



歯科用貴金属合金  
安全性試験レポート  
Vol.2

「ZEO METAL」シリーズ  
溶出試験と *in vitro* による細胞毒性試験

## 目次

1. はじめに	2
2. 金属アレルギー	3
3. 試験方法	4
3.1 使用貴金属合金の種類	4
3.2 試験溶液	4
3.3 各試験方法	5
4. 細胞毒性試験の流れ	6
4.1 試験液調整	6
4.2 細胞毒性試験	6
5. 試験結果	7
5.1 溶出試験結果	7
5.2 細胞毒性試験結果	9
6. 考察	10
6.1 細胞毒性試験結果から	10
6.2 溶出試験結果から	10
7. まとめ	10

# 「ZEO METAL」シリーズ 溶出試験と *in vitro* による細胞毒性試験

山本貴金属地金株式会社  
生体科学安全研究室

## 1. はじめに

近年、高度医療化に伴い、あらゆる科学物質の生体への安全性に対する社会的関心が高まりつつあり、歯科領域でも当然のことながら生体材料として新しい素材開発は求められている。さらに、今春施行の改正薬事法では、人体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。

特に貴金属材料は、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。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ず種々の金属元素を添加した合金組成となる。これらの添加元素は、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、生体に対する有害性の判定は難しく、一般的に生物学的試験評価が紹介されており各合金の種類に沿った報告例も少ない。

その代表的なシミュレーション試験としては、溶出する金属イオンと *in vitro* (生体外)における細胞毒性試験の評価が多く紹介されている。

また、金属イオンとアレルギーは深い関係にあり、金属アレルギー発症報告も見られ、歯科治療においては、特に配合組成の情報と合金選定に十分注意しなければならない。

このため当社の新しい貴金属合金開発では、設計段階で①使用する元素の種類を出来る限り少なくする。②今後アレルギーになる可能性を極力低下させるため、物性を落とさないギリギリの範囲内で合金の組成を変化させ、溶出する金属の量を低下させる。などを目的にした合金開発にも取り組んできた。

また2003年から、「歯科材料の安全性に関する試験」を具現化するために高知大学医学部腫瘍病態学口腔腫瘍制御学講座との共同研究を開始した。そして、新しい高分子材料の安全性試験の実施例と今後の研究開発の安全性評価の代表例を紹介する安全性に関する冊子として、まず"安全性パンフレット"を作成した。

今回の"安全性シリーズVol.2"本試験レポートは、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、溶出試験と細胞毒性試験の安全性試験結果を公表する事を目的に作成した。今後当社の製品を使用させて頂くに当たり、ここで公表しているデータがお客様方の何らかの手助けになっていただければ幸いである。

## 2. 金属アレルギー

アレルギー反応は、I型、II型、III型、IV型の4種類に分類される。I型はアナラフィキシーショックなどのように短時間で発症するアレルギー反応であるのに対し、IV型は長時間で発症するアレルギー反応である。有名なものには、臓器移植後に現れる拒絶反応があり、金属アレルギーもこのIV型アレルギーに該当する。

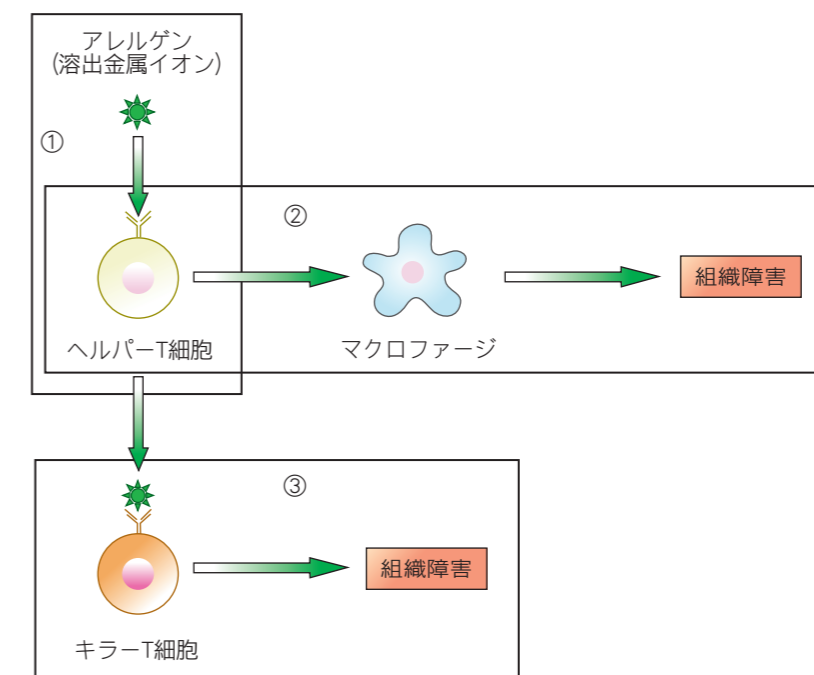
歯科金属アレルギーは、歯科用合金に含有される金属元素が口腔内の環境で唾液中にイオンとして溶け出し、更にこの金属イオンに対して免疫が働き始めることで発症すると言われている。金属アレルギーを発症するまでの流れを下記に示す。

