

令和元年6月5日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11668

研究課題名(和文)チタン合金インプラント組成金属のES/iPS細胞による発生毒性の検討

研究課題名(英文)Embryotoxicity of titanium alloy implant composition metal by mouse ES/iPS cells

研究代表者

今井 弘一 (IMAI, Koichi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90103100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チタン合金製のインプラント体組成金属元素の*in vitro*発生毒性をEST法で調べた結果、バナジウム以外発生毒性リスクは確認できなかった。さらに、Ti-6Al-4V合金(ASTM F136)の板状試料、研削粉ともに、フッ化水素酸処理群では無処理群と比べてマウス由来の3T3細胞、ES-D3細胞、iPS細胞で細胞生存率の低下が認められた。フッ化物で腐食した板状試料では無処理群と比べ、ES-D3細胞、iPS細胞で細胞分化に影響がなかったが、研削粉では影響が認められた。今回の実験条件は使用条件を超えた過酷な条件であったが、発生毒性の存在は明確に確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チタン合金インプラントのヒトの正常な新生児誕生に関係する生殖・発生毒性リスクについては未知である。フッ化物が含まれた歯磨や洗口剤の使用についてのチタン合金製インプラント腐食物についての発生毒性リスクの情報は存在しない。今回、EST法でバナジウム含有合金に発生毒性リスクの可能性が判明し、医療用Ti-6Al-4V合金研削粉がES-D3細胞とマウス由来iPS細胞の正常な分化に影響することが判明したことは学術的にも影響は大きいと考えられる。今回の*in vitro*実験のみではヒトの発生毒性リスクが存在する可能性は難しいが、さらに社会的にも多方面から発生毒性研究の継続を期待するものである。

研究成果の概要(英文)：The *in vitro* embryotoxicities of metals (Ti, V, Al, Nb, Ta, and Zr) used in a commercially available implant made of titanium alloy were examined by the EST protocol, demonstrating no embryotoxicity for any metal, except vanadium. The survival rates of mouse 3T3, ES-D3, and iPS cells based on the MTT method were lower in the fluoride-treated group than in the negative controls (i.e., untreated ground powder and plate made of titanium alloy). In addition, the test solution, prepared by immersing corroded, ground powder (hydrofluoric acid-treated ground powder of Ti-6Al-4V plate (ASTM F136)) into a cell culture medium, reduced the rates of contraction in teratomas, due to differentiation, in both ES-D3 and iPS cells, as compared with untreated titanium alloy. However, the ALP activities showed no significant difference. No embryotoxicity was demonstrated, even though the experimental conditions were more severe than the conditions on actual use.

研究分野：歯科理工学

キーワード：チタン合金 Ti-6Al-4V 発生毒性 *in vitro* EST法 インプラント 表面処理 フッ化水素酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科用インプラントには純チタンやチタン合金が用いられている。チタン合金に数多く使用されている Ti-6Al-4V 合金成分のバナジウムは非常に細胞毒性が強い元素のため、バナジウムの代わりにニオブ、タンタルやジルコニウムなどを使用した合金も開発されている。チタンやチタン合金は生体内の条件によっては耐食性が損なわれる可能性について、炎症組織でマクロファージが活性化すると活性酸素同様にヒドロキシラジカルが活性化しチタンの耐食性に問題が発生する可能性が指摘されている。さらに、酸性化でフッ素イオンが存在すると耐食性が極端に低下する、あるいは金属の上部構造との組み合わせによるガルバニー電流の発生による電気化学的な問題など数多くの報告がある。インプラントの組成合金イオンが腐食することで溶出し、生体に取り込まれた金属イオンの発生毒性レベルをチェックすることが必要であった研究上の背景があった。

(2) 化学物質による正常なヒト新生児誕生に対する影響の中でも発生毒性の存在は非常に重大な生物学的リスクである。正常なヒト新生児の誕生を妨げる歯科用インプラントから口腔内などの体内に入るリスクレベルを把握する必要がある。報告者らは Embryonic Stem Cell Test (EST)法を用いた発生毒性研究を 20 年以上継続して実施してきた。EST 法はマウス ES 細胞の細胞分化能などを利用した *in vitro* 発生毒性試験法で、すでに欧州を中心に国際的なバリデーション試験を行い、化学物質によるヒトの発生毒性データとの相関関係では高い予知性が示されている実験方法である。この EST 法は国内外の複数の安全性試験受託機関でも採用されている簡便かつ信頼性の高いスクリーニング法であり、歯科用インプラント合金組成元素ならびにチタン合金製インプラント体が腐食して溶出する化学物質の発生毒性リスクをスクリーニングし、ヒト新生児の正常な誕生に重要なデータを得る動機があった。

