

学位論文題名

チタン微粒子に対する

*in vivo* および *in vitro* 生体反応とサイズ依存性

学位論文内容の要旨

（緒言）

今日の臨床において、金属やその化合物は、機械的強度や延性の点から、骨や歯牙の補填材として不可欠な材料である。生体内で使用される際には、さらに化学的安定性や生体親和性が必要とされる。チタン(Ti)は、その表面に安定した不動態酸化皮膜を作る物性から、顎口腔領域において使用される金属のなかでも耐食性に優れた生体親和性に富む材料とされ、主にデンタルインプラントや骨接合用のミニプレートとして用いられている。

しかし Ti は耐摩耗性に劣るため、動的負荷の条件下では微細磨耗粉の発現とその影響が懸念される。Ti インプラントを用いた *in vivo* 実験において、埋入周囲の軟組織中に Ti の存在を報告した論文は多数あり、我々も臨床材料を検索した結果 Ti インプラント埋入部周囲軟組織に多数の Ti 微粒子が存在することを確認している。

（目的）

本研究では、Ti 微細粉末の生体に及ぼす影響、特にそのサイズ依存性を、*in vivo* 及び *in vitro* の実験により明らかにし、さらにチタンをイオンと微粒子の両者で比較検討することにより、生体における作用機序の面から材料の生体親和性を評価することを目的とした。

（材料・方法）

1 動物内移植実験

はじめにチタンの為害性にサイズ依存性があるかを調べるため、ラット皮下へのチタン粒子埋入実験を行った。

Ti 棒及び微細粉末(1~3、10、40、150  $\mu$ m)をラット上皮下へ埋入し、1、2、4、8、15、30 週後に Ti 粒子を含む周囲軟組織をした。通法に従って組織標本作製し、H-E 染色を行った後、病理組織学的に検索した。

2 ヒト好中球に対する Ti 粒子のサイズ効果

次にチタン粒子の細胞毒性の作用機序を検討するために、細胞機能試験として、健常ヒトより採血・分離したヒト好中球を用い、各種 Ti 粉末作用時の好中球の細胞生存率、活性酸素産生

能、TNF- $\alpha$  放出量を測定し、さらに SEM 観察による形態学的影響を調べた。

(結果)

### 1 動物内移植実験

動物実験において、炎症性細胞よりも大きな Ti 粒子 (40、150  $\mu\text{m}$ ) では、各粒子ごとに線維性結合組織に被包され、比較的早期に炎症が鎮静化するのに対し、細胞と同程度あるいはより小さな Ti 粒子 (1~3、10  $\mu\text{m}$ ) では、多数の粒子が一塊として被包されていた。また、10、40  $\mu\text{m}$  Ti 粒子では、炎症性細胞による貪食反応はあまり認められず、線維性結合組織と炎症性細胞浸潤が各粒子間に観察された。一方、細胞より粒径の小さい Ti (1~3  $\mu\text{m}$ ) では、粒子は炎症性細胞により貪食された後に粒子群全体が線維性結合組織により被包されており、粒子間に細胞成分はほとんど観察されなかった。

なお、同時に行ったラット腎臓と脾臓の X 線分析や ICP 分析では Ti は検出されておらず、Ti の体外への排出は起こらなかったと考えられる。

### 2 ヒト好中球に対する Ti 粒子のサイズ効果

好中球は、自らよりサイズの小さな Ti 粒子 (1~3  $\mu\text{m}$ ) に対して貪食反応を示すことが SEM により明らかにされた。また、Ti 粒子作用時に TNF- $\alpha$  値の上昇、活性酸素産生量の増加が測定された。TNF- $\alpha$  の上昇は 1~3  $\mu\text{m}$  Ti 粒子のみでみられた為、SEM で観察された貪食と関連があるものと考えられた。

(考察)

