



歯科用貴金属合金  
安全性試験レポート  
Vol. 6

歯科材料の物性から生物学的影響まで  
硬質レジン, メタルセラミック修復用合金, 金合金における検討

## 目次

1. はじめに	2
2. 歯科材料の生きる道	3
3. 当社の研究への取り組み	6
4. メタルセラミック修復用合金, 金合金の物性検討	7
4.1 金属の溶出	7
4.2 金合金の理工学的物性について	12
5. 生物学的検討	17
5.1 コロニー形成阻害試験	17
5.2 細胞増殖阻害試験, DNA合成試験, 蛋白合成阻害試験	18
5.3 細胞傷害性試験, DNA断片化試験	22
6. まとめ	24

# 歯科材料の物性から生物学的影響まで 硬質レジン, メタルセラミック修復用合金, 金合金における検討

## 1. はじめに

山本貴金属地金株式会社  
代表取締役会長 山本 裕久

最近、国内外の食品メーカーの賞味期限改ざんや体に害のある物質の混入など、生活を脅かす報道を毎日のように目にするようになった感があります。

一方で、エレベーターやガス器具などを消費者が普通の使い方をしているにも関わらず、命まで落としてしまう痛ましい事件が発生しています。

私たち消費者は、有名メーカーというブランドから「当然この企業であれば安心して使用できる」と信じてきたものですが、どうもそうではないらしいという疑念が広がってきております。

このような企業不祥事は、以前から潜在的にあったものなのか、それとも長引く不況を起因としたコストカットから企業の生き残りのため半ば意図的につくられたものなのか、あるいはリストラや企業合併などで社員の勤労意欲が減退したことで生まれるようになったものなのか、その真因は定かではありません。

しかしながら、真の原因が何であれ、私たち消費者の製品選択に対する目は年々厳しくなっており、消費者は本当に安心して使用できるものでなければ手にとらなくなって来たことは、確かな事実であります。

企業側に目を転じてみると、以前は規格に即した製品作りをしていればそれが安心の根拠になっていたのですが、いまでは品質管理や安全管理のシステムを明確にしなければ、消費者に認められる品物作りができなくなってきています。これは換言すると、安全性に対する強い信念を持っている企業でなければ、消費者のかたがたに安心できるよいものを提供できないということを表しています。

さて、歯科材料は、従来、物理（機械）的性質をはじめとする諸性質の科学的検討が行われてきました。また歯科材料は経験的に人体への影響が少ない素材であると認識されてきました。しかし、安全性に対する要求が高まる中、いまや口腔内に装着する歯科材料は長期間にわたる人体への影響を考慮した製品であることが求められ、そのことが安心して使用していただくための必須条件となってまいりました。

そこで当社では生体科学安全研究室を設置し、高知大学医学部との共同研究などで、ISO 10993「医療機器の生物学的評価」に準じた評価を行ってまいりました。その中で、細胞、組織、遺伝子工学を基礎とした独自の試験項目を加え、安全性に重点をおいた製品開発を進めることで、医学的な安全性を融合させた真に安心できる材料を提供し、歯科医療の信頼を高める活動を展開しております。

歯科材料は言うまでもなく「医療機器」であり、国の定めたガイドラインにも明確に示されている通り、国際レベルでの安全、および長期にわたる人体への「安全」にこだわり、それを実現させることが当社の使命としております。

これからも、歯科医療の高度化にともない、「安心」「信頼」「満足」していただける製品を提供

する事を当社のテーマとし、今後も研究開発に取り組んでまいります。

## 2. 歯科材料の生きる道

山本貴金属地金株式会社 医療・技術顧問  
高知大学名誉教授 医学博士 尾崎 登喜雄

人類が自らの体の損傷・欠損・機能障害を手当し補うことを行いだしたのはいつ頃からであろうか。恐らくそれは、太古の昔からであり、最初に用いた材料は多分、骨折の手当としての副木（添木）であったであろう。その太古からさほどの進歩もなく何十万年、いやひょっとして何百万年がすぎたに違いない。そんな長い長い時間を経て、古代文明の夜明けと共に、医学とおぼしき学問が発達して来たのであるが、その幕を明けたのはギリシャ文明であった。

ギリシャが栄えた紀元前5世紀前後には、哲学あるいは芸術と共に医学が発達した。その代表として任じられるのは、医聖と呼ばれるヒポクラテスであるが、彼は病氣・病人の客観的観察による実証主義に基づき、今日でいう、解剖学、外科学の萌芽をもたらしたのだった。ギリシャ文明の中で開花したヒポクラテスの医学の後を受けて、紀元1世紀にはケルススが、2世紀にはカレノスが、ローマにおいて古典医学を発展させて行ったのである。しかし、その間、生体の欠損・損傷を補綴・修復する材料にさしたる進歩はほとんど見られず、あい変わらず、副木に松葉杖程度のものであった。

医学の発展はローマの繁栄が終ると共に停滞して行き、その後、約1500年間、解剖学に外科学が多少の進歩を遂げたのみで、そのような、いわば暗黒の1500年を経た後、他の分野共々、医学にあっても近代的な発展が加速度的に進んで行ったのである。

中世を過ぎ、ルネッサンスを迎えると、未だ、十分に科学的論証に立脚したものではないにしても、医学は「解剖学」、「内科学」、「外科学」、「精神医学」、「薬学」といった分野を形成しながら発展して行った。その中で大きな発見は、17世紀の前半に発表されたイギリスのウィリアム・ハーヴェイによる血液循環論であった。そして、18世紀に入ると、科学全般に渡る発達と軌を一にして、病理学、生理学、感染学が発展を遂げ、18世紀の終りにはジェンナーの種痘による痘瘡の克服という画期的な発見に至ったのだった。ジェンナーの種痘は“免疫”の証明であり、微生物に対する人類の科学的な戦いの輝かしい勝利の第一歩であった。19世紀はナポレオン一世のヨーロッパ制覇でもって幕が開けられたが、医学の上では大きな進歩が刻まれた。その最大の研究は、植物を含め生物は細胞から成り立っているとしたドイツのシュライデンとシュワンの仕事であった。それと共に、細胞は細胞から生じるとの考えで病因・病態を細胞レベルで考証したウィルヒョウの「細胞病理学」であった。20世紀に入ると、細菌学・感染症研究はフランスのパスツール（狂犬病ウイルスの発見者）の後を受けてヨーロッパ、特にドイツで発展し、コッホ、あるいは我が国の北里柴三郎等によって細菌学・免疫学が切り拓かれ、感染症に対する礎が確立したのである。それを受けて20世紀の前半は、感染症に対する研究は著しく発展したのであるが、それと共に、顕微鏡の進歩、レントゲンをはじめとする医療検査機器の開発、あるいは分析技法の開発を基にして、それまでの細胞レベルから分子レベルの研究へと進化し、生理・生化学が飛躍的に進歩したのであった。そして、20世紀

の後半から今日にかけては、抗菌薬をはじめとする薬学の発展を皮切りに、各疾患の病因・病態が分子レベルで解析され、加えて、ワトソン・クリックが切り開いた遺伝子研究が盛んとなり、現在の“細胞工学”、“遺伝子工学”へと繋がって行くのである。

さて、このような医学の発展史の中で、個体（ヒト）の組織・器官欠損あるいは機能障害に対する生体用材料はどのように発展してきたのであろうか。それが残念なことに、生体用材料は太古からほとんど進歩することなく進み、20世紀に入るまでは精工な義肢や眼鏡、あるいは義歯程度で、生体の一部として生理的に機能する生きた材料は開発されないままであった。

それでも、20世紀に入ると、動物の骨を用いた骨移植が試みられたり、自己の組織（皮膚、骨）の移植が行われるようになり、それに伴って、生体用材料の開発が進んで行ったのである。しかし、生体に用いられる材料の大きな発展は20世紀の中途すぎまで待たねばならなかった。すなわち、今日用いられている移植あるいは組織充填・修復用材料は、わずか50年程度の歴史しか有していないことになり、長い医学の歴史の中で、特異な位置に立っているのである。

