



# 安全性試験レポート

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

## 目次

1. はじめに	2
2. 試料と試験方法	3
2.1 試料	3
2.2 試験方法	3
3. 結果および考察	7
3.1 PHK16細胞 増殖試験	7
3.2 V79細胞 コロニー形成試験	8
3.3 THP.1細胞 トリパンブルー色素排除試験	9
3.4 フクシン染色試験	10
4. まとめ	11

# ハイブリッド型硬質レジン「ツイニー」の生物学的評価

山本貴金属地金株式会社 常務取締役  
博士(工学) 安楽 照男

## 1. はじめに

歯科補綴には、金属、セラミック、レジンなどの材料が用途によって使い分けられているが、口腔内の使用環境においては強度や耐久性は勿論のこと、生体に対して安全であることが何より求められている。特にレジン材料は、操作性が良好で天然歯を再現できるメリットから用途に応じて普及が拡大してきている。そのような中で、弊社では歯冠用硬質レジンの基礎研究に着手し、無機フィラーの形状やモノマーとの充填率や物性について多くの研究発表を行ってきた<sup>1-8)</sup>。さらに、安全性の強化として高知大学医学部歯科口腔外科学講座と共同研究に取り組み、細胞・組織・遺伝子工学を基礎にした試験を行い<sup>9)</sup>、生体に対して安全である歯冠用硬質レジンの「ルナウィング」を2006年6月に完成させた。

近年、臨床においてインプラント治療の需要が拡大しており、インプラント上部構造に対して歯冠用硬質レジンよりも高い強度と優れた審美性を有する補綴材料の要求が高まっている。そこで、新しい歯冠用硬質レジンの開発にあたっては、「ルナウィング」をベースに、原材料では安全性に配慮するとともに、操作性を維持しながら強度や耐久性を高くすることを目標に掲げたハイブリッド型硬質レジンの基礎研究で新規無機フィラーを見出すことに成功した<sup>10)</sup>。その後、充填率や添加材など更なる研究を重ね、歯冠用硬質レジンよりも疲労強度が高く耐久性に優れ、操作性が良好であり、ラインアップも豊富で審美性に優れたハイブリッド型硬質レジン「ツイニー」を完成した<sup>11-14)</sup>。安全性に取り組むメーカーである弊社は、“優れた物性”だけでなく“生体に安全であること”を開発コンセプトとしており、「ツイニー」はISO 10993「医療機器の生物学的評価」に準拠した*in vivo*試験で生体に安全であることを確認している。

今回は、ハイブリッド型硬質レジン「ツイニー」の口腔内に対する影響をより詳細に知るために、① 口腔粘膜上皮への影響を想定したPHK16（上皮細胞）の細胞増殖試験、② 結合組織への影響を想定したV79（線維芽細胞）のコロニー形成試験、③ 免疫系への影響を想定したTHP.1（白血球細胞）の色素排除試験の3種類の方法を用いた生物学的安全性試験を高知大学医学部歯科口腔外科学講座との共同研究で行った。ここに試験結果をまとめて“安全性試験レポート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”としてレポート化した。これらの安全性情報は、歯科医療従事者や患者の安心につながるものと確信している。

また、基礎的物性、光学的特性、技工特性に関する情報については、テクニカルレポートを参考にしたい。

## 2. 試料と試験方法

### 2.1 試料

試料として弊社ハイブリッド型硬質レジン製品「ツイニー」を、比較試料として弊社硬質レジン製品「ルナウィング」を使用した。試料調製は下記に示す通り行った。

各試料をポリエチレンテレフタレートフィルムで挟んだ金枠（直径15 mm、厚さ1 mm）を用いて円形に成形後、片面3分ずつ光重合を行った。ハイブリッドレジン試料は、光重合後、110℃、15分間加熱重合を行った。その後、各試料の表層を耐水研磨紙で最低0.05mmずつ研削後、バフを用いて光沢がでるまで研磨したものを試験片とした（図1）。

