

生体における微小領域組織の pH 測定 — ニードル型 pH マイクロセンサー応用の報告 —

川原 一郎^{1,2,3}, 辻本 真⁴, 村上 剛一⁵, 定岡 直^{2,3}, 川原 良美⁵

¹松本歯科大学病院 初診室総合診断科

²松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

³松本歯科大学 公衆衛生学講座

⁴松本歯科大学病院 臨床研修医

⁵松本歯科大学 歯科矯正学講座

pH measurement of tissues in living body

— The trial examination of needle type pH microsensor application —

ICHIRO KAWAHARA^{1,2,3}, MAKOTO TUJIMOTO⁴, GOUICHI MURAKAMI⁵,

SUNAO SADAOKA^{2,3} and YOSHIMI KAWAHARA⁵

¹*Department of Diagnostic and Preventive Dentistry,
Matsumoto Dental University Hospital*

²*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

³*Department of Public Health Sciences, School of Dentistry,
Matsumoto Dental University*

⁴*Clinical resident of Matsumoto Dental University Hospital*

⁵*Department of Orthodontics, School of Dentistry,
Matsumoto Dental University*

Summary

Even today, pH measurement of living tissue in a clinical environment has been difficult. In this study, we succeeded in measuring the pH of living tissue and observing changes over time using an optical fiber coated with a newly developed pH-reactive fluorescent substance.

A standardized hole was made in the rat tibia, Poly Ether Ether Ketone (PEEK) and Commercially Pure (CP)-titanium were implanted, and the pH change was measured after

7 days. As a result, it was confirmed that the pH of the tissue was increased with CP-titanium, in which osseointegration was confirmed, and with PEEK, which imparted surface wettability. In addition, a decrease in pH over time due to tissue damage was also confirmed. From the above, it was confirmed that a needle-type pH microsensors is suitable for measuring the pH of living tissue over time. With this method, the development of new implant materials can be expected.

はじめに

骨内インプラントのオッセオインテグレーションなどの石灰化現象は、組織局所の pH が大きく影響する¹⁾。石灰化は一般には塩基性環境が必要であるが、外科的組織傷害を伴う処置は組織に炎症を惹起させる場合が多く、酸性環境になりやすい²⁾。また、埋入材料となるバイオマテリアルは、材料表面と生体組織との界面の反応によって、pH 変動を起こす可能性が指摘されている³⁾。インプラント周囲組織の pH を適切に調整できれば、インプラント埋入処置の成功率向上ならびにインプラント新素材開発が期待出来る。しかし、生体組織の微小領域の pH 測定は、これまでは生体組織のサンプル採取が必要など、経時的、非侵襲的測定には多くの問題があり、特に臨床的には非常に困難であった。

近年、pH に反応する蛍光物質の生物学的応用

が報告され⁴⁾、また、マイクロファイバーに蛍光物質を塗布した pH 測定機器が販売されている。今回、pH 反応性の蛍光物質が塗布されたニードル型 pH マイクロセンサーを用いて、生体組織に埋入した3種類のインプラント材料周囲組織の経時的な pH 測定を試みた。

材料と方法

< pH メーター >

pH 反応性蛍光物質が塗布された光ファイバー内包の Needle-Type pH Microsensor (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg Germany) を用いた (図 1)。

< 実験動物と実験手法 >

ウイスター系雄性ラット (8 週齢, 体重 200gwt) 8 匹を用い、イソフルラン吸入麻酔下で下肢脛骨側面にドリル孔を作製した。低速回転型エンジン (Bien-Air Dental SA, Bienne Switzerland) に