### 1 動物内移植実験

生体親和性に優れた生体材料とされている Ti においても形状によっては炎症反応を誘発すること、その程度は粒子の大きさに影響を受けることを示している。生体内に異物が進入した際生じる反応には、炎症性細胞による貪食、消化、線維性結合組織による被包化、体外への排出があり、その反応は異物の大きさや性状、異物の存在部位によるものとされている。これらの現象と結びつけて考察してみると、今回の実験で得られた結果は以下のように推論される。すなわち、細胞成分より大きな Ti 粒子は線維性結合組織による被包化を受け、小さな粒子は炎症性細胞による貪食される。ただし、貪食された Ti 粒子は炎症性細胞内では処理されないため細胞が死ぬまで細胞内の一部に集積してとどまり、最終的には細胞の死により線維性結合組織による被包化をうける。この際、1~3  $\mu\text{m}$  のような微小な Ti 粒子が小さい範囲に集積するのは、炎症性細胞の細胞質内に取り込まれた粒子が細胞内のごく狭い範囲に集積するためと考えられる。

### 2 ヒト好中球に対する Ti 粒子のサイズ効果

生体内に Ti が埋入された際に最初に触れるのは体液や血液成分である。好中球は、そのなかでも炎症の一番初期に反応する特異性を持たない白血球で、生体内に進入した異物に対して貪食作用や活性酸素の産生による殺菌作用を示すとともに、各種サイトカインを放出

して他の炎症性細胞や線維芽細胞などを励起する。従って、材料に対する生体反応の発現プロセスを検討し、生体親和性を評価する上で、好中球は、極めて重要であり、本研究では、好中球の活性酸素産生能、貪食作用及びサイトカイン TNF- $\alpha$  放出に着目し、材料の影響を検討した。

TNF- $\alpha$  値の上昇は好中球自身のアポトーシス促進や、それに伴うマクロファージによる好中球の貪食を引き起こし、さらに線維芽細胞を誘導して被包化を生じさせ、最終的に炎症は収束させる。1~3  $\mu\text{m}$  の微粒子作用時にのみ TNF- $\alpha$  の上昇が観察されたことは、粒径の小さな Ti は大きいものに比べて周囲組織により強く炎症反応を惹起する可能性のあることを示している。

また、好中球により生成された活性酸素は、殺菌作用を有するとともに正常細胞の損傷をも引き起こす。それゆえ Ti により引き起こされる活性酸素産生量の上昇は周囲組織に対し刺激性、為害性を与える可能性がある。

(結語)

生体親和性に及ぼす Ti のサイズ効果に関して、動物実験ならびに好中球機能試験での評価を行った。その結果、およそ 100  $\mu\text{m}$  付近を境として Ti に対する生体反応が変化し、それより大きな場合は生体親和性を示し、小さな場合には炎症反応を引き起こすことが明らかとなった。特に Ti 粒子が細胞よりも小さな 10  $\mu\text{m}$  以下のサイズでは、好中球などの炎症性細胞による貪食を受けること、生体内で被包化される際は各粒子ごとでなく、粒子が集積し、一塊として被包化されること、さらに炎症性細胞からの TNF- $\alpha$  の放出など、生体に対して為害性を示す可能性を持つ反応も引き起こす可能性のあることが確認された。以上の *in vivo* 及び *in vitro* の両者の結果から、イオンの作用とは異なる生体親和性に及ぼす Ti 粒子のサイズ依存性が示され、細胞よりも粒径の小さな Ti ではより強い炎症反応を引き起こす可能性のあることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 亘 理 文 夫  
副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

## チタン微粒子に対する

### *in vivo* および *in vitro* 生体反応とサイズ依存性

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

チタンは、その表面に安定した不動態酸化被膜を作ることから、顎口腔領域において使用される金属生体材料の中でも耐食性に優れた生体親和性の良い材料とされ、デンタルインプラントや骨接合用プレートとして広く用いられている。しかし、チタンは耐磨耗性に劣るため、動的負荷の条件下では微細磨耗粉の発現とその影響が懸念される。これまでにチタンの生体親和性に関する研究は数多く行われているが、いずれも比較的大きなサイズのチタンやチタンイオンに関するもので、微小サイズのチタンが生体に与える影響を検討した研究はなく、また *in vivo* と *in vitro* 実験を関連づけた研究も少ない。本研究は、生体親和性に及ぼすチタンのサイズ依存性を明らかにすることを目的として、チタン粒子が生体に及ぼす影響を *in vivo* 及び *in vitro* の両面から検討したものである。