生体用材料を大別すると、生体から得られた材料すなわち生体材料と人工物からなる人工材料に分けることが出来る。前者はその材料源によって、異種（人間以外）材料、同種（他人）材料、自己材料とに分けられるが、1960年頃までは主にこれらの生体材料が研究されてきた。ただ、生体材料は大きな問題を抱えていたのである。それは、自己材料以外は拒絶反応によって生着しないという難問であり、それをクリアするべき自己材料には組織適合性において自ずと限界があり、かつ、ドナーサイト（採集部）に形態的、機能的障害を後遺することである。そのような問題のみならず、近年、大きくクローズアップされてきた問題は、同種材料によるウイルス感染である。今日の薬害肝炎問題は同種材料であるコラーゲン製剤によってであり、少し前とはなるが、輸血コラーゲン製剤による肝炎（C型）あるいは血液凝固製剤によるHIV（エイズウイルス）感染を見るだけでも、生体材料の危険性が納得される。

科学の発達スピードは“指数関数的”といえる程であり、最近の50年間の発展はあらゆる分野で目を見張るものがある。その科学の発展に伴って、優れた性質を有する化学合成物が製造されるに至り、生体の各組織に適合する性質・性能を有する化学合成物が作られるようになってきた。すなわち、人工の生体用材料（人工材料）の登場である。その人工物は、補聴器やコンタクトレンズ等の外用のものから、人工心臓、人工血管、心血管用カテーテル／ステント、人工骨、コラーゲンシート等々、数え切れない程に多彩である。素材としても、種々の金属・合金、珪素や炭素の焼成物あるいは合成樹脂まで多種・多様で、今現在、より良い材料を求めて開発競争が熾烈化している。

さて、このような医学・医療用材料の発展の中で、歯科領域ではどうであったであろうか。一口でいうならば、歯学・歯科材料の発展は一部を除いて医学の後追いであった。確かに、未だ他領域では機能的な補綴物が用いられていない時代にすでに、口腔には総義歯が用いられ、咀嚼機能を回復するという役割を果たしていた。しかし、歯冠修復、欠損歯の補綴、あるいは顎骨や舌の欠損補綴の発展は、医学全般から見れば、他に追従してきた観は否めない。ところが、最近の20年程を見るならば、他領域の発展に優るとも劣らない発展が歯科材料に認められる。それは、歯冠修復材料のみならず、骨内インプラント材あるいは人工骨において明らかで、現在は、歯科材料の全盛期のようにも見て取れる。

ただ、ここで危惧されるのは、この盛況がいつまで続くかということである。歯科材料のほとんどは、印象材、埋没材、キャスト用金属、歯冠修復用レジン、人工歯、いずれを取っても生体外用材料であ

り、生体組織との反応にほとんどあずからない。実は、ここに大きな問題が潜んでいるのである。生体（組織・細胞）と反応しないことが暗黙の了解、先入観念となり、歯科材料を製作する側（製造会社）も用いる側（歯科医師）も、用いる材料の生体に及ぼす影響を忘れてしまい勝ちになり、単に“無機物”を扱っている感覚に陥ってしまうことである。成る程、歯は硬組織であり、歯髄あるいは歯根膜にしても細胞の生命活動は量的に極く限られている。可撤性の義歯を装着しても、それは粘膜上のことであり、そこに生物反応は生じないと考えられ易い。

しかし、今やそれであっては、歯科医療そのものが成り立たないと同時に、そのような考えの下での製品は臨床使用されなくなりつつあるのである。義歯を入れたならばカンジダ症の発症に留意する、金属を用いる場合にはその溶出・酸化／アレルギー誘導性に配慮する、歯冠修復性レジンに対しては歯髄刺激作用の有無を、インプラント体であれば骨形成誘導性を考慮しなくてはならないであろう。これらは、直接には術者（歯科医師）が考えるべきことではあるが、当然のこととして、作る側もそれらを念頭に置いて、製品開発を進めなくてはならないことは言を待たない。

ここで、素直に言わして頂くならば、今日まで、製品開発に当って、あるいは一度、製品化した材料に対して、生物学的な検証が行われることが、一部の会社を除き、極めて少ないように見受けられてならない。先に述べた如く、歯を中心とした口腔は、生活応答が低いことから、ややもすれば、この点が軽んじられてしまうわけではあるが、今後、医療材料生成の中で生き残り発展して行くためには、単に理工学的検討を行うだけではなく、各々の材料の生体に及ぼす影響を検証することが必要となるであろう。

歯科材料の研究はある意味、大きな将来性を有している。その手短なものは骨内インプラントである。現在、幾つもの研究施設でインプラント体の骨形成誘導／インプラント体と骨との緻密な連結が、インプラント体表面のコーティング等を通じて研究されている。その成功の先には、例えば、大腿骨の骨頭置換物として、卓越した利点を有する歯科用インプラントが用いられる日もやって来るはずである。歯科材料を歯科（口腔）の中だけで見詰めるのではなく、広く医学の中で生体全体を視野に置いて開発する哲学を持ちたいものである。

### 3. 当社の研究への取り組み

山本貴金属地金株式会社 生体科学安全研究室  
常務取締役 安楽 照男

歯科材料が口腔内の長期間の環境で使用されるためには、硬さや強さなどの機械的性質と耐食性に加え、生体に対して為害性のないことが要求される。さらに、2005年4月施行の改正薬事法では、人体へのリスクに応じた医療機器のリスク分類が行われ、特に新しい歯科材料も含めた医療機器に対して、安全性、有効性評価が強化されている。

このような社会的変化や改正薬事法を考慮するとともに、歯科材料を提供するメーカーとして、当社では製品の物理化学的性質の向上は勿論のこと安全性の強化を図る体制にシフトした。そのために、「歯科材料の安全性に関する試験」を具現化するために2003年から高知大学医学部口腔外科との共同研究に取り組み、2005年には大学内に生体科学安全研究室を設置した。そして共同研究を行う中で、貴金属合金の溶出試験やコロニー形成阻害試験、レジンではISO 10993に準拠した急性毒性試験、コロニー形成阻害試験、復帰突然変異試験、皮膚感作性試験、口腔粘膜刺激試験、蛋白合成試験などの結果を公表してきた。

貴金属合金は、機械的性質や加工性、耐食性に優れていることから、歯科では多用途の歯冠修復材に用いられている。ただ、金や白金等の純金属のままでは、機械的性質が不十分なため口腔内での負荷に耐えられず、そこで種々の金属元素を添加した合金が用いられることとなる。その目的に沿って金や白金に添加される元素としては、機械的性質や操作性を向上させるため非貴金属元素が多いが、生体に対する為害性を一方では考慮しなければならない。その代表的なシュミレーション試験としては、溶出する金属イオンと*in vitro*における細胞毒性試験が多く用いられている。ところで、金属イオンとアレルギーは深い関係にあり、金属アレルギーが多数報告されてきており、歯科治療においては、用いる合金の選定に十分注意しなければならない。その点に留意し、当社では貴金属合金の成分を全て開示している。

周知の通り、3大歯科材料の一つはレジンである。そのレジンには、モノマーが使用されているが、一部では細胞毒性が報告されている。そればかりではなく、高分子であるモノマーの一部には、内分泌攪乱物質作用のあることも報告されている。そこで当社のレジンの新製品開発に当たっては、生体に及ぼす影響を考慮して取り組んでいる。

当社が販売している製品をより安心して使って頂くため、またより納得して使って頂くため、これまでも安全性試験をレポート化し、今後も試験結果は公表していきたいと考えている。今回は、これまでの安全性試験レポートを総評して“安全性シリーズVol.6”の『歯科材料の物性から生物学的影響まで』としてまとめた。

