

チタンイオンが骨芽細胞株 (Saos-2) の生細胞および サイトカイン産生に及ぼす影響

横瀬 勝美^{1,2} 桑田 文幸^{1,2}

Effects of titanium ions on cell viability and cytokine production by the human osteosarcoma cell line, Saos-2

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

Abstract

The present study investigated the effects of titanium ions on cell viability and interleukin 1 α (IL-1 α) and IL-6 production by the human osteosarcoma cell line, Saos-2. Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. After culturing cells for 24h, 0.1mM of TiC₄ was added. After incubation for 1, 2, 3, 4, or 5 days, cell viability was assessed by colorimetric assay using a LDH cytotoxic test. In addition, the production of IL-1 α and IL-6 by these cells was examined using specific ELISA kits. The addition of 0.1mM titanium ions did not alter cell viability during 2 days of incubation. However, 0.1mM titanium ions induced cell death after incubation for more than 4 days. The addition of titanium ions had little effect on IL-1 α and IL-6 production by these cells. These results indicate that the addition of 0.1mM titanium ions induces osteosarcoma cell death rather than cytokine production.

Key words: cell viability, IL-1 α production, IL-6 production, osteosarcoma cell, titanium ion

緒 言

歯科治療において歯が喪失した場合、従来では歯科補綴修復物が主流であったが、近年インプラント医療が普及し様々な金属材料や骨補填材としての生体材料の開発が進んでいる。それら金属材料は口腔内で唾液や飲食物などが電解質と作用し、pH変化や各種イオン等によって腐食性変化を生じ、長時間のうちに溶出される

と考えられている。そのため歯科治療で使用されている金属材料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。口腔内にはそれ以外にも、各種の溶出要因が共存しており、歯肉から浸出する体液、食べかすによる電解質の存在、細菌が産出する酸や硫化水素、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の要因がある¹⁻⁷⁾。このような口腔内におけ

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形態部門

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

(受理: 2006年9月29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

る作用を受け、歯科用インプラント金属材料は、長期間埋入され生体との接触は密接であり、局部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。

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、その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、臨床報告も増加している^{2,3)}。イオンプラントに使用されているチタンはフィクスチャーとして歯槽骨に埋め込まれ長期間埋入されているため、口腔軟組織や硬組織に影響を与え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、特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)}。また、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変化を調べた^{11,12)}。本研究では歯科用イオンプラント材に多く使用されているチタンについてヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞 (Saos-2 細胞) への経時的変化を低濃度、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) およびインターロイキン-6 (IL-6)¹³⁾ の産生に及ぼす影響も検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

実験には骨芽細胞として理化学研究所細胞開発銀行から購入した Saos-2 細胞を使用いた^{13,14)}。Saos-2 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 (経時的変化)

生細胞へのチタンイオンによる経時的変化の影響を調べるために、24 穴プレートに Saos-2 細胞 1×10^4 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。Saos-2 細胞播種後、24 時間後にチタンイオン (Ti⁴⁺) を含む DMEM (10%FBS および抗生物質を含有) とチタンイオン無添加の DMEM (10%FBS および抗生物質を含有) に交換した。生細胞へのチタンイオン経時的変化の影響を調べるためにその作用時間をそれぞれ 1, 2, 3, 4, および 5 日間として培養を行った。なお、培地中のチタンイオン (Ti⁴⁺) は終末濃度 0.1 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 3000 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。また、実験は 2 連で行い、結果は平均値で示した。金属イオン経時変化を比較するため、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-6 産生

材料および方法の 2. と同様に、24 穴プレートに Saos-2 細胞を播種後、24 時間後、チタンイオン (Ti⁴⁺) の濃度、0.1 mM を含む DMEM および無添加の DMEM に交換した。その作用時間をそれぞれ 1, 2, 3, 4, および 5 日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-6 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

