

チタンイオンが口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) の生細胞数およびサイトカイン産生に及ぼす影響 第2報

横瀬 勝美^{1,2} 桑田 文幸^{1,2}

Effects of titanium ion on cell viability, IL-1 α and IL-8 production by an oral epithelial cell line, Ca9-22

Katsumi Yokose^{1,2} and Fumiyuki Kuwata^{1,2}

Abstract

The effects of titanium ions on cell viability and interleukin IL-1 α and IL-8 production in an oral epithelial cell line, Ca9-22 were investigated. The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. The cultures having 100% confluent cells were serum starved for 24h, and then 0.2mM of TiCl₄ was added. After the incubation for 1, 3, 6, 15, 24, 30, 48, 56, 72 or 80hours the cell viability was assessed by colorimetric assay using a LDH cytotoxic test. IL-1 α and IL-8 production were examined using specific ELISA kits. The addition of 30h the same concentration of titanium ions induced cell death. Titanium ions were observed to have little effect on IL-1 α and IL-8 production. These results indicate that the additions of 0.2mM titanium ions induces epithelial cell death rather than cytokine production.

Key words: titanium ion, cell viability, IL-1 α production, IL-8 production, oral epithelial cell

緒 言

歯科治療で使用されている金属は口腔内において、様々な要因が複雑に絡み合い極めて過酷な環境にあると言える。それら歯科用金属は唾液や飲食物などが電解質として作用し、pH変化や各種イオン等による腐食性変化を生じ、長時間のうちに溶出されると考えられる。口腔内ではそれ以外にも、金属溶出要因が共存しており、それらは、歯肉から浸出する体液・口腔内

細菌が産出する酸、温度や酸素の濃淡などの変化、咬む力が働く部分の金属に起こる応力腐食や咬耗などがある¹⁻⁷⁾。近年、歯科用イオンプラント材料として優れた実績を有しているチタンは、有床義歯、架橋義歯や欠損補綴材料としても幅広く使用されているが、先に記したような環境下で使用されている歯科用金属の中でも特に、生体親和性に優れている金属の一つとしてよく知られている。しかし、そのインプラント材によるアレルギーを訴える患者が近年増え、

¹ 日本大学歯学部化学

² 日本大学歯学部総合歯学研究所機能研究部門

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

(受理: 2005年10月1日)

¹ Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

臨床報告も増加している^{2,3)}。このように歯科用金属は、生体との接触は密接であり、局所的為害作用に加え全身的为害作用までに至っていると考えられる。

著者らは、先に歯科用金属の金属イオンが口腔軟組織、とくに上皮組織におよぼす影響を解明する第一ステップとして、歯科補綴物の成分であるクロムおよびニッケル、歯科修復物の合金中に存在する亜鉛について、ヒト口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) のコンフルエント後の生細胞数および DNA 合成能におよぼす影響について報告した^{8,9,10)}。前報ではチタンの影響を調べるために他の金属と同様チタンイオン高濃度、短時間における生細胞への経時的变化を調べた¹¹⁾。本研究ではチタンについて生細胞への経時的变化を低濃度、長時間の影響を調べ、さらに、インターロイキン-1 α (IL-1 α) および IL-8¹²⁾ の 2 種類のサイトカイン産生に及ぼすチタンイオンの経時的变化もあわせて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

実験にはヒューマンサイエンス資源バンク (大阪) から供与されたヒト歯肉癌由来細胞株 Ca 9-22 (JCRB 0625)¹³⁻¹⁶⁾ を使用した。Ca 9-22 細胞は、Dullbecco's modified Eagle medium (DMEM, 旭テクノグラス) に、10% ウシ胎児血清 (FBS, 旭テクノグラス), 50 U/ml ペニシリン および 50 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を加えた培地を用い、37°C, 5% CO₂ の湿潤条件下で培養を行った。

2. 細胞障害率 (経時的变化)

生細胞へのチタンイオンによる経時的变化の影響を調べるために、I 型コラーゲンをコートした 24 穴プレート (住友ベークライト) に Ca 9-22 細胞 1×10^5 個/cm² を播種し、500 μ l の DMEM (10% FBS および抗生物質を含有) で培養を開始した。細胞が 24 穴プレート内に 100%

