原 著 論 文

浸漬試験によるチタン溶出の評価

小池 麻里 中村 茂 藤井 弘之

In Vitro Assessment of Release from Titanium by Immersion Tests

Mari Koike, Shigeru Nakamura and Hiroyuki Fujii

Abstract : The purpose of this study was to examine the released titanium from casted isolated titanium and casted titanium coupled with other dental alloys (gold, Au-Ag-Pd, and Ag-Sn-Zn alloys) by the immersion test. After 3 weeks of immersion, titanium released into solutions were measured by ICP-AES.

The results were as follows :

1. Titanium released from isolated titanium test pieces in 1.28 mM lactic acid were significantly more soluble than that in artificial saliva, saline solution, 1.28 mM formic acid, and 1.28 mM acetic acid.
2. Titanium released from coupled titanium test pieces in lactic acid were more soluble than that in artificial saliva, saline solution. However, the released amount of titanium in lactic acid seemed to be attenuated by combining with gold, Au-Ag-Pd, and Ag-Sn-Zn alloys.

Key words : titanium, immersion test, artificial saliva, organic acid, ICP-AES

I. 結 言

疾病構造や生活環境の変化および社会意識の変化に伴い、生体材料の安全性^{1,2)}に対する関心が高まりつつある。チタンは、*in vitro* では表面に不動態皮膜を形成するため溶出し難く^{2,3)}、安全性の高い生体材料とされている。

歯科領域でも、インプラントや種々の修復治療でチタンの使用頻度が増え、その生体親和性を指摘する報告⁴⁾も少なくない。しかし、歯科材料としてのチタンの使用経験は、川添らの報告⁵⁾から起算するとまだ15年にすぎない。最近ではチタンに対する不適応やアレルギー反応の発症を示唆した報告^{6,7)}も散見され、生体材料としてのチタンの特性にはまだ不明な点が多い。

生体材料の特性を評価する方法の1つに、浸漬試験がある。チタンやチタン合金についても浸漬試験に関するいくつかの実験的報告^{8~14)}がある。しかし、これらの報告で用いられている実験条件はさまざまで、多様な口腔内あるい

は生体内環境下でのチタンの動態はほとんど知られていない。

本研究は、口腔内での使用を想定したいくつかの条件を設定して、浸漬試験法でチタンの溶出を観察したものである。

II. 研究方法

1. 試料の作製

1) チタン単体試料

モリタ社製純チタン A (以下 Ti と略す) をメーカーの指示に従い、約 15×20×1 mm の大きさ¹⁵⁾に casting した後、チタン専用酸化皮膜除去液 (モリタ社製) に1分間浸漬して酸化膜を除去した。JIS 規格 T-6106 に準拠して、この casting 体を耐水研磨紙で 800 番まで研磨した。その後、アセトン中で15分超音波洗浄して脱脂、乾燥させた。

2) 異種金属接合試料

ジーシー社製 Casting Gold M.C. (Type IV : 歯科 casting 用金合金)、Castwell (歯科 casting 用金銀パラジウム合金)、Miro Silver (歯科 casting 用銀合金) をメーカーの指示に従って、Ti と同じ大きさに casting した後、蒸留水中で超音波洗浄した (以下、それぞれ AuA, PdA, AgA と略す)。

長崎大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任 : 藤井弘之教授)
Department of Removable Prosthodontics, Nagasaki University
School of Dentistry (Chief : Prof. Hiroyuki Fujii)
平成9年3月18日受付

表 1 Chemical composition of alloys analysed
合金の化学的組織

(mass %)

Alloys [abbreviation]	Chemical composition									
	Ti	Fe	Au	Ag	Pd	Cu	Pt	Sn	Zn	Others
歯科用純チタンA (第2種：モリタ)：[Ti]	99.49	0.25								0.26
Casting Gold(IV：GC) ：[AuA]			70	8	3	16	2			1
Castwell(GC)：[PdA]			12	46	20	20				2
Miro Silver(GC)：[AgA]				65				20	15	