2. 研究の目的

(1) 正常なヒト新生児誕生に対する化学物質の影響を知ることが重要である。チタン合金製インプラント体で使用される組成金属の発生毒性リスクについては解明されていない。ヒト胎児の催奇形性を予測できる EST 法でチタン合金製インプラント体の組成金属の発生毒性リスクを調べる。EST 法は欧州で国際的なバリデーションでヒトの発生毒性リスクを予測できる可能性が高いことがすでに判明している。純チタンやチタン合金は表面には強固なチタンの不動態膜ができることで、生体内に組成金属元素の溶出が非常に少なく生体安全性の優れた材料であることが知られている。しかし、純チタンやチタン合金は生体内の特殊な環境下では耐食性が損なわれる可能性も指摘されている。

(2) フッ素イオンは化学反応性が非常に高いハロゲン元素に含まれ、酸性条件下でチタン表面がフッ素イオンで侵される可能性が大きいことが報告されている。チタン合金製インプラント体組成元素のマウス由来 ES 細胞、iPS 細胞の細胞分化への影響から発生毒性の可能性を評価する目的である。

3. 研究の方法

実験 1 でチタン合金組成の各元素の発生毒性について可能性を探った。実験 2 でバナジウムの入った医療用 Ti-6Al-4V 合金を NaF では腐食しなかったため、フッ化水素酸を用いたチタン合金板の腐食群と無処理について調べた。さらに、歯科用ダイヤモンドポイントで研削した研削粉を用いて、フッ化水素酸で腐食して ES-D3 細胞とマウス iPS 細胞の細胞分化に及ぼす影響を調べた。

(1) 実験 1

歯科用純チタンならびに歯科用チタン合金製の市販インプラント体で使用される基本組成金属のチタン、バナジウム、アルミニウム、ニオブ、タンタル、ジルコニウムの各元素について、それぞれ原子吸光光度計用の標準試験液(表 1)を用いて元素イオンレベルで発生毒性のスクリーニングを行った。ES-D3 細胞(図 1)の細胞分化指標である ID50 値、ならびに ES-D3 細胞と Bulb/c 3T3 細胞(以後 3T3 細胞、図 2)の細胞毒性指標である IC50 値の 3 つのパラメータを用いて、EST 法に基づいて実験を行った。すなわち、ES-D3 細胞用培養液として、あらかじめ加熱処理を行った Fetal Bovine Serum(以下 FBS, HyClone®, Lot. KPK22095, UT, USA)を、Dulbecco's Modified Eagle Medium(以下 DMEM, 富士フイルム和光純薬, 大阪)に容積比 10% 添加した。さらに容積比 1% Non-Essential Amino Acids, L-Glutamine, Penicillin-Streptomycin, β -Mercaptoethanol(いずれも Invitrogen, CA, USA)を添加した。なお、マウス由来 iPS 細胞も ES-D3 細胞と同じ培養液を用いた。また、3T3 細胞用培養液として、容積比 5% FBS(HyClone®)と L-Glutamine を DMEM(いずれも Invitrogen, CA, USA)に添加した。

表 1 原子吸光光度計用の標準試験液

Ions	Manufacturers	Lot No.
Ti	Wako*	DSL5783
V	Wako*	AWR4218
Al	Wako*	TWR6815
Nb	Wako*	DSK6434
Ta	Wako*	DSP2560
Zr	Wako*	DCE3117