コンフルエントに達した培養 3 日目に、それぞれ無血清の DMEM (抗生物質を含有) に培地を交換して 24 時間血清飢餓を行い、その後、チタンイオン (TiCl₄) を含む無血清の DMEM と交換した。生細胞へのチタンイオン経時的变化の影響を調べるためにその作用時間をそれぞれ 1 時間, 3 時間, 6 時間, 15 時間, 24 時間, 30 時間, 48 時間, 56 時間, 60 時間, 72 時間および 80 時間として培養を行った。なお、培地中のチタンイオン (TiCl₄) は終末濃度 0.2 mM になるように添加した。チタンイオンを作用させた後、無血清の DMEM と交換し 24 時間培養後、上清を回収する。回収した上清は 3,000 rpm, 5 分遠心し、LDH-Cytotoxic Test (和光純薬) を用い細胞障害率を比色測定した。本研究では、上皮細胞の成長因子に対する反応性がマトリックス依存性であるという報告¹⁷⁾ を参考にして、I 型コラーゲンがコートされた 24 穴プレートをを用いた。また、実験は 2 連で行い、結果は平均値で示した。金属イオン経時变化を比較するため、金属イオン無添加の場合をコントロールとして比較した。

3. IL-1 α および IL-8 産生

材料および方法の 2. と同様に、I 型コラーゲンをコートした 24 穴プレートに Ca 9-22 細胞を播種し、100% コンフルエントに達した培養 3 日目のものに対し 24 時間血清飢餓を行った後に、チタンイオン (TiCl₄) の濃度、0.2 mM を含む無血清の DMEM と交換し、1 時間, 3 時間, 6 時間, 15 時間, 24 時間, 30 時間, 48 時間, 56 時間, 60 時間, 72 時間および 80 時間として培養を行った。

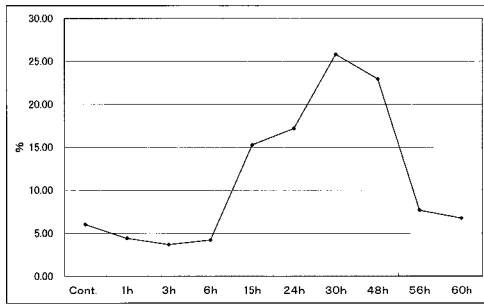
その後、無血清の DMEM と交換し、24 時間後それぞれの培養上清を回収後、IL-1 α 定量用 ELISA キット (BioSource) および IL-8 定量用 ELISA キット (BioSource) を用いて上清中のサイトカイン量を定量した。

成 績

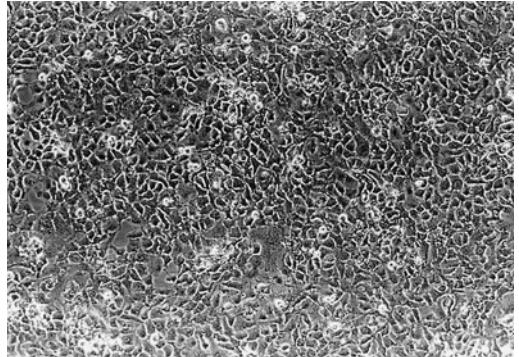
1. 細胞障害率（経時変化）

100%コンフルエントに達した後の Ca 9-22 細胞にチタンイオン (TiCl₄) 0.2 mM 濃度を添加した影響を第 1 図(経時的变化(細胞障害率))に示した。

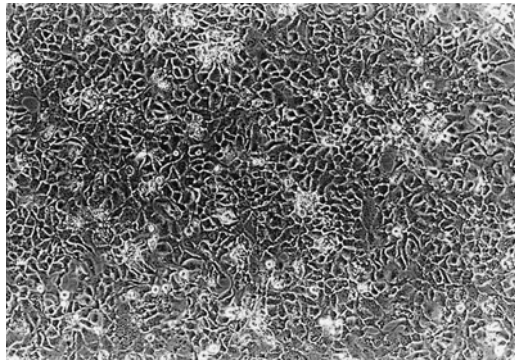
第 1 図では、チタンイオン (TiCl₄) 濃度 0.2 mM, 作用時間 1 時間, 3 時間, 6 時間, 15 時間, 24 時間, 30 時間, 48 時間, 56 時間, 60 時間として培養を行った。60 時間以上では細胞死が起こり細胞数の減少が明白なため細胞障害率は表示していない(細胞状態(図 2~11))。