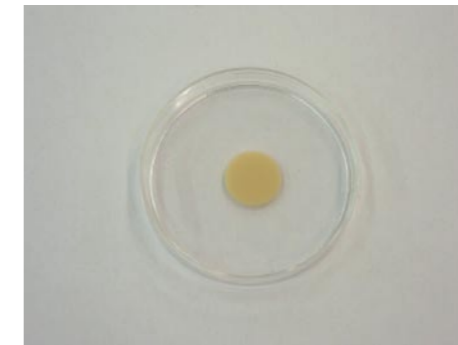


図1 試験片写真

### 2.2 試験方法

本試験では、口腔内を粘膜上皮組織、結合組織、免疫系の3種に大別し、それぞれを模擬する細胞として、粘膜上皮組織ではヒト由来角化細胞（PHK16細胞：図2）を、結合組織ではハムスター肺由来線維芽細胞（V79細胞：図3）を、免疫系ではヒト急性単球性白血球細胞（THP.1細胞：図4）を用いて細胞試験（表1）を行った。

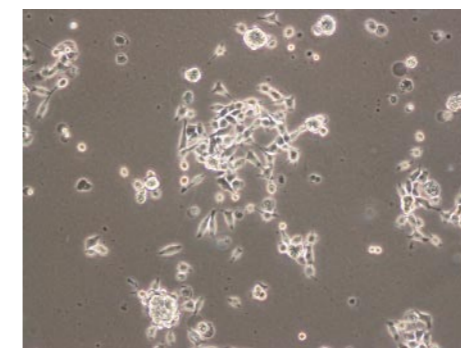


図2 PHK16細胞写真

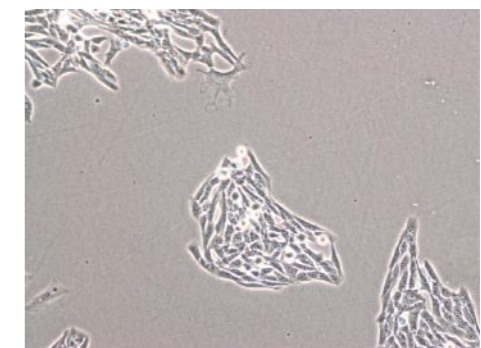


図3 V79細胞写真

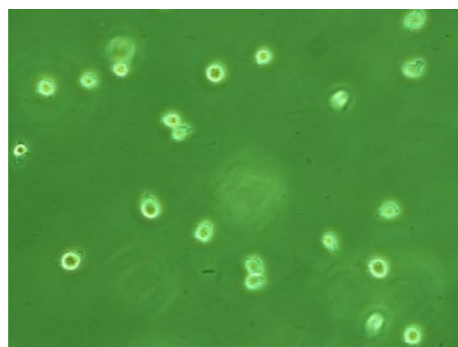


図4 THP.1細胞写真

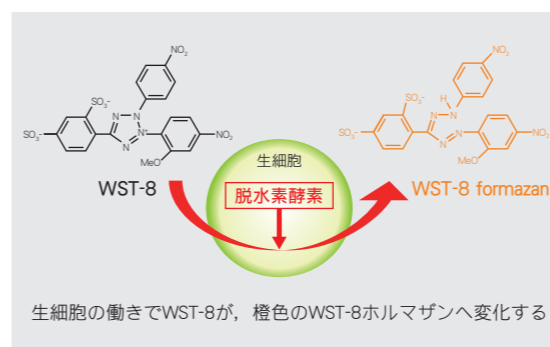


図5 WST-8→WST-8ホルマザン(試験原理)

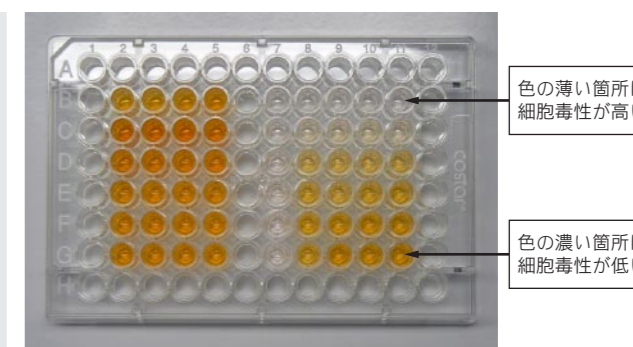


図6 WST-8アッセイ試験結果

表1 試験項目

細胞	試験法	試験原理；検討項目
PHK16 (上皮細胞) 上皮組織	細胞増殖試験	試薬 (WST-8) により、生細胞のみを発色させ、その色の濃淡を指標とする分析法。 → 細胞の酵素代謝に対する影響
V79 (線維芽細胞) 結合組織	コロニー形成試験	細胞が形成するコロニー (細胞群) の数を指標とする分析法。 → 細胞塊形成に対する影響
THP.1 (白血球細胞) 免疫系	色素排除試験	染色試薬 (トリパンプルー) により染め分けられた、生細胞・死細胞のカウント数を指標とする分析法。 → 細胞の増殖および生死に対する影響
—	フクシン染色試験	染色試薬 (フクシン) によって、試料中のモノマーを染色する試験方法。 → モノマー量と、細胞試験の結果の関連性

