

## 1 はじめに

生体材料としての金属材料は体内で不動態化し耐食性を得ている。医療用金属材料の耐食性と生体親和性は表裏一体をなすので、不動態膜の損傷は材料の強度劣化を引き起こすのみならず、溶出した金属イオンは毒性やアレルギーなど生体異物反応の原因になる。このような金属腐蝕に起因する事故事例は臨床医家により多数報告されている。医療用金属材料は開発段階で細胞毒性試験や動物実験等によって体内での安全性は十分に確認されているはずである。しかし、それに反して臨床使用では耐食性、安全性に疑問を持たざるを得ない事例が後を絶たない。この不一致の主な原因は、体内における腐蝕の環境が *in vitro* 系の試験評価に正しく反映されていないためであると考えられる。従って、体内腐蝕の原因（特に金属表面に付着した **Biofilm** の成熟と細胞間の情報伝達機構の構築による活性化）を明らかにすることが医療用金属材料の信頼性を向上させるための最重要課題である。

## 2 方法

接着細胞（L929 マウス線維芽細胞およびU937 ヒト胸腺由来マクロファージ）を用いた **Biofilm** の金属腐蝕に対する関与を確認するために、次の方法でアノード分極電圧を測定した。

### (A) **Biofilm** の作成と溶存酸素濃度の測定

**Biofilm**/金属表面間の隙間に閉じ込められた体液、**Biofilm** 内部の溶存酸素濃度を測定した。

実際の金属との付着隙間は微小であり、直接溶存酸素を測定することができないので、測定可能なアクリル製の等価セルを作成して、培地の容量を 0.1~3ml で溶存酸素濃度を測定して容積 1  $\mu$  l 時の溶存酸素濃度の減少速度、平衡濃度を外挿して濃度を推定した。（図1）

### (B) 隙間容積の測定と溶存酸素濃度拡散に関する数学モデルの作成

細胞の焦点接着面積をノーマルスキー微分干渉顕微鏡で測定し、接着点の個数と配置を定量する。細胞単体で接着している場合、および複数細胞が細胞間接着した場合の溶液中の溶存酸素濃度の経時変化を細胞接着面積、代謝活性をパラメータとする拡散方程式を基調とした数学モデルを作成し、濃度と金属の電位貴化現象を観察した。

## 3 結果および考察

### 3-1. **Biofilm** による溶存酸素濃度の低下

培地AとBの溶存酸素濃度の変化を図2に示す。培地Aは大気に開放されているために細胞により消費された酸素は外部から供給されその平衡状態が 5mg/L であった。一方、培地Bは酸素救急が無く、2mg/L で平衡に達した。培地Bの容積を少なくすると速く平衡状態に達した。

### 3-2. 溶存酸素濃度拡散に関する数学モデル

3-1の培地Bの酸素消費速度より細胞1個あたりの酸素消費速度は、 $1.11 \times 10^{-9} \mu\text{g/s/cell}$  であった。細胞接着

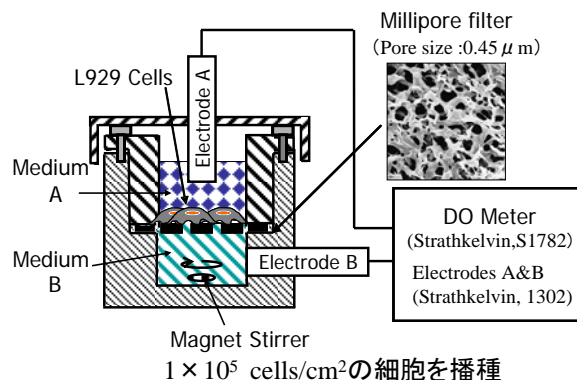


図1 接着細胞の酸素消費量の測定

表面間隙はレーザー光（波長 408nm）による干渉縞観察の結果、最も厚い部分で 400nm 程度であることが実測された。以上の結果から、図 3 の如く、金属表面に接着した細胞コロニーの側面から供給される酸素量はコロニーで吸収される酸素量と等しくなるまでを酸素供給可能領域、それ以下を供給不可（十分な酸素供給がなされない）領域としてコロニー成長度（Biofilm の大きさ）と接着間隙の酸素濃度の低下の有無を検討した。