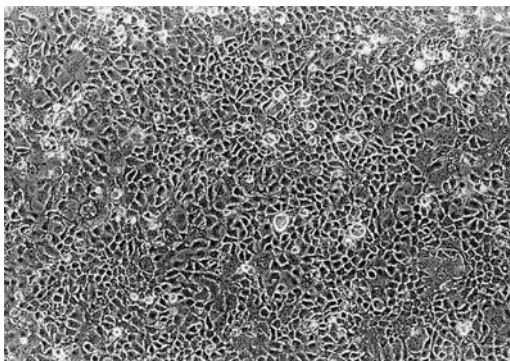
第 1 図 Ca 9-22 細胞の細胞障害率に及ぼすチタンイオンの影響



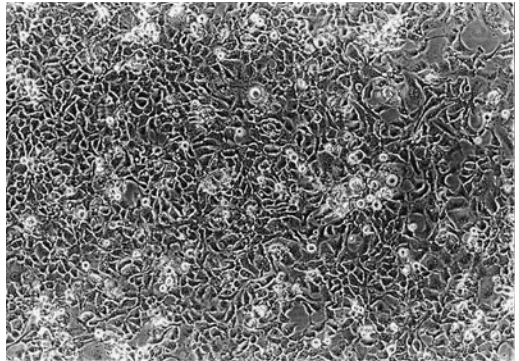
第 3 図 チタンイオン 0.2 mM 1 時間作用させたときの細胞形態



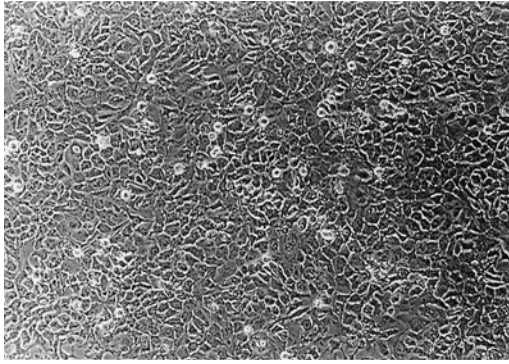
第 4 図 チタンイオン 0.2 mM 3 時間作用させたときの細胞形態



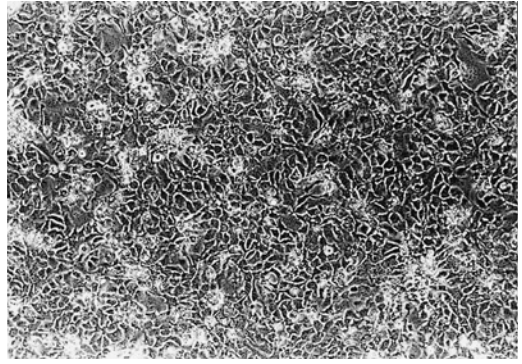
第 2 図 Ca 9-22 細胞 control 形態 (チタンイオン作用時間, 0 分)