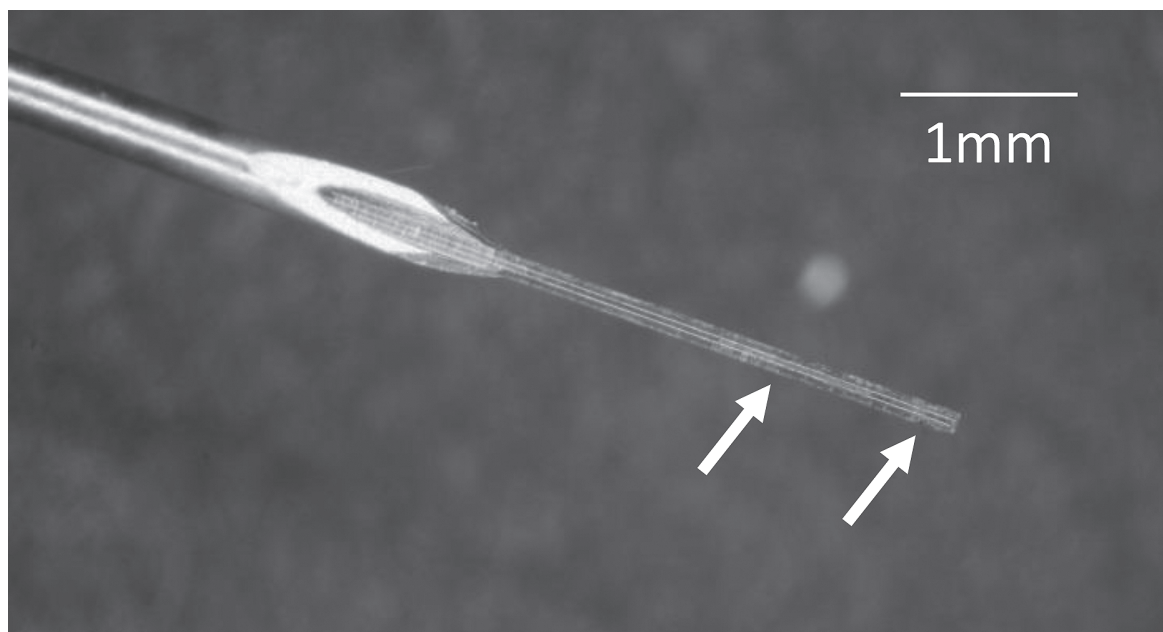


図 1 : The needle-type pH microsensors. Optical fiber coated with fluorescent material including the needle. arrows; Optical fiber coated with fluorescent material

スチール製ドリル (PROXXON No.28855直径0.8mm) を装着, ハンドピースをマニピレーター固定して, 毎分50回転以下の低速回転で間欠的に無注水にて精確に皮質骨を穿孔させた。

