

埼玉大学[院] ○ 橋本季子  
 埼玉大学 森田真史

### 1. 緒言

金属インプラントを使用するにあたっては、体内における金属の毒性について配慮する必要がある。その毒性は金属の状態、すなわち、気体または微粒状粉体、イオンまたは金属化合物、または固体金属（塊）のいずれの状態であるかによって毒性は著しく異なる。これらの状態変化は長年インプラントされて摩擦・摩耗や腐食作用を受けることによって生じ、毒性やアレルギー反応を引き起こす。金属インプラント材料の生体適合性を評価するにあたっては、このような長期埋植を想定した材料の質的变化および腐食産生物の毒性も考慮する必要がある。

生体内に置かれた金属は周囲の組織と直に接触するため、生物学的影響を受ける恐れがある。従来のインプラント金属の耐食性試験は、擬似体液としてRinger液やHanks液中での浸漬試験や電気化学試験が一般的であり、生物の関与については検討されていない。細胞毒性試験も行われているが、金属が細胞に与える影響に視点を置くに止まり、腐食メカニズムに細胞が如何に関与するかを検討するものではなかった。

我々は、本研究において、接着性細胞が金属の腐食を如何に促進するかを明らかにし、金属インプラント材料の生体内腐食メカニズムについて検討した。

### 2. 供試材料および実験方法

#### 2.1 試料の作成

純Ni板(10mm×10mm×1mm)表面を#600～#2000の耐水性研磨紙で鏡面上に用手研磨仕上げしたものを供試材とした。アセトンおよびDDWで超音波洗浄後に20分間蒸気圧滅菌して細胞培養実験に供した。

#### 2.2 細胞

接着細胞としてマウスL929線維芽細胞を、浮遊細胞としてU937ヒト胸腺由来マクロファージ(未分化のもの)を用いた。播種した細胞数は、L929が $5 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1.3 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^4$  cells/well、U937が、 $5 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^4$  cells/wellであった。

#### 2.3 培養条件

10%ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地1mlを12穴プレート(φ20, ファルコン製)に分注して37°C、5%CO<sub>2</sub>ガスインキュベータ内で培養した。

#### 2.4 実験方法

L929細胞を金属表面に播種し、12時間通常の条件で培養し、細胞を金属試験板上に着床させた。その後、A群は新しい培地に交換し通常の培養条件で3日間培養した。B群は12時間後に10%ホルマリンで細胞を固定して生物活性を強制的に停止させた。その後、A群と同様に培地を交換し、3日間培養した。C群はU937浮遊細胞をNi試験片の入った通常の培地で3日間培養した。D群は細胞を含まない培地中で3日間試験片を浸漬した。A～D群の各培地を試験終了後に回収し、溶出したNiイオン濃度をICP発光分析装置(SPS770 Plasma Spectrometer, SEIKO Ins. Japn)を用いて測定した。

### 2.5 SEM観察

実験に供した金属試験片をDDWで洗浄し、付着している細胞を全て除去してSEM観察した。

### 3. 結果

L929の細胞数は試験終了時には $4.5 \times 10^5$ ( $5 \times 10^5$ )、 $3.9 \times 10^5$ ( $1.0 \times 10^5$ )、 $2.2 \times 10^5$ ( $5.0 \times 10^4$ )、 $5.7 \times 10^4$ ( $1.0 \times 10^4$ ) cells/wellに、U937は $5 \times 10^5$ ( $5 \times 10^5$ )、 $2.5 \times 10^5$ ( $1.0 \times 10^5$ )、 $1.3 \times 10^5$ ( $5.0 \times 10^4$ )、 $8.3 \times 10^4$ ( $1.0 \times 10^4$ ) cells/wellに変化した。ただし、カッコ内は播種密度である。U937細胞は順調に増殖したが、L929細胞は増殖は緩慢か、逆に細胞数が減少したものもあった。

Fig.1に接着性細胞(L929)と浮遊性細胞(U937)の細胞密度の違いによるNi溶出量を示す。浮遊細胞のNi溶出量は密度依存性が見られるものの、細胞密度が $5 \times 10^5$  cells/wellでもNi溶出量は20ppm以下であった。一方、接着性細胞では播種細胞数 $5 \times 10^5$  cells/wellで200ppmのNiが溶出し、肉眼でも金属表面の光沢が消失腐食痕が確認された。しかし細胞密度が $1.7 \times 10^5$  cells/well以下ではNiの溶出は5ppm以下であり、金属腐食における接着性細胞の関与は顕著ではなかった。浮遊細胞C群またはネガティブコントロールであるD群の金属溶出傾向と有意の差は認められなかった。