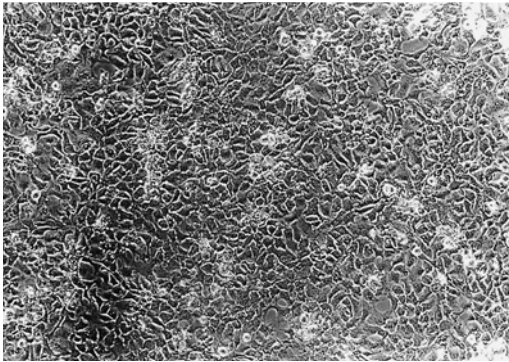
第 5 図 チタンイオン 0.2 mM 6 時間作用させたときの細胞形態



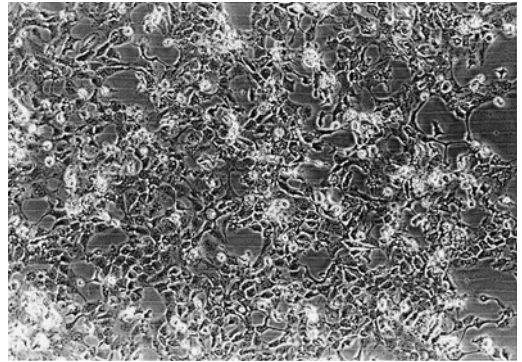
第 6 図 チタンイオン 0.2 mM 15 時間作用させたときの細胞形態



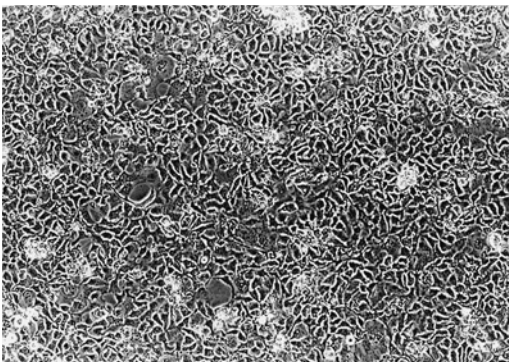
第 9 図 チタンイオン 0.2 mM 48 時間作用させたときの細胞形態



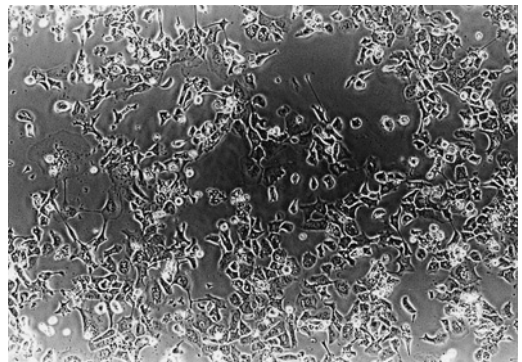
第 7 図 チタンイオン 0.2 mM 24 時間作用させたときの細胞形態



第 10 図 チタンイオン 0.2 mM 56 時間作用させたときの細胞形態



第 8 図 チタンイオン 0.2 mM 30 時間作用させたときの細胞形態



第 11 図 チタンイオン 0.2 mM 60 時間作用させたときの細胞形態

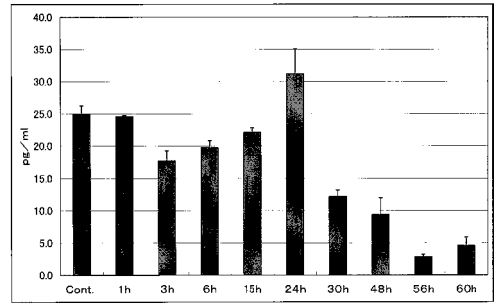
前報¹¹⁾で報告したチタンイオン濃度より半分以下の 0.2 mM であるため、細胞障害率は作用時間 1 時間では 4.39%，3 時間で 3.67%，6 時間 4.18%，15 時間 15.26%，24 時間 17.17%，30 時間 25.80%，48 時間 22.92%，56 時間 7.65%，60 時間 6.74%，72 時間 3.99%，最長の 80 時間では 2.20% であった。

チタン作用時間（0 分，1 時間，3 時間，6 時間，15 時間，24 時間，30 時間，48 時間，56 時間，60 時間）ごとの細胞状態を図 2～11 に示した。コントロールと比較しても，30 時間まではチタンの影響がなく，細胞の萎縮は見られなかった。48 時間から細胞萎縮がおり始め，56 時間では細胞死が起き細胞数が減少し，60 時間では細胞数が極端に減少した。

2. IL-1 α 産生

コンフルエントに達した後の Ca 9-22 細胞の IL-1 α 産生におよぼすチタンイオン (TiCl₄) 0.2 mM 濃度の経時的变化の影響を調べた結果を第 1 表，第 12 図に示した。

Ca 9-22 細胞の IL-1 α 産生におよぼすチタンイオン (TiCl₄) 濃度の経時的变化の影響を調べた結果，コンフルエントに達した後の



第 12 図 Ca 9-22 細胞の IL-1 α の産生に及ぼすチタンイオンの影響

Ca 9-22 細胞の IL-1 α 産生量はチタンイオン (TiCl₄) 濃度 0.2 mM コントロールでは 25.0 pg/ml，1 時間作用させ培養した場合で 24.6 pg/ml，3 時間で 17.8 pg/ml，6 時間で 19.4 pg/ml，15 時間で 22.1 pg/ml，24 時間で 31.2 pg/ml，30 時間で 12.2 pg/ml，48 時間で 9.4 pg/ml，56 時間で 2.8 pg/ml，60 時間で 4.6 pg/ml になった。72 時間以上では細胞萎縮が大であるため測定を行わなかった。3 時間まではコントロールより減少したもののそれ以後 24 時間までは IL-1 α 産生量は徐々に増加した。

