymidine を取り込ませるために、confluent な状態になるのを避けるべく、細胞数を調整して培養カップ内に播種した。また、

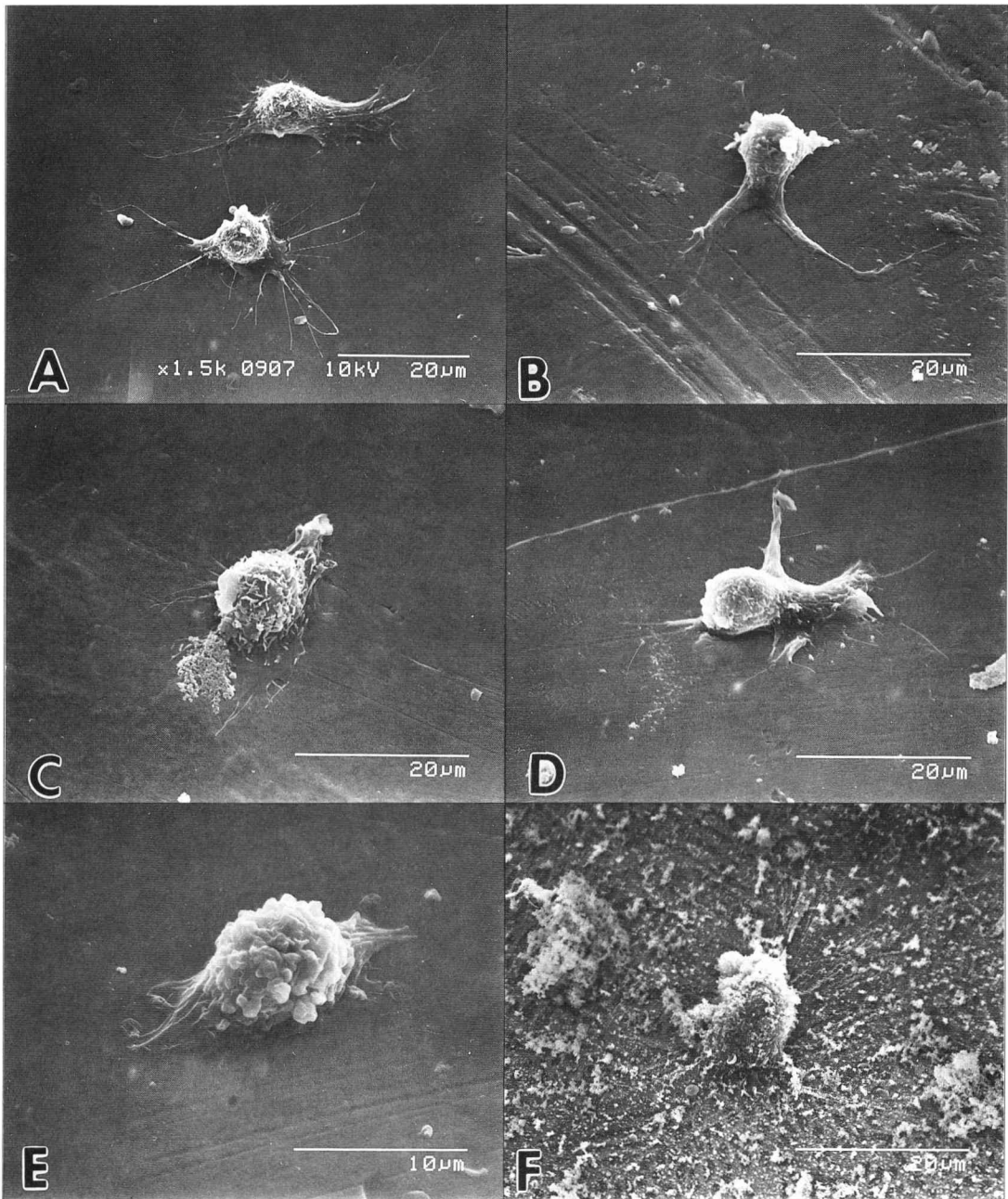


Fig.2 Scanning electron micrographs of cells grown on metals after 24 hrs of cultivation. All cells attached spherically onto metals possess a few filopodium - like processes extending in all directions. There are no significant changes in their growth patterns except for F. F shows a coarse surface of metal and cell degeneration.
Abbreviations : refer to Fig. 1.