本試験レポートが、当社の製品を使用して頂くに当たり、歯科医療従事者の臨床に役立てて頂ければ幸いである。

### 4. メタルセラミック修復用合金、金合金の物性検討

#### 目的

歯科用合金の持つべき条件は幾つかある。その一つは、不溶性であることである。金属（イオン）の溶出は金属自体の腐食を招くのみならず、歯肉の着色やアレルギー反応をきたし、さらには、ガルバニー電流を誘発することとなる。さらに一方では、歯科用合金は硬さ、熱膨張変化などにおいて、然るべき理工学的物性を有していなくてはならない。そこで当社製品のメタルセラミック修復用材（ゼオメタルシリーズ、スーパーエクセレント）と金合金（ビーアイエロー、ベネフィットG、ベネフィットジャスティ）の溶出試験を行うと共に更に金合金において硬さ、引張強さ、及び熱膨張試験を行った。

#### 4.1 試料

##### 4.1.1 メタルセラミック修復用合金

##### 1) 試験片作製方法

表1に示す通りの組成を有するゼオメタル87/53/ST及びスーパーエクセレントを検討対象とした。各々の試験片の作製は以下の通りである。試験片は、シートワックス#24（厚さ0.56mm）を用いて20×15mmの大きさにワックスパターンを作製し、リン酸塩系埋没材中に埋没した。次いで、ワックスパターンを焼却した後、真空鑄造機を用いて各試験片（合金）の鑄造温度において鑄造した。放冷後、サンドブラスト（粒径50μm）を使用し、鑄造体（試験片+スプルー）表面に付着している埋没材や酸化被膜を除去し、試験片の上面・下面・側面を合わせた全表面積が6±0.3cm<sup>2</sup>となるように、耐水研磨紙#180、#320、#800、#1000を用いて表面研磨を行った。次いで、蒸留水で15分、アルコールで2分間超音波洗浄を行い、蒸留水で洗浄した後、乾燥させ試験片として供した。なお、試験片は各合金ごとに2枚ずつ作製した。

表1 検討した合金の組成 (mass%)

種類	品名	Au	Pt	Pd	Ag	その他
ゼオメタルシリーズ	ゼオメタル87 (ZEO 87)	87	11	—	—	Zn,Ir 2.0
	ゼオメタル53 (ZEO 53)	53	1.5	27.5	12.3	Sn,In,Ir,Cu,Ga 5.7
	ゼオメタルST (ZEO ST)	—	—	60.5	27	Sn 5.7,In 5.4,Zn,Ga,Ru 1.4
ハイプレシヤス系	スーパーエクセレント (SUPER)	86	11.8	—	—	In,Zn,Ir,Fe,Mn 2.2

## 2) 溶出試験方法

溶出試験は、JIS T 0304（金属系生体材料の溶出試験方法）に準じて行った。各試験片を各試験溶液（MO5溶液（A液）、0.05%HCl溶液（B液）、0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液（C液））50mL中に浸漬し、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで7日間静置した後、試験片を取り除き、浸漬溶液を過酸化水素と硝酸でもって処理し溶液中の有機物を除去した上で溶出金属量を測定した。測定には誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-MS）を用い、定性及び定量分析を行った。

## 3) 結果

ゼオメタル87では、試験溶液の種類に関わらず溶出したのはZnのみであった。C液中で最も高く100μg/cm<sup>2</sup>を越えていた（図1）。ゼオメタル53では、いずれの溶液中にも低濃度（4μg/cm<sup>2</sup>以下）のAgとCuの溶出が見られた。ゼオメタルSTでは、A液中にごく低濃度のZnとAgが認められたが、B液及び、C液においては金属の溶出はほとんど認められなかった。スーパーエクセレントでは、Zn、Mn、Feの溶出が認められ、特にB液及びC液中でのZnの溶出は150μg/cm<sup>2</sup>以上と高値であった。Mn及びFeもB液/C液中に認められたが、その濃度は5μg/cm<sup>2</sup>以下であった。

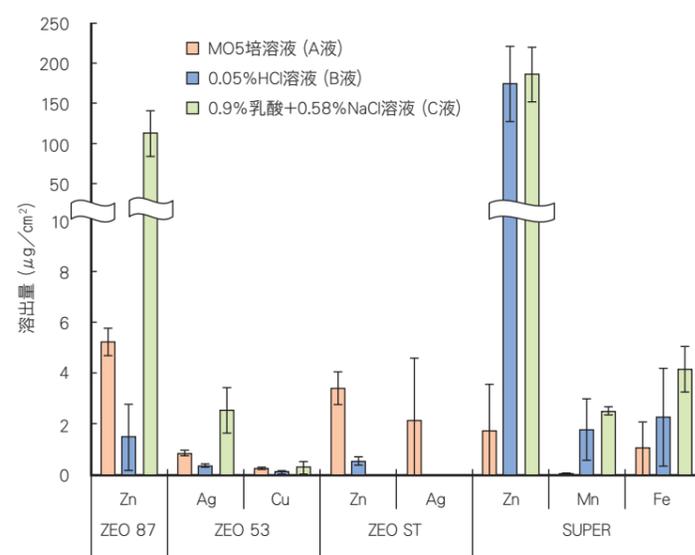


図1 メタルセラミック修復用合金の溶出試験結果

## 4) 小察

コントロール液であるA液（MO5溶液）、あるいはB液（0.05%HCl溶液）に比べ、C液（0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液）では高濃度に金属が溶出していた。その理由として最も考えられるのは溶液のpHの違い、すなわち「酸度」の違いが第一に考えられる。しかし、B液のpHは2.0であるのに対して、C液のpHは2.4であり、溶出の程度を酸度にのみ求めることは出来ない。そうすると、金属の溶出は酸度のみによって規定されるものではなく〔H<sup>+</sup>〕濃度と共に、溶液中に共存する〔Cl<sup>-</sup>〕等の他の陰イオンによっても規定されるように思われる。調べた4つの合金の中で、ゼオメタル87とスーパーエクセレントは他の2つの合金よりもZn/Mn/Feの溶出量が高かったことより、これら2つの合金は酸の影響を受けやすいと考えられる。特にスーパーエクセレントはB液でもZnが強く溶出していたことより、ゼオメタル87以上に酸によって溶出しやすく腐食されやすいことが推定される。対して、ゼオメタル53、ゼオメタルSTはC液中でもあまり溶出しておらず酸に対して比較的安定であると考えられる。

ところで、各金属の溶出量は、試料中の組成量にも関わることが当然考えられる。Agはゼオメタル53では12.3%、ゼオメタルSTでは27%含有されている。対して、Znは2%以下であるにも関わらずZnはAgに比べはるかに強く溶出していた。これはZnが他の金属より溶出しやすいことを物語っており、その原因として、酸性液中におけるイオン化傾向がAgあるいはCuより大であることが考えられる。そこで対策として考えられることはZnの含有量を可及的に少なくすることであり、その点においてはゼオメタル53が優れているといえるであろう。

#### 4.1.2 金合金

##### 1) 試験片作製方法

金合金（ピーアイエロー、ベネフィットG、ベネフィットジャスティ、各々の組成は表2の通り）の試験片は、以下に示す如く2通り作製した。

表2 検討した合金の組成 (mass%)

種類	品名	Au	Pt	Pd	Ag	Cu	その他
金合金	ピーアイエロー	71	4	—	12.3	12.1	Zn,Ir 0.6
	ベネフィットG	70	4.5	2	13.6	8.8	Zn,Ir 1.1
	ベネフィットジャスティ	68	7	—	16.2	8	Zn,Ir 0.8

##### ① MO5溶液（A液）用試験片の作製

厚さ2mmの試験片を4-1-1 1)と同様に作製した。試験片は合金ごとに4枚ずつ作製した。

##### ② 0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液（C液）用試験片の作製

Polyethylene terephthalate (PET) を34×13×1.5mmに成形し、クリストバライト系埋没材中に埋没した。鑄造から洗浄までは4-1-1 1) 試験片作製方法と同様に行った。なお、試験片は合金ごとに4枚ずつ作製した。

##### 2) 溶出試験方法

A液における溶出試験は、静置法と振とう法の2法でもって行った。静置法は、4-1-1 2)と同様に行った。振とう法では試験片をアルミナボールの上に置き、A液50mL中に試験片を浸漬し、37℃、7日間、150rpmの振とう条件にて抽出した。