3. IL-8 産生

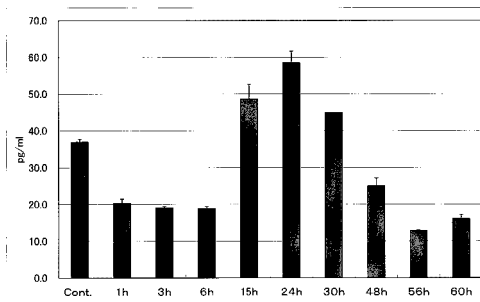
コンフルエントに達した後の Ca 9-22 細胞の IL-8 産生におよぼすチタンイオン (TiCl₄) 濃度の経時的变化の影響を調べた結果を第 2 表，第 13 図に示した。Ca 9-22 細胞の IL-8 産生におよぼすチタンイオン (TiCl₄) 濃度の経時的变化の影響を調べた結果，コンフルエントに達した後の Ca 9-22 細胞の IL-8 産生量はチタンイオン (TiCl₄) 濃度 0.2 mM コントロールでは 36.9 pg/ml，1 時間作用させ培養した場合で 20.3 pg/ml，3 時間で 19.0 pg/ml，6 時間で 18.8 pg/ml，15 時間で 48.7 pg/ml，24 時間で 58.5 pg/ml，30 時間で 44.9 pg/ml，48 時間で 25.0 pg/ml，56 時間で 12.9 pg/ml，60 時間で 16.0 pg/ml になった。6 時間まではコントロールより減少したもののそれ以後 24 時間までは

第 1 表 Ca 9-22 細胞の IL-1 α の産生に及ぼすチタンイオンの影響

作用時間	IL-1 α 量 (pg/ml)		
	平均値		
Cont.	25.2	24.7	25.0
1 h	24.7	24.5	24.6
3 h	18.8	16.7	17.8
6 h	18.9	20.5	19.7
15 h	21.6	22.6	22.1
24 h	28.4	33.9	31.2
30 h	12.9	11.5	12.2
48 h	7.5	11.2	9.4
56 h	3.1	2.5	2.8
60 h	3.6	5.5	4.6

第 2 表 Ca 9-22 細胞の IL-8 産生に及ぼすチタンイオンの影響

作用時間	IL-8 量 (pg/ml)		
	平均値		
Cont.	37.5	36.3	36.9
1 h	21.1	19.4	20.3
3 h	18.7	19.3	19.0
6 h	19.2	18.3	18.8
15 h	46.4	49.5	48.0
24 h	57.6	59.2	58.4
30 h	44.8	44.9	44.9
48 h	26.5	23.4	25.0
56 h	12.9	12.8	12.9
60 h	16.4	15.3	15.9



第 13 図 Ca 9-22 細胞の IL-8 産生に及ぼすチタンイオンの影響

IL-8 産生量は徐々に増加し, IL-1 α 産生量と同じような傾向がみられた。

考 察

歯科用金属には様々な金属が使用されているが, それらの多くは合金として歯科用修復物, 補綴物, 矯正用材料等に使われている。歯科治療の技術の発展にともない歯科用金属は歯の硬組織への局所的修復だけでなく, 歯科インプラントに代表されるような深部組織内に長期埋植する生体材料が使用されるようになった。そのため歯科用金属材料は, 唾液, 血液, リンパ液に接触し, 生体の pH, 体温, 酸素分圧など繰り返

返し荷重負荷をうけ変化し, 金属は溶出し生体に為害作用を引き起こすと考えられる。歯科材料の生体内動態は為害作用と密接に関係するため, その動態を知ることは安全性を考えるうえで不可欠であると思われる。