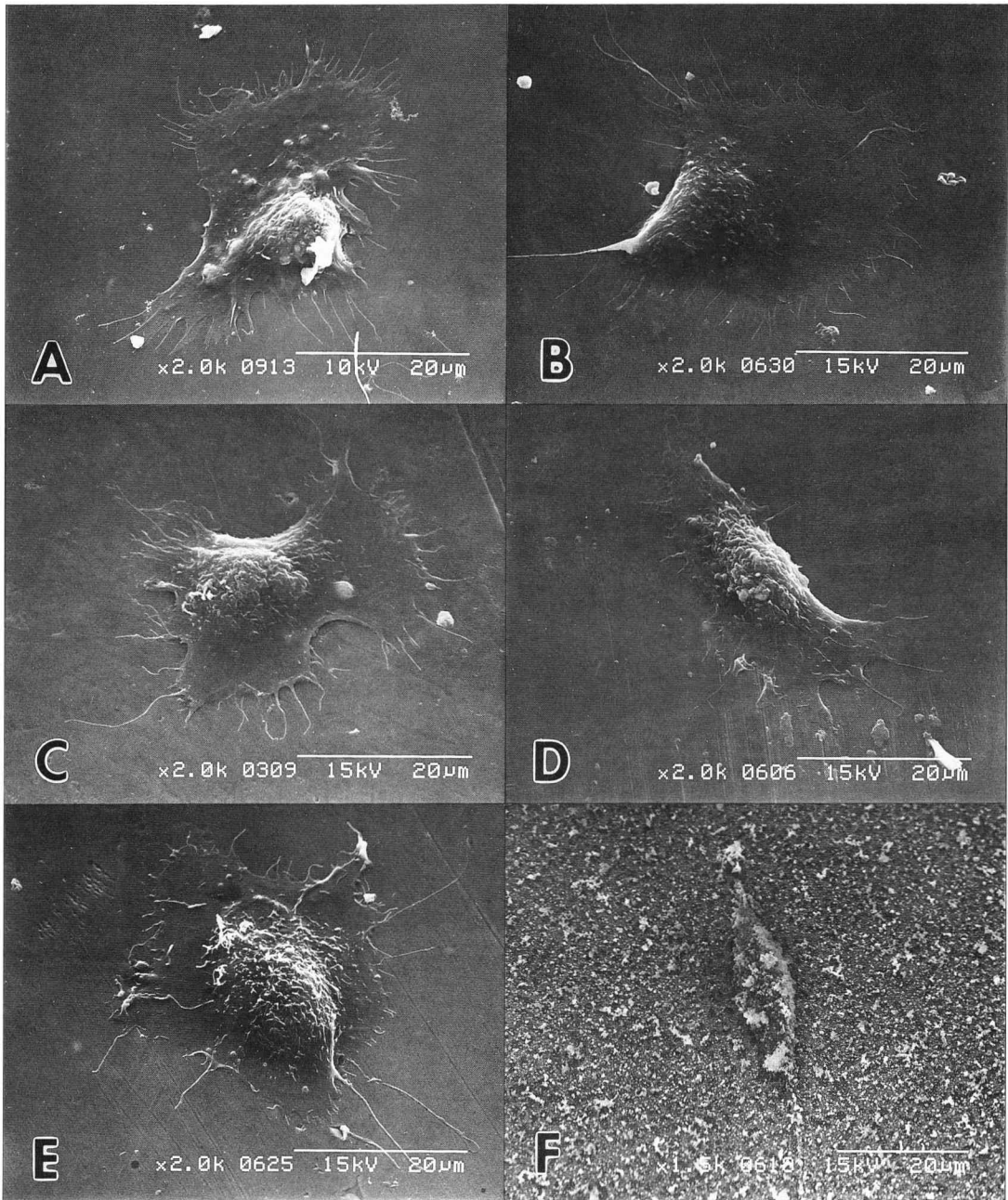


Fig.3 Scanning electron micrographs of cells grown on metals after 48 hrs of cultivation. Compared with Fig.2, all cells are more flattened with a prominent nuclear area and extend to many filopodium-like processes and ruffled membrane on all sides. F shows a coarse surface and cell destruction.

Abbreviations : refer to Fig.1.

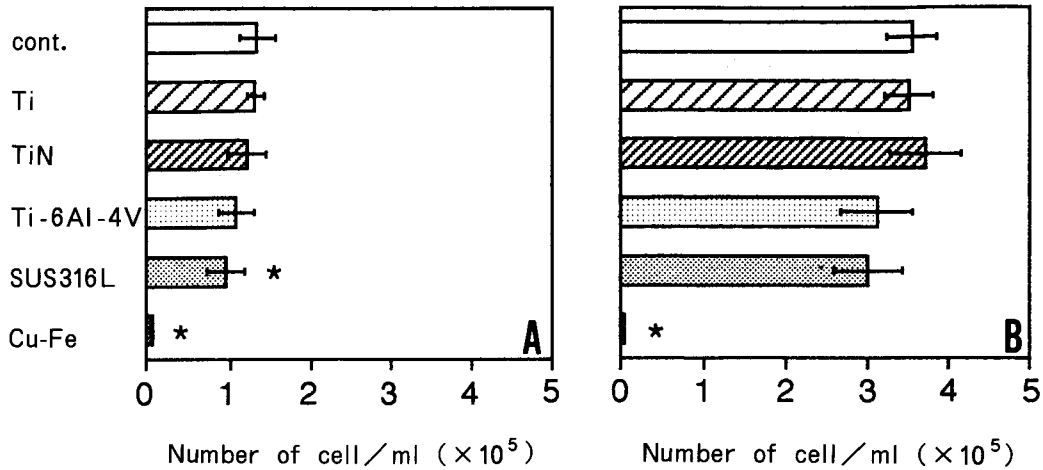


Fig. 4 A (after 3 days of cultivation) and B (after 5 days of cultivation) show cell growth rates on metals. All cells are proliferated about threefold from 3 to 5 days of cultivation except for Cu-Fe alloy. Titanium nitride shows excellent growth rate compared with control and pure titanium. There are no significant differences between all experiments except for Cu-Fe alloy.