C液における溶出試験は、JIS T 6116（歯科鑄造用金合金）に準じて試験を行った。すなわちC液10mL中に試験片1つを浸漬し、37℃、7日間静置した。どちらの浸漬溶液も4-1-1 2)と同様に処理し、定性及び定量分析を行った。溶出量は4つの試料の平均値でもって示した。

##### 3) 溶出試験結果

A液中には静置条件下でのピーアイエロー、ベネフィットG、ベネフィットジャスティ、いずれからも少量（1μg/cm<sup>2</sup>）のAgが検出された。しかし、Cu、Znの溶出は認められなかった。一方、振とうした場合にはいずれの試料からもCu（4～8μg/cm<sup>2</sup>）、Zn（3～5μg/cm<sup>2</sup>）、Ag（1μg/cm<sup>2</sup>以下）が検出された。ただし、Agの溶出量は静置法と振とう法においては、大きな差がなかった。

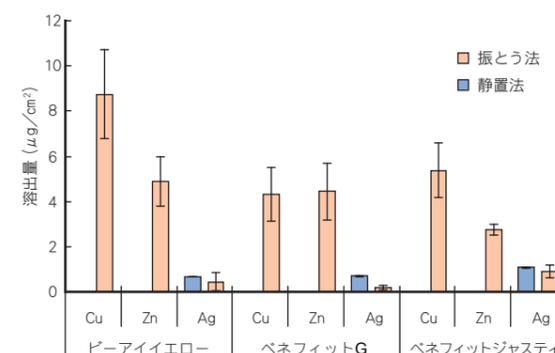


図2-1 MO5溶液（A液）における金合金の溶出試験結果

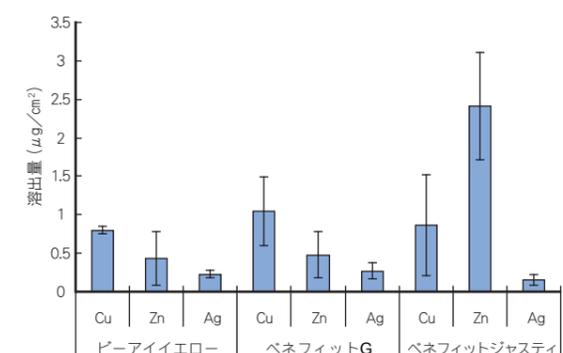


図2-2 0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液（C液）における金合金の溶出試験結果（静置条件下）

これに対し、C液中にはいずれの試料からも静置条件下でCu、Zn、Agが0.4～2.5μg/cm<sup>2</sup>溶出していた。これら3つの金属のうちZnの溶出が一番高く、特にベネフィットジャスティからは他の2つの合金からよりも有意（P<0.05, u-検定）に高値であった。

##### 4) 小察

C液すなわち0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液＝酸性液では、A液（MO5溶液）に比べ含有金属が溶出しやすく、静置法ではA液中へCu、Znはほとんど溶出していなかったのに対し、C液中にはCuが0.8～1.2μg/cm<sup>2</sup>、Znが0.4～2.4μg/cm<sup>2</sup>溶出していた。これはゼオメタルシリーズの結果とも一致するものであり、酸性液、特にpHの低い溶液中では金合金であっても構成金属の溶出が生じることを意味している。更に、振とうすると静置状態では金属の溶出を認めなかったA液中に、Cu（4.6～8.6μg/cm<sup>2</sup>）、Zn（3.2～5.2μg/cm<sup>2</sup>）及びAg（0.3～0.6μg/cm<sup>2</sup>）のいずれも強く溶出していた。これは、合金表面に、溶液中のH<sup>+</sup>イオンあるいはCl<sup>-</sup>イオン分子がより多く衝突するためと考えられる。ところで、組成からすると、Znの含有量はCu/Agよりはるかに少量であるのにZnが一番溶出しやすく、組成比からすると他の金属の20倍以上である。これは図1の結果と一致する。この結果からしてもZnは溶出しやすい金属元素と考えられる。なかでも、ベネフィットジャスティからのZnの溶出が高かったが、これについては今のところ、その合理的な理由を探し求めることが出来ない。

## 4.2 金合金の工学的物性について

### 1) 試験方法

#### ① 引張試験

JIS T 6116「歯科鑄造用金合金」に準じて行った。試験片は棒状で、直径3mm、長さは60mmとし、試験片に対し鑄造後、処理をしなかったもの（無処理）、軟化処理（大気中750℃で約15分間保持後、水中で急冷したもの）、硬化処理（軟化処理後、大気中で10分間450℃に保った後、450～150℃まで約30分間かけて炉内で冷却し、その後室温まで放冷）した後の3種類を試料とし、それぞれにつき3検体を用意した。

引張強さは、オートグラフAGS-10kND（島津製作所）を用いて最大応力と0.2%耐力をもって測定した。なお、測定条件は標点距離15mm、クロスヘッドスピード1.5mm/minとした。また、結果は3検体の結果の平均値をもって示した。

#### ② 硬さ試験

JIS Z 2244「ピッカース硬さ試験－試験方法」に準じ、HMV-2000（島津製作所）を用いて測定した。条件としては300gの荷重を15秒間負荷した。試験片は無処理、軟化処理、硬化処理の3種類とし、それぞれにおいて1検体を用い、1検体につき9ヶ所の測定を行った。結果は最小値と最大値を除去して、残る7箇所での結果の平均値をもって示した。

#### ③ 熱膨張ヒステリシス測定

熱機械分析装置TMA8310（リガク社）を用いて測定した。試験片の形状は円柱状で、直径5mm、長さ20mmとした。室温から最高温度900℃（ビーアイエローは液相点が910℃であるため、850℃とした）まで各試験片を加熱し、10分間係留後、室温まで冷却させた。この操作を3回繰り返した。測定前と3回加熱・冷却後の試験片長さより変位量（%）を測定した。測定は無処理の試験片でのみ行った。

#### ④ 組織観察

試験片の表面を1500番まで耐水研磨紙で研磨し、鏡面仕上げをした後、王水1/2溶液（王水を水で2倍に希釈したもの）でもって約20秒間エッチングし、水洗した後金属顕微鏡PM-6（オリンパス社）を用いて観察した。試験片は無処理、軟化処理、及び硬化処理の3種類とし、それぞれ1検体について5ヶ所を鏡した。

## 2) 結果と考察

### ① 引張試験

測定した3種類の金合金の引張強さはほぼ等しく、最大応力は800MPa弱であった（図3）。硬化処理後の引張強さは、無処理と変らなかったが、軟化処理後にはいずれの金合金も同程度に低下（520～540MPa）した。

0.2%耐力（0.2%変形した応力）において（図4）、無処理の検体では3つの合金とも同程度（～600MPa）で、軟化処理後には大きく低下し（～380MPa）、硬化処理後では処理前と同等かやや上昇（～650MPa）していた。

