Co-29Cr-6Mo 合金の細胞に及ぼす影響

沼田 泰子¹ 首藤 文榮¹ 野村 直之² 千葉 晶彦²¹岩手大学地域連携推進センター²岩手大学工学部

J. Japan Inst. Metals, Vol. 70, No. 2 (2006), pp. 142-145

© 2006 The Japan Institute of Metals

Effects of a Co-29Cr-6Mo Alloy on Cultured Cells

Yasuko Numata¹, Bunei Syuto¹, Naoyuki Nomura² and Akihiko Chiba²¹Center for Regional Collaboration in Research and Education, Iwate University, Morioka 020-8551²Department of Welfare Engineering, Faculty of Engineering, Iwate University, Morioka 020-8550

We evaluated the biocompatibility of cobalt-29 chromium-6 molybdenum alloy by analyzing disorders of the membranes of cells of the murine fibroblast L929 line. L929 cells were incubated with 10% fetal bovine serum at 37°C for 7 days in Eagle's minimum essential medium in the presence of either an extract of this alloy, or titanium extract, or vanadium ions. No morphological changes in the cells were observed in medium containing cobalt-29 chromium-6 molybdenum alloy extract or titanium extract, but a remarkable change was observed in the medium containing vanadium ion as a positive control. From the enzyme activity of the culture supernatant we determined the amount of lactate dehydrogenase (LDH) that leaked through the cell membranes. The amount that leaked from cells incubated in the presence of either of the metal extracts or vanadium ion decreased on day 1 and then increased with incubation time from day 2 onward. There was only a small increase in leakage in the media containing the metal extracts but a marked increase in the medium containing vanadium ion. These results indicate that the cell membrane remained nearly unaffected by Co-29Cr-6Mo alloy.

(Received October 20, 2005; Accepted December 26, 2005)

Keywords: cobalt-chromium-molybdenum alloy, lactate dehydrogenase activity, membrane disorder, cell cytotoxicity, biocompatibility

1. 緒 言

近年、材料研究の進展に伴い、インプラントとして生体に適用する医療用金属材料の開発が進んでいる。最近開発された Co-29Cr-6Mo 合金は、機械的特性と耐食性に優れ、アレルギー性が問題となっている Ni もほとんど含んでいないことから、生体材料としての使用が検討されている¹⁾。しかし、Co-29Cr-6Mo 合金の生体への適用においては、生体適合性評価が必要である。

インプラント材は、生体に対し高い適合性を有することが必要であることから、種々の試験法により生体適合性評価がなされている。その中で、細胞レベルの適合性試験法として、JIS 規格による金属系インプラント材料の細胞適合性評価方法²⁾および厚生省ガイドラインによる医療用具の細胞毒性試験³⁾がある。これらの評価法は、金属材料存在下で特定の株化細胞を培養し、細胞の生死をもって金属材料の生体適合性の判定基準にしている。規格に基づく評価法とは別に、インプラント材の細胞毒性については、既に多くの研究報告があるが⁴⁻⁸⁾、細胞膜性状の変化に関するものは少ない。

細胞がインプラントに接触した際、最初にその影響を受けるのは細胞膜である。インプラント材との接触により細胞膜の構造が変化すると、細胞内への情報伝達系や細胞内からのシグナル分子の放出機構に乱れが生じ、細胞機能がかく乱さ

れると考えられる。また、その影響が細胞の裏打ち構造に及ぶ場合は、細胞の形態学的変化が予想される。

そこで本研究では、はじめに Co-29Cr-6Mo 合金に接触することにより引き起こされる細胞の形態学的変化を観察し、ついで LDH の遊離を指標にして、細胞膜機能の微細変化を解析し、これらの結果をもとに Co-29Cr-6Mo 合金の細胞に及ぼす影響について検討した。

2. 実 験 方 法

細胞: 細胞は L929 細胞(NCTC clone 929 大日本製薬より購入)を用いた。

試薬: 細胞培養に用いた Trypsin-EDTA 液(0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na)および PBS(-)は GIBCO 社のものを使用した。LDH 発色試薬は、promega 社の CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay を使用した。

金属サンプル: 粒径が 600-710 μm のビーズ状の Co-29Cr-6Mo 合金(ASTM F-75)(化学分析組成を Table 1 に示す)および同形状の純 Ti を使用した。金属はあらかじめメタノー

Table 1 Chemical composition (mass%) of ASTM F-75.

	Co	Cr	Mo	Ni	C	Si	O	N
ASTM F-75	Bal.	28.45	6.06	0.16	0.26	—	0.0028	0.0018

ル, 純水, PBS で洗浄して実験に用いた. バナジウムは, バナジウム標準液(米国 SPEX 社製 ICP 用バナジウム標準溶液)を使用した.

培地: 培地は, E-MEM 培地に, ウシ胎児血清を 10% となるよう添加したものをを用いた(MEDIUM13 MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE'S MP Biomedicals, Inc).