*富士フイルム和光純薬

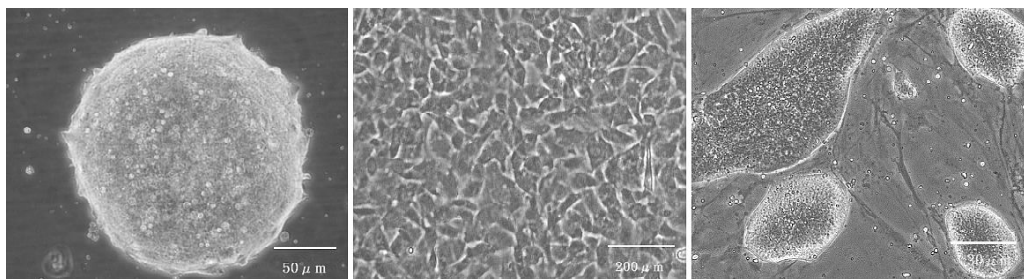


図1 ES-D3 cells

図2 3T3 cells

図3 マウス由来 iPS cells

Embryoid Body(EB)の製作

各金属イオンの標準試験液(1,000ppm)をPBS(-)で100ppmにした後、新鮮培養液でさらに濃度10ppmの原液を製作した。原液を培養液で倍数希釈して得られた各濃度の試験液でES-D3細胞の細胞懸濁液(3.75×10^4 cells/mL)を製作した。プラスチックディッシュ蓋の裏側に細胞懸濁液をピペットで25μLずつ約60個分注し、さらにプラスチックディッシュ内に20mLのPBS(-)を分注した。ディッシュに蓋を静かに被せ37℃の炭酸ガス恒温器で3日間懸滴培養した。得られた細胞の凝集体を集め、さらに各試験液を用いて細胞が伸展しないように底面が無処理の細菌培養用ディッシュを用いて炭酸ガス恒温器内で2日間静置培養して各試験液でEBを製作した。

細胞分化と評価

24wellのmulti-dishの各wellにEBを1個ずつピペットで投入し、各試験液1mL/wellを分注し炭酸ガス恒温器で5日間静置培養した。細胞分化したテラトーマ内で倒立位相差顕微鏡を用いて心筋に正常に分化して鼓動が認められた細胞の百分率から細胞分化のパラメータであるID50値を求めた。さらに細胞毒性のパラメータである2種類の細胞生存率について、ES-D3細胞と3T3細胞を試験液を用いて細胞懸濁液を作り、96wellのmulti-dishに100μL/well分注して炭酸ガス恒温器中で10日間静置培養した。MTT法でそれぞれのIC50値を求めた。なお、吸光度計の吸光度は570nmとした。また、対照群は金属イオン無添加群とした。

(2) 実験2

Type I コラーゲン(新田ゼラチン, 大阪)を用いてES-D3細胞およびマウス由来iPS細胞(図3)の3次元培養法における細胞増殖と細胞分化を調べた。鏡面研磨した直径6mm、厚さ1.0mmのTi-6Al-4V合金の医療用チタン材であるASTM F136規格品(東京チタニウム 埼玉)を用いた。フッ化水素酸(HF=20.01, Lot.PKF7599, 和光純薬, 大阪)による腐食群と無処理群を製作した。いずれも円板状のチタン合金を中性洗剤で十分に洗浄した後、表面をエタノールに5分間浸漬した。腐食群はフッ化水素酸に浸漬する時間や濃度条件については、予備実験としてチタン合金板を濃度100%のフッ化水素酸に浸漬した場合、化学反応で急激に発熱し浸漬液が沸騰して危険なため、チタン合金板を浸漬する適切なフッ化水素酸濃度および浸漬時間をあらかじめ決定した。フッ化水素酸10%溶液で12時間浸漬する条件とした。腐食群、無処理群共に流水で十分に洗浄し、オートクレーブ滅菌後に自然乾燥した。なお、腐食群のチタン合金板表面は光沢がなく暗灰色を呈していた。

細胞毒性試験

12wellのMulti-dish底面に腐食群、無処理群のチタン合金板を置き、ES-D3細胞、マウス由来iPS細胞、3T3細胞の細胞懸濁液(1×10^4 cells/mL)2mL/wellを分注した。なお、マウスiPS細胞は培養にフィーダー細胞が必要なため、あらかじめMEF細胞(リプロセル, 神奈川)をチタン合金板上に分注し、炭酸ガス恒温器内で24時間培養後にマウス由来iPS細胞を分注した。3種類の細胞を分注した後に炭酸ガス恒温器内で4日間培養し、MTT法を用いて吸光度570nmで測定した。なお、対照群はチタン合金板の無添加群とした。