(* : student's t $p < 0.05$)

Abbreviations : cont. : Glass, Ti : Pure titanium, TiN : Titanium nitride, Ti-6Al-4V : Titanium alloy, SUS316L : Stainless steel, Cu-Fe : Cu-Fe alloy

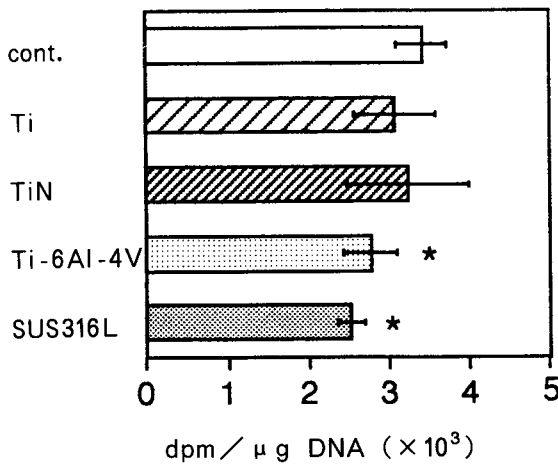


Fig. 5 ³H-thymidine incorporation in DNA after 5 days of cultivation. There are no significant differences in incorporation of ³H-thymidine between control, pure titanium and titanium nitride. However, titanium alloy and stainless steel indicate significant decreases compared with control.

(* : student's t $p < 0.05$)

Abbreviations : refer to Fig. 4.

この実験では、細胞増殖の認められなかった銅鉄合金は除外した。

培養5日目に³H-thymidine 2 μCi/dishで2時間パルスラベルを行ったところ、細胞のみを播種した対照群の³H-thymidineの放射活性は(3.41 ± 0.31) × 10³ dpm / μg DNAであった。これに対し、純チタンは(3.06 ± 0.51) × 10³ dpm / μg DNAとやや低く、窒化チタンは(3.23 ± 0.77) × 10³ dpm / μg DNAとSD値にややばらつきがあったものの、対照群と比較してこれら2つの金属試験片の間には有意差は認められなかった。チタン合金とステンレス鋼の放射活性はそれぞれ(2.76 ± 0.34) × 10³ dpm / μg DNA, (2.52 ± 0.16) × 10³ dpm / μg DNAと低く、対照群と比較して有意に³H-thymidineの取り込みが抑制されていた(Fig. 5)。

5. 溶出金属元素の測定 (Table 1)

純チタン : 30日後では3群中2群に、60日後では3群すべてに、微量のTi元素が検出さ

elements detected			Ti	Al	V	Fe	Ni	Cr	Mo	Cu
			(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Ti	30 days	a	↓	-	-	-	-	-	-	-
		b	0.013	-	-	-	-	-	-	-
		c	0.030	-	-	-	-	-	-	-
Ti	60 days	a	0.013	-	-	-	-	-	-	-
		b	0.008	-	-	-	-	-	-	-
		c	0.009	-	-	-	-	-	-	-
TiN	30 days	a	↓	-	-	-	-	-	-	-
		b	↓	-	-	-	-	-	-	-
		c	↓	-	-	-	-	-	-	-
TiN	60 days	a	0.005	-	-	-	-	-	-	-
		b	↓	-	-	-	-	-	-	-
		c	↓	-	-	-	-	-	-	-
Ti-6Al-4V	30 days	a	0.018	0.40	↓	-	-	-	-	-
		b	0.012	0.19	↓	-	-	-	-	-
		c	0.012	0.24	↓	-	-	-	-	-
Ti-6Al-4V	60 days	a	0.020	0.46	↓	-	-	-	-	-
		b	0.010	0.52	↓	-	-	-	-	-
		c	0.020	0.44	↓	-	-	-	-	-
SUS316L	5 days	a	-	-	-	0.25	↓	↓	↓	-
		b	-	-	-	0.19	↓	↓	↓	-
		c	-	-	-	0.23	↓	↓	↓	-
SUS316L	10 days	a	-	-	-	0.20	↓	↓	↓	-
		b	-	-	-	0.47	↓	↓	↓	-
		c	-	-	-	0.22	↓	↓	↓	-
SUS316L	30 days	a	-	-	-	0.22	↓	↓	↓	-
		b	-	-	-	0.16	↓	↓	↓	-
		c	-	-	-	0.20	↓	↓	↓	-
Cu-Fe	5 days	a	-	-	-	35.7	-	-	-	0.32
		b	-	-	-	125.6	-	-	-	0.16
		c	-	-	-	132.5	-	-	-	0.07
Cu-Fe	10 days	a	-	-	-	49.7	-	-	-	0.48
		b	-	-	-	250.1	-	-	-	0.02
		c	-	-	-	264.2	-	-	-	0.13
limits of detection			0.005	0.02	0.01	0.05	0.2	0.02	0.05	0.02