①アレルギー(溶出金属イオン)をヘルパーT細胞が何らかの理由(この理由は現在の医学では明確になっていない)で、有害である外的侵入物と認識する。

②ヘルパーT細胞がマクロファージに、アレルギー(金属イオン)が接触している組織を攻撃するよう指示を出す。

③ヘルパーT細胞自身がキラーT細胞(司令塔タイプから攻撃実行タイプ)に変化し、アレルギー(金属イオン)が接触している組織に攻撃を開始する。

このような免疫の反応が金属アレルギーを引き起こすとされている。以下に金属アレルギーが起こるまでの略図を示す。



金属アレルギー発症までの模式図

### ※用語説明

ヘルパーT細胞 - 免疫細胞の司令塔。胸腺(Thymus)で教育される細胞なのでT細胞と言う。

キラーT細胞 - オフェンス型免疫細胞。

マクロファージ - アメーバー状の免疫細胞。攻撃対象を捕食する。満腹になると自分も死ぬ。

### 3. 試験方法

#### 3.1 使用貴金属合金の種類

下表に示す当社の歯科用貴金属合金(メタルセラミック修復用)を用い溶出試験及び細胞毒性試験を行った。

表1 使用歯科用貴金属合金の組成

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

#### 3.2 試験溶液

##### 3.2.1 溶出試験溶液

下記の試験溶液①及び②は、JIS T 0304(金属系生体材料の溶出試験方法)記載の試験溶液例に基づいて選定した。また、③はISO1562(Dental casting gold alloys)及びJIS T 6116(歯科鑄造用金合金)記載の試験溶液に準拠した。

- ①MO5培養液
- ②0.05% HCl溶液
- ③0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液

##### 3.2.2 細胞毒性試験溶液

試験溶液は、MO5培養液を用いた。

- ①MO5培養液

#### 3.3 各試験方法

##### 3.3.1 溶出試験

貴金属合金の試験片は、通法に従って鑄造体を作製した。さらに試験片の表面を180番から1200番の耐水研磨紙で表面研磨を行い、試験片の総面積が6 cm<sup>2</sup>になるように仕上げた。この試験片を試験溶液50mL中に浸漬し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター(高知大学医学部異常発生実験室(写真1)中で7日間静置抽出した(写真2)。その後、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-MS)(写真3)を使用し、定性及び定量分析を行った。なお、測定は2回繰り返して行った。



写真1 細胞実験室

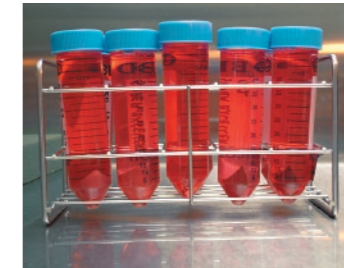


写真2 試験片の静置抽出



写真3 高周波誘導プラズマ分析装置

##### 3.3.2 細胞毒性試験

本試験は、ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices-Part 5 : Tests for *in vitro* cytotoxicityに基づいて行った。

溶出試験を行ったMO5培養液(n=1)を試験原液(100%)とした。この試験原液を0.22 μmのフィルターでろ過滅菌後、MO5培養液を用いて50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%に濃度調整した。