細胞分化試験

2次元培養: ES-D3細胞およびマウス由来iPS細胞を新鮮培養液で細胞懸濁液(3.5×10^4 cells/mL)で実験1と同様に5日間培養しそれぞれEBを製作した。細胞毒性試験と同様に12wellのmulti-dish底面に腐食群、無処理群のチタン合金板を置き、それぞれのEB1個を板上に置き、10日間培養してテラトーマ内に認められる細胞の鼓動率を数えて全体のwell数の百分率とした。なお、マウスES細胞はMEF細胞を分注しチタン板上に分注し、24時間後にマウス由来iPS細胞のEBを置いた。

3次元培養: Cell culture insertを12well multi-dishに入れ、Type I コラーゲン(新田ゼラチン, 大阪)8mL、10倍濃度のDMEM 1mL、reconstitution buffer(新田ゼラチン) 1mLを容量10mLの短試験管に入れて氷冷下混合し、cell culture insert内に300μL入れた。さらに、cell culture insertとmulti-dishの間に2mL/well培養液を分注し、炭酸ガス恒温器内で24時間培養した。cell culture insert内のコラーゲンゲル上にEBを2個ピペットで置いた。さ

らに EB に乾燥の影響が少ないように EB 周囲に培養液を 50 μ L/well 入れた。チタン合金板を EB 上に置き、炭酸ガス恒温器内で 10 日間静置培養した。チタン合金板をピペットで取り去り、cell culture insert 内で EB から細胞分化したテラトーマをコラーゲンゲルとともに取り出して、別の 12 well multi-dish に入れた。細胞が入っていないコラーゲンゲルを可及的に除去し、PBS(-)で細胞を洗浄後に StemTAG™ Alkaline Phosphatase Staining and Activity Assay Kit (Colorimetric, Cell Biolabs, Inc., CA, USA) 付属の Cell Lysis Buffer で処理後に 37 で 30 分間染色し、Stop Solution で反応を停止させた。染色液を 96 well multi-dish に 100 μ L/well 入れ、吸光光度計の吸光度は 405nm とした。なお、対照群はチタン合金無添加群とした。

なお、実験 2 開始時における予備実験から 2% NaF 溶液ならびに 1% 希塩酸溶液に 1 週間浸漬条件によるチタン合金板表面の腐食も試みた。NaF では合金表面に肉眼的に影響が認められなかった。また、希塩酸では合金表面がやや黒色化し光沢が無くなったが、ES-D3 細胞の細胞毒性と細胞分化への影響に有意差が認められなかった。

(3) 実験 3

実験 2 と同様の Ti-6Al-4V 板表面を歯科用ダイヤモンドポイントで研削した研削粉 100mg をエタノールとともに遠沈管に入れて 5 分間遠沈した。残渣をシリコン製の容器に入れ、10% フッ化水素酸を 5 mL 加えて室温で 24 時間浸漬した。フッ化水素酸を捨て、腐食した研削粉を蒸留水で数回洗浄した。腐食研削粉をそれぞれの細胞培養液 10mL に入れた。37 で 4 日間静置浸漬し、浸漬液は 0.2 μ m メンブランフィルターで濾過滅菌を行った。各浸漬液を培養液で倍数希釈して各試験液とした。なお、フッ化水素酸無処理群を対照群とした。

細胞毒性試験

3 種類の細胞を 96well multi-dish に 100 μ L/well 分注し、37 の炭酸ガス恒温器で 24 時間静置培養した。培養液を 100 μ L の各試験液と交換し、炭酸ガス恒温器で 7 日間静置培養し、MTT 法を用いて吸光度 570nm でそれぞれの細胞生存率を調べた。

細胞分化試験

ES-D3 細胞とマウス iPS 細胞の用いて細胞分化への影響を調べた。24well multi-dish に培養液 1mL/well 入れ、実験 1 と同様に製作した EB を各 well にピペットで 1 個入れ、炭酸ガス恒温器内で 7 日間培養した。倒立位相差顕微鏡で両細胞が分化したテラトーマを観察し、各 well 中のテラトーマ内で心筋の鼓動が認められた well 数を、全体 well 数からの百分率を求めた。

4. 研究成果

(1) 実験 1

歯科用インプラント体に使用される基本組成金属のチタン、バナジウム、アルミニウム、ニオブ、タンタル、ジルコニウムの各元素における原子吸光度計用の標準試験液で EST 法による発生毒性スクリーニングを行った。ES-D3 細胞の細胞分化指標の ID50 値、ES-D3 細胞と 3T3 細胞の細胞毒性指標である IC50 値の平均を図 4 に示す。