Table 1 Dissolution of metallic elements into culture medium. Titanium elements were detected in culture media with pure titanium (Ti), titanium nitride (TiN), and titanium alloy (Ti-6Al-4V). Dissolution of titanium elements did not increase with the passage of time. Titanium nitride indicated the least dissolution of titanium elements among the above three metals.

Abbreviations : a, b, c, : Samples,

↓ : Less than the limit of detection, Ti : Pure titanium, TiN : Titanium nitride,

Ti-6Al-4V : Titanium alloy, SUS316L : Stainless steel, Cu-Fe : Cu-Fe alloy

れた。しかし、溶出元素の経日的増大傾向は認められなかった。

窒化チタン：30日後では3群すべてが検出限界値以下であり、60日後では1群のみに検出限界値ぎりぎりのTi元素の検出がみられたが、他の2群の溶出Ti元素は検出限界値以下であった。純チタンに比較して窒化チタンのTi元素の溶出は明らかに抑制されていた。

チタン合金：純チタンと同程度のTi元素の溶出が検出された。Al元素も検出され、経日的に溶出量の増大がみられた。V元素は検出限界値以下であった。

ステンレス鋼：Fe元素の溶出は明らかであったが、経日的な増大傾向は認められなかった。Ni, Cr, Mo元素は検出限界値以下であった。

銅鉄合金：Fe元素の溶出が多量に検出され、溶出は経日的に増大していた。Cu元素の溶出も検出されたが、経日的増大傾向は認められなかった。

考 察

窒化処理は金属材料の表面処理法の一法であり、純チタンにこの方法を用いると表面の硬化が得られ、材料全体の物性、強度が向上することがすでに知られている^{11,12)}。また、金属元素の溶出を抑制するとの報告¹³⁾もあり、金属プレートとして有用であると考えられてきた。しかしながら、窒化チタンに関する組織ならびに細胞親和性についての実験報告は、いまだ不十分なのが現状である。

そこで本実験では、現在、多くの口腔外科領域でミニプレートや下顎骨再建用プレートとして臨床応用されている純チタン、チタン合金、ステンレス鋼の他に、当科で臨床応用を始めた窒化チタンを取り入れ、培養細胞への毒性と親和性について検討を試みたものである。従来より、細胞毒性が強いといわれているCu, Feを重量比50%の合金として作製し、負の対照として実験に取り入れた。

金属試験片の接触面における培養細胞の発育

増殖の観察では、純金属に関してはL株細胞を用いた川原ら¹⁾、松前¹⁷⁾の研究、歯科金属材料として使用されている合金に関しては、L株細胞と銀合金の毒性についての水谷¹⁸⁾、L株細胞と金・銅合金についての高橋¹⁹⁾、L株細胞とCu-Alについての山上ら²⁰⁾、Ni-Ta系合金とヒト歯肉線維芽細胞の毒性についての加我ら²¹⁾の報告がみられ、金属材料の培養細胞毒性の評価の手段の一つとして用いられている。

今回実験に用いた純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼との接触面における細胞の分裂、増殖には大きな差異は認められなかった。一方、銅鉄合金の接触面では著しい細胞の分裂、増殖の阻害がみられた。

これまでの報告の中で、純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼からの構成金属の金属元素の溶出が確認されている^{4,22,23)}。なかでも、チタン合金やステンレス鋼にはV, Fe, Ni元素などのように細胞毒性があるといわれている金属元素が含まれている。川原ら¹⁾、武田ら²⁾が純金属が細胞に与える毒性をin vitro実験において検討している。川原ら¹⁾はTi, Al, CrおよびMo元素は毒性が認められないか、あっても弱く、Ni, V, CuおよびFe元素は強度ないし中程度の毒性が認められることを報告している。しかし、武田ら²⁾はCr元素の溶出はわずかであったにもかかわらず強い毒性を示したと報告しており、一部異なった実験結果もみられる。

本実験に使用した金属試験片間では銅鉄合金のみが強力な毒性を示した。銅鉄合金(50 wt%)においては1日目から腐蝕によると思われる金属粒子の溶出、浮遊が肉眼的にも観察され、培養液の着色がみられた。試験片周囲の培養細胞は伸展することなく球形のままで、空胞化するなど強い毒性が示された。また、細胞質内に溶出した金属粒子が蓄積しているような像も観察された。川原と西田²⁴⁾はCu元素が細胞質内や核質内に多数蓄積することを報告しており、この所見と類似した像を呈していた。また、培養液中などのタンパク質存在下においては、

