

## 606 マクロファージの共存による腐食挙動の加速と金属粉による細胞毒性

工学院大学[院] ○中山美樹 工学院大学[工] 木村雄二  
 埼玉大学[工] 森田真史

## 1. 緒言

現在の整形外科領域において、関節炎疾患などにより関節機能が損傷を受けたとき、人体の関節部と同等な関節機能に代替するなどの治療法が多く見られ、その中の一つが人工関節である。人工関節の国内市場は全体で500~600億円程度と小さいが、高齢者の増加により、今後も2ケタ成長が見込まれる。その中でも、人工股関節の市場規模は人工関節全体の約6割を占め、様々な人工関節の中で最も需要が多く、変形性股関節症、先天性脱臼などの手術に用いられている。人工股関節は、耐摩耗性や耐腐食性、耐疲労性などが必要とされるため、様々な金属材料の生体材料の使用が検討されている。しかしながら、摺動部分やステム部分で生成される微小摩耗粉や、使用されている金属材料からの溶出イオンが人体に与える影響が懸念されている<sup>1)</sup>。本研究では、現在使われている生体材料を中心に人工股関節の摺動部分などの摩耗を想定し、そこから発生する摩耗粉や金属材料からの溶出イオンの細胞毒性を擬似生体環境内において比較検討することを目的とした。

## 2. 供試材料及び実験方法

## 2-1. 供試材料

供試材料として、以下に示した平均粒径の金属粉末による生化学的な細胞毒性と粒子の存在による物理的な意味での細胞毒性を評価するために金属イオンが溶出しない蛍光ビーズを使用した。

金属粉末は今まで生体材料として、汎用されていたSUS316Lの構成元素であるNi、Mo、ならびに現在多く使用されているTi-6Al-4Vの構成元素であるTi、Al、Vを使用した<sup>2)</sup>。金属粉、蛍光ビーズの粒径は、細胞毒性評価のために本実験で使用したマクロファージ(以下MΦ)が病原菌などの異物を細胞内に取り込み消化する(以下貪食)ことができると報告されている<sup>3)</sup>10μm以下のものを使用した。

金属粉末:	蛍光ビーズ:
• Ni [3 μm]	• 平均粒径 0.75 μm
• Ti [10 μm]	• 平均粒径 4.5 μm
• Al [3 μm]	• 平均粒径 10 μm
• Mo [3 μm]	
• V [10 μm]	

## 2-2. 細胞培養及び試料投与

ヒト由来MΦをシャーレー(培養面積190mm<sup>2</sup>)に加え細胞密度を5.0×10<sup>5</sup> cell/mlに調節した。

各粉を濃度による細胞毒性を評価するために10ppmから10<sup>4</sup>ppmの間で濃度を調節した。この試料液をMΦが存在する溶液に1mlずつ投与した。投与してから、37℃、5%CO<sub>2</sub>の環境下で48時間実験を行った。

## 2-3. ICPによる金属粉のイオン溶出量の定量

実験後、各金属粉を含んだ試料液を、遠心分離機で10分間、60rpmで粉体と溶液を分離し、上澄み液を各濃度、1mlずつ回収した。各試料に対して、ICP測定を行ない、イオン溶出量を算出した。

## 2-4. 遊離LDH測定による細胞膜損傷度評価

実験後の各濃度の試料液を回収し、遊離LDH(乳酸脱水酵素)測定法を用い遊離したLDHの活性値を測定した。遊離LDH測定法とは細胞膜が破壊されることによって、細胞内に存在するLDHが、細胞外部へ遊離した量を測定することにより細胞膜の損傷を測定する方法である。細胞膜損傷度を測定するため、以下に示す(1)式を用いた。

$$D = \frac{\text{Objective LDH av.} - \text{Negative cont. LDH av.}}{\text{Positive cont. LDH av.} - \text{Negative cont. LDH av.}} \times 100^{(1)}$$

Objective LDH av.は、試料をMΦに投与した実験群のLDH活性値、Positive cont LDH av.は、MΦを力学的に全破壊したときのLDH活性値、Negative cont LDH av.とは培養液のみを加えた実験群のLDH活性値を表す。

