

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11343

研究課題名(和文) SR-XRFおよびICP-MSを用い微量金属元素の口腔粘膜沈着メカニズムを探る

研究課題名(英文) Infiltration of trace metal ions in the oral mucosa of a rat analyzed using SRXRF,

研究代表者

簡野 瑞誠 (KANNO, Zusei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40345301

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)：金属元素の組織中への侵入は、金属材料と粘膜との直接接触が必要であることを明らかにした。また、Ni-Ti合金ワイヤーからのNiイオンの溶出はほとんど認められず、安定した合金であることが確認された。

一方、Ni、Ni-TiワイヤーにRhメッキを施した実験においては、メッキによりNiイオンの溶出ならびに組織への沈着はある程度抑制されたものの、いくつかのサンプルでは逆に溶出量が増大し、組織への沈着も顕著であった。(結果未発表)この検証のための追加実験において、乳酸、塩酸を用いて溶出実験を行ったが同様の結果となった。これは、局所の微小なメッキのはがれが、ガルバニー電極効果を起こしているものと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔内に溶出した金属の粘膜への浸透・蓄積の様子を初めてとらえたものであり、用いた手法の斬新さおよび有効性を明らかにした。また、組織への直接接触によってのみ、金属イオンが組織内へと浸透することも明らかとなった。一方で、金属材料の表面改質すなわちコーティングにより、直接接触を抑制した実験では、局所のガルバニー電極効果により金属イオンの溶出の増大が確認された(未発表)ことで、今後の製品開発や臨床応用についてはさらなる検証が必要であるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the amount, distribution, and chemical state of metals in the buccal mucosa using ICP-MS, SRXRF, and XAFS. We observed the infiltration of metals into the oral mucosal connective tissue and found that the metals are present in the form of a hydrated ion and oxide state. Our results help develop a new approach to inhibit metal allergy, which causes orthodontic patients to suffer from inflammation of the oral mucosa due to the contact of orthodontic devices.

Rhodium as coating material is aesthetic and corrosion resistant. However, the coating could not provide absolute resistance against acidic attacks. In combination with the results obtained from both the in-vitro and in-vivo experiments, it shows that NiTi is a stable and durable material, as despite the presence of ion dissolution, they were all under the daily intake threshold.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：金属イオン溶出 ICP-MS SR-XRF Rhメッキ 金属アレルギー

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

### 1. 研究開始当初の背景

矯正歯科臨床においては、その優れた機械的な特性により、さまざまな金属材料が用いられている。しかしながら、口腔内の唾液環境下では金属イオンが溶出し、時に型の遅延型アレルギーを惹起することがある。我々の分野では、より高いレジリエンスを持ち、持続的な弱い矯正力を発揮できるニッケルチタン(Ni-Ti)合金線を開発し、今日に至るまで臨床に活用している実績がある。Ni-Ti合金線の持つ形状記憶特性、超弾性特性に加え、その高い振動減衰能は矯正歯科臨床において大いに貢献するものであるが、一方で含有するNiはイオン化傾向が強く、人体のタンパク質と結合してアレルギーとなるタンパク質(ハプテン)へと変性させ、金属アレルギーにおいては最も問題とされる金属でもある。一方、食物による金属イオンの摂取が直接型アレルギーの発症を促すものではなく、皮膚や粘膜への直接接触を介して体内へと侵入する際にハプテンとなることも言われている。そこで、本研究では、口腔内での金属イオンの溶出ならびに組織内への進入経路に着目した。

### 2. 研究の目的

矯正装置の合金から溶出する金属イオンは微量であるとともに、唾液の流動性によりその濃度の変動は大きいものと思われる。様々な状況下での金属イオンの溶出に関する研究は数多くなされており、免疫機構における金属アレルギー発症メカニズムについても解明が進んでいるが、溶出実験では現象をとらえたばかりのものが多いこと、溶出した金属イオンが生体内に侵入しアレルギーを形成する経路が未だ不明であること、そして *in vitro* 中心の研究であり臨床的な解決法に直接結びついていないこと、などの問題がある。本研究では、矯正装置が口腔粘膜に接触することで局所に高濃度で金属イオンが沈着している可能性があることに着目し、以下の項目について検証することを目的とした。

(1) 矯正用金属材料における金属イオン溶出の定量的分析(*in vitro*)

(2) 実験動物の口腔内ならびに皮下に金属サンプルを留置し、沈着金属イオンの定量的分析、局在部位の定性的分析(*in vivo*)

(3) 金属材料の表面改質(メッキ)による効果について検証(*in vitro*, *in vivo*)