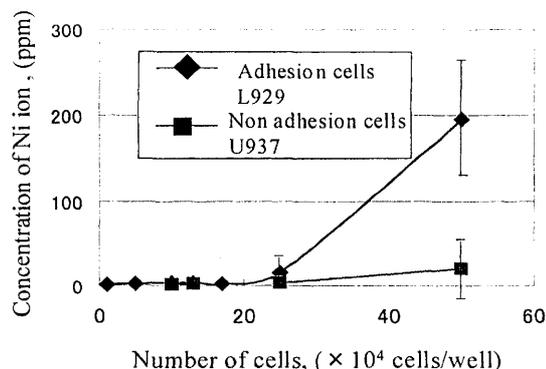
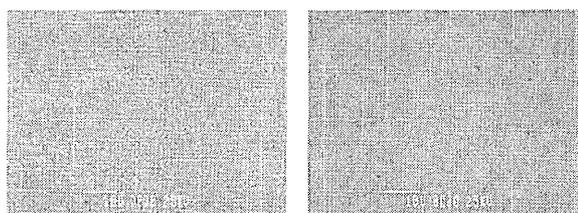


Fig.1 Ni ion release changes associated with two different types of cells

Fig.2は実験終了後に金属表面をSEM観察した結果である。A)は $5 \times 10^5$  cells/wellで播種し、3.5日間細胞培養した後の金属表面である。実験開始直後から、ほぼ全面が細胞で覆われた。個々の接着細胞はおおむね直径が10 $\mu$ mの紡錘形であり、腐食孔はそれに対応し、全面



A) L929 cells were adhered on the metal surface for 3.5 days.

B) Metal plate was immersed in the culture medium for 3.5 days.

Fig.2 SEM images of corroded surface of pure Ni plates by living adhesion cells

に孔状腐食痕が存在した。B)は試験前の表面の状態である。表面粗さRaは0.1 $\mu$ m程度で鏡面状を保った。

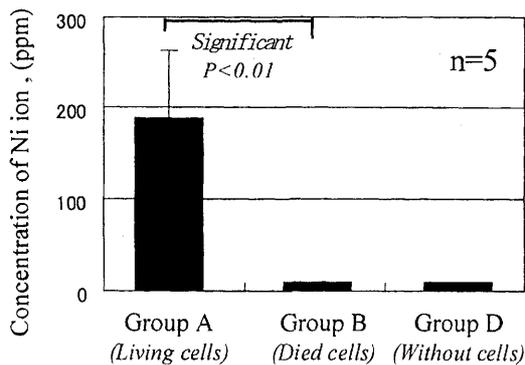


Fig.3 Ni ion release changes by the adhesion cells with or without of the biological activity

L929 adhesion cells,  $5 \times 10^5$  cells/well, were cultured in Groups A and B. No cells were included in Group D.

Fig.3は生きたL929接着性細胞(A群;細胞密度 $5 \times 10^5$  cells/well)と金属に接着した時点で細胞をホルマリン固定して生物学的活性を失わせたL929接着性細胞(B群;細胞密度 $5 \times 10^5$  cells/well)、および細胞を含まない培地中に浸漬したD群における金属イオン溶出量を示す。B群は細胞密度の多少にかかわらず、Niの溶出量は3 ppm以下であった。また、D群の溶出量と有意の違いはなかった。一方、A群の高細胞密度( $5 \times 10^5$  cells/well)では200 ppm近く溶出し、B群、D群と有意に異なった。

#### 4. 考察

##### 4.1細胞密度と腐食

Fig1の接着細胞と浮遊細胞による金属イオン溶出量およびFig.2のSEM像の比較から、接着性細胞でNi溶出が著しいことが明らかになった。金属の表面に細胞が接着することによって腐食が促進されることが確認された。また細胞密度が高ければそれだけ細胞と金属との接触頻度が高くなるので、Ni溶出量は細胞密度に依存すると考えられる。