表 2 Composition of immersing solutions
浸漬液とその組成

Solutions	pH	Concentration	Composition	
Artificial Saliva (Saliveht® ：TEIJIN)	5.0～6.0	0.08%	NaCl	Sodium Carboxymethyl Cellulose (thickener)
		0.12%	KCl	D-Sorbitol (corrective agent)
		0.01%	CaCl ₂ (2H ₂ O)	Sodium Benzoate (preservative agent)
		0.005%	MgCl ₂ (6H ₂ O)	Sorbic Acid (preservative agent)
		0.03%	K ₂ HPO ₄	Refined Water (Solvent)
Physiological Saline Solution (TERUMO)	4.5～7.0	0.9%	NaCl	Refined Water (Solvent)
Lactic Acid	2.0～3.0	1.28 mM (1%)	CH ₃ CHOHCOOH	Refined Water (Solvent)
Formic Acid	2.0～3.0	1.28 mM	CHCOOH	Refined Water (Solvent)
Acetic Acid	2.0～3.0	1.28 mM	CH ₃ COOH	Refined Water (Solvent)

仕上げ研磨および表面処理は、前述の Ti の場合と同様である。

これら 3 種類の試験片と前述の方法で作製した Ti 試験片を、銅線の両端にスポット溶着した。銅線と溶着部はシリコーン充填剤（ワンタッチ：カンベハビオ(株)）で被覆・絶縁し、これを異種金属接合試料とした。

メーカーが表示した使用金属の組成を表 1 に示した。

2. 浸漬液

試料浸漬液として、人工唾液（Saliveht®：帝人(株)）、滅菌生理食塩水（テルモ(株)）（以下、生食液と略す）、乳酸、ぎ酸および酢酸（和光純薬(株)）溶液の 5 種類を準備した（表 2）。乳酸、ぎ酸および酢酸は、それぞれ Milli-Q 水を用いて 1.28 mM に希釈した。なお、乳酸溶液の濃度 1.28 mM は、パーセント濃度では 1% に相当する。

3. 浸漬試験

1) Ti 単体試料の浸漬試験（実験 1）

各浸漬液を 50 ml Centrihug Tube に 10 ml 分注し、その中に試料 1 個を全浸漬し、しっかりと蓋をした。各浸漬液ごとに試験片を浸漬した 4 本の tube を準備し、合計 20 本の tube を恒温槽に入れて、3 週間 37°C、80 回/min

の振盪を加えた。なお、同じ試験を期日を変えて、さらに 1 回繰り返した。

2) Ti-異種金属接合試料（実験 2）

浸漬液に、人工唾液、生食液および乳酸溶液を用いた。接合試料は、鑄造した試料片が浸漬液中に全浸漬する高さで tube 内に木綿糸で吊した。その他の条件は、実験 1 と同様とした。ただし、異種金属接合試料では、試験の繰り返しは行わなかった。

4. 溶出イオンの測定と分析

ICP 発光分析装置（SPS 1500 VR：セイコー電子工業(株)）を用いて¹⁶⁻¹⁸⁾、各サンプルごとに 4 回の測定を繰り返した。測定値が検出限界（0.005 ppm）以下の場合には、溶出量を 0 ppb とした。

標準液には、Milli-Q 水で 1 ppm に希釈した原子吸光分析用チタン標準液（1,000 ppm：和光純薬(株)）を用いた。さらに、各浸漬液でチタン濃度 1 ppm の標準液を作製し、各浸漬液と Milli-Q 水希釈標準液の測定値と比較して補正値を求めた。

補正測定値は試料表面積で除して、これを各試料の単位表面積あたりの溶出量とした。データの統計的検定には分散分析法¹⁹⁾を用いた。

表 3 Ti released from Ti-test piece into solution by 3-weeks immersion tests
Ti 単体試料から浸漬液へのチタン溶出量 (3 週間)

		(ppm/cm ²)				
Sessions		Solution				
		Artificial Saliva	Saline Solution	Lactic Acid	Formic Acid	Acetic Acid
I	$\bar{X}$	0.037	0.000	0.802	0.008	0.003
	(SD)	(0.003)	(0.000)	(0.062)	(0.003)	(0.001)
	N	4	4	4	4	4
II	$\bar{X}$	0.019	0.000	0.274	0.007	0.002
	(SD)	(0.001)	(0.000)	(0.008)	(0.001)	(0.000)
	N	4	4	4	4	4
General mean		0.028	0.000	0.538	0.008	0.003
(SD)		(0.010)	(0.000)	(0.285)	(0.002)	(0.001)

表 4 Ti released from Ti-test piece coupled with various alloys into solution by 3-weeks immersion tests
Ti-異種金属接合試料から浸漬液へのチタン溶出量 (3 週間)
(ppm/cm²)

Connected alloy	Solution		
	Artificial Saliva	Saline Solution	Lactic Acid
AuA (N=4)	0.016 (0.010)	0.000 (0.000)	0.270 (0.010)
PdA (N=4)	0.009 (0.001)	0.002 (0.002)	0.276 (0.076)
AgA (N=4)	0.001 (0.001)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)