Cuの溶出が促進されることが知られている²⁵⁾。特にCu元素はタンパク質とのキレート化により、有機金属化合物を作るといわれ、このことが培養細胞に強い影響をあたえ、破壊的に働くと考えられている。

細胞接触実験では、銅鉄合金以外の金属試験片間に明確な差が確認されなかった理由の一つとして、チタン合金やステンレス鋼などの合金は有害とされる金属元素が毒性のない金属と合金化することによりマスクされ、かつ安定した不動態膜が形成されることによって毒性が発現され難くなることが考えられる^{19~21, 26)}。

本実験の溶出金属元素の測定においてもチタン合金からはTi, Al元素が、ステンレス鋼からはFe元素のみが検出されただけで、他のV, Ni, Cr, Moなどの構成元素の溶出は検出限界値以下であり、これらの金属元素が合金化することによってマスクされている可能性が考えられる。一方、本実験にみられるようにV, Ni, Cr, Moなどの合金金属元素は短期間で溶出することはないので、本実験のような短期間の毒性実験ではその効果は現れずにいるものと思われる。したがって、さらに長期間の実験が必要と考えられる。

窒化チタンは純チタンと比較して、Ti元素の溶出は抑制的で、ほとんどが検出限界値以下であった。これは窒化処理がチタン表面の安定した不動態膜を維持し、さらに母体金属からのTi元素の溶出を抑制し、培養細胞や培養環境に及ぼす影響の少ないことを示している。

光顕的には純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼間の優劣の傾向を把握できなかったため、細胞の機能面に与える影響を細胞増殖度と³H-thymidineの取り込みによって検討した。その結果、純チタンと窒化チタンは対照群と同様の増殖傾向を示し、細胞の増殖には差異は認められなかった。これまでも純チタンは生体内で、非常に安定性の高い材料とされており、in vitro実験においても細胞毒性のないことが報告されている¹⁾。また、in vivo実験でも周囲組織に対する親和性が非常に良好である

ことが示されており^{5, 27)}、純チタン金属材料は単材で臨床応用されている。しかしながら、純チタン単体ではその物理的強度が小さく、この欠点を補うための一方法として窒化処理の応用が試験的に行われてきたが^{11, 12)}、細胞増殖度からみると窒化チタンは純チタンに劣ることなく良好な結果が得られた。

チタン合金とステンレス鋼では、対照群との間に有意差は認められなかったが、細胞の増殖は対照群、純チタン、窒化チタンに比較して若干抑制的な傾向が示された。このことは合金の構成成分であり、有害とされているV, Fe, Ni元素などや、毒性がないといわれているTi, Al元素の溶出が間接的に細胞に影響を与えた可能性も考えられる。これらの合金からの金属元素の溶出は、Merrittら²⁸⁾、Arbertら²⁹⁾、栗田²³⁾らが行った実験では、チタン合金からはTi, Al, V元素が、ステンレス鋼からはFe, Ni, Cr元素の溶出が確認されている。本実験ではV, Ni, Cr, Mo元素の溶出はいずれも検出限界値以下であった。この結果は検出方法の相違によるのかどうかは明らかでないが、実験期間が長くなれば金属元素溶出の可能性も十分に考えられる。また本実験の細胞増殖度からみれば、チタン合金とステンレス鋼を長期間処理すると有意に細胞増殖が抑制される可能性が示唆される。

一方、金属試験片存在下での培養細胞の機能評価の指標として、DNAの合成能について比較検討がなされた。細胞増殖度実験と同様に、純チタンは窒化チタンよりも減少の傾向がみられるものの、純チタン、窒化チタンはともに対照群と比較して有意の差がなく、DNA合成の抑制は認められなかった。しかしながら、チタン合金とステンレス鋼は対照群に比べ、³H-thymidineの取り込みが減少しており、DNAの合成が有意に抑制されていた。

対照群、純チタン、窒化チタンとチタン合金、ステンレス鋼とを比較すると、細胞増殖度実験および³H-thymidine取り込みの実験結果は相同の傾向を示し、対照群、純チタン、窒化チタ

ンには有意差はみられず、チタン合金とステンレス鋼ではいずれも抑制的な傾向が示された。

一方、本実験に用いた MC 840106 株培養細胞は付着依存性であり、培養瓶底に付着して分裂、増殖を行う。この培養細胞に対する金属表面の親和性、安定性について検討した結果、カバーガラス上の対照群と純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属試験片上の細胞伸展形態の間には、著しい差異は認められなかった。