なお、無処理、軟化処理後、さらには硬化処理後の各検体において、最大応力及び0.2%耐力共に3種類の合金間に大差は認められず、ほぼ同じであった。

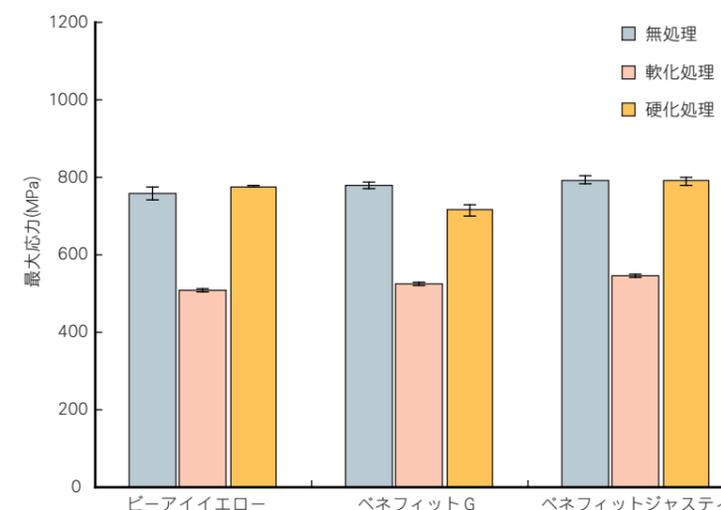


図3 引張強さ試験結果

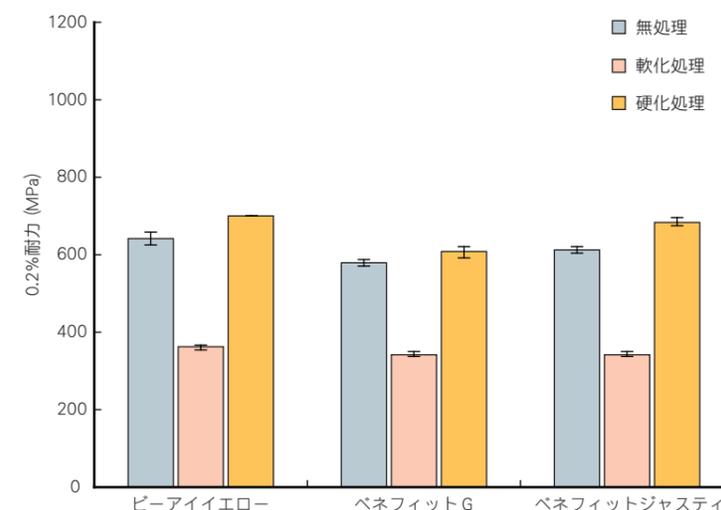


図4 0.2%耐力試験結果

② 硬さ試験

ビーアイエローがやや高値（～280HV）を示したが他の2者（～260HV）と大差は認められなかった（図5）。軟化処理後には当然ながら硬さは低下し、いずれにおいても無処理の2/3程度（～HV180）に低下した。一方、硬化処理後では、硬さは上昇したがその程度はわずか（HV20～30）であった。

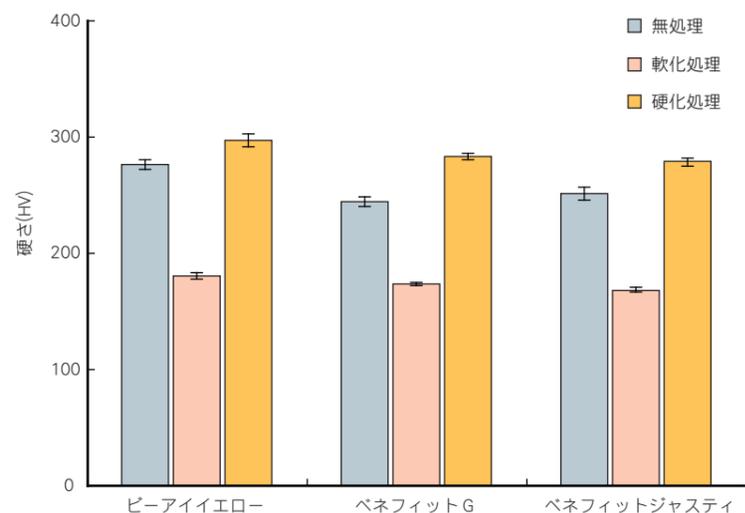


図5 硬さ試験結果

ビーアイエローは、0.2%耐力、硬さの硬化処理後の値が他の金合金より高い傾向にあった。これは、ビーアイエローのCu含有は、他の金合金より含有量が高いことから、硬化性に影響があるAuCu I 規則化が大きいことが原因であると考えられる。

③ 熱膨張ヒステリシス

熱膨張ヒステリシスから求められた変位量は、ベネフィットジャスティが最も小さく、850℃、900℃ともに約0.08%であった。ベネフィットGでは、最高温度850℃で約0.12%、900℃で約2.2%であった（図6）。一方、ビーアイエローは液相点が低いため、最高温度900℃で変形を生じて測定不可能となったため、850℃でのみ測定したが、-0.06%と低い収縮値を示した。

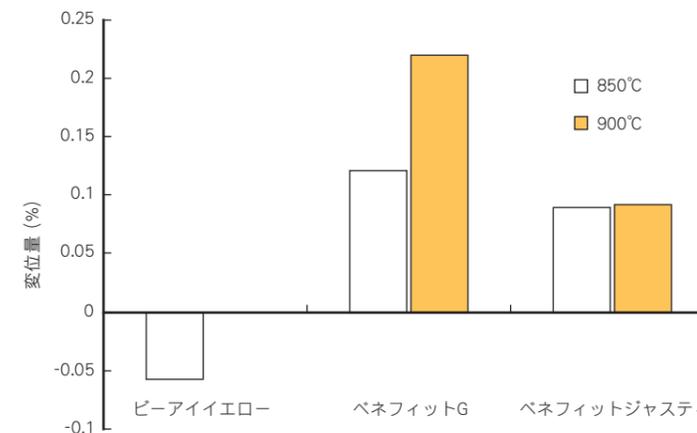


図6 熱膨張ヒステリシスから求めた変位量

結晶粒径が最も細かい金合金は、ベネフィットジャスティ（約20-30μm）であり次いでビーアイエロー（約30-40μm）、ベネフィットG（約30-50μm）の順であった（図7）。軟化処理により、ベネフィットGの粒径はやや大きくなる傾向を示す一方、硬化処理によりベネフィットジャスティの結晶粒子は小さくなっていった。ビーアイエローでは軟化・硬化処理によっても粒子の大きさに明らかな変化は認められなかった。なお、各検体において検鏡した5ヶ所ともほぼ同じ所見を呈していた。

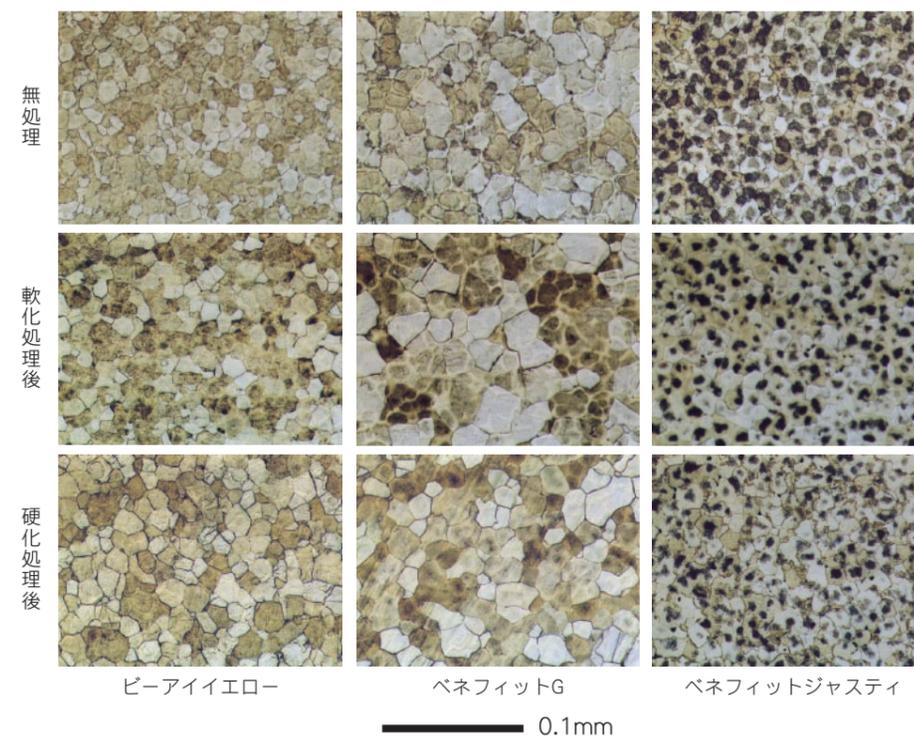


図7 金合金の無処理，軟化処理後，硬化処理後の顕微鏡組織（200倍）

### 3) 小察

ビーアイエローは、相転移の影響を受けて熱膨張曲線が変化し、常温で負の値（収縮）を示した。変位量が小さい理由としては、Cu含有量に大きく関係し、特にCu含有量の少ないベネフィットジャスティは、AuCu I の規則化が小さく、相転移による熱膨張曲線の変化が少ないことが影響していると考えられる。