図 1 Ti released from test pieces into solution by 3-weeks immersion tests
試料から浸漬液へのチタン溶出量 (3 週間)

III. 結 果

1. Ti 単体試料からの溶出

人工唾液、生食液、乳酸溶液、ギ酸溶液および酢酸溶液に Ti 単体試料を浸漬した結果を表 3 に示した。

分析の結果、チタンは生食液を除く浸漬液中に溶出することがわかった。溶出が最も多いのは乳酸溶液に浸漬した場合で (3 週間で平均 0.538 ppm/cm²)、次いで人工唾液 (同 0.028 ppm/cm²) であった。両者間には統計的な有意差が認められた ($p < 0.001$)。

ギ酸および酢酸溶液中でも、0.008 ppm/cm² 以下の溶液が認められたが、その溶出量は乳酸溶液や人工唾液に浸漬した場合に比べて有意に少なかった ($p < 0.001$)。

肉眼的には、人工唾液、生食液および乳酸溶液に浸漬した試料には、変化は認められなかった。しかし、酢酸溶液浸漬後には、試料表面に注意深く観察すると気づく程度のわずかな変色が認められ、また、ギ酸溶液浸漬後には試料全面が黄金色になっていた。

2. Ti-異種金属接合試料からの溶出

表 4 に、Ti-異種金属接合試料からのチタンの溶出量を示し、図 1 にこれらデータを Ti 単体試料の結果 (表 3)

とを対比させて図解した。

異種金属接合試料からのチタンの溶出は、浸漬液と接合金属によって異なっていた ($p < 0.005$)。すなわち、浸漬溶液の効果は、Ti 単体試料の場合 (表 4) と同様、乳酸溶液浸漬時に最も強く、その溶出は人工唾液浸漬時の約 17 倍 (AuA) から 30 倍 (PdA) であった。

異種金属接合試料から溶出したチタンの量は、Ti 単体試料の当該値を超えることはなく、むしろ減少する傾向がうかがえた。特に Ti と銀合金 (AgA) を接合した試料からのチタンの溶出は 12 tube すべてにおいて検出限界以下で、Ti 単体試料の当該値および金合金 (AuA) やパラジウム合金 (PdA) と接合した場合と比べて少なかった ($p = 0.001$)。

なお、Ti-AgA 接合試料では浸漬試験後、乳酸溶液中に乳白色沈殿物を認めた。

IV. 考 察

1. 試験方法について

歯科修復物は口腔内で種々の環境²⁰⁾にさらされる。本研

究では、これらのことを考慮して、人工唾液、生食液および *Streptococcus mutans* など Dental Plaque 内の常在菌が産生する有機酸である乳酸、ぎ酸および酢酸を含む 5 種類の浸漬液を準備した。しかし、同一個人でも、時間、摂食、生体の活動状態あるいは健康状態などによって口腔内環境は刻々と変化しているため、これらを再現する実験条件の設定はいまのところ不可能に近い。そこで今回は、有機酸については、他の金属の変色試験¹⁵⁾、腐食および浸漬試験^{21,22)}で使用されている乳酸濃度を参考にして設定し、人工唾液については臨床で使用されている Saliveht[®]を使用することにした。また、有機酸間の効果を比較するため、浸漬液に用いたぎ酸および酢酸溶液の濃度は、乳酸溶液と同じモル濃度にした。ちなみに、乳酸濃度は、刺激を与えたときの唾液中でおおよそ $10\sim 50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ²³⁾ ($0.11\sim 0.56\text{ mM}$) とされている。しかし、歯垢による乳酸産生を表した Stephan curve によると、ショ糖摂取後 10 分には 2.7% に達することになり²⁴⁾、これは、本実験で設定した濃度 (1.28 mM) の 2.34 倍に相当する。また、歯垢中の有機酸は、須賀が引用した Geddes (1975) の報告²⁴⁾によると、摂食前には乳酸が 14% であるが、同 5 分後には 55% に達し、同 2 時間 30 分後には、酢酸 55%、乳酸 13% になると報告されており、本研究で設定した有機酸の濃度は過酷な条件ではないと考えられる。

溶出は、浸漬条件によっても異なる^{25,26)}。本実験では浸漬液中の溶出金属イオン濃度を可能な限り均一に保ちたいと考え、恒温槽中で試料を浸漬した tube を 80 回/min の頻度で振盪し、恒温槽の温度も 37°C とした。