ES-D3 細胞の ID50 値と ES-D3 細胞と 3T3 細胞の IC50 値から、バナジウムのみ、"weak embryotoxicity"を示した。

他の金属イオンではすべて "non embryotoxicity" の範疇を示した。さらに、それぞれの元素で 2 種のイオンを併せた状態でも EST 法の結果、バナジウムと他の元素を併せた場合、いづれも "weak embryotoxicity"であった。

医療用に用いられるチタン合金の中でバナジウムを含む ASTM F136 規格品 (チタンのほか、バナジウム 3.50 ~ 4.50%、アルミニウム 5.50 ~ 6.75% 含有) に発生毒性が存在するリスクがあることが判明した。我が国で使用される医療用チタン合金でバナジウムを含有せず、代わりにニオブ 6.50 ~ 7.50% と 0.50% 以下のタンタルを含む ASTM F1295 規格品は以後の実験対象外とした。

(2) 実験 2

細胞毒性試験

板状に加工した ASTM F136 規格チタン合金の腐食群と無処理群における ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞、3T3 細胞上の細胞毒性試験の結果、腐食群ではそれぞれ 76.2%、80.1%、64.8% を示した。しかし、無処理群では対照群との有意差がいづれの細胞も認められなかった。

細胞分化試験

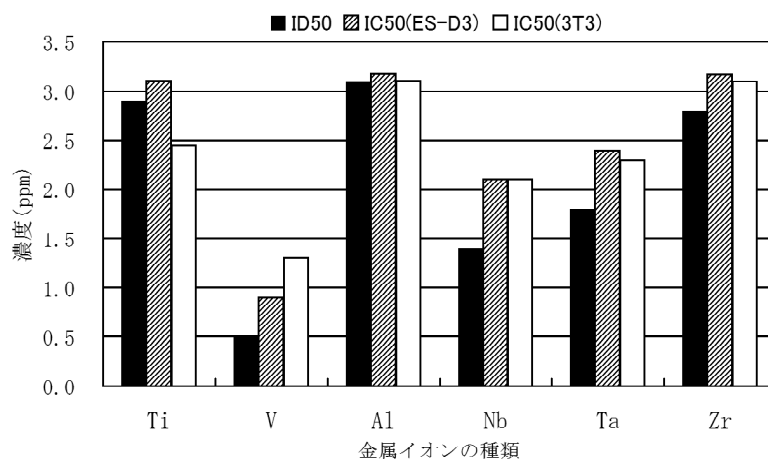


図 4 各金属イオンの ID50 値と IC50 値

2次元培養の結果、腐食群、無処理群ともに、ES-D3細胞、マウス由来 iPS 細胞で有意差の心筋の鼓動が認められた well 数の割合は 50~67% でいずれも有意差が認められなかった。なお、板状金属試料上のテラトーム内で鼓動する細胞像は倒立位相差顕微鏡では観察できないため金属顕微鏡を改造して観察したが非常に観察が難しく、十分な観察可能数が得られなかった。3次元培養の結果を図5に示す。キットの Lysis Buffer では 0.05 を示した。また、ES-D3細胞の未分化の EB では平均 0.84、マウス由来 iPS 細胞の未分化の EB では 0.88 と未分化状態では大きかった。しかし、腐食群で細胞分化した条件では ES-D3 細胞は 0.24 であった。マウス由来の iPS 細胞で 0.28 であり、いずれも無処理群と差が認められなかった。なお、各グラフ上の縦棒は標準偏差を示す。今回の実験から、腐食群と無処理群のチタン合金板では ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞ともに細胞分化には影響が認められなかった。

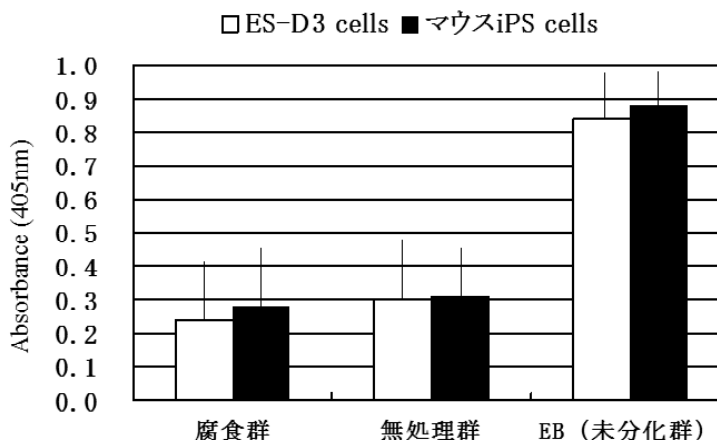


図5 腐食群、無処理群と対照群での細胞分化

なお、実験2の結果から、板状に加工した ASTM F136 規格チタン合金の腐食群と無処理群における ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞、3T3 細胞上の細胞毒性試験結果では、フッ化水素酸による腐食群でやや細胞毒性が認められたが、ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞の3次元培養条件下の細胞分化では影響が認められなかった。