ろう着や鋳接作業の際に800-900°C付近に加熱するが、その際に変位量が小さいことが必要である。変形しにくい（適合が良好）ためには、得られた結果から変形が少ないと考えられるベネフィットジャスティはベネフィットGより、インプラント上部構造などのろう着や鋳接が必要な材料として有利といえよう。なお、ビーアイエローは液相点が910°Cと低いため、加熱操作を伴う補綴物にはやや適応しにくいと考えられる。

機械的性質は、結晶粒径と関係している。微細結晶構造は、強度と靱性を向上させることが知られている。しかし、3種類の金合金の結晶粒径の範囲では、機械的性質に差が生じなかった。したがって、この程度の結晶粒径の大きさの違いは合金の機械的性質に差を生じさせる程ではないと考えられ、溶出や熱膨張ヒステリシスには、合金中のCuをはじめとする各金属の組成によることが大であると考えられる。AuCu I の規則化は、硬さに依存することが知られていることから、この3種類の金合金に近似した組成の機械的性質は、結晶粒径よりむしろCu含有量による規則化が大きく関与するものと考えられる。

ただし、変位量は、ベネフィットG>ベネフィットジャスティであった。この理由としてベネフィットジャスティは、最も結晶粒径が小さいことから、加熱され膨張した結晶粒は、冷却後の結晶粒界の隙間が少なくなることなどが考えられる。

なお、黒い斑点が見えるが、ベネフィットジャスティは銀濃度が高いため、エッチングの際に硝酸銀が析出した可能性が高いと考えられる。

熱処理後の強度は、軟化処理後には立方晶となるため軟らかくなる。逆に硬化処理後には、正方晶に相転移（立方晶から正方晶）により硬くなる。金合金は用途により熱処理を加えられるが、加熱によって変位量に影響を受け形状寸法の変化をきたすことになる。熱処理を必要とせず強度が要求される場合には、鋳造後の強度が大である金合金を選定することも大事であり、ベネフィットジャスティやビーアイエローが有用であるといえる。

## 5. 生物学的検討

### 目的

歯科材料は金属材料であれ、高分子材料であれ、材料によって程度差はあれ、口腔内で溶出する。そして、溶出した物質は生体に何らかの影響を与えることが考えられる。そこで、各々の材料が生体にどのような影響を与えるかを調べるため、メタルセラミック修復用合金（4種類）とレジン原材料を用いて生物学的検討を行った。

### 5.1 コロニー形成阻害試験

#### 1) 試験方法

合金の場合：ISO 10993-5に準じて試験を行った。MO5培養液50mL中に金属試験片（2.0×1.5×0.56mm）1個を浸漬し、5%CO<sub>2</sub>、37°Cで7日間放置後、試験片を取り除いた培養液を試験原液（100%）とした。その試験原液を、2倍（50%）、4倍（25%）、8倍（12.5%）、16倍（6.25%）に段階希釈した。

レジン原材料の場合：蛍光顔料・着色顔料はMO5培養液に0.1g/mLの割合で加え、37°Cで24時間放置した。その後、0.22μmフィルターで不溶のまま残った顔料を濾過し除去したMO5培養液を試験原液（100%）とした。また、プライマーはMO5培養液を用いて希釈し、1000μg/mLを試験原液（100%）とした。顔料の試験原液はMO5培養液を用いて、50%、10%、5%、1%、0.5%に希釈し、一方、プライマーの試験原液は、50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%に希釈した。

コロニー形成阻害試験は、V79細胞を24穴平底組織培養用マイクロプレートに100cells/wellずつ播種し、各希釈試験培養液中で3日間培養した後、顕微鏡下でコロニー数をカウントした。

#### 2) 結果

金属片を浸漬したMO5培養液は原液（100%）であってもコロニー形成阻害率は、±5%であり、50%及び25%溶液の場合とほとんど変わらず、濃度依存的なコロニー形成阻害作用は認められなかった。すなわち、溶出した金属によるコロニー形成阻害作用は明らかにすることは出来なかった。

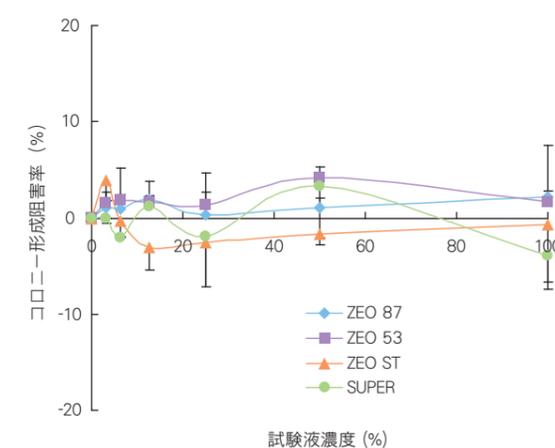


図8 コロニー形成阻害試験結果（メタルセラミック修復用合金）

一方、レジンの原材料についてみると、蛍光顔料はいずれの濃度においてもコロニー数の減少は認められなかったが、着色顔料は強いコロニー形成阻害作用を示し、1%溶液で阻害率3.3%、50%溶液で約60%の阻害を、100%では完全（阻害率100%）にコロニー形成を阻害した。プライマーは、着色顔料程強くはないものの、コロニー形成を阻害した。すなわち、100%溶液で25%の阻害を示し、50%溶液から12.5%溶液では10%前後の阻害を示した。

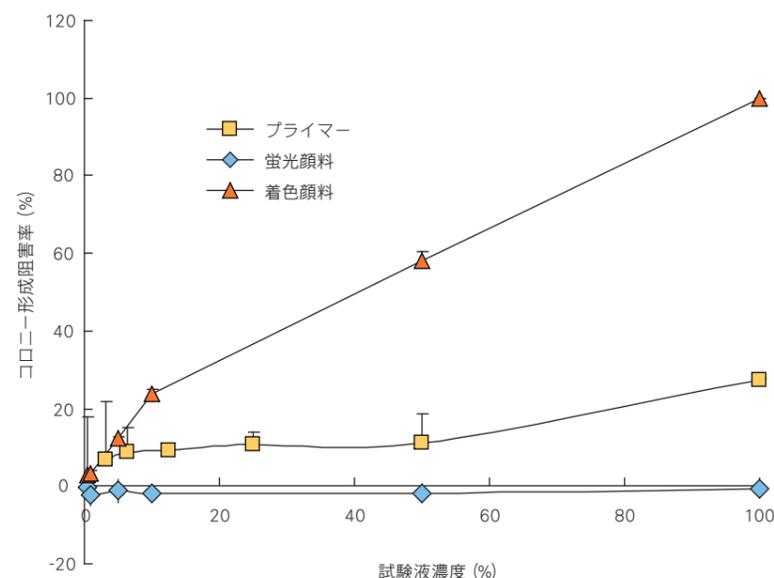


図9 コロニー形成阻害試験結果（レジンの原材料）

## 5.2 細胞増殖阻害試験、DNA合成試験、蛋白合成阻害試験

### 1) 試験液調整

細胞増殖阻害試験、DNA合成試験、蛋白合成阻害試験では、3T3細胞（マウス線維芽細胞）を用い、培養液はD-MEMとし、試験体としては当社製品のレジンの原材料とレジンの試作品（ペレット）を用いた。

試験液調整は次の様に行った。蛍光顔料・着色顔料は0.1g/mLの割合で培養液に加え、24時間後、0.22μmのフィルターで濾過滅菌した。プライマー・UDMA・TEGDMAは培養液に難溶であったため、あらかじめDMSOに溶解させた後、プライマーは500もしくは1,000μg/mL、UDMA・TEGDMAは1mMとなるように培養液を用いて試験液とした。この時、プライマー、UDMA及びTEGDMAの試験液に対するコントロールは希釈した同濃度のDMSO希釈液とした。一方、レジンのペレットは（20×10×3mm）のものを作製し、蒸留水でよく洗浄後、裏表を30分間ずつ紫外線照射滅菌し、5cm<sup>2</sup>/mLの割合で培養液を加え37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中でレジンの含有成分を24時間抽出した。