## 2-5. 蛍光ビーズの粒径サイズによるMΦ細胞膜損傷度

粒径サイズのみによる細胞膜損傷度を求めるために遊離LDH測定を行った。

## 3. 結果及び考察

## 3-1. ICPによる細胞投入前後の金属イオン濃度測定

細胞投入前後の金属粉から溶出した各金属イオン濃度を定量した結果を、Fig.1に示した。

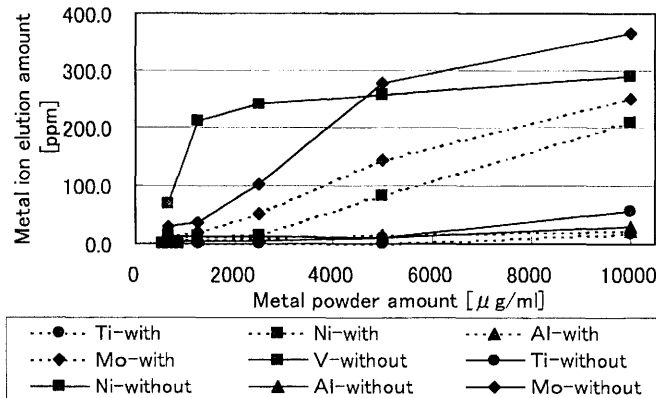


Fig.1 Amount dissolved metal ion detected by ICP

Fig.1から各金属ともに細胞を投入した場合、イオン溶出量が増える傾向が見られた。このことから、金属イオンの溶出には細胞による貪食の影響が考えられる。

溶液中ではTiO<sub>2</sub>の不動態皮膜形成によりTiイオンを溶出しにくいTiにおいても他の金属と同様に溶出イオンが増加していることから、細胞の貪食により金属の腐食が促進されると考えられる。

## 3-2. 各金属の遊離LDH測定による細胞膜損傷度評価

各金属各濃度の遊離LDH活性値による細胞膜損傷度を測定した。各金属濃度の細胞膜損傷度結果をFig.2に示した。

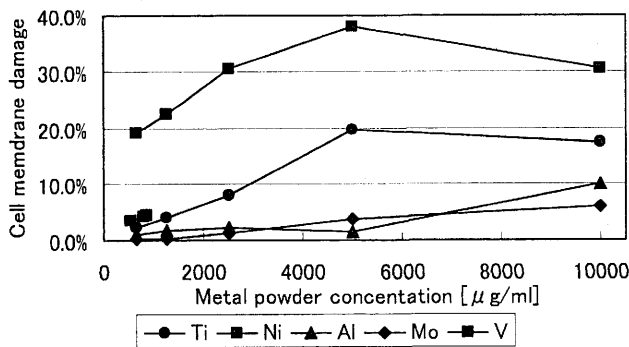


Fig.2 The degree of cell membrane damage caused by each metal powder determined by LDH measurement

Fig.2 から、Ni の細胞膜損傷度が特に高かった。これは、Ni イオンの溶出自体が多かったこと、細胞毒性が他の金属イオンに比べ Ni イオンの方が強いことによるものだと考えられる。

今回の実験では、Fig.1 から溶出イオン量が多かった Mo において細胞膜損傷度が低かったことから、Mo イオンの細胞毒性は低いことが考えられる。

### 3-3. 蛍光ビーズの粒径サイズによる MΦ細胞膜損傷度表評価

蛍光ビーズの濃度を一定として、粒径サイズによる MΦ細胞膜損傷度の影響及び形態学的に観察を行った。

各粒径蛍光ビーズの細胞膜損傷度を Fig.3 に示す。

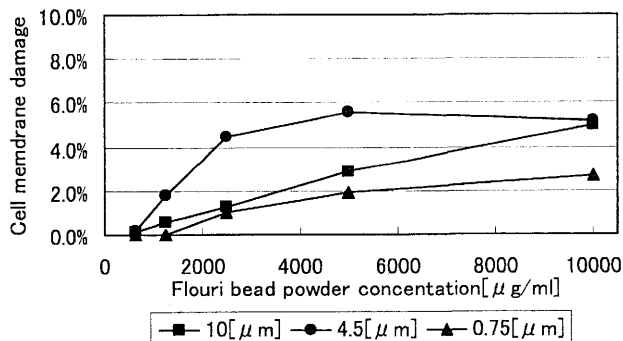


Fig.3 The degree of cell membrane damage caused by Fluorescence bead determined by LDH measurement