歯科においてチタンは歯科用インプラント材として優れた実績を有し, 有床義歯, 架橋義歯など欠損補綴材料として幅広く使用されている。そしてチタンはアレルギーを引き起こさないとされてきた。しかし, 近年チタンインプラント材が原因で発症したと思われる金属アレルギーの症例報告が増加しているのも事実である。チタンインプラントを 2 本植立した際, 一年半後同部頬粘膜に白色病変 (扁平苔癬) が見られ, 組織像からも表皮直下に細胞浸潤が見られ症状がした患者や, 顎骨の再建にチタンプレートを使用し痛みを訴えた患者の組織内には慢性肉芽腫性炎が観察され, インプラント周囲特に血管周囲に多くのリンパ球とマクロファージの浸潤があり, この症状のある患者の組織内には金属片沈着を見ることができると報告されている¹⁸⁻²³⁾。口腔内の様々な要因が総補的に起きている可能性があるが, そのメカニズムの一つとして, 金属の一部がイオン化し, これが表皮や粘膜上皮のケラチンなどのタンパクと結合することによって異質のタンパク (抗原) となり, マクロファージなどに取り込まれ, 様々な免疫反応が起り遅延型アレルギーとして発症すると報告されている²⁰⁻²⁶⁾。このようにチタンは生体親和性に優れているとされてきたが, 金属アレルギーの症例報告も多く, チタンが生体内で様々な作用をしていると考えられる。そこで本研究ではチタンについて生細胞への経時的変化を調べた。前報¹¹⁾でチタンの検討を行ったが, チタン濃度を 0.5 mM とし作用時間を 10 分, 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間, 12 時間および 24

時間に設定しチタンイオン高濃度、短時間作用させ培養を行った。本研究ではチタンの影響が遅延型であるという症例報告¹⁸⁻²³⁾もあるため、低濃度 0.2 mM、長時間において測定をした。

生細胞数に及ぼす影響を生細胞障害率の測定には LDH 測定法を用いた。本測定の LDH-Cytotoxic Test は細胞毒性を簡便に測定できるばかりでなく、細胞が細胞膜に障害を受けて細胞から遊離した LDH (乳酸脱水素酵素) 活性を測定することができ、生理活性物質による細胞障害や細胞性免疫による細胞障害、補体依存性細胞障害、抗体依存性細胞障害の他、細胞の生存率にも利用できることからこの方法を用いた。コントロールはチタン作用をしないで無血清培地として培養を行い、上清を回収するまでの 24 時間をさらに無血清培地を交換してある。チタンを作用させた細胞はチタン作用後同様に無血清飢餓状態 24 時間行い、上清を回収し測定を行なった。LDH 活性測定において、コントロールの場合 6.00% の障害率を示し、その後チタン作用時間の細胞障害率はコントロール (作用時間 0 分) と比較して、6 時間までは減少し、15 時間から 30 時間まで細胞障害率は増加した。56, 60 時間以降は再び細胞障害率は減少しているが、細胞形態の図 2~11 からわかるように 56 時間以上は細胞衰退が起こっているようで、プレート内に存在する細胞数が減少しているため、上清中の測定である細胞障害率が減少したと考えられる。これはチタンを長時間作用したために細胞死の誘発起こった可能性が考えられる。チタンの症例報告などから解るように、チタンインプラント装着後数年してアレルギー症状が現れるがその多くが遅延型であり、チタン作用時間を長時間にして観察したが、低濃度では 15 時間以上では細胞障害率が増加し、細胞萎縮が始まる傾向が予期される。48 時間になると細胞形態に作用し細胞死が誘発され 56 時間以上ではプレート内の生細胞数が減少してい

る。前報で高濃度 (0.5 mM) では短時間 (3 時間まで) でコントロールより細胞障害率は低くなり、むしろチタンを微量に含んでいる方がよいように見受けられ、その後細胞障害率が増加している。本測定の場合も、同様に 6 時間まではチタンを含んでいる方がよいような傾向がみられたが、15 時間から徐々に細胞障害率が増加している。前報¹¹⁾の場合、6 時間でチタンの影響が示唆されたが、本研究の場合は 30 時間以上でその影響が現れた。