続いて単層に増殖したV79細胞(チャイニーズハムスター肺細胞)(写真4)をトリプシン処理によりはく離し、MO5培養液を用いて200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プレートの各ウェルに0.5mLずつ播種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した。

培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してから培養液を除き、各濃度の試験液、空抽出試験液を各々4個のウェルに0.5mLずつ加え、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウェルを10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1%メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。なお、試験は2回繰り返して行った。

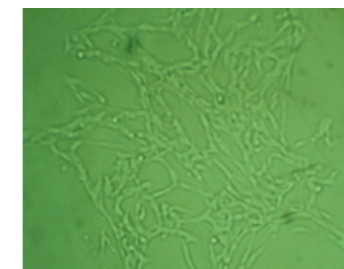
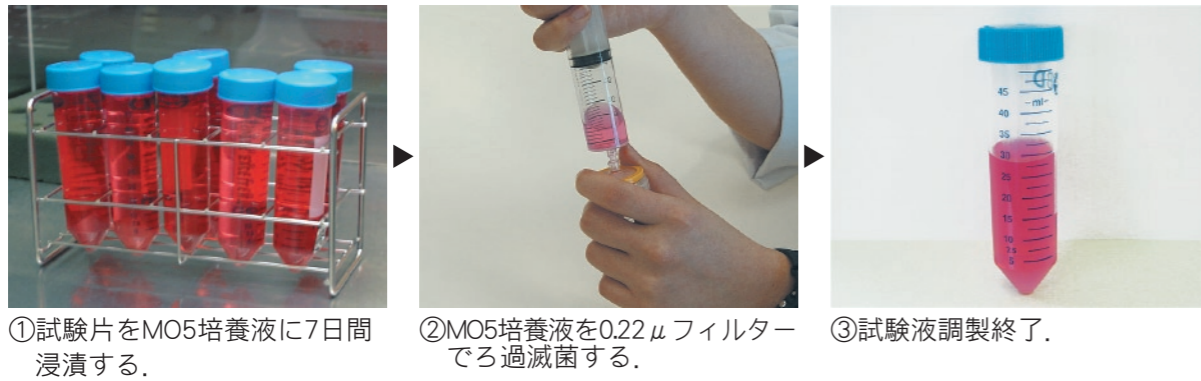


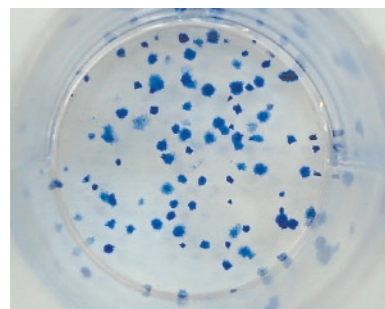
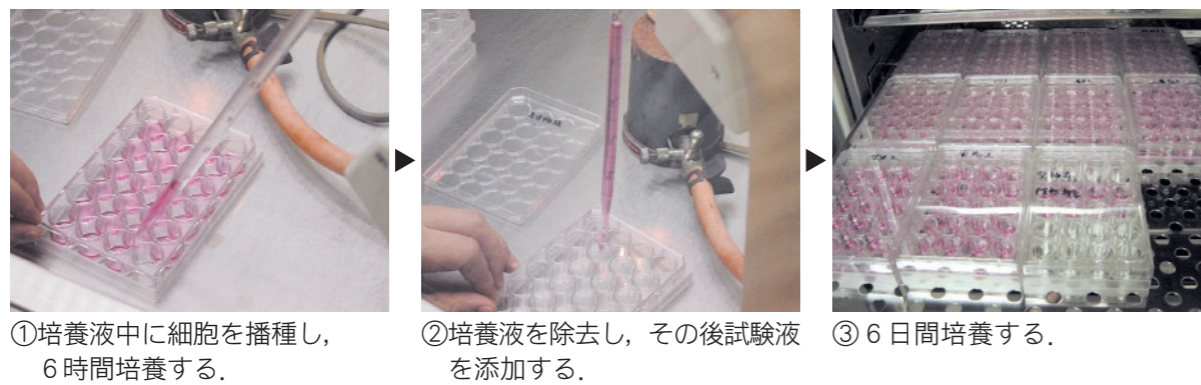
写真4 V79細胞