酸素供給はコロニーの外側と接着間隙中央の濃度勾配で生じる拡散によって賄われるとし、以下の式で酸素供給量を推定した。

$$J = -D_{O_2} \frac{dC}{dx}$$

$$= -D_{O_2} \frac{C_0}{d/2}$$

$$C = C_0 (x = 0), C = 0 (x = d/2)$$

…………… (1)

ただし、溶存酸素拡散係数  $D_{O_2}$  を  $1.27E-5 \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  とした。図 4 は (1) 式より推定した酸素供給能の推定結果である。コロニー径が  $200 \mu\text{m}$  以下であれば酸素供給は可能であることが分る。それ以上の大きなコロニーであると酸素供給能が酸素消費量を下回り、いずれはコロニー中心部において酸素欠乏状態に陥ることが推察される。過去の研究<sup>2)</sup>において、細胞を分散させて接着した場合、金属溶出が微量であったこと、非接着細胞では顕著な金属溶出が確認されなかったこと、さらに、隣接する細胞に細胞間接着が観られるときに顕著に金属溶出が認められたことと、本研究の接着細胞の酸素消費によってもたらされる溶存酸素濃度の変化と良い一致をみた。以上の結果より、インプラント金属の体内腐食機構として、図 5 に示す Biofilm による酸素濃淡電池形成が推定できる。 $200 \mu\text{m}$  以上のコロニーに成長した Biofilm の接着面間隙は溶存酸素の補給が絶たれ、酸素濃度が  $2.0 \text{mg/L}$  以下に低下する恐れがある。その低溶存酸素濃度域がアノード極、非接着面がカソード域となつて、その間に酸素濃淡電池が形成され、アノード極から金属が金属イオンとして溶液に溶け出すために、金属は腐食すると考えられる。

#### 4. おわりに

Biofilm 形成により、同一金属表面上で溶存酸素濃度の高低が生じ、腐食が促進される可能性がある。

#### 5. 文献

- 1) 金属の腐食・防食 Q&A、腐食防食協会編、丸善、2002.
- 2) M.Morita, et al, Mat.Trans., 48(3), pp352-360, 2007.

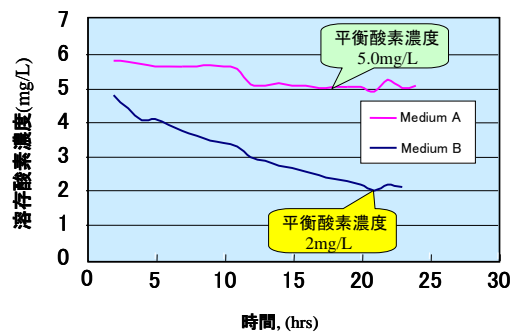


図2 接着性細胞(L929)の溶存酸素濃度 (Medium A と B 容積 3ml)

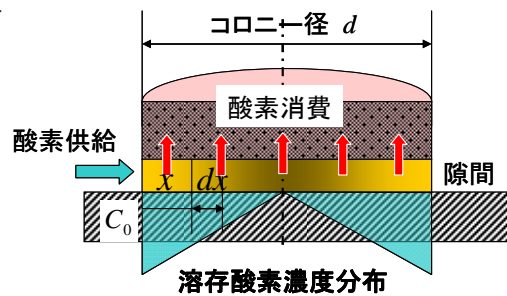


図3 接着間隙の酸素供給モデル

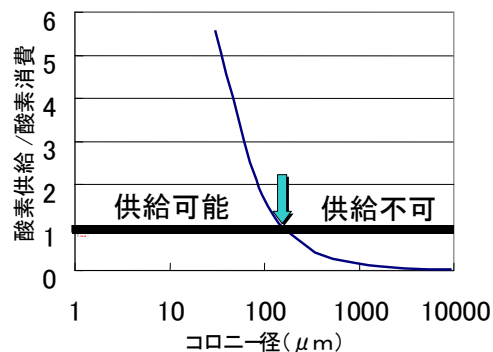


図4 Biofilm 下の酸素供給能

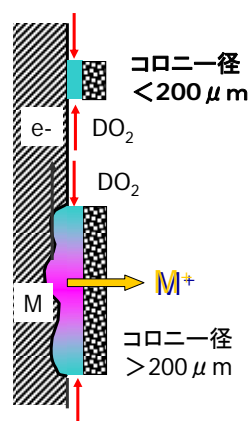


図5 酸素濃淡電池