金属培地の調製: 金属の容積が 5.0 mL になるように洗浄した Co-29Cr-6Mo 合金(24.84 g)または純 Ti(13.78 g)を秤取りし, 50 mL の遠心管に入れ, 121°C, 15 分間オートクレーブにて滅菌した. 予め 37°C に温めておいた E-MEM + 10% FBS 培地を 25 mL 加え, 37°C の恒温水槽で 30 分間振盪抽出を行い, 上清を抽出液として採取した. この抽出液を便宜上 100% 抽出液と呼ぶことにする. 100% 抽出液を E-MEM + 10% FBS 培地で 2 倍段階希釈して抽出液の含有比がそれぞれ 50, 25 および 12.5% の培地を調製し, 試験に使用した. また, 細胞毒性陽性対照として, バナジウムを培地中に最終濃度 1 ppm となるよう添加し, 同じく 37°C の恒温水槽で 30 分間振盪したものを調製した. 試験には, 無希釈の 1.0 ppm の他に, E-MEM + 10% FBS 培地で希釈して 0.1, 0.3 および 0.5 ppm に調製したものを使用した.

細胞培養: 培養には, 25 mL フラスコおよび 96 ウェルプレートを使用した. 液体窒素中に凍結保存しておいた L929 細胞の懸濁液を 37°C で融解し, 培地を加えて 1×10^4 個/mL になるように調整した. この懸濁液 5 mL を 25 mL フラスコに移して 37°C で培養し, 細胞がコンフルエントな状態になるまで増殖させ, 以下の操作を行った. フラスコから培養上清を可能な限り取り除き, PBS(-) 5 mL を加えて細胞を洗浄した. 洗浄後, 0.05% トリプシン-EDTA 液 2 mL を加え, 37°C に 1 分間静置して, 細胞をフラスコ壁から分離

した. 直ちに 8 mL の培地を加え, 1000 min^{-1} , 3 分間遠心して細胞を集め, トリプシン-EDTA を除いた. 細胞を 10 mL の培地に再浮遊し, 再度遠心洗浄した. 洗浄した細胞を培地に懸濁して, 5×10^4 /mL の細胞懸濁液を調製し, 96 ウェルプレートに, 1 ウェルあたり 200 μL ずつ分注した. 約 6 時間培養して細胞がウェルに接着していることを確認し, 培地を金属培地と交換した. 対照群は, 金属処理していない通常の培地と交換した. 試料は 24 時間毎に各試験区から採取した. 培養上清を可能な限り採取し, 漏出 LDH の活性測定に供した. 上清を取り除いたウェルに H_2O 100 μL を加えて, ピペットでよく攪拌混合し, CO_2 インキュベータ内に 1 時間静置して細胞を低浸透圧で破裂させた. これを細胞溶解液とした. また, 細胞の形態的な変化は, 倒立位相差顕微鏡(Nikon ECLIPSE TE2000-U)で経目的に観察した.

LDH 活性測定: 採取した培養上清または細胞溶解液 50 μL とり, 発色試薬 50 μL を添加して室温で 30 分間, 遮光状態で発色反応を行った. 反応終了後, 反応停止液 50 μL を加え, H_2O で 3 倍に希釈して 490 nm の吸光度を測定した. なお, LDH の漏出量は以下の式により算出した⁹⁾.

$$\text{LDH 漏出量}(\%) = (\text{LDH 試験群培養液} - \text{LDH 対照群培養液}) / (\text{LDH 総活性} - \text{LDH 対照群培養液}) \times 100$$

3. 実験結果および考察

3.1 細胞の増殖と形態的变化

L929 細胞を 96 ウェルプレートに, 1 ウェルあたり細胞数が 1×10^4 個となるよう播種し, 1-7 日間培養した. その中で, 培養 1 日目および 3 日目の細胞形態を Fig. 1 に示す.

培養 1 日目, 対照群では, 播種した細胞はウェルに接着

Fig. 1 Morphological change of L929 cells during incubation with or without metal. After 24 hours incubation; (a) control, (b) Co-29Cr-6Mo alloy extract, (c) Ti extract, (d) 1.0 ppm of vanadium ion in the medium. After 72 hours incubation; (e) control, (f) Co-29Cr-6Mo alloy extract, (g) Ti extract, (h) 1.0 ppm of vanadium ion in the medium. After 168 hours incubation; (i) control, (j) Co-29Cr-6Mo alloy extract, (k) Ti extract, (l) 1.0 ppm of vanadium ion in the medium.