## 4. 細胞毒性試験の流れ

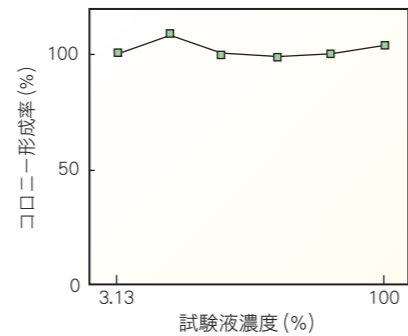
### 4.1 試験液調整



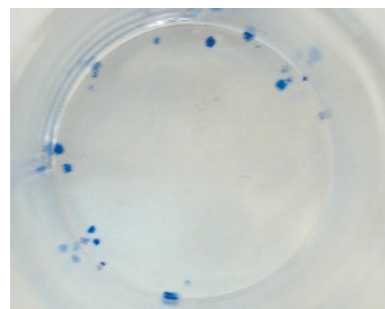
### 4.2 細胞毒性試験



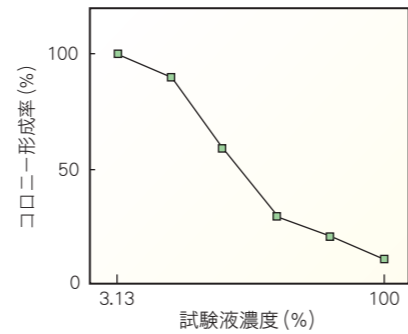
④試験液に毒性が無い場合、コロニーを形成する。



④' コロニー形成率 (%) のグラフ



⑤試験液に毒性がある場合、コロニー形成率が低下する。



⑤' コロニー形成率 (%) のグラフ

## 5. 試験結果

### 5.1 溶出試験結果

#### 5.1.1 MO5培養液

MO5培養液を用いて行った溶出試験結果を図1に示す。ゼオメタル87では、Znのみの溶出が見られた。ゼオメタル53ではAgとCuが、ゼオメタルSTではZn、Agが、スーパーエクセレントではZn、MnとFeの溶出が見られた。これらの溶出は、すべて低量の溶出量であった。

#### 5.1.2 0.05%HCl溶液

0.05%HCl溶液を用いて行った溶出試験結果を図2に示す。本試験においてはスーパーエクセレントのZn溶出量のみが増加していた。その他の溶出傾向についてはMO5培養液と比較してさほど大きな違いは見られなかった。

#### 5.1.3 0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液

0.9%乳酸+0.58%NaCl溶液を用いて行った溶出試験結果を図3に示す。ゼオメタル87、スーパーエクセレントのZnの溶出量がMO5培養液と比較して増加していた。その他の溶出傾向については0.05%HCl溶液及び、MO5培養液と比較してさほど大きな違いは見られなかった。