金属材料と細胞の直接接触における評価について、工藤³⁾、松前¹⁷⁾、Nakamura ら³⁰⁾、斉藤ら³¹⁾、Inoue ら³²⁾は純チタンが細胞の接着性、安定性に優れていることを報告している。しかしながら、細胞の接着性が金属材料の材質のみならず、他の因子も関与していることが知られている。Jansen ら³³⁾は材料表面の性状と細胞機能との間には、その相関関係は証明されなかったと述べているが、Schakenraad ら³⁴⁾は血清タンパク存在下、あるいは非存在下での各種ポリマー表面におけるヒト線維芽細胞の伸展を評価し、細胞の伸展と増殖には血清が重要な作用をもたらしていることを示唆した。Sukenic ら³⁵⁾はチタン表面の chemical endgroup が細胞の接着に働く fibronectin をコントロールしているとし、金属表面処理の重要性を指摘している。細胞は金属材料に interspace を介して接着していることが知られている^{36,37)}。この interspace は主として血清由来の蛋白質と多糖類が水を媒質とした粘性の高い親水コロイド層からなり、これが細胞の接着効果を高めていると考えられている^{38,39)}。このように、血清は材料と細胞の付着や伸展に重要な役割を果たすものと考えられる。

柳澤⁴⁰⁾は生体材料の水に対する接触角をもって材料の“ぬれ性”をあらわし、この接触角が小さいほど細胞の接着率や細胞の伸展率が良好であることを明らかにした。“ぬれ性”は材料の組織親和性をあらわす細胞レベルでの一つの指標と考えられるが、本実験で用いた純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼の金属

試験片間では、この特性に関しては細胞の伸展性からみて大きな差異はなかったものと推察される。

しかしながら、Johansson ら⁴¹⁾の in vivo 実験によるとチタン合金は純チタンに比較してインプラント体と骨基質との間に広い interspace を形成し、不定形の骨組織が認められると述べている。また、チタン合金からの Ti, Al, V 元素の溶出が水酸化ハイドロキシアパタイト結晶の構築を阻害するとの報告もあり⁴²⁾、さらに V 元素の溶出による生体組織への影響が懸念されている。また、ステンレス鋼からの Fe, Ni, Cr 元素の溶出はすでに報告されており^{4,23,29)}、ステンレス鋼がまったく安全であるとの根拠はなく、ステンレス鋼によるアレルギー症⁴³⁾や、さらにはステンレス鋼のスクリーインプラントによる発癌例⁴⁴⁾なども報告されている。したがって、これら合金の生体への長期の埋入は避けるべきであろうと思われる。

窒化チタンについては in vitro での溶出試験や細胞増殖試験がわずかにみられ、その中で窒化処理を行わなかった対照群との間に著しい差は認められなかったことが報告されている^{45~47)}。また、関⁹⁾の家兎を使用した in vivo 実験では、純チタンと同等の生体反応を示したという報告がみられる。一方、窒化処理が金属表面の生物学的特性を変え、炎症性細胞であるマクロファージの遊走が多くなり、窒化処理の有効性は認められなかったとする報告もある⁴⁸⁾。

しかしながら、チタン金属材料には少なからず Ti 元素の溶出が認められ、また長期使用に際しては機械的強度に問題のあることなどが指摘されるようになり、その弱点を補強する意味でチタンの窒化処理が考えられてきた。本実験では、チタン金属に窒化処理を施した窒化チタンは Ti 元素の溶出が抑制され、細胞に及ぼす影響は純 Ti と比較して有意の差は認められず、しかも細胞の親和性に関しては勝るとも劣らない結果が得られ、金属プレートとして生体内使用が可能であることが示された。

結 論

純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼、銅鉄合金が培養細胞に及ぼす毒性について比較検討し、次のような結論が得られた。

1) 光顕的には細胞の増殖はほとんどの金属間では著しい差異が認められなかったものの、銅鉄合金のみは著明な腐食とこれに伴う強い毒性が示された。

2) 純チタン、窒化チタン、チタン合金、ステンレス鋼上で培養された細胞は走査電顕の観察では良好な付着、伸展が観察され、また細胞の形態的变化や生育状態はこれら金属間で差異が認められなかった。しかし銅鉄合金の細胞は球形に萎縮し、著しい変性を示した。

3) 純チタン、窒化チタンの細胞増殖度、³H-thymidine の取り込みは対照群との間に有意差は認められなかったが、純チタンは窒化チタンに比較していずれも低い傾向がみられた。一方、チタン合金、ステンレス鋼における³H-thymidine の取り込みは対照群に比べて有意に低く、DNA 合成の抑制を示した。

4) Ti 元素の溶出は純チタンからは微量に、また窒化チタンからはほとんど検出されなかった。Ti, Al 元素はチタン合金から、Fe 元素はステンレス鋼から検出され、その他の成分元素は検出限界値以下であった。Fe, Cu 元素は銅鉄合金から多量に検出された。

5) 窒化チタンは純チタンに比較して、Ti 元素の溶出が抑制され、より良好な細胞親和性のあることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座工藤啓吾教授、同口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授、同口腔生化学講座太田稔教授、同教養部化学中館興一教授に謹んで感謝の意を表します。また、ご指導ご鞭撻いただきました同口腔外科学第一講座大屋高德助教授、同歯科理工学講座桂啓文助教授、口腔生化学永井雅純助手に

