

PIXE 法による骨固定用金属材料周囲組織の元素分析

— 第六報；家兎モデルにおけるチタン元素含有量について —

中村ますみ、杉山芳樹、石橋 修、関山三郎、二ツ川章二¹⁾、世良耕一郎²⁾

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座
020-8505 盛岡市中央通 1-3-27

¹⁾ 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

²⁾ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

1. はじめに

金属生体材料の人体への影響については、臨床的および材料学的に様々な研究が行われている。当科でも骨固定用金属材料であるチタンに着目し臨床検体を用いて、口腔粘膜、骨膜に対するチタン元素の含有量をPIXE法で測定し検討してきた。しかしながら、骨へのチタン元素の含有量については、臨床検体では十分に検討がなされなかった。そこで、動物実験では、チタン製骨固定用金属材料を日本白色家兎の顎骨に埋入し、埋入期間ごとに皮膚、口腔粘膜、健常骨膜、金属上骨膜、骨を試料として採取し、PIXE法を用いてチタン元素の含有量を測定し検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 実験動物

平均体重 3.5 kg の日本白色雄性家兎を室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ の岩手医科大学歯学部動物舎において 1～2 週間の予備飼育を行い、健康状態を確認したのちに実験を行った。実験期間は、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月とした。飼育試料は、固形試料を自由摂取させ、水は自動給水装置で与えた。なお、チタン製骨固定材料を埋入しない群を control とした。

2.2 埋入材料および埋入方法

埋入は、家兎にネンブタール 30 mg/kg を耳介静脈から注入後、左側頬部から顎下部にかけてバリカン及び脱毛剤で皮膚を露出させた。術野をイソジンにて消毒し、1/10 万エピネフリン含有 1% 塩酸リドカインを術野周囲に湿潤麻酔した。咬筋前方部から下顎骨下縁に沿って前方に約 30 mm の皮膚切開を加え、骨膜まで剥離し骨面を露出した。チタンプレートを咬筋前方部より切歯から 10 mm 後方までの骨側面にスクリューにて固定した。4-0 吸収糸を用いて骨膜、皮膚をそれぞれ縫合し、感染予防としてベンジルペニシリン 3 万単位/day

を生理食塩水 1ml に溶解し大腿部の筋肉内に投与した。

2.3 組織採取方法

組織採取時は、耳介静脈に 10ml の空気を注入し殺伐した後、埋入時と同様の切開を行い、プレートの埋入している部位を確認してから埋入部位に近い皮膚、口腔粘膜を採取した。骨膜、骨は顎角部よりプレート埋入部位を含めて一塊として取り出し、骨膜を採取してから骨よりスクリュー、プレートを除去した。Buehler 社製 Low speed saw を使用してスクリューとプレートの接している部分をブロック状に採取した。さらに Low speed saw でプレート接触部から骨深部へ向かい厚さ 1 mm の骨切片を作製し、同様にスクリュー接触部から水平方向に厚さ 1 mm の骨切片を作製し測定試料とした。なお、実験を行うに際し、使用するチタン製プレート、Ti 製スクリュー、Low speed saw の分析をあらかじめ行い、チタン製プレート、チタン製スクリューはチタン元素が 99.8% 以上の純チタンであり、Low speed saw には、チタン元素が含まれていないことを確認した。

2.4 試料の作製・実験方法

採取した組織は、付着している血液を除去するために生理食塩水で 1 時間攪拌し洗浄を行い、同様の操作を 2 回繰り返した。次に 40°C のホットプレート上で十分に乾燥し、分析用電子天秤を用いて乾燥重量が 5 mg の組織片となるように調整した。テフロン容器を用い乾燥試料 5 mg に対し硝酸 200 μ l と内部標準元素として原子吸光分析用インジウム標準液 5 μ l を加え、電子レンジにて 2 分間加熱後 1 分間放置し、さらに 2 分間加熱した。その後は、そのままの状態です 5 分間自然冷却を行った^{3) ~5)}。次に、試料を厚さ 4 μ m のポリプロピレンフィルム 3 枚に、それぞれ 10 μ l を滴下し、乾燥後に測定試料とした。

3. 結果

3.1 軟組織のチタン元素含有量

実験では埋入期間ごとに日本白色家兎 3 羽を使用し各群の平均をデータとして検討した。下記の表 1 は、各埋入期間の平均値を示した。

表 1 軟組織埋入期間別チタン元素含有量の平均値 (μ g/g)

埋入期間別	n	μ g/g \pm SD			
		皮膚	口腔粘膜	健常骨膜	金属上骨膜
control	3	0	0	0	0
1ヶ月	3	0	0	2.94 \pm 2.82	208.95 \pm 35.95
3ヶ月	3	1.95 \pm 1.71	3.52 \pm 3.34	0	348.11 \pm 316.25
6ヶ月	3	0	14.18 \pm 15.90	4.05 \pm 1.18	126.55 \pm 178.01
12ヶ月	3	3.84 \pm 0.92	3.74 \pm 0.34	5.94 \pm 0.66	47.86 \pm 48.22
24ヶ月	3	3.52 \pm 3.08	4.51 \pm 0.19	3.47 \pm 3.78	10.25 \pm 7.21

表 1 からわかるとおり軟組織では金属上骨膜のチタン元素の含有量が 3 ヶ月で 348.11 μ g/g と最も高値を示し、埋入期間が長くなるほど減少傾向を示している。健常骨膜、皮膚、口腔粘膜では若干の値の差はみられるが比較的同程度の含有量を示し、埋入期間による値の差も少なかった。また、骨固定材料を埋入しなかった群では、チタン元素は検出されなかった。