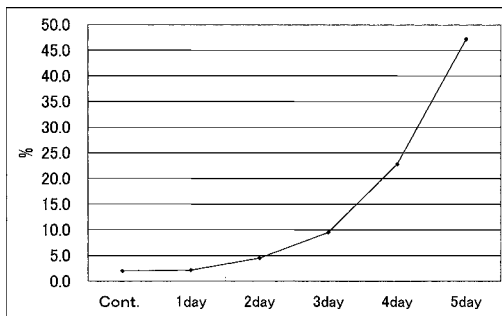
た。

成 績

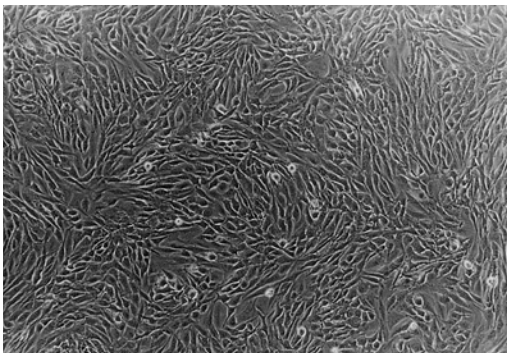
1. 細胞障害率（経時変化）

Saos-2 細胞にチタンイオン (Ti^{4+}) 0.1 mM 濃度を添加した影響を第 1 図（経時変化（細胞障害率））に示した。

第 1 図は、チタンイオン (Ti^{4+}) 濃度 0.1 mM, 作用時間 1 日, 2 日, 3 日, 4 日および 5 日間培養を行った。チタンイオン添加により細胞障害率は、1 日では 2.1%, 2 日では 4.5%, 3 日では 9.5%, 4 日では 22.8%, 5 日では 47.2% であった。細胞障害率は作用時間に依存して 3 日まで僅かずつ増加していき、4 日後では急激に増加した。チタン作用時間（コントロール,

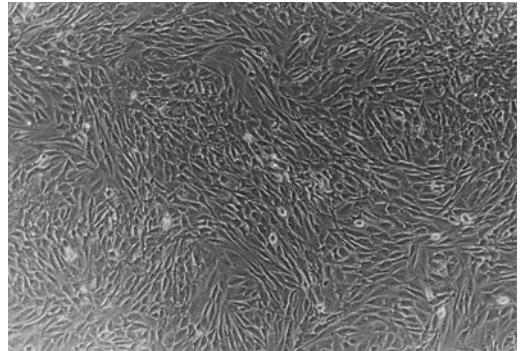


第 1 図 Saos-2 細胞の細胞障害率に及ぼすチタンイオンの影響

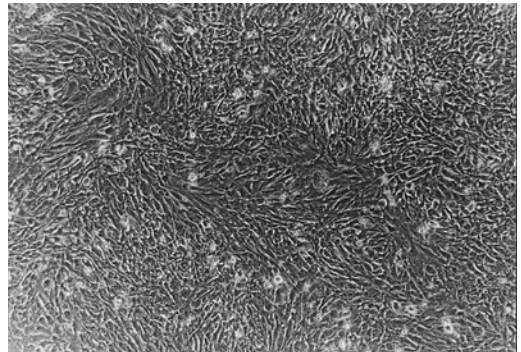


第 2 図 Saos-2 細胞 control 形態（チタンイオン作用時間, 0 分）

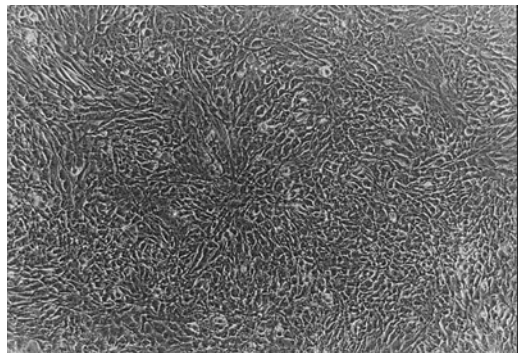
1 日, 2 日, 3 日, 4 日, 5 日) ごとの細胞状態を図 2 ~ 7 に示した。3 日間まではチタンの