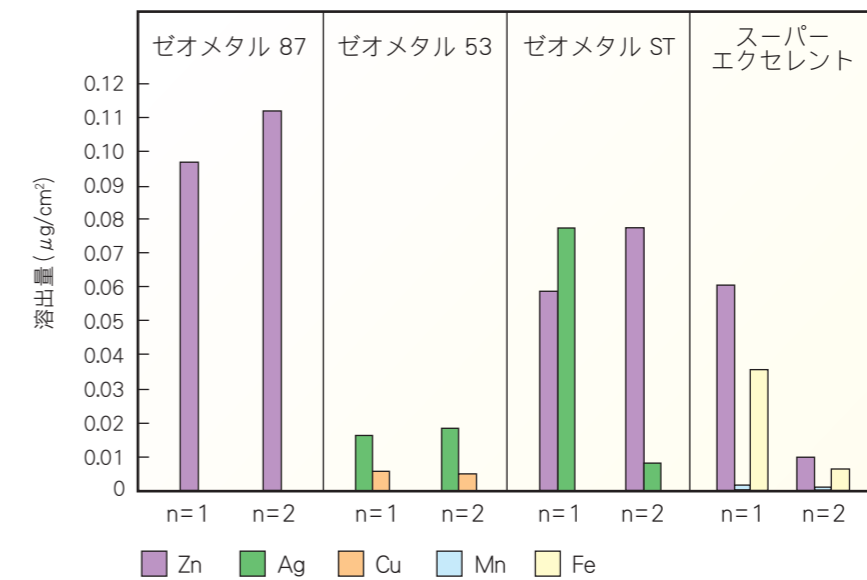


図1 MO5培養液による溶出試験結果

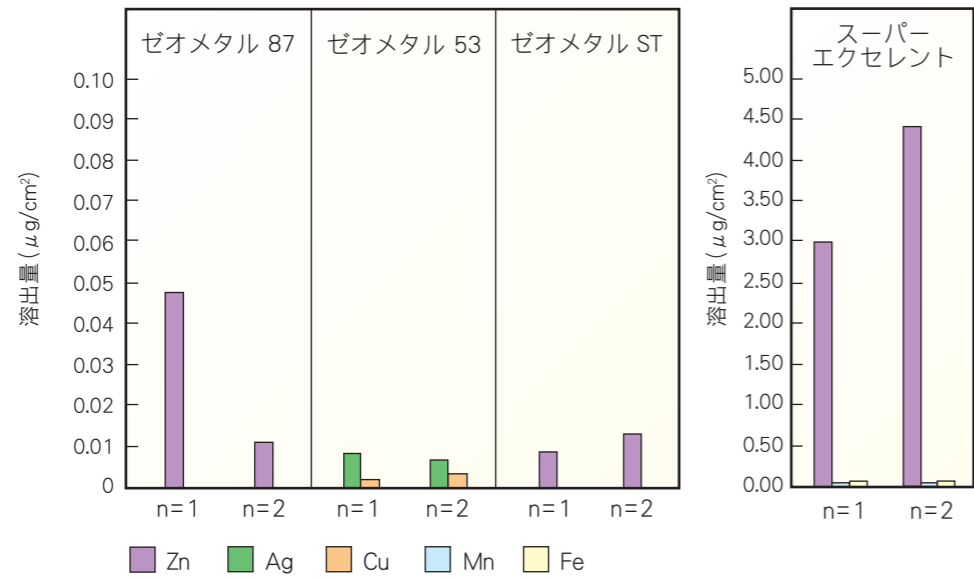


図2 0.05% HCl溶液による溶出試験結果

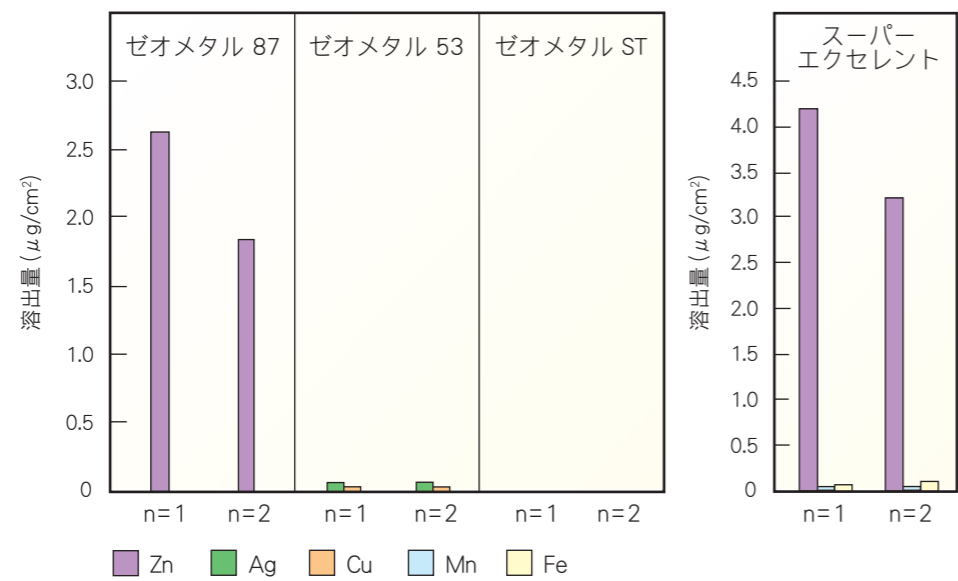


図3 0.9%乳酸+0.58% NaCl溶液による溶出試験結果

## 5.2 細胞毒性試験結果

MO5培養液を用いた細胞毒性試験結果を図4～図7に示す。今回試験した貴金属合金は、試験液濃度(3.13%～100%)に関係なくV79細胞(チャイニーズハムスター肺細胞)に対してコロニー形成阻害を示さなかった。