##### 4.2細胞の生死と金属の腐食

Fig.3より、生きた細胞で金属溶出が促進され、死細胞及び細胞を含まない培地では腐食促進作用が認められなかった。このことから、生きた細胞が産生する何らかの生理活性物質が金属の腐食に深く関与していると考えられる。特に生きた接着性細胞で腐食が著しいことから、接着性細胞のみが分泌するFibronectine等の接着性因子、あるいは多くの細胞から分泌される生理活性物質や代謝産物が金属との接触部で局所的に高濃度になり腐食を促進する可能性もある。ホルマリン固定された接着性細胞はこのような生理活性物質や代謝物質を産生しないので、細胞接着があっても金属の腐食は起こらなかったと考えられる。

Clarkら<sup>1)</sup>、Brownら<sup>2)</sup>の研究で、腐食は体液中のAlbuminによって促進されていると指摘している。この実験でもAlbuminを含むFBS(ウシ胎児血清)入り培地を用いた。Albuminが腐食の主たる原因物質なら、細胞なしの条件でも腐食が促進されるはずであるが、Fig.1から顕著な腐食は認められなかった。このことから腐食を促進するのはAlbuminよりも生きた接着性細胞の関与が大きいと推察される。

##### 4.3金属の腐食メカニズムと細胞毒性の発現

細胞毒性が発現する過程において生物が介在する金属腐食のメカニズムを解明することは、その金属の生体適

合性を評価する上で重要である。

我々の実験結果から推定された金属の腐食メカニズムと細胞毒性の発現を説明するとFig.4の如くである。

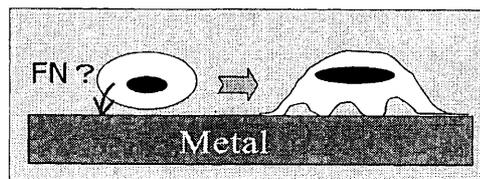
生きた接着性細胞(A群)にのみ金属の腐食促進作用が確認されたことから、金属溶出促進を引き起こす物質が分泌され、溶出した金属イオン濃度がシャーレ中である閾値レベルの濃度に達した時点で細胞は損傷を受けるか、死滅すると思われる。その閾値濃度は金属の種類とイオン溶出量によって異なる。イオン濃度がそれ以下であれば毒性は発現しない。個々の細胞が分泌する腐食促進物質の生産量は一律であると考え、一連の金属溶出量とその細胞密度の関係を説明しやすい。

##### 4.4インプラント金属の細胞毒性試験のあり方

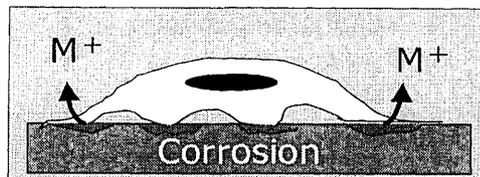
今回、我々が得た金属の耐食性に及ぼす接着性細胞の関与に関する知見は、従来広く行われてきた生体材料の生体適合性評価のあり方を見直す必要があることを示唆している。すなわち、細胞の種類や播種密度など培養条件によって同じ試験材料であっても、その毒性の発現に違いのあることが確認されたためである。

#### 5. 結語

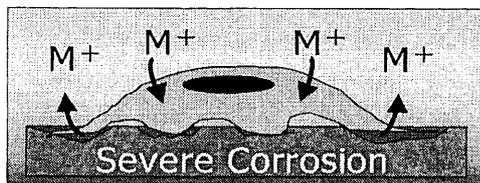
本研究から、浮遊細胞よりも接着細胞で腐食が促進されることが明らかになった。その接着性細胞は、細胞が生命活動を行っている(生きている)時、金属の耐食性低下を引き起こすこした。またそれは細胞密度が、ある一定以上で耐食性の低下が顕著であった。



Stage 1 Cell growth factors or adhesion substances are secreted from the living cells. Then, the cells can be contacted and adhered through on the metal surface.



Stage 2 Metal ion release is promoted by the cells. Cell toxicity is not yet appeared, because of the low level of metal ions.



Stage 3 Cells are killed by themselves to take the metal ions and/or the metal corrosion products in the cells. The amount of the corrosion products, which appear the toxicity, is depending on the metal. Cell toxicity is appeared in this step.

Fig.4 Appearance of the adhesion cell toxicity on the metal surface.

#### 謝辞

本研究の一部は平成15-16年度科研費(基盤研究C 14580830)の助成を得て行われたことを付記する。

#### 参考文献

- 1) Clark GCF, Williams DF: The effect of protein on metallic corrosion. J. Biomed. Matter. Res, 16, 125-134 (1982).
- 2) Brown SA, Merriit K: The effect of serum proteins on corrosion rates in vivo. Avd. Biomatter, 4, 195-202 (1982).