抽出時間と抽出割合は表3に示す通りである。

表3 試験液調整条件

	細胞増殖阻害試験		DNA合成試験		蛋白合成阻害試験	
	抽出時間	濃度	抽出時間	濃度	抽出時間	濃度
蛍光顔料	-	-	24h	0.1g/mL	24h	0.1g/mL
着色顔料						
レジン硬化物						
プライマー		62.5,125,250,500μg/mL		500μg/mL		1000μg/mL
UDMA		125,250,500,1000μM (58.8,117.5,235,470μg/mL)		1000μM		1000μM
TEGDMA		125,250,500,1000μM (35.75,71.5,143,286μg/mL)				

### 2) 試験方法

#### ① 細胞増殖阻害試験

単層に増殖した3T3細胞を0.25%トリプシンによりはく離し、D-MEM培養液あるいは各試験液を用いて5×10<sup>4</sup>個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を、24穴平底組織培養用プレートの各ウェルに1mLずつ播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で48時間培養した。

MTT法により、生存細胞をマイクロプレートリーダー（THERMOmax：Molecular Devices社）で570nmの吸光度を測定して求め、コントロールを100%とした時の吸光度比から細胞数を求めた。

#### ② DNA合成試験

細胞増殖阻害試験と同様に細胞浮遊液の調製を行い、96穴平底組織培養用マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で48時間培養した。培養終了6時間前に<sup>3</sup>H-チミジン（0.5μCi/well）を加え、取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、コントロールを100%としたDNA合成率を求めた。

#### ③ 蛋白合成阻害試験

細胞増殖阻害試験と同様に細胞浮遊液の調製を行い、24穴平底組織培養用マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で48時間培養した。培養後、各ウェル中の試験液をエッペンドルフチューブに回収し、遠沈後、上清を吸引除去した。このチューブに、Phenyl methyl sulfonyl fluorideの2-プロパノール溶液（0.2mM）とTNEバッファの混合溶液を加え、元の各ウェルに内容液を戻し、氷水中で15分間保持した。各ウェルの細胞をピッペティングにより剥離させ、チューブに回収後、遠沈し、上清を新しいチューブに移した。この上清とBCA Protein Assay Reagent（PIERCE）を混合し、570nmでの吸光度を測定し蛋白定量を行い、コントロールを100%とした蛋白合成阻害率を求めた。

### 3) 結果

#### ① 細胞増殖阻害試験

プライマーは、細胞増殖抑制を全く示さなかった。しかし、UDMAとTEGDMAは濃度依存的に強く細胞増殖を抑制した。ちなみに、細胞増殖を50%阻害したTEGDMA及びUDMAの濃度は双方とも約70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、高濃度ではUDMAの方が強く抑制していた。

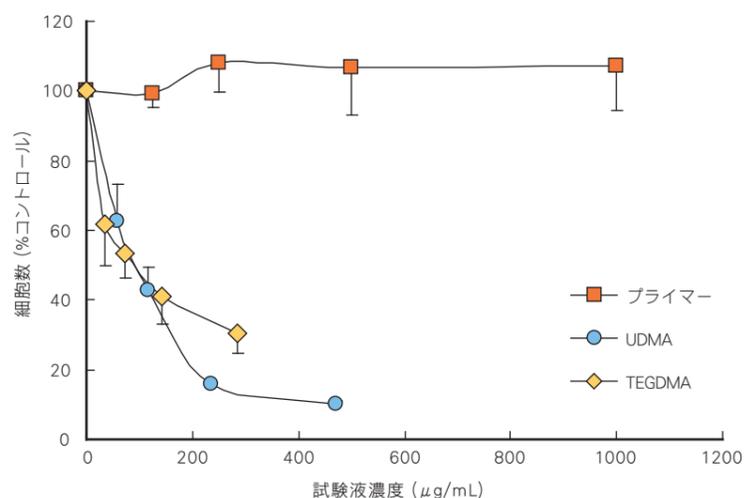


図10 細胞増殖阻害試験結果

#### ② DNA合成試験

蛍光顔料ではコントロール (DMEM) に対して約78%上昇し、着色顔料では逆に38%低下した。さらにプライマーにおいては約23%上昇し、UDMA及びTEGDMAではDNA合成はほぼ完全に阻害された。

#### ③ 蛋白合成阻害試験

蛍光顔料及びレジンにおいては、蛋白合成の低下 (阻害) は認められなかった。しかし、着色顔料では、約23%低下し、プライマーでは約6%の低下が認められた。一方、UDMAでは約52%、TEGDMAでは約25%と著明な蛋白合成阻害が認められた。

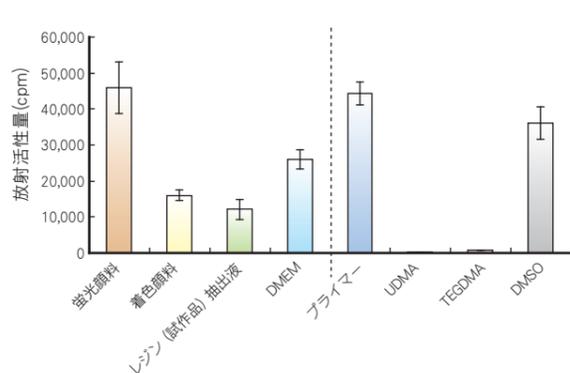


図11 DNA合成試験結果

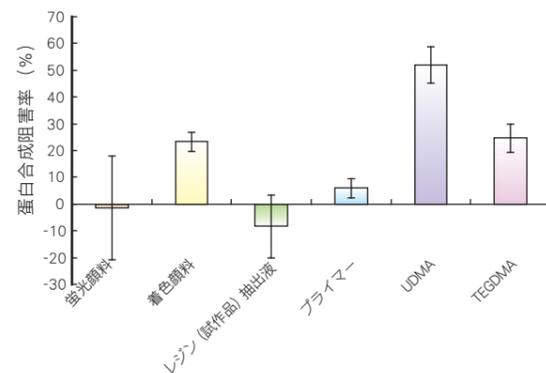


図12 蛋白合成阻害試験結果

### 4) 小察

合金から組成金属が溶出することは溶出試験で認められたが、金属が溶出したとしてもその溶出した金属 (イオン) が、細胞の増殖/コロニーを抑制する程のものではないことが明らかとなった。これに対し、レジンの顔料は強い抗細胞増殖作用があり、特に着色顔料はコロニー形成阻害作用が強かったことから、細胞増殖阻害能は強力であると推定される。それと共に、UDMA及びTEGDMAの抗細胞増殖作用は強力であり、レジンモノマーの生体 (細胞) 為害作用が想定される。

細胞増殖は蛋白合成あるいはDNAとも一般的に相関する。測定が1ポイントの濃度でしか測定されていないことより確定的にはいえないが、得られた結果からすると、UDMA及びTEGDMAは非常に強いDNA・蛋白合成阻害を示し、細胞増殖阻害結果とよく一致していた。これらの結果を総合すると、UDMA及びTEGDMAは強いDNA・蛋白合成阻害作用をもって細胞増殖を強く抑制することが想定される。

一方、プライマーはDNA・蛋白合成にあまり影響を与えていなかった。これは、コロニー形成及び細胞増殖に対する抑制作用が軽微であることとも一致していた。顔料の中でコロニー形成を強力に抑制した着色顔料はUDMAやTEGDMA程ではないものの、強くDNA合成及び蛋白合成を阻害しており、各実験結果に整合性が認められた。これに対し蛍光顔料では、コロニー形成阻害を認めたものの、蛋白合成阻害は認められず、DNA合成はむしろ亢進していた。この蛍光顔料によるDNA合成の亢進を合理的に理解することは困難であるが、 $^3\text{H}$ の測定、すなわち、 $\beta$ 線の測定に蛍光顔料が何らかの影響を与えたことも考えられる。