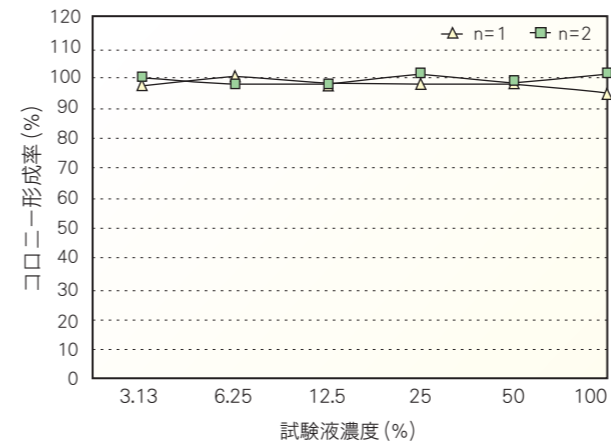


図4 ゼオメタル87のコロニー形成阻害性試験結果

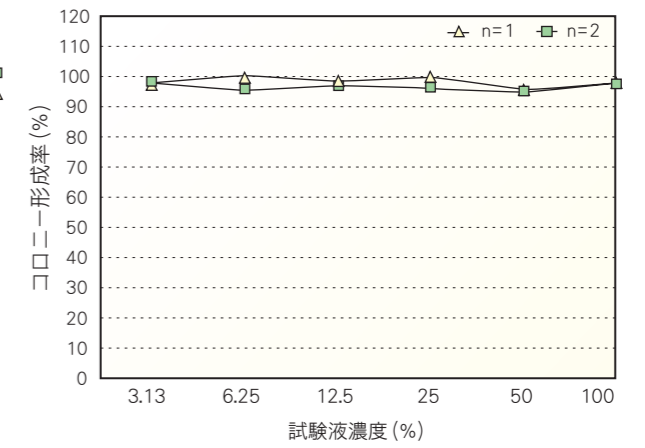


図5 ゼオメタル53のコロニー形成阻害性試験結果

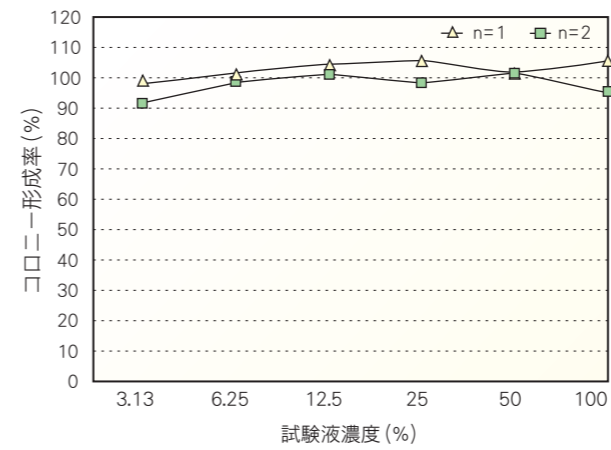


図6 ゼオメタル STのコロニー形成阻害性試験結果

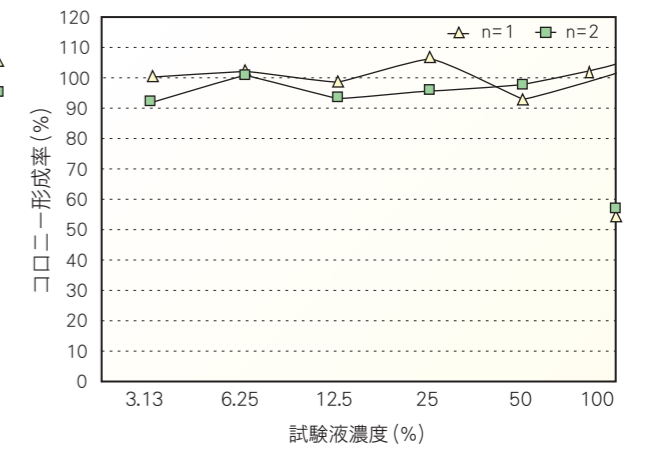


図7 スーパーエッセレントのコロニー形成阻害性試験結果

## 6. 考察

### 6.1 細胞毒性試験結果から

歯科用貴金属合金の溶出試験については多くの報告があるが、今回試験した貴金属合金(メタルセラミック修復用)の種類については報告例が見当たらない。

配合組成と溶出金属との関係は、配合元素が多いほど溶出金属の種類も増える傾向にある。このような傾向の中でゼオメタル87においては、4元素のみで構成された貴金属合金であり、さらに溶出試験においてもZnの溶出のみしか示さなかった。このことは、アレルギーの感作対象が最大でも4元素に限られているうえ、今回、特にZn以外3元素については溶出傾向を示さなかったことから、最もリスクの低い貴金属合金であると考えられる。

### 6.2 溶出試験結果から

今回の溶出試験結果の金属溶出量と同等の溶出量で、細胞に対し毒性を示したという報告例は見られなかった。さらに、今回当社が行った細胞毒性試験においても、全ての試験結果においてコロニー形成阻害が見られなかった。このことから、今回試験に用いた貴金属合金は、細胞毒性を示さないものと考えられる。

## 7. まとめ

今回行った溶出試験において溶出した金属の種類は、ゼオメタル87でZn、ゼオメタル53でAg、Cu、ゼオメタルSTでZn、Agであった。さらにスーパーエクセレントではZn、Mn、Feであった。

細胞毒性試験の観点から、各貴金属合金とも溶出によるコロニー形成阻害は見られず、いずれも高い安全性を有していると考えられる。また、これに加えゼオメタル87は、Znのみの溶出であったことから、今回試験を行った貴金属合金の中で最も安全性を有する合金であると考えられる。

ゼオメタルシリーズの使用に当たり、この試験結果が医療従事者の安全性情報として少しでも役立てていただければ幸いである。