謝意を表します。さらに、本研究にご協力いただきました同口腔解剖学第二講座立花民子助教、石関清人講師、坂倉康則講師、藤原尚樹助手に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、日本解剖学会第38回東北・北海道地方連合会(1992年9月12日、旭川市)ならびに第47回日本口腔科学会総会(1993年5月13日、弘前市)において発表した。

引用文献

- 1) 川原春幸, 越智茂三, 種谷克己, 加藤邦雄, 磯貝満彦, 水野善雄, 山本広之, 山上哲賢: 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: 65-85, 1963.
- 2) 武田昭二, 垣内英也, 土井英暉, 中村正明: 非貴金属系合金を構成する純金属の細胞毒性について, 歯材器, 8: 648-652, 1989.
- 3) 工藤貴也: 細胞の回復能力からみた金属元素の細胞毒性について (in vitro), 歯材器, 7: 525-544, 1988.
- 4) 関 克典: 家兎組織内におけるチタンの溶出と生体親和性に関する研究, 岩医大歯誌, 17: 158-177, 1992.
- 5) 保志信男: 諸種金属の生体内腐蝕の病理組織学的並びに組織化学的研究 I 純金属並びにその合金の生体組織に及ぼす病理学的研究, 阪大歯誌, 4: 283-339, 1959.
- 6) 長谷川 明, 古田憲治, 大平弘司, 土田有宏, 本多洋之, 西村恒一: Titanium plate 補強による下顎骨再建手術について - 下顎骨半側欠損症例への応用 -, 日口外誌, 23: 144-149, 1977.
- 7) 坂本栄一, 葦沢 健, 嶋田 淳, 山本美朗: チタニウム再建用プレートの使用経験, 日口外誌, 35: 2149-2156, 1989.
- 8) 横山康之, 茂木健司, 武内章浩, 横堀 守, 大友友昭, 松田 登: Bowerman-Conroy チタニウム製インプラントを使用した下顎骨好酸球肉芽腫の症例, 日口外誌, 30: 1568-1574, 1984.
- 9) Ohya, T. and Ohara, I: Pure titanium reconstruction plate and screw system in reconstruction of the mandible. *Asian J. Oral Maxillofac. Surg.* 3: 49-56, 1991.
- 10) 道 健一: 口腔外科への応用と問題点-人工骨, 人工歯根について-, 歯医学誌, 10: 171-175, 1991.
- 11) 光松文雄, 丹羽義典, 柴田英明: チタンの熱処理と着色, 金属, 5: 27-34, 1989.
- 12) 吉成正雄: イオンプレティングの歯科修復物への応用に関する研究 第一報 TiN イオンプレティングについて, 歯材器, 3: 71-78, 1984.
- 13) 立石哲也, 伊藤敦夫: 医用複合材料の開発, 金