まず、チタンの為害性にサイズ依存性があるかを調べるため、生後 12 週齢のウイスター系雄ラット皮下に、粒径 1~3、10、40、150  $\mu\text{m}$  大のチタン細粉末各 10mg ないし 1x5mm 円筒形のチタン棒を埋入し、1、2、4、8、15、30 週後に試料を含む周囲組織を摘出した。通法に従って組織標本を作製し、H-E 染色を行った後、病理組織学的に検索した。次に、チタン粒子の細胞毒性の作用機序を検討するため、健常ヒトより採血・分離したヒト好中球を用い、各サイズのチタン粉末作用時の好中球の活性酸素産生能ならびに TNF- $\alpha$  放出量を測定し、SEM による形態学的観察を行った。対照には、バナジウムならびにニッケル溶液を用いた。

チタン埋入実験の結果、チタン棒では、埋入 2 週目ですでに周囲組織の炎症反応は沈静化し、4 週後には周囲を線維性結合組織で被包されていた。炎症性細胞よりも大きなチタン粒子 (40、150  $\mu\text{m}$ ) では、チタン棒の場合に比べて、炎症反応の沈静化や線維性結合組織による被包化にやや時間を要したものの、各粒子が線維性結合組織により被包化されていた。一方、細胞と同程度あるいはより小さなチタン粒子 (1~3、10  $\mu\text{m}$ ) で

は、4週後においても埋入チタン粒子を中心に炎症性細胞浸潤が観察され、炎症反応は30週以降も認められた。線維性結合組織による被包化は多数の粒子が集簇し一塊として被包化される傾向を示し、特に粒径の小さなチタン粒子(1~3 $\mu$ m)でその傾向が顕著で、粒子間に細胞成分はほとんど観察されなかった。

ヒト好中球に各サイズのチタン粉末を作用させた実験の結果では、活性酸素産生能は1~3 $\mu$ m大のチタン粒子で有意に高く、またTNF- $\alpha$ の放出は1~3 $\mu$ m大のチタン粒子を作用させたときにのみ認められた。さらにSEMによる形態学的観察ならびにエネルギー分散型X線元素分析の結果、1~3 $\mu$ m大のチタン粒子を作用させたときに好中球細胞内ないし表面にチタンが取り込まれていることが確認された。

チタン埋入動物実験ならびに好中球機能試験の結果から、チタン粒子が生体に及ぼす影響は以下のように結論された。およそ100 $\mu$ mを境として、それより大きな粒子では生体親和性を呈する巨視的サイズの特徴を有する。一方、それ以下の粒子では炎症反応を惹起し、その程度は粒径が小さいものほど強く、特に1~3 $\mu$ m大のチタン粒子で顕著に認められる。これは、粒径が炎症性細胞より小さなチタン粒子は好中球やマクロファージによる貪食を受け、その際、貪食細胞から放出されるTNF- $\alpha$ や活性酸素などが周囲組織に為害性に作用することによるものと考えられる。好中球による貪食の結果として、1~3 $\mu$ m大のチタン粒子では被包化は粒子ごとではなく、粒子群全体が一塊としてなされる。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。主な質問事項は、細胞機能性試験における好中球とマクロファージの比較、組織の染色方法と炎症性評価、微粒子の粒度分布・形状の影響、活性酸素放出と金属腐食の関連、放出と貪食作用の判定、などであり、広汎かつ詳細に質疑応答がなされた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、生体親和性に優れた生体材料とされているチタンにおいてもその、形状によっては炎症反応を誘発すること、その程度は粒子の大きさに依存し粒径が1~3 $\mu$ m大のチタン粒子で顕著に生じること、さらに炎症反応の誘発にはチタン粒子が好中球による貪食を受けた際に放出されるTNF- $\alpha$ や活性酸素が関与していることを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。