各試験方法は、下記の通り行った。

#### (1) PHK16細胞 増殖抑制試験 (WST-8 アッセイ)

水溶性のテトラゾリウム化合物である2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt (WST-8) は、生細胞が有する脱水素酵素 (NAD<sup>+</sup>, NAD(P)<sup>+</sup>デヒドロゲナーゼ) によって橙色のWST-8ホルマザンへと還元される (図5)。従って、この橙色の濃度を測定することで、間接的に生細胞の数を測定することが可能となる (図6)。

試験片に対して、表面積/容積比が3 cm<sup>2</sup>/mlとなるように細胞培養液を添加し、炭酸ガスインキュベーター内 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) で72時間抽出させた。抽出溶液を0.22 μmのフィルターでろ過し、試験溶液 (100%濃度) とした。

96穴培養プレートのウエルにPHK16細胞を1万個/ウエルとなるよう播種し、炭酸ガスインキュベーター内で48時間培養した。培地交換を行った後に72時間培養し、試験溶液を添加し、48時間培養した。その後、各ウエルにWST-8試験溶液を添加し、4時間呈色させ、450nmにおける吸光度を測定した。試料溶液の代わりに培地を用いたウエルをコントロールとし、コントロールに対する吸光度の変化から試料の細胞毒性を評価した。

#### (2) V79細胞 コロニー形成試験

V79細胞は、細胞増殖の際に細胞塊 (コロニー) を形成する。形成されたコロニー数によって試料の細胞毒性が評価できる (図7)。ISO 10993「医療機器の生物学的評価」に従い、下記のように試験を行った<sup>15)</sup>。

試験片に対して、表面積/容積比が3 cm<sup>2</sup>/mlとなるように細胞培養液を添加し、炭酸ガスインキュベーター内 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) で72時間抽出させた。抽出溶液を0.22 μmのフィルターでろ過し、試験溶液 (100%濃度) とした。

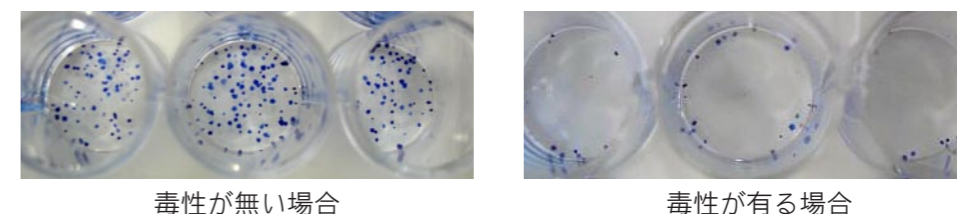


図7 コロニーの比較

24穴培養プレートに、V79細胞を100個/ウエルとなるように播種した。炭酸ガスインキュベーター内 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) で24時間培養した後、試験溶液を用いて培地交換を行い120時間培養した。ウエルから培地を除き、ホルムアルデヒドを添加し細胞コロニーを固定後、トリパンプルーで染色した。50個以上の細胞からなるコロニーを1コロニーとし、形成されたコロニーを計数した。

### (3) THP.1細胞 トリパンプルー色素排除試験

色素化合物であるトリパンプルー（青色）は、生細胞には取り込まれないが、死細胞には取り込まれて、細胞を青く染色する（図8）。この性質を利用して、生細胞と死細胞を顕微鏡観察によって計数することで、細胞の増殖と共に細胞生存率を測定する試験方法である（図9）。