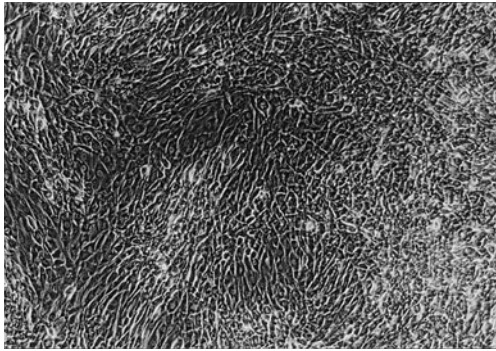
第 3 図 チタンイオン 0.1 mM 1 日間作用させたときの細胞形態



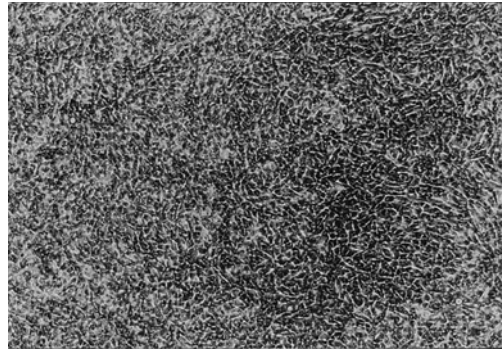
第 4 図 チタンイオン 0.1 mM 2 日間作用させたときの細胞形態



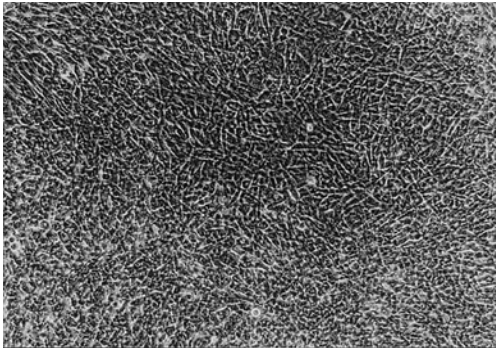
第 5 図 チタンイオン 0.1 mM 3 日間作用させたときの細胞形態



第6図 チタンイオン0.1 mM 4日間作用させたときの細胞形態



第8図 チタンイオン0.1 mM 7日間作用させたときの細胞形態



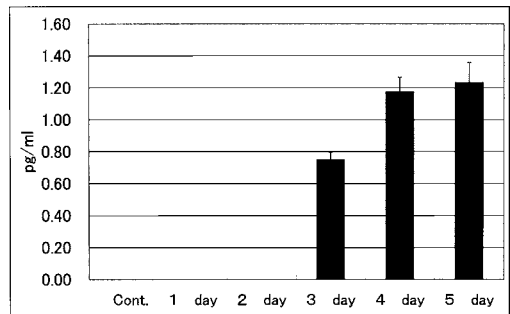
第7図 チタンイオン0.1 mM 5日間作用させたときの細胞形態

影響が少ないが4日間作以後では細胞の萎縮が見られ、5日間ではその萎縮が広がって行き細胞死が起こり、一週間後も継続的に観察したが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（細胞形態，図2～8）。

2. IL-1 α 産生

コンフルエントに達した後の Saos-2 細胞の IL-1 α 産生におよぼすチタンイオン (Ti⁴⁺) 0.1 mM 濃度の経時変化の影響を調べた結果を第1表，第9図に示した。

Saos-2 細胞の IL-1 α 産生におよぼすチタンイオン (Ti⁴⁺) 濃度の経時変化の影響を調べた結果，IL-1 α 産生量はチタンイオン (Ti⁴⁺) 濃度 0.1 mM コントロールでは 0.70 pg/ml 以



第9図 Saos-2 細胞の IL-1 α の産生に及ぼすチタンイオンの影響

第1表 Saos-2 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)		
	測定値	測定値	平均値
Cont.	<0.70	<0.70	<0.70
1 day	<0.70	<0.70	<0.70
2 day	<0.70	<0.70	<0.70
3 day	0.78	0.72	0.75
4 day	1.24	1.11	1.17
5 day	1.32	1.14	1.23

下，1日間作用させ培養した場合で 0.70 pg/ml 以下，2日間で 0.70 pg/ml 以下，3日間で 0.75 pg/ml，4日間で 1.17 pg/ml，5日間で 1.23 pg/ml になった。1日，2日間までは産生量は測定