<インプラント材料>

直径0.8mm, 長さ2mmの円柱状に加工された表面性状の異なるPEEK材2種類と工業用純チタンの計3種類の材料を用いた。

PEEK (Poly Ethel Ethel Keton) は表面の状態で下記の2種類に群分けを行った。

(1) PEEKを旋盤加工の削り出し面のままとした「PEEK群」。

(2) PEEKをフッ化処理により表面にスルホン基を導入することで, 表面親水性を付与した「PEEK-S群」。

(3) 工業用純チタン「CP-Ti群」。

また, 骨にドリルで穴を開けた「sham hole群」を対照群とした。

< pH測定 >

ドリル孔作製後, 経時的に「直後」, 「24時間

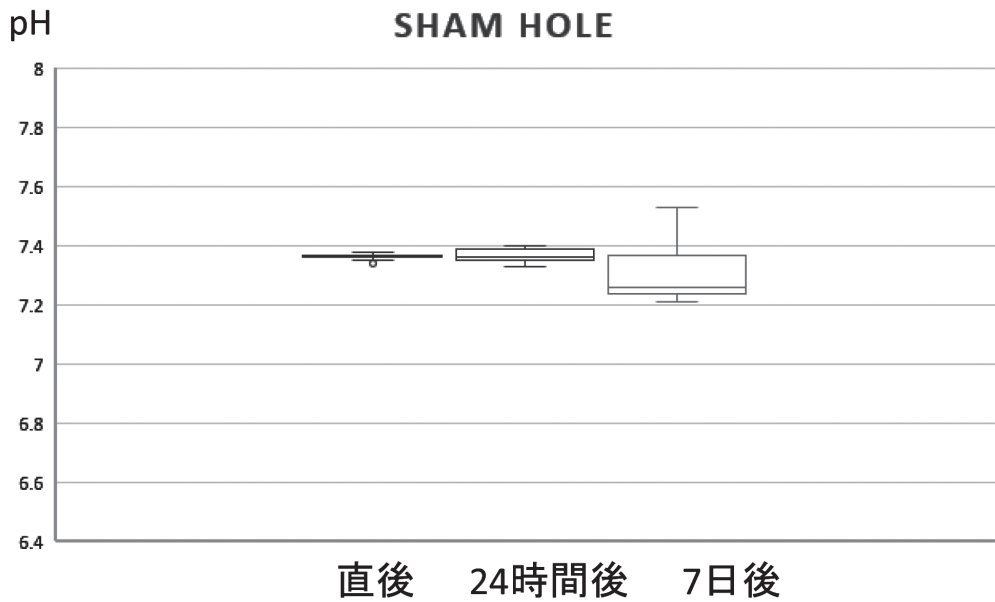


図2 : Change of pH in sham hole tissue, immediately, 24hours, 7 days after drilling

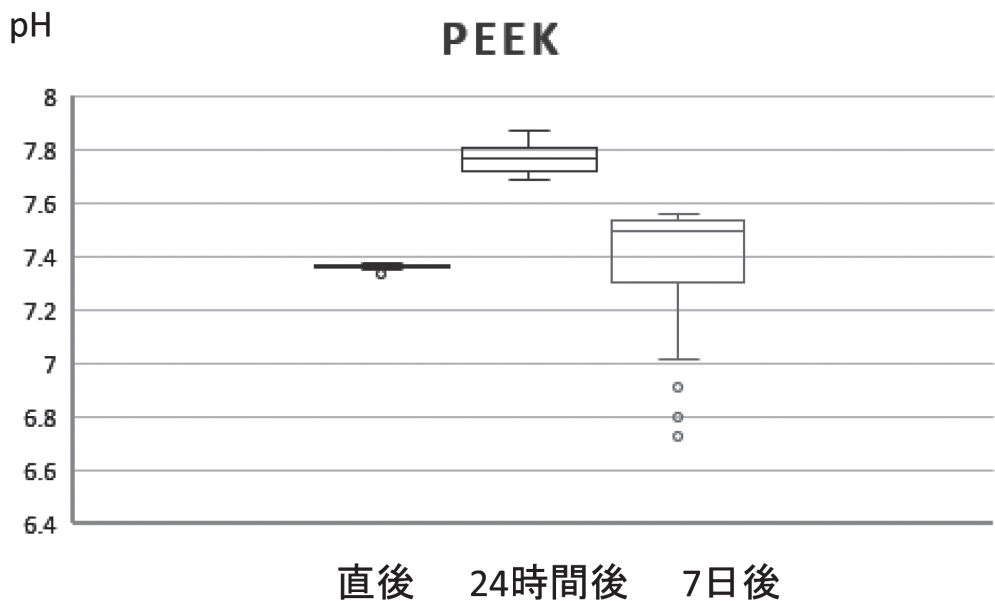


図3 : Change of pH of tissue around PEEK, immediately, 24hours, 7 days after drilling