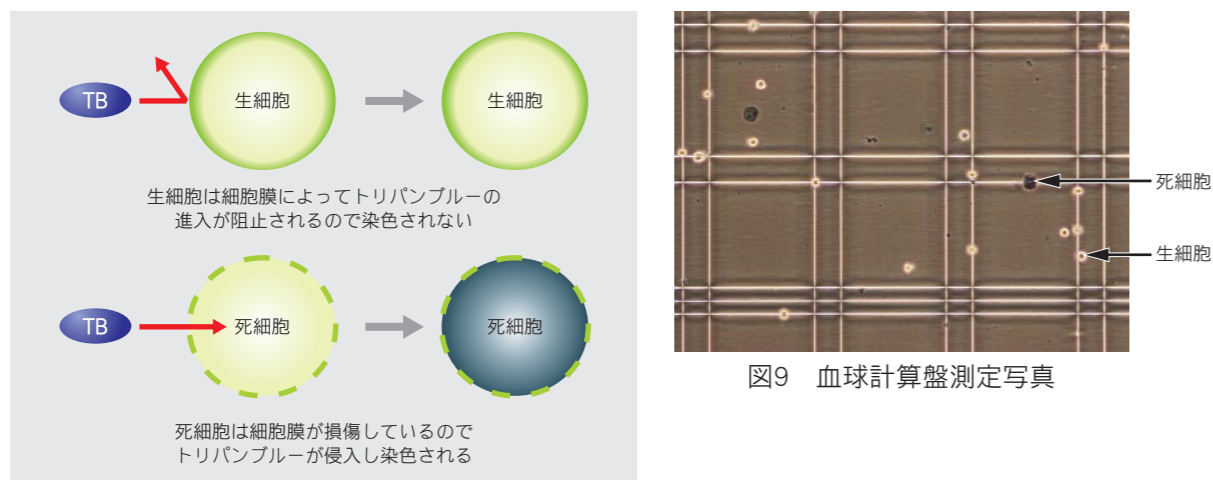


図8 トリパンプルー染色メカニズムの模式図

24穴培養プレートのウェルに試験片を設置し、ここにTHP.1細胞を10万個/ウェルとなるように播種した。これを炭酸ガスインキュベーター内（5%CO<sub>2</sub>、37℃）に静置し、72時間培養した。培養後、細胞溶液を回収し、トリパンプルーと等量混合し、血球計算盤にて生細胞数と死細胞数を計数した。72時間の培養で細胞数がどの程度増加したか（細胞増加率）、また、総細胞数（生細胞と死細胞の総数）に占める生細胞の割合（細胞生存率）を評価した。

### (4) フクシン染色試験

本試験で使用するフクシンは、試験片に存在するモノマーと反応して、赤く染色する性質を有している（図10）。この染色の度合い（色差）を測定することで、試料中のモノマー量を数値化する分析法である。



左：弱染色試験片，右：強染色試験片

図10 フクシン染色写真

試験片を十分量の0.2%（W/V）のフクシン溶液に浸漬し、37℃で24時間静置した。浸漬後に試験

片を回収し、これを十分に水洗し、測色機により染色前および染色後の色調（L\*、a\*、b\*）を測定し、色差を求めて着色の程度とした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 PHK16細胞増殖試験

PHK16細胞増殖試験の結果を示した。コントロールの吸光度を100%とし、試料添加時の吸光度を相対的にプロットしており、相対吸光度が100%に近い試料ほど、細胞毒性が低いことを示している。その結果、ツイニー抽出液ではいずれの濃度においても相対吸光度の減少は認められなかった（図11-1）。

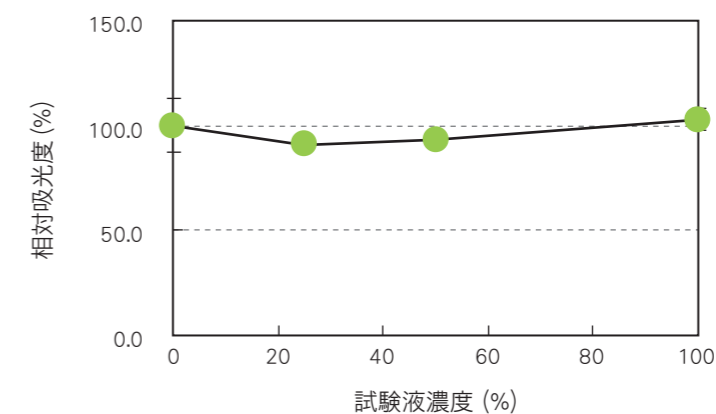


図11-1 PHK16細胞増殖試験（ツイニー）

比較対象として用いたルナウィング抽出液においても、ツイニー抽出液と同様に相対吸光度の減少は認められなかった。50%濃度試験液および100%濃度試験液では逆に相対吸光度がそれぞれ115%、126%となり、コントロールを超える吸光度を示した（図11-2）。