(3) 実験3

細胞毒性試験

ASTM F136 規格チタン合金研削粉の腐食群と無処理群における ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞、3T3 細胞上の細胞毒性試験結果、腐食群の原液では、ES-D3 細胞では対照群の 4.3%、2倍希釈の試験液でも 8.9%、最も希釈率が大きな 8倍希釈でも 63.7% であった。マウス iPS 細胞、3T3 細胞でも同様な結果であった。しかし、無処理群では、ES-D3 細胞の原液で 56%、マウス iPS 細胞で 44%、3T3 細胞で 40% であった。4倍希釈群で対照群との有意差がいずれの細胞でも認められなかった。なお、3種類の細胞間での有意差は認められなかった。

細胞分化試験

細胞分化率の結果、ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞で、原液から 8倍希釈までの試験液では全く細胞分化が認められなかった。ES-D3 細胞の 16倍希釈において 8well 中 3well で心筋による鼓動が確認できた。また、マウス由来 iPS 細胞では 8well 中 2well で心筋による鼓動が確認できた。なお、対照群では ES-D3 細胞、マウス iPS 細胞共に実験日数内において 8well 中 4well で鼓動が確認できた。なお、原液から 4倍希釈までは EB が全く得られなかった。

細胞分化試験では、ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞共にやや細胞分化への影響が認められた。細胞毒性が大きな場合には細胞分化への影響も大きいと考えられる。また、板状と異なり、研削粉の場合には材料表面積が非常に大きいため細胞毒性、細胞分化ともに影響が大きかった可能性がある。また、研削粉はダイヤモンドポイントで製作したため、十分に洗浄・滅菌したが、ダイヤモンドポイントのダイヤモンド、ステンレス、およびメッキ成分も僅かに混入した可能性も考えられる。

また、予備実験段階で 2% NaF 溶液、3% 過酸化水素溶液、1% 希塩酸溶液で 1週間浸漬してチタン合金表面を観察した結果、NaF 溶液と過酸化水素溶液では合金表面には肉眼的には変化が認められなかった。希塩酸溶液浸漬条件では表面がやや黒化し金属光沢が失われたが、ES-D3 細胞では細胞毒性、細胞分化率ともに無処理群と有意差が無かった。

フッ化物を研削片に作用させた場合では、板状の試験片と異なり、細胞生存率の低下が大きく、ES-D3 細胞、マウス由来 iPS 細胞ともに細胞分化にも影響が認められた。歯磨剤に配合される NaF などのフッ化物はチタンを腐食する可能性は十分に存在することが知られており、フッ化物による影響があることが判明した。

得られた成果の国内外における位置づけは、今回は加速度試験としてフッ化水素酸を用いて短時間で腐食膜を生成した。歯磨剤に配合される NaF などのフッ化物はチタンを腐食する可能性は十分に考えられる。実際のブラッシング時の唾液中フッ化物イオン濃度ではチタン表面に影響する可能性は極めて少ないと考えられる。今回の研究からは十分ヒトへの発生毒性の影響は確認できなかったが、マウス由来の ES 細胞や iPS 細胞で、フッ化物で腐食したチタン合金について、細胞分化に影響があることが判明したため十分なインパクトがあったものとする。

今後の研究について、フッ素の毒性については報告が多い。フッ素によって吐き気や嘔吐などを生じる急性中毒量は、体重 1kg 当たり 2mg であることが知られている。また、長年飲料水等で過量のフッ化物を摂取したとき生じる斑状歯と骨硬化症が知られている。いずれも齲蝕予