本試験は、高知大学医学部 腫瘍病態学 口腔腫瘍制御学講座との共同研究で実施されたものである。

## 《参考文献》

- 1) 赤木誉, 武田昭二, 中村正明: 金銀パラジウム合金の溶出と細胞毒性, 歯科材料・器械, 19, 179-186, 2000
- 2) 坂根清文, 武田昭二, 中村正明: 細胞培養環境下における貴金属系合金の溶出挙動, 歯科医学, 64, 253-260, 2001
- 3) 三浦康伸, 武田昭二, 生体: 生体用金属材料の細胞毒性評価に及ぼす抽出条件の影響, 歯科材料・器械, 14, 253-264, 1995
- 4) 武田昭二, 垣内英也, 土井ひでき, 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, 歯科材料・器械, 8, 648-652, 1989
- 5) 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
- 6) 市野瀬志津子: 歯科用金銀パラジウム合金の各種溶液中での腐食, 歯科用材料・器械, 11, 149-168, 1992
- 7) ISO 10993-5:1999: 医療用具の生物学的評価 第5部: 細胞毒性試験: インビトロ法
- 8) 佐藤温重: 歯科材料の副作用と安全性, 24 ~ 31, 学建書院, 1997
- 9) 井上昌幸, 中山秀夫: 歯科と金属アレルギー, 22 ~ 53, デンタルダイヤモンド社, 1993
- 10) 井上昌幸, 中山秀夫, 松村光明: GPC のための金属アレルギー臨床, 34 ~ 71, デンタルダイヤモンド社, 2003
- 11) 海老原全, 松村光明, 濱野英也: チェアーサイドの歯科とアレルギーガイドブック, 38 ~ 41, デンタルダイヤモンド社

## 《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)

編集者 安楽 照男  
発行者 山本 隆彦  
印刷所 株式会社 ウラノ 大阪  
発行年月日 2005年6月1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  
<http://www.yamakin-gold.co.jp>

ISO 9001/13485 ISO 14001 認証取得



認証範囲  
本社及び支店工場



QAC/JP/0455  
認証範囲：高知工場