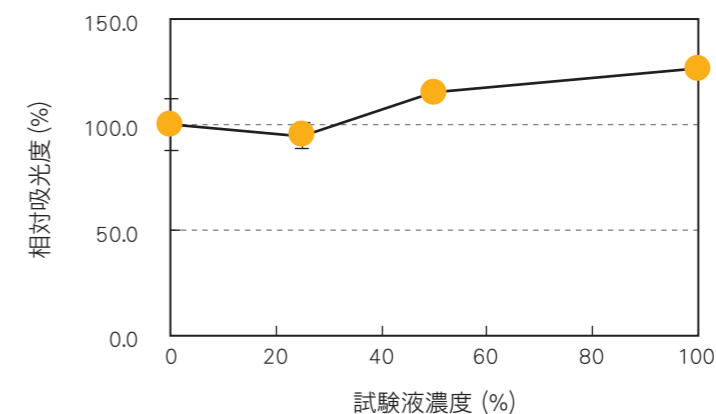


図11-2 PHK16細胞増殖試験（ルナウィング）

### 3.2 V79細胞コロニー形成試験

V79細胞コロニー形成試験の結果を示した。コロニー形成率が100%に近い試料ほど毒性が低いことを意味するが、ツイニー抽出液ではいずれの濃度においてもコロニー形成率の低下は認められなかった(図12-1)。

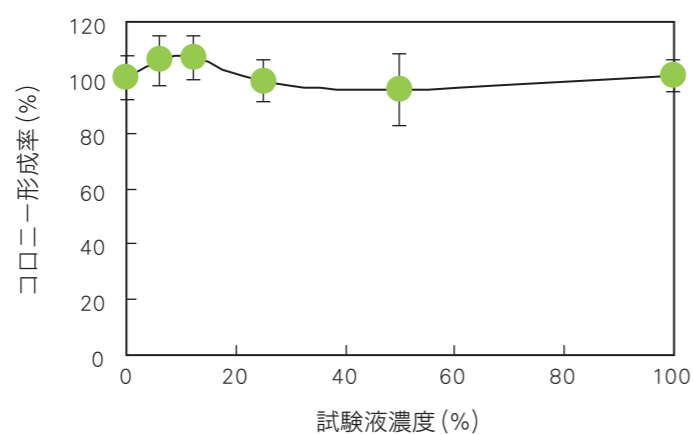


図12-1 V79細胞コロニー形成試験 (ツイニー)

比較対象として用いたルナウイング抽出液においても、ツイニー抽出液と同様にいずれの濃度においてもコロニー形成率の低下は認められなかった(図12-2)。

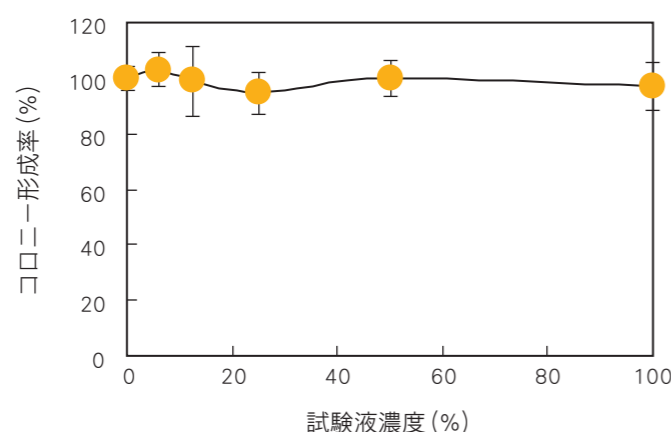


図12-2 V79細胞コロニー形成試験 (ルナウイング)

### 3.3 THP.1細胞トリパンブルー色素排除試験

THP.1細胞トリパンブルー色素排除試験の結果を示した。ここでは、播種時(0日)の細胞数に対し、3日間の細胞培養でどの程度細胞が増殖したのかをグラフ化した(図13-1)。