3.2 スクリュー接触骨のチタン元素含有量

スクリュー接触骨のチタン元素含有量の平均値を下記の表2に示す。骨に接触している部位をS-0とし、1mm水平方向に離れるごとにS-1、S-2、S-3、S-4とした。

表2 スクリュー接触骨埋入期間別チタン元素含有量の平均値 ($\mu\text{g/g}$)

埋入期間別	n	接触部位からの距離 ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)				
		S-0	S-1	S-2	S-3	S-4
control	3	0	0	0	0	0
1ヶ月	3	0	0	0	0	0
3ヶ月	3	0	0	0	0	0
6ヶ月	3	44.78 \pm 30.39	0	0	0	0
12ヶ月	3	21.99 \pm 21.35	0	0	0	0
24ヶ月	3	0	0	0	0	0

スクリュー接触骨では、埋入部位からみると、S-0のチタン含有量が高値を示している。また、埋入期間別ではS-0において6ヶ月で44.78 $\mu\text{g/g}$ と高値を示し、12ヶ月で21.99 $\mu\text{g/g}$ と減少傾向を示し、24ヶ月では、ほとんどチタンは検出されなかった。

3.3 プレート接触骨のチタン元素含有量

プレート接触骨のチタン元素含有量の平均値を下記の表3に示す。骨に接触している部位をP-0とし、1mm垂直方向に離れるごとに、P-1、P-2、P-3とした。

表3 プレート接触骨埋入期間別チタン元素含有量の平均値 ($\mu\text{g/g}$)

埋入期間別	n	接触部位からの距離 ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)			
		P-0	P-1	P-2	P-3
control	3	0	0	0	0
1ヶ月	3	181.69 \pm 251.24	0	0	0
3ヶ月	3	278.09 \pm 161.88	0	0	0
6ヶ月	3	140.96 \pm 93.17	0	0	0
12ヶ月	3	89.36 \pm 105.02	4.28 \pm 5.05	0	0
24ヶ月	3	0	0	0	0

プレート接触骨では、埋入部位からみると、各群ともP-0がどの部位よりも含有量が高値を示している。埋入期間別ではP-0において、1ヶ月で181.69 $\mu\text{g/g}$ 、3ヶ月が278.09 $\mu\text{g/g}$ ともっとも高値を示し、6ヶ月105.72 $\mu\text{g/g}$ 、12ヶ月89.35 $\mu\text{g/g}$ と埋入期間が長期になるにつれ減少傾向を示し、24ヶ月ではチタン元素はほとんど検出されなかった。

4. 考察

以上の結果をまとめると、前回の研究でも示したとおり軟組織では金属上骨膜が皮膚、口腔粘膜、健常骨膜に対しチタン元素含有量が高値を示し、そのピークは埋入期間3ヶ月であった。また、皮膚、口腔粘膜、健常骨膜では、埋入期間に関わらずチタン元素含有量はほぼ同程度の値を示した。これは、臨床材料における結果と同様のものではあった^{1)~2)}。骨組織では、金属に接触している部位におけるチタン元素含有量が高値を示し、プレート接触骨のピークは3ヶ月、スクリュー接触骨のピークは6ヶ月であり、金属から離れた部位からはチタン元素含有量はみとめられなかった。このことから、顎骨にチタン製骨固定金属材料を埋入した場合、骨組織においてチタン元素は金属が接触している部位に流出するが、金属接触部位より深部には蓄積されないこと、また同一固体の金属埋入部位以外の骨組織からは、チタン元素が検出されないことから、軟組織に比べ血流が少ないことによりチタン元素が局所にとどまり全身の骨や軟組織にはほとんど流出しないか、もしくは流出してもごく微量であり検出するまでにはいたらないことが考えられる。また、軟組織では金属上骨膜がチタン元素の流出に大きく関与し、血流を介して他の臓器や全身の軟組織へ移行することが考えられる⁷⁾。

別所らは、チタン元素の組織への蓄積に関する研究で、多臓器へのチタン元素の蓄積量は6~9週がピークと報告している。今回の我々の実験でも、埋入期間別では軟組織、骨組織共に3ヶ月で高値を示す傾向があり、別所らの報告と同様の動態を示すことが示唆された。さらに、埋入期間が長期になるほどチタン元素含有量は減少傾向を示していることから、チタン元素の生体の排泄量が組織への蓄積量より勝ってくることが予想される。

文献

- 1) 杉山芳樹：PIXE法による骨固定用金属材料周囲組織の元素分析。NMCC共同利用研究成果報文集6：111-116, 1998.
- 2) Yoshiki Sugiyama: Analysis of elements in the soft tissue covering titanium plates and screws for internal bone fixation by the PIXE method. International Journal of PIXE: Vol. 9, 305-313, 1992.
- 3) 世良耕一郎：PIXE法の医学・生物学試料への応用。Biomed Res Trace Element 3: 93-94, 1992.
- 4) 二ツ川章二、他：PIXE試料調製法の検討。NMCC共同利用研究成果報文集1：70-81, 1993.
- 5) 石橋 修：粒子励起X線分光法(PIXE法)による口腔健常粘膜の元素分析。日口粘膜誌4：91-100, 1998.
- 6) 和田 攻：必須金属；金属とヒト-エコトキシコロジーと臨床一，第3巻，朝倉書店，東京，26-33, 1992
- 7) Kazuhisa Besho: Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. Journal of Biomedical Materials Research: Vol. 29, 901-904, 1995.
- 8) 畑 秀一：チタン、チタン合金の生体埋入における金属溶出。歯学 85 (3)：455-465, 1997.