サイトカイン産生に及ぼすチタンイオンの経時的变化もあわせて検討した。インターロイキン-1 α (IL-1 α) は創傷治癒において重要な役割を果たしており、皮膚の創傷治癒においても、活性化されたケラチノサイトから IL-1 α が放出される。そして、それらが繊維芽細胞やケラチノサイトの増殖、繊維芽細胞のコラーゲン合成およびケラチノサイトのケモタキシスを促進させることが報告されている²¹⁾。本測定でチタンイオンが Ca 9-22 細胞の IL-1 α の産生を促進するかどうか調べた。今回の測定では、チタンイオン (TiCl₄) 濃度 (0.2 mM) 1 時間作用させ培養した場合で 24.6 pg/ml, 3 時間で 17.8 pg/ml, 6 時間で 19.7 pg/ml, 15 時間 22.1 pg/ml とチタンを作用させてから IL-1 α の産生量が減少していく。チタンを含んでいる方がむしろ良い結果が得られていた。その後、IL-1 α の産生量が増えはじめる。24 時間まで IL-1 α の産生量が増加しチタンを異物として反応しサイトカインの産生量が増加したチタンの影響が示唆された。

ついで細胞の IL-8 産生を促進するかどうか調べた。外来の異物の侵入に対して、創傷部位には多数の好中球が遊走してくる。活性化上皮細胞によっても産生される IL-8 は好中球に対する主要な走化性因子 (ケモカイン) の一つであるため^{27,28)}、チタンイオンが Ca 9-22 細胞の IL-8 産生を促進するかどうかを調べた。その

結果, コンフルエントに達した後の Ca 9-22 細胞の IL-8 産生量はチタンイオン (TiCl₄) 濃度 0.2 mM コントロールでは 36.9 pg/ml, 1 時間作用させ培養した場合で 20.3 pg/ml, 3 時間で 19.0 pg/ml, 6 時間で 18.8 pg/ml と IL-1 α の産生量と同様に時間と共に減少した。15 時間から 24 時間と IL-8 産生量は増加してゆく。IL-1 α の産生量より遅い 15 時間から IL-8 産生量が増加したが, IL-1 α の産生量とほぼ同じ様な成績で始めサイトカイン産生量が減少し, その後増加していくという結果が得られた。

チタンイオン低濃度 (0.2 mM), 6~24 時間までは炎症性サイトカイン (IL-1 α) が増加し, それに対処するように上皮細胞の IL-8 産生量も促進させ, 好中球の遊走を即して異物の侵入に対処できる可能性が示唆された。作用時間が長くなると細胞障害率も増加し細胞が衰弱し, 異物に対処できなくなり IL-8 産生量は低下し, 始めに異物の侵入に対処できなくなる。少ない IL-8 産生量になった可能性がある。本研究では低濃度でもある一定時間になるとチタンの影響があらわれた。

以上のことから修復および歯科補綴物由来のチタンイオンによる歯肉上皮細胞への影響は, 長時間チタンを作用させた場合サイトカイン産生を増加させ, 細胞死の誘導をも左右する可能性が示唆された。歯肉および口腔粘膜上皮の創傷治癒時にみられる上皮細胞増殖に対し抑制的に作用する可能性が示唆された。さらにチタン濃度を低濃度にし, 炎症性サイトカインがどの機構で起きているかさらにその影響を詳細に検討する予定である。