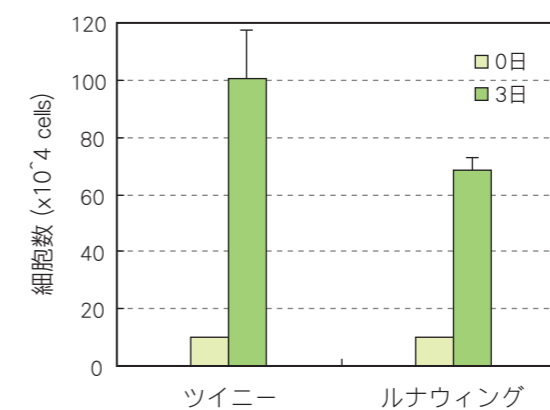


図13-1 THP.1細胞増殖

ツイニー上で培養されたTHP.1細胞は、播種時(0日)と比較して10倍以上という非常に高い細胞増殖率を示した(10万細胞→107万細胞)。さらに、その際の細胞生存率は90%以上であった。

比較試料であるルナウイング上で培養されたTHP.1細胞もまた7倍弱という高い細胞増殖率を示した(10万細胞→69万細胞)。また、90%以上の細胞が生細胞としてカウントされており、ツイニーと同様に高い細胞生存率を示した。

PHK16(上皮細胞)およびV79(線維芽細胞)を用いた試験では、「ツイニー」と「ルナウイング」の両試料間に、細胞に対する影響の差異は認められなかった。一方、THP.1(白血球細胞)を用いた試験において、細胞増殖は「ルナウイング」上で培養するよりも「ツイニー」上で培養したときの方が優れており、「ツイニー」上で培養した際の細胞数は「ルナウイング」上で培養したときの細胞数の約1.4倍であった。「ルナウイング」は、原材料から基本レジンに至るまで、様々な*in vitro*および*in vivo*試験で良好な結果を示しており、安全性の高い歯科補綴材料と位置づけることができる製品である。THP.1細胞に対する試験結果は、「ツイニー」は「ルナウイング」よりもさらに安全性の高い歯科材料であることを示唆している。

そこで、「ツイニー」上で培養した時のTHP.1細胞の細胞増殖が「ルナウイング」上で培養した時に比べ優れていた理由について検討することとした。両試料(ハイブリッドレジンとレジン)の違いとして1)原材料、2)製造方法、以上の二点が考えられる。1)については、THP.1細胞に影響を与えるような試料間の差異を特定し得なかった。そこで、2)の製造方法の違いについて検討することとした。2-1. 試料において示したように、ハイブリッドレジンである「ツイニー」とレジンの「ルナウイング」の製造方法には、光重合の後に加熱重合の有無という大きな違いが存在する。各重合工程で、原材料中のモノマーがポリマーへと重合されるが、この際に、重合されなかったモノマーが未重合モノマーとして残留する。細胞を用いた歯科用高分子材料の研究において、原材料であるモノマー成分が細胞に対して影響を及ぼすことが報告されている<sup>16-21)</sup>。ウレタン系ジメタクリレート(UDMA)やトリエチレングリコールジメタクリレート(TEGDMA)などのモノマーは、硬質レジンの主成分として長

年の臨床実績がある。この両モノマーは、弊社「ツイニー」や「ルナウィング」を含む多くの市販製品に使用されている。

光重合の後に加熱重合を行うツイニーは、光重合のみのルナウィングと比較して、未重合モノマーの残存量が少ないと考えられ、そのためTHP.1細胞に対して影響を示さなかったのではないかと推察される。

そこで、ツイニーおよびルナウィングに加えて、加熱重合を省略したツイニー：ツイニー（-）、加熱重合を行ったルナウィング：ルナ（+）を作製し、再度THP.1細胞をトリパンプルー色素排除試験に供した。ツイニーあるいはツイニー（-）上で培養したTHP.1細胞について分析したところ、ツイニーから加熱重合を省略したことで、ツイニー（-）上で培養した細胞の数は大きく低下した（ツイニー比51%の低下）。その際の細胞生存率はツイニー・ツイニー（-）共に90%以上であり、コントロールと同程度であった（図13-2）。