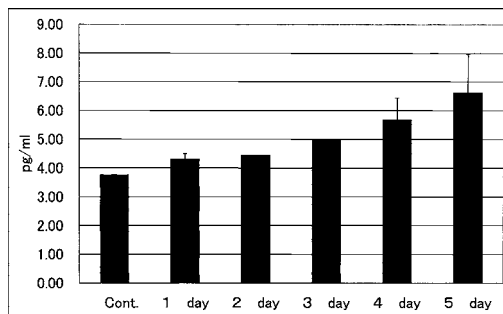
範囲以下あるがそれ以後は徐々に増加した。

3. IL-6 産生

コンフルエントに達した後の Saos-2 細胞の IL-6 産生におよぼすチタンイオン (Ti^{4+}) 濃度の経時変化の影響を調べた結果を第 2 表、第 10 図に示した。Saos-2 細胞の IL-6 産生におよぼすチタンイオン (Ti^{4+}) 濃度の経時変化の影響を調べた結果、IL-6 産生量はチタンイオン (Ti^{4+}) 濃度 0.1 mM コントロールでは 3.76 pg/ml、1 日間作用させ培養した場合で 4.30 pg/ml、2 日間で 4.44 pg/ml、3 日間で 4.99 pg/ml、4 日間で 5.67 pg/ml、5 日間で 6.62 pg/ml になった。時間と共に IL-6 産生量は徐々に増加がみられた。

第 2 表 Saos-2 細胞の IL-6 産生に及ぼすチタンイオンの影響

作用時間	IL-6 量 (pg/ml)		
	測定値		平均値
Cont.	3.76	3.77	3.76
1 day	4.44	4.17	4.30
2 day	4.44	4.44	4.44
3 day	4.99	4.99	4.99
4 day	6.21	5.12	5.67
5 day	7.57	5.67	6.62



第 10 図 Saos-2 細胞の IL-6 産生に及ぼすチタンイオンの影響

考 察

チタンとその化合物は腐食性に優れているためさまざまな医療材料に使用されており、また皮膚病の治療薬、化粧品、食品添加物としても使用されているため、安全性についての試験がいくつかなされている。そして毒性は低いとの報告が数多く成されている¹⁻⁷⁾。しかし、発癌性に関する経気道的暴露実験では、ラットに二酸化チタン (TiO_2) を吸入、暴露した結果、肺癌が検出されたという報告もされている¹⁶⁾。さらに四塩化チタンについても同様な結果が報告されている¹⁷⁾。微量金属は、生体に必須な金属であってもそれ自信や環境化学物質との共存下で発癌性を示し、活性酸素を生成させ DNA を損傷させることにより発癌に関する危険性があると考えられる。その反面微量金属の発癌における防御的作用として、細胞の恒常性を維持すると同時に遺伝子の損傷を修復することにより癌化の抑制に関与している。微量金属が、癌化または癌抑制のどちらに作用するかは、その種類、量および環境化学物質との共存などにより大きく異なるため、DNA 損傷を検出することにより微量金属による発癌の危険性の評価を簡易に行うことは、癌の初期予防に貢献するだけでなく、薬理作用を検証するうえでも非常に重要なことであるといえる。

歯科治療には様々な歯科用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。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が、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、1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など、生体適合性が優れているチタンでも金属アレルギーを引き起こす患者が増え、症例報告がされている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こ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、チタンが生体内で様々な作用をしていると考えられる。

本研究では歯科用金属の中で、近年歯科用インプラント材として使用されているチタンについて検討を行った。前報^{11,12)}では口腔由来上皮細胞株(Ca 9-22)を使用しその影響を検討したが、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⁾もあり、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でもあるため、ヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞(Saos-2)における生細胞数への経時変化およびサイトカイン産生に及ぼす影響について検討を行った。

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1.98%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、1日間、及び2日間まで大きな変化はなく、3日間以降は細胞障害率が増加した。細胞形態の図2~8からわかるように4日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期にして観察したが、低濃度では3日間以降では細胞障害率が徐々に増加し、細胞萎縮が始まる傾向が予期される。4日間になると細胞形態に作用し始め、5日間以上ではプレート内の生細胞数が減少し細胞死が誘発されている。

サイトカイン産生に及ぼすチタンイオンの経時変化にあわせて検討した。インターロイキン-1 α (IL-1 α)は単核球が産生する歯骨細胞刺激因子の主成分であることが明らかにされて以来、IL-1 α の骨代謝・骨疾患との関連が検討されて、最も強力な骨吸収促進因子の1つである。IL-1 α はきわめて低濃度で、ヒト骨髓細胞より歯骨細胞を誘導する作用をもち、更に骨芽