口腔内では、金属修復物は単体で存在する場合と、異種金属と接触して存在している場合とがある。また、異種金属との接触には、接触面間に間隙が存在する接触と、緻着や鑄巣の緻盛りなど接触面間に間隙の存在を許さない接触とがある。前者の場合、浸漬試験では金属成分は主に試料の表面腐食とすき間腐食によって溶液中に溶出し、試験結果の評価を複雑にする。本研究では、すき間腐食²⁷⁾の影響を極力排除し、異種金属の接触のみによって起こるチタン溶出量の変化を観察したいと考え、異種金属を銅線で連結することにした。

2. 変動について

Ti 単体試料の繰り返し試験の結果は、1 回目と 2 回目の溶出量に無視しえない程度のバラツキが存在することが示された (表 3)。たとえば、乳酸溶液に浸漬した時の試験 1 回目の溶出量は同 2 回目の約 3 倍であった。

このバラツキには 2 つの原因が考えられる。1 つは試料の不均一で、他の 1 つは測定時の誤差である。前者には、鑄造条件の差異による結晶構造の違いや鑄巣の多少および研磨の同一性などが関与する。鑄巣や粗な研磨は試料の表面積を大きくし、結果として溶出量を過大に評価する。後

者の原因の 1 つは標準液濃度のわずかな差異である。本実験では、両者が複合した可能性を否定できないが、試料表面の観察などから前者の影響が大きいと考えている。ニッケルの溶出を調べた研究では、試料間のバラツキが約 12.5 倍に達している報告²⁸⁾もあり、これらの結果は、臨床でも類似の変動が起こりうることを示唆したものと理解した。なお本実験では、単体試料 2 回目と異種金属接合試料の試料作製および浸漬試験は同時期に実施したので、実験条件の同一性は高く、両データの対比に大きな矛盾はないと考えている。

3. 結果について

チタンの溶出が最も多かったのは、乳酸溶液に浸漬した時であった。しかし、金属の腐食は唾液中の mucin による獲得被膜の形成、あるいは他の可溶性蛋白質、炭酸塩、リン酸塩などによっても影響される²⁹⁻³¹⁾。また、口腔内では Dental Plaque の付着は同じ歯でも部位によって異なり、環境が好気的か嫌気的条件かによって産生される有機酸の種類も異なる。口腔内ではこれらの要因が相互に関連しあうので早急な結論は避けるべきであるが、本実験結果は、生体環境下でのチタンの溶出は生じうることを示している。

伊藤³²⁾は、異種金属と接触させた場合、接触する金属の種類や大きさのほかに、浸漬液の電解質の種類によっても腐食電流の大きさは異なると述べている。

本研究では、Ti を金合金あるいは金銀パラジウム合金と接触させた場合には、Ti 単体の場合よりもチタンの溶出が減少する傾向があった。また、銀合金と接触させた場合にはチタンの溶出量は検出限界以下に減少していた (図 1)。この結果は、チタンの溶出は金合金と接触すると減少し、金銀パラジウム合金と接触させた場合には増加する傾向があったとする Iimuro らの報告³³⁾と、一部で異なっている。しかし、本実験と彼らの報告では、異種金属と接合してもイオン化傾向の大きいチタンの溶出が増大するとは限らないという点では一致している。

このことから、本実験条件下におけるチタンの溶出の背景は、他の合金成分の溶出を含めてさらに詳細な検討が必要である。

V. ま と め

1. チタンの溶出を浸漬試験で評価した。
2. チタンの溶出は、乳酸溶液に浸漬したとき最も多く、次いで人工唾液、ぎ酸、酢酸溶液の順であった。生理食塩水への溶出は検出限界以下であった。
3. Ti 単体試料と比較して、Ti-異種金属接合試料からのチタンの溶出量は、Ti 単体試料の当該値を超えることはなく、逆に減少する傾向が観察された。

4. Ti-銀合金接合試料からのチタンの溶出は、すべての浸漬液において検出限界以下であった。

稿を終えるにあたり、純チタンAの鑄造を担当して下さい下江幸司歯科技工士に厚くお礼を申し上げます。さらに、人工唾液Saliveht®のご協力を頂いた、帝人株式会社に感謝の意を申し上げます。