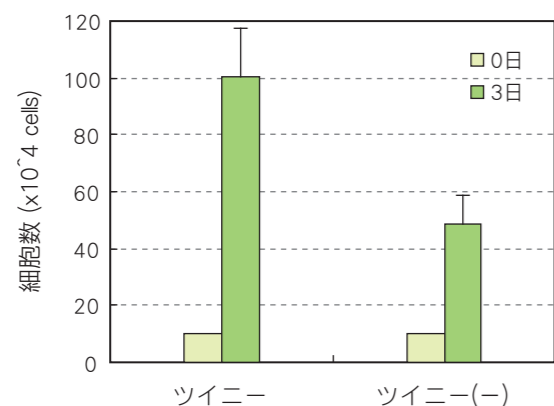


図13-2 THP.1細胞増殖

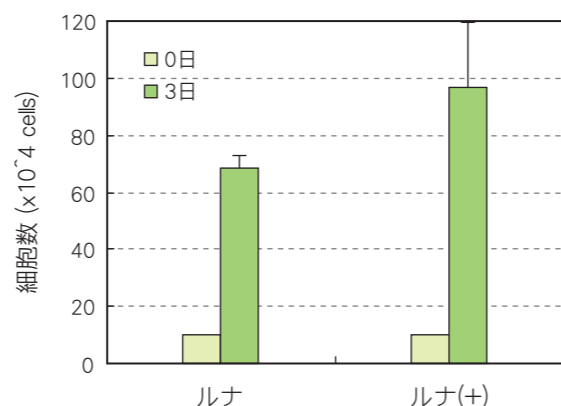


図13-3 THP.1細胞増殖

続いて、ルナあるいはルナ（+）で同様の検討を行ったところ、追加で加熱重合を行ったルナ（+）上で培養すると、高い細胞生存率（90%以上）を維持したまま細胞数が大きく増加した（ルナウィング比40%の増加）（図13-3）。

これらの結果は、THP.1細胞に対する未重合のモノマーの影響に関する推察を支持するものと考えられる。

### 3.4 フクシン染色試験

THP.1細胞に対する未重合モノマーの関与についてより詳細に検討するため、トリパンプルー色素排除試験後の4種の試料ツイニー、ツイニー（-）、ルナ、ルナ（+）中に存在する未重合モノマーをフクシンで染色した。この試験では、試料中の未重合モノマー量が多ければ多いほど、フクシンによって染色され、染色の度合い（色差）が大きくなる。

試料ごとに、細胞試験の結果と、染色試験の結果をグラフにプロットし、両測定結果の相関性について解析した。

その結果、色差と細胞数との間には、 $R^2 = 0.6659$ という高い相関関係が認められた（図14）。色差は未重合モノマー量に相当するので、この結果は、THP.1細胞に対する未重合モノマーの強い関与を示すものである。

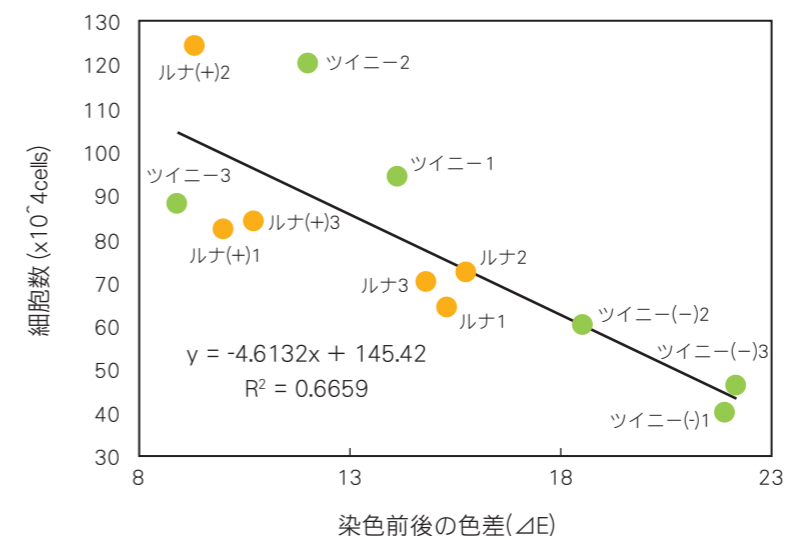


図14 細胞数と色差の相関図

## 4. まとめ

口腔内の状態を想定した3種類の細胞（PHK16細胞、V79細胞、THP.1細胞）に対して、ハイブリッド型硬質レジン「ツイニー」と硬質レジン「ルナウィング」を用いて細胞試験を行った。

上皮細胞であるPHK16細胞および線維芽細胞であるV79細胞に対して、「ツイニー」および「ルナウィング」は細胞毒性を示さなかった。

免疫系細胞であるTHP.1細胞に対して、「ツイニー」および「ルナウィング」いずれも細胞死を誘導しなかった。さらに、「ツイニー」上における細胞増殖は、「ルナウィング」上のものよりも優れていた。この違いは、「ツイニー」は加熱重合をすることにより、細胞増殖抑制作用を有する未重合モノマーが「ルナウィング」よりも少ないためと考えられた。