本研究の一部は平成 17 年度日本大学歯学部佐藤研究費によって行われたことを付記する。

文 献

- 1) Brune D (1986) Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials* 7, 163-167
- 2) 井上昌幸, 山中秀夫編著 (1993) 歯科と金属アレルギー, デンタルダイヤモンド社, 東京
- 3) 佐藤温重編 (1997) 歯科材料の副作用と安全性, 学健書院, 東京
- 4) John CW (2000) Biocompatibility of dental casting alloys. *Areview J Prosth Dent* 83(2), 223-234
- 5) 五島孜郎, 糸川嘉則 (1994) 生体内金属元素, 光生館, 東京, 155-156
- 6) 不破敬一郎 (1982) 生体と重金属, 講談社, 東京, 52-53
- 7) Bridgewater LC, Manning FC, Woo ES, Patierno SR (1994) DNA polymerase arrested by adducted trivalent Chromium. *J Dent Res* 73(3), 122-133
- 8) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2001) 口腔由来細胞株 (Ca 9-22) の生細胞数および DNA 合成能に及ぼす金属イオンの影響, 研究紀要 日本大学歯学部 (一般教養) 29, 37-44
- 9) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2002) 亜鉛イオンが口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) の生細胞数, DNA 合成能およびサイトカイン産生に及ぼす影響, 研究紀要 日本大学歯学部 (一般教養) 30, 49-58
- 10) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2003) クロムイオンが口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) の生細胞およびサイトカイン産生に及ぼす影響, 日大歯学部紀要 31, 9-16
- 11) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2004) チタンイオンが口腔由来上皮細胞株 (Ca 9-22) の生細胞およびサイトカイン産生に及ぼす影響, 日大歯学部紀要 32, 25-34
- 12) Li J, Ireland GW, Farthing PM, Thornhill MH (1996) Epidermal and oral keratinocytes are induced to produce RANTES and IL-8 by cytokine stimulation. *J Invest Dermatol*, 106, 661-666
- 13) 堀越勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫 (1974) 人の歯肉癌由来の株細胞の樹立 (第一報), 日口腔外科会誌 20, 100-106

- 14) Gamou S, Shimizu N (1987) Change in metabolic turnover is an alternative mechanism increasing cell surface epidermal growth factor receptor levels in tumor cells. *J Biol Chem* 262, 6708-6713
- 15) Hirai M, Gamou S, Minoshima S, Shimizu N (1988) Two independent mechanisms for escaping epidermal growth factor-mediated growth inhibition in epidermal factor receptor-hyperproducing human tumor cells. *J Cell Biol* 107, 791-799
- 16) Hirai M, Shimizu N (1990) Purification of two distinct proteins of approximate Mr 80000 from human epithelial cells and identification as proper substrates for protein kinase C. *Bio Chem J* 270, 583-589
- 17) Dunsomere SE, Rubin JS, Kovacs SO, Dhedid M, Parks WC, Welgus HG Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem* 271, 24576-24582
- 18) Davies RJ, Wang JH, Tringg CJ, devalia JL (1995) Expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8 and RANTES in the bronchial epithelium of mild asthmatics is down-regulated by inhaled beclomethasone dipropionate. *Int. Arch Allergy Immunol* 107, 428-429
- 19) Li J, Farthing PM, Ireland GW, Thornhill MH (1995) IL-1 α and IL-6 production by oral and skin keratinocytes; similarities and differences in response to cytokine treatment in vitro. *J. Oral Pathol. Med.* 25, 157-162
- 20) 井上孝, 秦暢宏, 才藤純一, 下野正基 (2000) インプラントと金属アレルギーの考察, *日本歯科評論*, 101-110
- 21) 細川隆司, 赤川安正 (2002) チタンインプラントも対する金属アレルギーのリスク, *廣大歯誌* 34, 1-5
- 22) 長島義之, 吉永修, 森永博臣, 岡松加恵, 山本勝巳, 森田雅之, 城戸寛史, 松浦正朗 (2004) 他院で埋入後経過不良のためインプラントを撤去した症例の臨床的検討および撤去後の補綴処置について, *日口腔インプラント誌* 17, 31-38
- 23) Katou F, Andou N, Motegi K, Nagura H (1996) Immuno-inflammatory responses in the tissue adjacent to titanium miniplates used in the treatment of mandibular fractures. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 24, 155-162
- 24) Hunt JA, Williams DF (1994) The effect of titanium debris on soft tissue response. *J. mater. Sci.*, 381-383
- 25) Ungersboek A, Geret V, Pohler O (1995) Tissue reaction to bone plates made of pure titanium. —a prospective, quantitative clinical study—, *J materi Sci*, 223-229
- 26) Torgersen S, Moe G, Jonsson R (1995) Immunocompetent cells adjacent to stainless steel and titanium miniplates and screws. *Eur J Oral Sci* 103, 46-54
- 27) Sauder DN, Kilian PL, McLane JA, Quick TW, Jakubovic H, Davis SC, Eaglestein WH, Mertz PM (1990) Interleukin-1 enhances epidermal wound healing. *Lymphokine Rss.* 9, 465-473
- 28) Kupper TS (1990) The activated keratinocyte a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol* 94, 146s-150s