細胞を介して間接的に歯骨細胞の活性化を促進する。一方、IL-1 α はヒト骨芽細胞のDNA合成促進作用を示し、コラーゲン合成に関しては少量で促進、大量で抑制作用を示す。このような作用があるため、チタンイオンがSaos-2細胞のIL-1 α の産生を促進するかどうか調べた。その結果、IL-1 α 産生量はチタンイオン(Ti⁴⁺)濃度0.1mMコントロールでは0.70 pg/ml以下、1日間作用させ培養した場合で0.70 pg/ml以下、2日間で0.70 pg/ml以下、3日間で0.75 g/ml、4日間で1.17 pg/ml、5日間で1.23 pg/mlになった。1日、2日間までは産生量は測定範囲以下であるがそれ以後は徐々に増加した。

しかし、産生量は少なく0.1mMの低濃度ではチタンの添加により、少量ではあるがIL-1 α 産生量があったことを考え併せ、IL-6産生量の測定を行った。IL-6はB細胞刺激因子として純化されたサイトカインであるが、骨芽細胞でも産生され、IL-1 α 、TNF、PTH、などによりその産生が促進され間接的に破骨細胞の活性化をも促進するため、クロムイオンがSaos-2細胞のIL-6産生を促進するかどうかを調べた。その結果、Saos-2細胞のIL-6産生量はチタンイオン(Ti⁴⁺)濃度0.1mMコントロールでは3.76 pg/ml、1日間作用させ培養した場合で4.30 pg/ml、2日間で4.44 pg/ml、3日間で4.99 pg/ml、4日間で5.67 pg/ml、5日間で6.62 pg/mlになった。時間と共にIL-6産生量は徐々に増加がみられた。チタンイオン低濃度(0.1mM)、3日以降、IL-1 α が徐々に増加し、Saos-2細胞のIL-6産生量も僅かずつ増加した。

以上のことからチタンイオンによるヒト骨髄由来の株化骨芽細胞への影響は、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。炎症性サイトカインであるIL-1 α 、IL-

6は破骨細胞性骨吸収の促進作用をもつため、骨吸収サイトカインともよばれていることから、本研究によりSaos-2細胞がチタンイオンにより産生されたIL-1 α 、IL-6が破骨細胞に影響を及ぼす可能性が考えられるため、破骨細胞への影響はさらに詳細に検討する予定である。

謝 辞

本研究の一部は平成18年度日本大学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. *A review 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 arrest by adducted trivalent Chromium. *J Dent Res* 73(1), 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, *日大歯研紀* 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, *日大歯研紀* 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, *日大歯研紀* 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, 日大歯研紀 32, 25-34
- 12) 横瀬勝美, 桑田文幸 (2005) 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 第2報, 日大歯研紀 33, 19-28
- 13) Spyrou p, Papaioannou S, Hampson G, Brandy K, Palmer RM, McDonald F (2002) Cytokine release by osteoblast-like cell cultured on implant discs of varying alloy compositions, *Clin Oral Implants Res* 13, 623-630
- 14) Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell line derived from human tumors, *J Nat Cancer Inst* 58, 209-214
- 15) Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL (1988) Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics, *Dent Clin North Am* 32, 411-435
- 16) Lee K.P., Trochimowicz H.L., Reinhardt C.F. (1985), *Toxicol, Appl. Pharmacol.* 79, 179
- 17) Lee K.P., Kelly D.P., Schneider P.W., Trochimowicz H.L. (1986), *Toxicol, Appl Pharmacol* 83, 30
- 18) Ahing-Hsin K, Dominique P.P, Martin B, Petre J G (2002), Effect of different Ti-6Al-4V surface treatments on osteoblasts behaviour, *Biomaterials* 23, 1447-1454
- 19) 今井敏夫, 岩上徳志, 白川正順 (2003) 骨芽細胞の細胞増殖機構に及ぼすチタンの影響について, *Biomed Res Trace Elements* 14, 374-376
- 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, *広歯誌* 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 mater 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