- 属, 5 : 68 - 74, 1992.
- 14) 大屋高德, 関 克典, 福田喜安, 渋井 暁, 石川義人, 青村知幸, 八木正篤, 檀上 達, 工藤啓吾, 藤岡幸雄, 田中久敏, 石橋寛二 : 下顎再建用窒化チタニウムプレートシステム (オハラ®) の開発と臨床的検討, 日口外誌, 38 : 918 - 927, 1992.
 - 15) 中村精三, 筒井義一 : チタン製品の窒化処理装置, 特許公報, B 2 : 143 - 147, 1988.
 - 16) 名和橙黄雄, 小山田勇樹, 舟木康博, 坂倉康則, 飯田就一, 原田順男, 広田萬貴子 : マウス胎仔頭蓋冠由来細胞系の樹立について, 岩医大歯誌, 11 : 169 - 174, 1986.
 - 17) 松前久子 : 生体材料としてのタンタルムおよびジルコニウムに関する実験的研究, 口科誌, 37 : 862 - 878, 1988.
 - 18) 水谷 裕 : 組織培養からみた各種銀合金の細胞毒性に関する実験的研究 (in vitro), 歯理工誌, 17 : 145 - 161, 1976.
 - 19) 高橋 清 : 金・銅合金の細胞毒性に関する実験的研究 (in vitro), 歯理工誌, 16 : 79 - 86, 1975.
 - 20) 山上哲賢, 川原春幸, 西村 守, 渡辺弘基, 水谷裕, 菱田 稔 : Cu-Al 合金の細胞毒性に関する研究, 歯理工誌, 13 : 112 - 116, 1972.
 - 21) 加我正行, 小野木正章, 野田坂佳伸, 渡辺郁也, 及川 精, 太田 守 : Ni-Ta 系合金の研究 第3報 ヒト歯肉由来培養線維芽細胞に及ぼす影響について, 歯材器, 3 : 191 - 198, 1984.
 - 22) 小玉 剛 : チタン合金の生体適合性に関する基礎的研究, 口病誌, 56 : 263 - 288, 1989.
 - 23) 栗田新也 : 各種金属の骨誘導に及ぼす影響, 愛院大歯誌, 30 : 171 - 194, 1992.
 - 24) 川原春幸, 西田堯吉 : 培養細胞の金属とりこみ機構のX線マイクロ解析, 歯界展望 (臨時 増刊), 43 : 1154 - 1155, 1974.
 - 25) Clark, G.C.F. and Williams, D.F. : The effects of proteins on metallic corrosion. *J. Biomed. Mater. Res.* 16 : 125 - 134, 1982.
 - 26) 藤本和久 : インプラントとしての Ti-Ni 2 元合金に関する実験的研究, インプラント誌, 7 : 25 - 55, 1986.
 - 27) Hansson, H.A., Albrektsson, T., Brånemark, P. I. : Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J. Prosthet. Dent.* 50 : 108 - 113, 1983.
 - 28) Merritt, K., Margevicius, R.W., Brown, S.A. : Storage and elimination of titanium, aluminum, and vanadium salts, in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 26 : 1503 - 1515, 1992.
 - 29) Arbert, B. F., Patrick, G. L., Edwin, S.H. : The ionization of metal implants in living tissues. *J. Bone Joint Surg.* 24 - A : 77 - 90, 1960.
 - 30) Nakamura, M., Kawahara, H., Imai, K., Kawamoto, T., Hosohama, T., Kataoka, Y. : Cell contact to metal surface. *J. Dent. Appara. Mater.* 19 : 98 - 111, 1978.
 - 31) 斎藤 修, 平原雅通, 斎藤素子, 笹崎弘己, 奥田礼一, 菅野恵美, 清水義信 : 歯根修復に関する研究 第1報 純チタン面へのヒト歯根膜由来細胞の附着・培養, 日歯保誌, 31 : 1597 - 1611, 1988.
 - 32) Inoue, T., Pillar, R.M., Melcher, A.H. : Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblast in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 21 : 107 - 126, 1987.
 - 33) Jansen, J.A., van der Waerden, J. P. C. M., de Groot, K. : Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials. *Biomaterials* 12 : 25 - 31, 1991.
 - 34) Schakenraad, J.M., Busscher, H.J., Wildevuur, C.R.H., Arends, J. : The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J. Biomed. Mater. Res.* 20 : 773 - 784, 1986.
 - 35) Sukenik, C.N., Balachander, N., Culp, L.A. : Modulation of cell adhesion by modification of titanium surface with covalently attached self-assembled monolayers. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 : 1307 - 1323, 1990.
 - 36) Kawahara, H. : Cellular responses to implant materials : biological, physical and chemical factors. *Int. Dent. J.* 33 : 350 - 375, 1983.
 - 37) Flaxman, B.A., Lutzner, M.A., van Scott, E.J. : Ultrastructure of cell attachment to substratum in vitro. *J. Cell Biol.* 36 : 406 - 409, 1968.
 - 38) 川原春幸 : 生物理工学について, DE, 49 : 25 - 31, 1979.
 - 39) Kawahara, H. : Materials for hard tissue replacement. *Implantologist* 3 : 17 - 27, 1985.
 - 40) 柳澤いづみ : 生体用材料の“ぬれ性”が培養細胞に与える影響, 日大歯誌, 62 : 8 - 19, 1988.
 - 41) Johansson, C., Lausmaa, J., Ask, M., Hansson, H.A., Albrektsson, T. : Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti6Al4V or commercially pure titanium. *J. Biomed. Eng.* 11 : 3 - 8, 1989.
 - 42) Blumenthal, N.C., Cosma, V. : Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. *J. Biomed. Mater. Res. : Appl. Biomater.* 23 : 13 - 22, 1989.
 - 43) Schriver, W.R., Shereff, R.H., Domnitz, J.M., Swintak, E.F., Civjan, S. : Allergic response to stainless steel wire. *Oral Surg.* 42 : 578 - 581, 1976.
 - 44) McDougall, A. : Malignant tumour at site of bone plating. *J. Bone Joint Surg.* 38 - B : 709 - 713, 1956.
 - 45) Tateishi, T., Ushida, T., Ito, A., Aoyagi, J., Homma, T., Ise, H. : R&D of the nitrided titanium alloy for artificial joint. *Bioceramics* 2 : 193 - 197, 1990.
 - 46) Kummer, F.J., Ricci, J.L., Blumenthal, N.C., :

RF plasma treatment of metallic implant surface. *J. Appl. Biomater.* 3 : 39 - 44, 1992.

- 47) Wisbey, A., Gregson, P.J., Peter, L.M. : Effect of surface treatment on the dissolution of titanium-based implant materials. *Biomaterials* 12 : 470 - 473, 1991.

- 48) Röstlund, T., Thomson, P., Bjursten, L.M., Ericson, L.E. : Difference in tissue response to nitrogen-ion-implanted titanium and c.p.titanium in the abdominal wall of the rat. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 : 847 - 860, 1990.