

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 椋 梨 兼 彰 (神奈川県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 乙 第 255 号
学位授与年月日 平成 26 年 12 月 18 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 歯科用磁性アタッチメントを構成するステンレス鋼からの金属イオン溶出と細胞増殖への影響
鶴見歯学 第 41 巻 1 号 1 頁～10 頁掲載 平成 27 年 1 月 10 日発行
論文審査委員 主査 教授 早 川 徹
副査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 桃 井 保 子

内容の要旨

【序 文】

歯科治療において金属材料を用いた補綴処置は日常的に行われ、特に高齢者の口腔内では、義歯を含め複数の異種金属材料が混在する環境にあることが多い。その結果、長期間の使用において金属材料から金属イオンが溶出する可能性が高くなる。義歯の維持安定の手法である磁性アタッチメントではステンレス鋼が用いられ、効率よく磁力を利用するためのシールドリングとして非磁性ステンレス鋼 SUS316L が、また、磁石を覆う筐体としての磁性ステンレス鋼 SUS447J1 が使用されている。両ステンレス鋼とも構成する金属元素はほぼ同じであるが、試料中の組成比率が異なっており、これらの磁性ステンレス鋼にはアレルギーの原因となるといわれている Ni, Cr などの金属イオンが含まれている。本研究では、磁性ステンレス鋼の臨床で使用方法についての指針を得ることを目的に、これらのステンレス鋼から溶出した金属イオンが細胞増殖に与える影響について調べ、さらに溶液浸漬後のステンレス鋼の表面形状の観察および溶出した金属イオンの分析を行った。

【材料と方法】

材料：磁石構造体のシールドリングとして使用されているステンレス鋼 SUS316L およびヨークやキーパーに使用されている磁性ステンレス鋼 SUS447J1 を用いた。

1. 細胞増殖阻害実験：それぞれのステンレス鋼の円柱状試料(φ5 mm×5 mm)を縦方向に二分割にしたものを実験に用いた。各試料の平坦面を注水下、エメリー紙で#800 まで研磨した後、エタノールおよび純水で各 1 分ずつ超音波洗浄処理を施した。1% 乳酸水溶液(pH 2.74)または 0.9% NaCl 水溶液(pH 4.02)を調整し、各水溶液 20 ml をポリエチレン容器に採取した。ステンレス鋼の研磨試料を 1% 乳酸水溶液または 0.9% NaCl 水溶液に 37℃ で 7 日間浸漬した。細胞としてはヒト喉頭癌由来の cell line である Hep-2 細胞を、細胞培養培地としては 10% Fetal Cow Serum を加えた Minimum Essential Media 培地を用いた。その後、各浸漬液を培地に加え、Hep-2 細胞の培養 3 時間後の細胞増殖についてマイクロタイタープレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

2. 細胞の形態観察：上記と同一条件で行った培養細胞をトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡下にて細胞の形態観察を行った。

3. 表面形状の観察および溶出金属の分析：1% 乳酸水溶液または 0.9% NaCl 水溶液に浸漬前後のステンレス鋼の表面形状を、走査電子顕微鏡を用いて加速電圧 10 kV にて観察した。また、7 日間浸漬後に、試料を取り出し、1% 乳酸水溶液中に溶出した金属イオンを高周波誘導結合型プラズマ質量分析装置を用いて定量分析を行った。

【結 果】

1. 細胞増殖阻害実験：SUS316L の 1% 乳酸水溶液浸漬液を加えた場合に、コントロールと統計学的に有意に低い値となり、細胞増殖が阻害されることが判明した。SUS447J1 浸漬液の場合には、細胞増殖は阻害されなかった。0.9% NaCl 水溶液

液浸漬液の場合には、SUS316L 浸漬液、SUS447J1 浸漬液どちらもコントロールと細胞増殖に統計学的な有意差は見られず、細胞増殖を阻害しなかった。

2. 細胞の形態観察：細胞培養後の細胞の形態を観察すると、SUS447J1 よりも SUS316L の 1% 乳酸水溶液浸漬添加の場合に細胞の大きさの変化や、核の断片化やクロマチンの凝集、アポトーシス小体の形成などの変化が顕著に認められた。

3. 表面形状の観察および溶出金属の分析：両ステンレス鋼ともに、浸漬前においては研磨によると思われる傷が認められ、また、小孔がわずかに認められた。1% 乳酸水溶液浸漬後では、どちらのステンレス鋼も表面が大きく腐食されており、孔食が進行したものと推定された。一部にはかなり深い孔食が観察された。SUS316L と SUS447J1 とを比較すると、SUS316L の方がより腐食が進行している様相が観察できた。一方、0.9% NaCl 水溶液に浸漬した場合、小孔の存在が比較的多く観察された。乳酸水溶液に浸漬した場合のような大きな腐食は見られなかった。また、1% 乳酸水溶液中に溶出した金属イオンの分析を行ったところ、Cr、Ni、Mo、Mn、Fe イオンの溶出が確認された。SUS316L と SUS447J1 とで金属イオンの溶出量を比較すると、SUS316L の方が全体的な溶出量は多く、特に Cr イオンは SUS447J1 の 2 倍以上の溶出を示した。組成比では SUS316L の方が、Cr 含有量が低くなっている。この結果から、SUS316L の方が SUS447J1 よりも Cr イオンが溶出しやすい傾向にあることが分かった。Ni イオンの溶出量は SUS316L と SUS447J1 とでほとんど違いはなかった。