Fig.3 より、溶出イオンが発生しない材料粒子(蛍光ビーズ)においても生体内においては異物と認識され、溶出イオンだけでなく、粒子の存在自体にも、物理的な意味での細胞毒性があることが明らかとなった。

また、蛍光ビーズの粒径が変化しても細胞膜損傷度にあまり変化が見られなかった。

MΦが貪食できる粒径では、粒径の違いによる細胞膜損傷度はほぼないといえる。これは、溶液中において粒径は小さいほど凝集しやすいため、この凝集したものが本実験で用いた最も大きい 10 μm と同等の大きさになり、これを MΦが貪食したためだと考えられる。

Fig.2 および Fig.3 から、蛍光ビーズによる金属イオンが出ない場合では細胞膜損傷度があまりなかったことがわかった。このことから、金属粉の細胞膜損傷度は金属イオンに依存していることが考えられる。

### 3-4. 金属イオンの に依存した細胞毒性の差異

3-3.までの結果を踏まえ、さらに金属イオンのみによる細胞損傷度評価を行った。Fig.4 に各金属イオンを一定にした条件下で求められた細胞毒性の評価を示す。

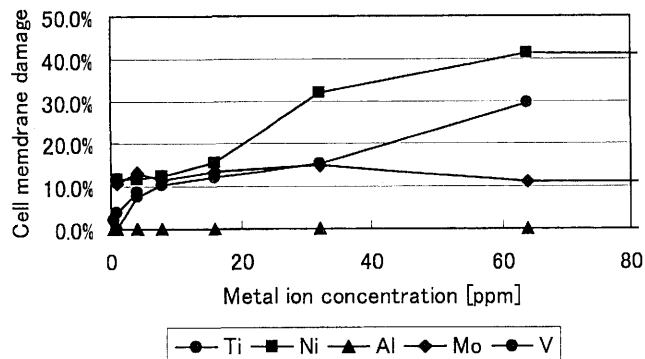


Fig.4 Cell toxicity due to dissolved metal ion

金属イオンのみでも、細胞膜損傷がおきており、イオンに対する依存性が存在するもののその損傷度は高いことがわかった。このことにより、金属粉の存在による細胞膜に対する損傷は金属イオンに起因していることが明らかとなった。

## 4. 結言

現在使われている生体材料を中心に人工股関節の摺動部分などの摩擦を想定し、そこから発生する摩擦粉や金属材料からの溶出イオンの細胞毒性を擬似生体環境内において比較検討した結果、以下の事柄が明らかとなった。

各金属とも、細胞が貪食した場合、イオン溶出量が増える傾向が見られた。

溶液中では TiO<sub>2</sub> の不動態皮膜形成により Ti イオンを溶出しにくい、Ti において細胞の貪食によりイオンが増加している。

Ni の細胞膜損傷度が特に高かった。

溶出イオンが発生しない材料粒子(蛍光ビーズ)においても生体内においては異物と認識され、溶出イオンだけでなく、粒子の存在自体にも、細胞毒性があることが明らかとなった。

また、蛍光ビーズの粒径が変化しても細胞膜損傷度にあまり変化が見られなかった。

MΦが貪食できる粒径では、粒径の違いによる細胞膜損傷度はほぼないといえる。これは、溶液中において粒径は小さいほど凝集しやすいため、この凝集したものが本実験で用いた最も大きい 10 μm と同等の大きさになり、これを MΦが貪食したためだと考えられる。

蛍光ビーズによる金属イオンが出ない場合では細胞膜損傷度があまりなかったことがわかった。

金属イオンが存在する場合のみでも、細胞膜損傷はおきており、その損傷度は高いことがわかった。このことにより、金属粉の細胞膜損傷度は金属イオンに起因していることが明らかとなった。

## 参考文献

- 1) 本間貴昭, NiTi 形状記憶合金の生体適合性評価と表面改質による同特性の改善, (2003).
- 2) 宮島勝郎, 日経 B P 社, 日経バイオ最新用語辞典, 806, (2003).
- 3) 筏義人, 東京出版, 生体材料学, (1994).