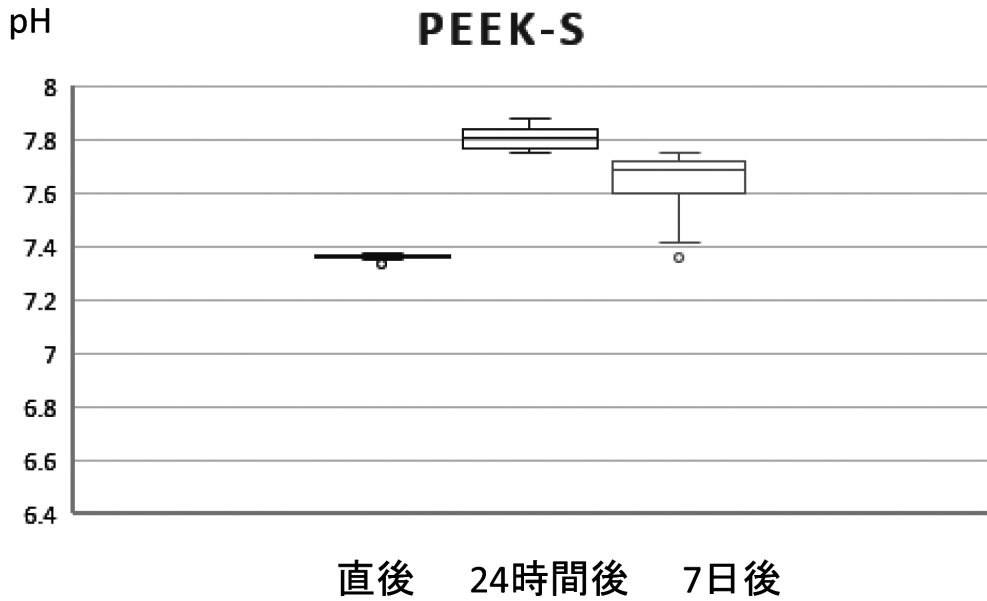


図4 : Change of pH of tissue around PEEK-S, immediately, 24hours, 7 days after drilling

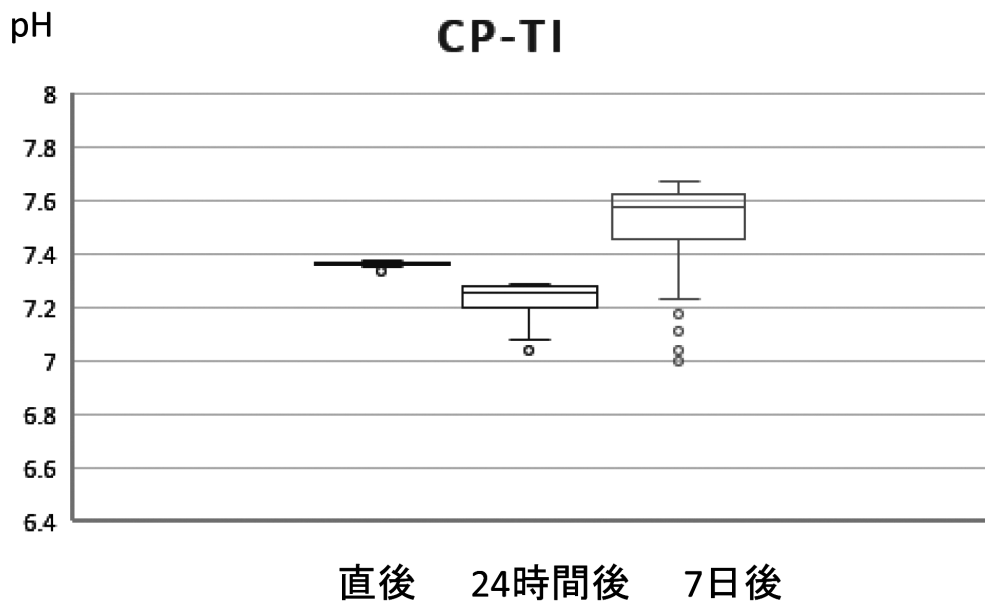


図5 : Change of pH of tissue around CP-Ti, immediately, 24hours, 7 days after drilling

後], 「7日後」にそれぞれの動物をイソフルランによる麻酔下で, 該当部分を開放し, 穿孔内の埋入材料を引き抜いて, pH マイクロセンサーの先端を穿孔に約 1 mm 挿入して pH の測定を行った。pH 測定は30秒間行い, 計測値の安定を確認した。pH 測定後, 穿孔部に埋入材料を戻した。

結 果

sham hole 群は, 穿孔直後で pH7.36を示した。24時間後では pH7.37でほぼ変わらず, 7日後では pH7.3でわずかに低下した (図2)。

PEEK 挿入群では, 挿入直後の pH7.36から24時間後には pH7.77と上昇を示したが, その後低下傾向を示して7日後では pH7.38を示した (図

3)。

PEEK-S 群では、埋入直後の pH7.36から24時間後に pH7.81と上昇し、その後も高値を維持し7日後でも pH7.65を示した(図4)。

CP-Ti 群では、埋入直後の pH7.36から24時間後には pH7.23と低値となるが、その後上昇に転じて7日後では pH7.5を示した(図5)。

考 察

<生体微小領域の pH 測定の意義>

通常、生体の pH (水素イオン濃度指数) の値は、血漿やサンプル採取した組織の測定値であって、生体組織しかも極めて局所の微小領域 pH の測定は報告が見られなかった。