### 3. 研究の方法

極微量の組織から含有元素の解析が可能であり、ほぼ全ての元素を同時に測定可能である誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて溶出金属イオンの定量ならびに組織内沈着金属イオンの定量を行い、さらに、高感度微量元素分析と分析領域として局所領域情報(可視化)が得られる、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設における放射光蛍光 X 線分析(SR-XRF)を用いた。

方法としては、Wistar 系雌性ラットを疑似手術群、Ni 群、Ni-Ti 群、Co-Cr 群にランダムに分類し、Ni (1mm 径)、Ni-Ti (0.016×0.022 inch)、Co-Cr (0.016×0.022 inch) のワイヤー(10mm)を各群のラット右側頬粘膜に縫合した。疑似手術群は、右側頬粘膜に絹糸の縫合を10mm間隔で2か所行い、2週間後に両側頬粘膜(2mm×12mm, 0.03g)を採取した。採取した組織のうち、定量分析を行うものは10mlの希釈した超高純度硝酸にて溶解し、ICP-MSにて分析を行い、Dunnet 検定にて統計処理を行った。SR-XRFにて元素分布分析を行う組織は20μm厚で凍結切片作成後、フィルム(12.5μm)に貼付し、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(KEK-PF)のBL-4Aにて12.9keVのX線をビーム径20μm、試料ポイント40μmで分析を行った。得られた元素分布画像は隣接する切片をHE染色し、その構造と比較した。また、SR-XRF測定から得られた分布像におけるNi、Co、Crの集積部位にてXANESスペクトルを蛍光XAFS法(KEK-PF, BL-4A)で測定し金属の化学的状態を特定した。

次に、表面改質の影響を検証するため、Ni、Ni-Tiワイヤーにロジウム(Rh)メッキを施し、

同様の実験を行った。

#### 4. 研究成果

右に代表的な図表を示す。溶出した金属の濃度と粘膜組織での分布の関連性、さらにその化学的状態がNi, Coは水和イオン、Crは酸化物として存在することを示し、金属元素の組織中への侵入は、金属材料と粘膜との直接接触が必要であることを明らかにした。また、Ni-Ti合金ワイヤーからのNiイオンの溶出はほとんど認められず、安定した合金であることが確認された。

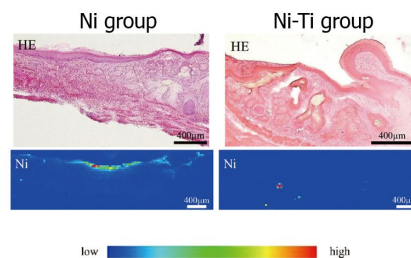


Fig. 4 Representative Ni distribution images of the Ni group (left) and the Ni-Ti group (right). Color bar indicates relative concentration with an arbitrary unit.

一方、Ni, Ni-Ti ワイヤーに Rh メッキを施した実験においては、メッキにより Ni イオンの溶出ならびに組織への沈着はある程度抑制されたものの、いくつかのサンプルでは逆に溶出量が増大し、組織への沈着も顕著であった。(結果未発表)この検証のための追加実験において、乳酸、塩酸を用いて溶出実験を行ったが同様の結果となった。これは、局所の微小なメッキのはがれが、ガルバニー電極効果を起こしているものと思われる。

Table 2 Concentrations of metals in buccal mucosa in four groups analyzed using ICP-MS

	Ti		Cr		Co		Ni	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Sham surgery	0.12	(0.26)	0.05	(0.08)	0.05	(0.08)	0.00	(0.00)
Ni	0.01	(0.00)	0.01	(0.00)	0.02	(0.03)	46.92*	(48.61)
Ni-Ti	0.01	(0.02)	0.05	(0.08)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)
Co-Cr	0.44	(0.47)	3.36*	(3.10)	0.12	(0.12)	0.00	(0.00)

Numbers are expressed in parts per billion (ppb).  
SD: standard deviation.  
\*: p<0.05

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Toshihiro IMAMURA, Zuisei KANNO, Haruki IMAI, Tomoko SUGIYAMA, Takahiro WADA, Midori YOSHIDA, Minoru SAKAMA, Takashi ONO, Eiichi HONDA and Motohiro UO.: Infiltration of trace metal ions in the oral mucosa of a rat analyzed using SR-XRF, XAFS, and ICP-MS, Dental Mater J, 2015;34:814-821.

〔学会発表〕(計 3 件)

Imamura T, Kanno Z, Wada T, Honda E, Uo M, Ono T.: Infiltration of trace metal ions in the oral mucosa analyzed using SR-XRF, XAFS, and ICP-MS., 10th Asia Pacific Orthodontic Congress, Bali, 2016.9.1-3. (poster)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：今村俊博

ローマ字氏名：IMAMURA, Toshihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。