【考察と結論】

ステンレス鋼は表面に Cr の不動態被膜が形成されているが何らかの原因で破壊されるとその部位から金属イオンが溶出する。1% 乳酸水溶液に浸漬した場合、0.9% NaCl 水溶液浸漬の場合よりも不動態被膜がより容易に破壊され、また、SUS316L の方が SUS447J1 よりその程度が大きいことから、金属イオンの溶出が進行したものと推察される。これは細胞増殖阻害実験の結果と一致している。SUS447J1 は Cr の組成比率が SUS316L より多くなっているが、SUS316L の方が SUS447J1 よりも Cr イオンが溶出しやすい傾向にあることが分かった。Fe イオンの溶出も SUS316L の方が多かったが、Ni イオンの溶出量に両者でほとんど違いは見られなかった。イオンの違いによりステンレス鋼からの溶出方式が異なる事が推定されるが、今後、不動態被膜の破壊のメカニズムも含めて詳細な検討が必要である。

本実験から以下の結論を得た。

- 1) SUS316L 1% 乳酸水溶液浸漬液により細胞増殖が阻害された。
- 2) SUS316L 1% 乳酸水溶液浸漬液により細胞のアポトーシスが促進された。
- 3) 1% 乳酸水溶液浸漬によりステンレス鋼の腐食が進行し、SUS316L の方が SUS447J1 よりも、その程度が大きかった。
- 4) SUS316L 1% 乳酸水溶液浸漬後に Cr イオンの溶出がより多く認められた。

以上の結果から、磁性ステンレス鋼 SUS447J1 の方が非磁性ステンレス鋼 SUS316L よりも細胞増殖への影響が少なく、金属イオンの溶出も少ないことが判明した。現在、臨床で使用されている磁性アタッチメントの磁石構造体において細胞に障害を起こす可能性のある SUS316L の露出面積を極力少なくし、金属イオン溶出量を少なくした構造は、生体にとって安全性を高めることに寄与していることが本研究結果から裏付けられ、磁性アタッチメントを構成するステンレス鋼の生体安全性を考慮した設計の必要性が示唆された。

審査の結果の要旨

磁性アタッチメントがオーバードレンチャーの支台装置として臨床応用されてから、すでに四半世紀を迎える。有害な側方力や回転力を支台歯に伝達しないという磁石特有の性質は、可撤性支台装置としては特筆すべき大きな利点であり、骨植不良であっても支台歯として活用できることから、超高齢化社会の進展に伴いさらなる普及が期待されている。しかしながら、磁性アタッチメントにはステンレス鋼が使用されており、アレルギーの原因となりうる Ni や Cr などの金属イオンが含有されている。そこで申請者はステンレス鋼の磁石構造体における使用法に指針を与え、磁性アタッチメントの安全性を検証することを目的に、ステンレス鋼から溶出した金属イオンが細胞増殖に与える影響について調査し、溶出後のステンレス鋼の表面形状の観察および溶出した金属イオンの分析を行った。

磁石構造体のシールドリングとして使用されている非磁性ステンレス鋼 SUS316L とヨークやキーパーに使用されている磁性ステンレス鋼 SUS447J1 を用いて、円柱状試料を製作し、1% 乳酸水溶液または 0.9% NaCl 水溶液に 37℃ で 7 日間浸漬した。浸漬後の水溶液を採取、希釈し、浸漬液として調整し、ヒト咽頭癌由来細胞培養プレートの培地中に加えることにより細胞増殖阻害試験および細胞の形態観察を行った。また、水溶液浸漬前後のステンレス鋼の表面形状を SEM により観察するとともに、溶出した金属イオンは高周波誘導結合型プラズマ質量分析装置を用いて定量分析を行った。

その結果、SUS316Lの1%乳酸水溶液浸漬液を加えた場合に細胞増殖が阻害され、SUS447J1浸漬液の場合には細胞増殖は阻害されないことが判明した。0.9% NaCl水溶液浸漬液の場合にはSUS316L浸漬液およびSUS447J1浸漬液のどちらも細胞増殖は阻害されなかった。また、細胞培養後の細胞の形態はSUS316Lの1%乳酸水溶液浸漬の場合にアポトーシス小体の形成などの変化が観察された。水溶液浸漬前後のステンレス鋼の表面形状は1%乳酸水溶液浸漬によりステンレス鋼の腐食が進行し、特にSUS316Lで顕著であった。また、1%乳酸水溶液中に溶出したイオンを分析したところ、SUS316L浸漬後でCrイオンの溶出がより多く確認された。

磁性ステンレス鋼SUS447J1の方が非磁性ステンレス鋼SUS316Lよりも細胞増殖の影響および金属イオンの溶出も少ないことが判明したことから、磁石構造体において、SUS316Lの露出面積を極力小さくし、金属イオン溶出量を少なくすることが、さらに安全性を高めることに寄与すると考えられた。

以上、本研究はオーバードンチャーの可撤性支台装置として適応する磁性アタッチメントの安全性を口腔内環境において評価し、細胞増殖の阻害性や金属イオン溶出挙動を把握したことは今後の高齢者歯科学に大いに寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有すると判定した。