### 5.3 細胞傷害性試験・DNA断片化試験

#### 1) 試験方法

##### ① 細胞傷害性試験

細胞傷害はアネキシンV (Annexin V) の取り込みをフローサイトメーターで測定することによって検討した。手順を要約すると、単層に増殖した3T3細胞を0.25%トリプシンによりはく離し、D-MEM培養液あるいは各試験液を用いて5×10<sup>4</sup>個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用ディッシュ (φ6cm) に3mLずつ播種し、5%CO<sub>2</sub>, 37°Cで48時間培養した。

培養後、浮遊細胞を含めた溶液をPBS (-) とトリプシン処理により遠心チューブ (15mL) に回収し、遠沈後、上清を吸引除去した。これをBinding bufferで濃度調整を行い、Annexin V-FITC原液とPropidium iodide溶液を加え、フローサイトメーター用試料とした。これとは別に、フローサイトメーターの感度調整及び蛍光補正用として、コントロールの細胞浮遊液を用い、Annexin V-FITCのみ、Propidium iodide溶液のみを添加したサンプルチューブを用意した。これらの試料についてフローサイトメーターで解析を行った。

##### ② DNA断片化試験

細胞傷害性試験と同様に細胞浮遊液を調製、培養した。この培養細胞を、Cell scraperを用いてエッペンドルフチューブに集め、2000rpmで5分間遠沈し、ディターゼント (TRIZOL Reagent) を1mL加え、細胞を融解させた。この細胞溶解液をクロロホルム、エタノール、次いで酢酸ナトリウム溶液 (0.1M) で処理しDNAを抽出した。DNAの定量は、TEバッファーを20μL添加し、DNAを溶解させた後、260nmの吸光度から計算した。この定量結果をもとに、DNA量が一定(0.05μg)になるように、DNA溶解液 (試料サンプル) を採取し、泳動用バッファーと混同した (DNA溶解液: 泳動用バッファー=6:1)。電気泳動用アガロースゲルは市販のアガロースをTAEバッファーで1.8%に希釈して使用した。DNAの検出はUltraspec 3000にて行った。

#### 2) 結果

##### ① 細胞傷害性試験

コントロールにおいては、壊死細胞は全細胞の14.1%に認められ、初期アポトーシス細胞が2%認められた。これに対し、試料では大きな違いがあり、着色顔料と蛍光顔料では壊死細胞は15%前後でコントロールとほぼ同じであったのに対し、プライマーとTEGDMAでは壊死細胞はそれぞれ30.3%、33.2%と高値であり、UDMAでは95.2%とほとんどの細胞が死滅していた。

##### ② DNA断片化試験

いずれの処理によっても、ラダーは認められず、アポトーシスに特徴的なDNA断片化は見られなかった。

#### 3) 小察

この2つの実験を通じてみると、検索した材料にはアポトーシス誘導作用はないものの、プライマー及びUDMA、TEGDMAには強い細胞壊死誘導作用があることが明らかとなった。他の結果を合わせるとUDMA及びTEGDMAは強力にDNA・蛋白合成を阻害し、その結果として細胞増殖を抑制し壊死を誘導することが推定される。同様な作用は着色顔料にも認められるが、その作用は弱く明らかに壊死を亢進させる程ではない。プライマーについては各結果が一貫せずまちまちであるが、弱いながらもコロニー形成の抑制、蛋白合成の軽度阻害、さらには壊死細胞の増加という結果を合すると、抗細胞作用を有していると解釈できるであろう。

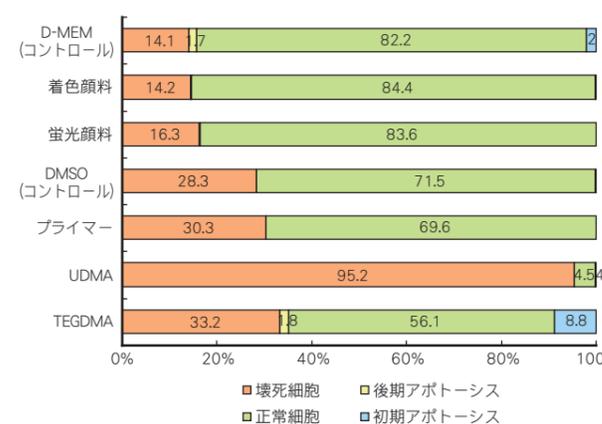


図13 細胞傷害性試験結果

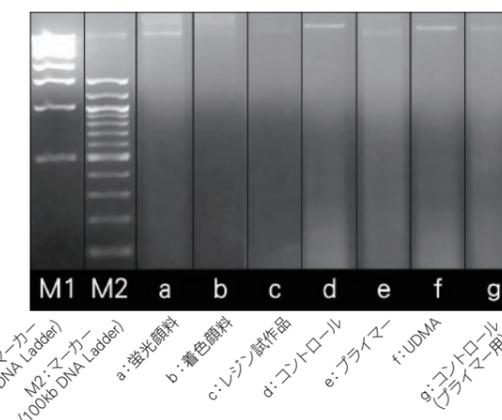


図14 DNA断片化試験結果

## 6. まとめ

1. 調べた合金において最も溶出しやすい金属は、アレルギーを誘導しうるZnであった。金属の溶出は酸性液中で上昇し、かつ、静置状態の溶液中にあるよりも溶液が流動すると溶出は高まることが明らかになった。
2. 調べた合金の硬さ及び引張強さは、歯科材料として十分な強さを有することが明らかにされた。
3. 結晶粒径はベネフィットジャスティが最小であり、熱膨張ヒステリシスの結果を合すると調べた合金の中では、ベネフィットジャスティがより良い物性を有しているように思われた。
4. 溶出金属によるコロニー形成阻害は認められなかったが、レジン顔料及びUDMA/TEGDMAは強力な抗細胞作用を示した。
5. UDMA及びTEGDMAの強い細胞壊死誘導作用は強力なDNA・蛋白合成阻害に基づくものと考えられた。着色顔料は、これらの2者程ではないが、やはりDNA・蛋白合成阻害に基づく抗細胞作用が認められた。また、弱いながらもプライマーにも同様な作用が認められた。
6. 調べた材料には、アポトーシス誘導作用は認められなかった。
7. これらの結果より、合金中のZn組成比を可及的に低くすること、レジン顔料及びモノマーに対して十分に配慮することが求められた。

溶出試験及び生物学的試験は、高知大学医学部歯科口腔外科学講座との共同研究で実施されたものである。

## 《安全性試験レポート 既刊》

---

- Vol.1 国際水準の品質と安全を求めて(2004年12月)
- Vol.2 「ZEO METAL」シリーズ 溶出試験と*in vitro*による細胞毒性試験(2005年6月)
- Vol.3 メタルセラミック修復用貴金属合金及び金合金 溶出試験と*in vitro*による細胞毒性試験(2005年12月)
- Vol.4 「ルナウイング」の生物学的評価(2006年6月)
- Vol.5 高カラット金合金の物性・安全性レポート(2007年10月)
- Vol.6 歯科材料の物性から生物学的影響まで 硬質レジン、メタルセラミック修復用合金、金合金における検討(2008年5月)
- Vol.7 金合金「ネクシオキャスト」の物性・安全性レポート(2008年10月)
- Vol.8 ハイブリッド型硬質レジン「ツイニー」の生物学的評価(2010年6月)
- Vol.9 貴金属合金の化学的・生物学的特性 チタンとの組み合わせによる溶出特性(2011年2月)
- Vol.10 メタルセラミック修復用貴金属合金「ブライティス」の物性と安全性(2011年10月)

編集者 尾崎 登喜雄  
発行者 山本 裕久  
印刷所 株式会社 ウラノ  
発行年月日 2008年5月23日

## YAMAKIN株式会社

本社：〒543-0015 大阪市天王寺区真田山町3番7号 TEL.(06)6761-4739(代) FAX.(06)6761-4743  
生体科学安全研究室：〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部 歯科口腔外科学講座研究室内  
東京・大阪・名古屋・福岡・仙台・高知・生体科学安全研究室・YAMAKINデジタル研究開発室  
<http://www.yamakin-gold.co.jp>