文 献

- 堀部 隆. 歯科材料とその安全性について. 歯界展望 51: 960-966, 1987.
- 筏 義人. 生体材料学 63-69, 東京: 産業図書, 1994.
- 野元成晃, 小野瀬英雄. 口腔環境における金属の運命-1. 金属の運命を考えるための基礎資料 (イオン化傾向ならびに開路電位) について. 歯界展望 58: 761-767, 1981.
- Bessho K, Hujimura K, Iizuka T. Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. J Biomed Mater Res 29: 901-904, 1995.
- 川添堯彬, 末瀬一彦. チタンのクラウン・ブリッジへの応用. 三浦維四, 井田一夫編, チタンの歯科利用 163-170, 東京: クインテッセンス出版, 1988.
- Donald LM, Scott AS, John AV. Tissue reaction involving an intraoral skin graft and CP titanium abutment: A clinical report. Int J Oral Maxillofac Implants 5: 79-84, 1990.
- 藤井弘之, 中村 茂, 小池麻里ほか. 金属アレルギー—歯科臨床の立場から—. DE 120: 1-5, 1997.
- Dag B, Dag E, Sigurd M. Corrosion of gold alloys and titanium in artificial saliva. Scand J Dent Res 90: 168-171, 1982.
- 藤本和久. インプラント材料としての 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.
- 松野修次. 歯科用チタニウム合金の耐食性に関する研究. 歯科学報 87: 1141-1152, 1987.
- 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.
- Osborn JF, Willich P, Meenen N. The release of titanium into human bone from a titanium implant coated with plasma-sprayed titanium. Biomaterials 9: 75-80, 1990.
- Kawalec JS, Brown SA, Payer JH. Mixed-metal fretting corrosion of Ti 6 Al 4 V and wrought cobalt alloy. J Biomed Mater Res 29: 867-873, 1995.
- Callen BW, Lowenberg BF, Lugowski S. Nitric acid passivation of Ti 6 Al 4 V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. J Biomed Mater Res 29: 279-290, 1995.
- 日本歯科材料工業協同組合. JDMA Guide Book, 東京: 日本歯科材料工業協同組合, 1992.
- 原口 紘. ICP 発光分析の基礎と応用, 東京: 講談社サイエンスフィク, 1986.
- 吉永 淳. 誘導結合プラズマ発光分析法および ICP 質量分析法. 日本臨床 54: 202-206, 1996.
- 篠原厚子, 千葉百子. マイクロ波プラズマ質量分析法の生体材料への応用—微量元素測定のための基礎的検討. 日衛誌 49: 924-934, 1994.
- Cornelius L. Geigy Scientific Table 2, West Caldwell: Ciba-Geigy, 1982.
- 野村浩道. 口腔内環境の生理. DE 60: 34-39, 1982.
- 堀部 隆, 岡本佳三, 辻 楠雄ほか. 鑄造用ニッケルクロム合金の腐食と変色. 歯材器 3: 605-613, 1984.
- 松村光明. 歯冠修復用金属の評価法に関する研究—第 1 報 浸漬試験における金属の変化の観察—. 補綴誌 30: 1198-1209, 1986.
- Cornelius L. Geigy Scientific Table 1 114-122, West Caldwell: Ciba-Geigy, 1981.
- 須賀昭一. 図説齲蝕学 109-119, 東京: 医歯薬出版, 1990.
- 土井英暉, 武田昭二. 非金属系合金の溶出に対する浸漬条件の影響. 歯材器 9: 375-386, 1990.
- 吉成正雄, 金子 節, 住井俊夫. 歯科用合金から金属元素の溶出に及ぼす電位の影響—静的浸漬試験との比較—. 歯材器 11: 515-526, 1992.
- 伊藤伍郎. 標準金属工学講座 16 腐食科学と防食技術 162-186, 東京: コロナ社, 1994.
- Lasse K, Thea S, Tuula E. Nickel release from metals and a case of allergic contact dermatitis from stainless steel. Contact Dermatitis 31: 299-303, 1994.
- 信太一好. 唾液が金属体の腐蝕を抑制する作用について. 歯材器誌 2: 42-52, 1955.
- 金竹哲也. 歯科用金属の腐蝕に関する実験的研究—主として唾液及び食品中における変化について—. 歯科学報 58: 123-130, 165-167, 257-267, 289-294, 1958.
- 大橋正敬. 歯科用金属の人工唾液による耐変色ならびに耐食性について. 歯材器誌 5: 64-75, 1961.
- 伊藤伍郎. 歯科用金属の腐蝕の研究 (金属接触腐蝕の研究). 歯材器誌 2: 36-41, 1955.
- Iimuro T, Yoneyama T, Okuno O. Corrosion of coupled metals in a dental magnetic attachment system. Dent Mater J 12: 136-144, 1993.