骨と接触するバイオマテリアルは骨成分である水酸アパタイトの結晶体の析出など、局所での pH 状態が極めて重要である¹⁾。骨内インプラントにおいても、オッセオインテグレーションなどの微小領域組織の pH は、臨床的な施術の成否に直結しているものの、その測定は容易ではない。近年、pH 反応性の蛍光物質の蛍光強度を測定することで、精密な pH 測定方法が開発された²⁾。インプラント周囲の微小領域 pH をリアルタイムで測定することにより、新たなインプラント材料の開発や、臨床における現状の精密な把握が可能となるなど、その有用性は大きい。

<ニードル型 pH マイクロセンサーの操作性について>

測定に用いたニードル型 pH マイクロメーターは(図1)、先端が直径約0.1mm であり、直径0.8mm の骨穿孔もしくはインプラント体周囲への組織へ刺入は容易であり、再現性も高かった。

また、pH 値は15~30秒程度で安定し生体に対する負荷は極めて軽微であった。

<埋入材料別 pH の変化について>

一般的に、傷害組織は血流不全による CO₂ の蓄積により pH が低下すると報告されている²⁾。今

回の実験でも、骨穿孔部は直後の pH7.36から7日後では pH7.3と低下を示し、組織傷害部に pH 低下が確認された(表1)。

樹脂である PEEK では、24時間後に上昇を見るが、7日後では pH7.38まで戻っていた。

一方、樹脂の PEEK 表面にスルホン基を導入して親水性を付与した PEEK-S では、24時間後では pH7.81まで上昇し7日後でも pH7.65の高値を維持していた。これまでのインプラント材料研究で、PEEK ではオッセオインテグレーションが確認されていない。今回、PEEK 周囲では pH7.37とほぼ中性域にあったが、PEEK 表面の親水性を付与した PEEK-S では、埋入直後から pH の高値が維持され、7日後においても pH7.65が記録された。PEEK 表面の親水性、もしくはスルホン基導入と pH の上昇の関連性については不明である。しかし、材料表面の親水性は生体組織との親和性を高めるとされており、酸性環境の原因物質である CO₂ を拡散する効果が推察される⁵⁾。

オッセオインテグレーションが確認されている CP-Ti において、24時間後では pH7.23まで低下した。in vitro 実験においてチタン材を浸漬した溶液では、pH 5 まで低下するとした過去の報告がみられ³⁾、一時的な pH の低下は今回の結果においても認められた。しかし、7日後では pH7.5 の高値を示した。CP-Ti は、実験および臨床においてオッセオインテグレーションが確認されている材料であり、pH7.5が石灰化可能な値であれば、PEEK-S が示した pH7.65はオッセオインテグレーション獲得の可能性が考えられる。

PEEK-S は pH 環境においてはオッセオインテグレーションの条件が認められたため、今後の長期的な観察によって組織の石灰化の可能性が期待出来る。

ま と め

ニードル型 pH マイクロセンサーを用いることで、生体微小領域の経時的な pH 測定が可能であった。

純チタンおよび表面親水性 PEEK では、周囲組織の pH 上昇が確認された。

表1 : Average value of pH around of several materials over time after implantation and sham hole tissue

| | 直後 | 24時間後 | 7日後 |
|-----------|------|-------|------|
| Sham hole | 7.36 | 7.37 | 7.3 |
| PEEK | 7.36 | 7.77 | 7.38 |
| PEEK-S | 7.36 | 7.81 | 7.65 |
| CP-Ti | 7.36 | 7.23 | 7.5 |

参考文献

- 1) Parfitt G D (1976) The Surface of Titanium Dioxide. *Progress in Surface and Membrane Science* **11** : 181–226.
- 2) Punnia–Moorthy A (1987) Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Pathol* **16** : 36–44.
- 3) Hench L L and Etheidgh E C (1975) *Adv Biomed Eng* **5** : 35.
- 4) Takahashi S, Kagami Y, Hanaoka K, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Uchiyama M, Honda I, Mizushima N, Taguchi T, Arai H, Nagano T and Urano Y (2018) Development of a series of practical fluorescent chemical tools to measure pH values in living samples. *J. Am. Chem Soc* **140** : 5925–33.
- 5) Wennerberg A, Jimbo R, Stubinger S, Obrecht M, Dard M and Berner S (2014) Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* **25** : 1041–50.