これまで、論文やレポートなどで「ルナウィング」の安全性について繰り返して報告してきた。さらに、市場への上梓以来、「ルナウィング」の使用による生体安全性に関する問題の発生は報告されていない。このように安全性の高い「ルナウィング」に対して、「ツイニー」はさらに安全性の高い製品と位置づけることができるであろう。

本試験は、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。

## 《参考文献》

---

- 1) 西本由美子, 星川武, 安楽照男, 山本裕久. 歯冠用硬質レジンにおける SiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> 系フィラーの屈折率と光透過性. 日歯技工会誌 2001; 22: 106-111.
- 2) 岸本吉則, 星川武, 山本裕久, 安楽照男. ゾル-ゲル法を用いた歯冠用硬質レジンの開発 I. 機械的性質について. 日歯技工会誌 2002; 23: 88-92.
- 3) 宮崎愛, 岸本吉則, 星川武, 山本裕久, 安楽照男. ゾル-ゲル法を用いた歯冠用硬質レジンの開発 II. オパール特性について. 日歯技工会誌 2002; 23: 88-92.
- 4) 岸本吉則, 星川武, 安楽照男, 山本裕久. 歯冠用硬質レジンの開発 - 歯ブラシ磨耗特性 -. 日歯技工会誌 2003; 24: 61-66.
- 5) 岸本吉則, 星川武, 山本裕久, 安楽照男. 動的粘弾性測定による歯冠用硬質レジンの評価. 日歯技工会誌 2003; 24: 67-71.
- 6) 岸本吉則, 山崎啓嗣. チオール化合物を用いた硬質レジン用プライマーの開発. 日歯技工会誌 2003; 24: 71-79.
- 7) 小池宏典, 岸本吉則, 安楽照男, 山本裕久. チオール化合物を用いた硬質レジン用プライマーの開発. 日歯技工会誌 2003; 24: 79-83.
- 8) Hirohisa Yamamoto, Takahiro Kato, Ai Miyazaki, Takeshi Hoshikawa and Teruo Anraku. Synthesis of SiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> Fillers by Emulsion Method and Optical Properties of Composite Resins with Fillers. Proceedings of the 19th Korea-Japan International Seminar on Ceramics 2002; 304-308.
- 9) 松浦理太郎, 三輪えりこ, 安楽照男, 山本哲也. 歯冠用硬質レジン添加剤の細胞毒性に関する生物学的検討. 歯科材料・器械 2009; 28: 1-7.
- 10) 星川武, 宮崎愛, 加藤喬大, 安楽照男, 山本裕久. 特開 2005-263648.
- 11) 加藤喬大, 星川武. 新規歯冠用ハイブリッド型硬質レジンの開発(第1報) 基礎的物性. 歯科材料・器械 2009; 28: 241.
- 12) 佐藤雄司, 加藤喬大, 星川武. 新規歯冠用ハイブリッド型硬質レジンの開発(第2報) 疲労強度について. 歯科材料・器械 2009; 28: 242.
- 13) 隅田昌志, 加藤喬大, 星川武. 新規歯冠用ハイブリッド型硬質レジンの開発(第3報) オペークレジンの基礎的物性. 歯科材料・器械 2009; 28: 243.
- 14) 加藤喬大, 星川武, 永井雅浩, 山本樹育. 新規歯冠用ハイブリッド型硬質レジンの開発(第4報) 基礎的物性. 歯科材料・器械 2010; 29: 183.
- 15) ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.
- 16) Lawrence WH, Bass GE, Purcell WP, Autian J. Use of mathematical models in the study of structure-toxicity relationships of dental compounds. Esters of acrylic and methacrylic acid. *J. Dent Res* 1972; 51: 526-535.
- 17) 原嶋郁郎, 今井弘一, 中村正明, 平澤忠. 歯冠用モノマーの細胞毒性 I. 純度の異なる Bis-GMA および TEGDMA の細胞毒性. 歯科材料・器械 1994; 6: 563-567.
- 18) Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37: 517-524.
- 19) Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41: 474-480.
- 20) Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Eick JD, Glaros AG, Yourtee DM. In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dent Mater.* 1999; 15: 363-373.

- 21) Schweickl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006; 85: 870-877.

## 《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)

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 2010年6月30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>



营本20100630  
20170707W