防を目的で使用する量をはるかに上回る量の使用で発症する。フッ化水素のヒトの慢性毒性で、反復吸入暴露及び皮下投与で精子形成に影響がみられる。従って過剰なフッ化物の摂取はヒトの健康に重大な被害を及ぼすことが判明しており、さらなるフッ化物のヒトへの影響についての研究開発が望まれる。今回の実験条件は使用条件を超えた過酷な条件であったが、発生毒性の存在は明確には確認できなかった。

<引用文献>

吉成 正雄、インプラント材料とその表面：その1．インプラント材としてのチタン、*歯科学報*、103 巻、2003、313 - 315

小田 豊、河田 英司、吉成 正雄、長谷川 晃嗣、岡部 徹、チタンおよびチタン合金の腐食に及ぼすフッ素イオン濃度の影響、*歯材器*、15 巻、1996、317 - 322

北村 隆他、吉成 正雄、小田 豊、接合した歯科用インプラント合金の電気化学的挙動、*歯科学報*、102 巻、2002、665 - 675

Spielmann H, Pohl I, Doering B, Liebsch M, Moldenhauer F, The embryonic stem cell test (EST), an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells, *In Vitro Toxicol*, 10 巻、1997、119 - 127

Spielmann H, Genschow E, Brown NA, Piersma AH, Verhoef A, Spanjersberg MQ, Huuskonen H, Paillard F, Seiler A, Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests, *Altern Lab Anim*, 32 巻、2004、245 - 274

Seiler AE, Spielmann H, The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity *in vitro*, *Nat Protoc*, 6 巻、2011、961 - 978

5．主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Imai K, Shirai T, Akiyama M, Zennyu M, Yoshida T, Okamura T, Shida M, Shimizu H, Morita S, Tominaga K, Masuno K, Matsumoto H, Nishikawa T, Study of differentiation level by three-dimensional culture of mouse ES cells on titanium alloy powder, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、15 巻、2018、159 - 164

DOI: doi.org/10.11223/jarde.15.159

Imai K, Zennyu K, Yoshida T, Ono Y, Kumabe S, Nishikawa T, Influence of fluoride contamination on titanium surface on cell viability and cell differentiation of ES-D3 cells, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、15 巻、2017、35 - 40

DOI: doi.org/10.11223/jarde.15.35

Imai K, Shirai T, Ishikawa H, Nakanishi T, Morita S, Inference of embryotoxicity of titanium alloy composition metal chemicals as an oral implant body with EST protocol, *Nano Biomed*, 査読有、9 巻、2017、9 - 14

DOI: doi.org/10.11344/nano.9.9

Imai K, Oshima H, Hashimoto Y, Akiyama M, Zennyu M, Yoshida T, Nishikawa T, Masuno K, Matsumoto H, Prediction of embryotoxicity by four kinds of fluorine compounds based on embryonic stem cell test (EST) protocol, *J Oral Tissue Engin*, 査読有、14 巻、2016、91 - 97

DOI: doi.org/10.11223/jarde.14.91

[学会発表](計7件)

今井 弘一、橋本 典也、秋山 真理、白井 翼、西川 哲成、本田 義知、チタン表面のフッ化水素酸処理における発生毒性への影響、第48回日本口腔インプラント学会、2018

今井 弘一、橋本 典也、秋山 真理、白井 翼、フッ化水素酸処理の Ti-6Al-4V 合金が ES 細胞の細胞増殖と細胞分化に与える影響、バイオインテグレーション学会第8回学術大会、2018

今井 弘一、橋本 典也、秋山 真理、白井 翼、中井 真理子、横山 直史、Ti-6Al-4V 合金のフッ化水素酸溶液による腐食生成物の発生毒性、第13回ナノ・バイオメディカル学会、2018

今井 弘一、橋本 典也、秋山 真理、白井 翼、善入 雅之、西川 哲成、インプラントで用いられるチタン腐食物の変異原性、第16回日本再生歯科医学会、2018

今井 弘一、橋本 典也、秋山 真理、白井 翼、吉田 貴光、純チタン腐食物の変異原性について - フッ化水素酸処理の影響 -、第8回臨床ゲノム医療学会"大阪学術大会"、2018

今井 弘一、橋本 典也、西川 哲成、チタン合金インプラント組成金属イオンの *in vitro* 発生毒性について、第47回日本口腔インプラント学会学術大会、2017

今井 弘一、近未来の再生医療と生物学的安全性試験への胚性幹細胞の応用、日本再生歯科医学会第8回シンポジウム(招待講演)、2016