し、ほとんどの細胞が線維芽細胞特有の紡錘形に変化している (Fig. 1(a)). Co-29Cr-6Mo 合金培地および Ti 培地においては、対照群に近い形態変化を示していた (Fig. 1(b), (c)). これに対し、バナジウム 1.0 ppm 培地では、ほとんどの細胞が接着はしているものの球形のまま、線維芽細胞の形態になっていないものが多い (Fig. 1(d)), 図には示していないが、バナジウム濃度が低くなると、紡錘形に変化した細胞の数が多くなった。

培養 3 日目、対照群では、細胞は増殖して重なり、上層の細胞は球形に見えるほどの増殖を示している (Fig. 1(e)). Co-29Cr-6Mo 合金培地ではやや細胞の重なりが少ないように見えた (Fig. 1(f)). Ti 培地では対照群とほぼ同様の増殖を示していた (Fig. 1(g)). これに対し、バナジウム 1.0 ppm 培地では、細胞はほぼ単層であり、同時に、巨大細胞の出現が認められる (Fig. 1(h)). バナジウム濃度が低くなると、対照群との差が小さくなり、巨大細胞の出現も濃度が低下するにつれて少なくなった。

培養 7 日目、Co-29Cr-6Mo 合金培地および Ti 培地においては、細胞は対照群と同程度の増殖を示していた (Fig. 1(i), (j), (k)). バナジウム 1.0 ppm 培地では増殖抑制および細胞の肥大化が見られた (Fig. 1(l)). また、図には示していないが、バナジウム 0.1, 0.3 および 0.5 ppm の培地においても、程度の差はあったが増殖抑制と細胞の肥大化が見られた。

これらの結果は、Co-29Cr-6Mo 合金は光学顕微鏡レベルで識別できるほどの形態変化は引き起こさないことを示している。

3.2 細胞膜の変化

採取した培養上清および細胞溶解液の活性から算出した LDH の相対的漏出量 (%) を、Fig. 2 に示す。Co-29Cr-6Mo 合金培地では、初めに僅かな抑制が見られ、その後微弱な上昇傾向が持続する (Fig. 2(a)). したがって、Co-29Cr-6Mo 合金は、光学顕微鏡で形態的に識別することはできないレベルで、細胞膜構造に微細な変化を引き起こしている可能性があるが、最終的に溶出される LDH は 1.3% 以内の増加にとどまっていることから考えると、その影響は極めて小さいと推測される。また、生体適合性が高いとされている Ti についてみると、Ti 培地では (Fig. 2(b)), 12.5% を除いて、7 日間を通して対照群との間に大きな差は見られない。12.5% Ti 培地における上昇の理由は、現時点では不明である。これに対し、陽性対照のバナジウム培地 (Fig. 2(c)) では、培養初期 (1 day) にはバナジウム濃度が高いほど LDH の漏出が強く抑制され、培養 2 日以降は、逆に濃度が高いほど漏出量が増加し、1.0 ppm では 5 日以降急激に増加する。その他の濃度においても、6 日以降は増加が見られ、7 日間の培養で、最終的には 0.1 ppm では 7.5%、1.0 ppm では 18.3% に相当する LDH の溶出増加が見られた。このことは、細胞毒性を有するバナジウムイオンは、細胞膜にも障害を与えることを示している。

生体にインプラントが埋め込まれると、それに接触した細胞は死に至るほど強い影響を受ける場合もあれば、生体に二

Fig. 2 Relative LDH activity leaked from the cells incubated with metal or metal ion. (a) Co-29Cr-6Mo alloy extract, (b) Ti extract, and (c) vanadium ion.

次的な反応を引き起こす生理活性物質を放出する場合もある。したがって、安全性の高いインプラントを開発するためには、素材の細胞に対する作用を毒性で判断することに加えて、細胞膜機能の障害性についても評価することが必要であろう。

4. 結 論

Co-29Cr-6Mo 合金は、L-929 細胞において、光学顕微鏡レベルで識別できるほどの形態的变化を引き起こさない。ま

た, LDH の透過性を大きく変えるような細胞膜機能の変化も引き起こさない。

この研究は, 文部科学省都市エリア産学官連携促進事業「高機能・高生体適合性 Co-Cr-Mo 合金の創製」の研究費により実施されたものであります。関係各位に深謝の意を表します。

文 献

- 1) A. Chiba: Biomaterial **23** (2004) 107-113.
- 2) K. Hiraga: JIS T 0301Kinzokukeiinnpurantozairyou nosaibou-

- tekigouseihyoukahouhou (2000).
- 3) Kouseisyou Yakumukyoku Iryoukikikaihataka kanshuu: Iryouy-ougu oyobi iyouzairyou no kisotekina seibutugakutekisikenn no gaidorainn 1995 kaisetsu (1996).
- 4) M. A. Germaina, A. Hattona, S. Williamsb, J. B. Matthews, M. H. Stonec, J. Fisherb and E. Inghama: Biomaterials **24** (2003) 469-479.
- 5) A. Katzer, S. Hockertz, G. H. Buchhorn and J. F. Loehr: Toxicology **190** (2003) 145-154.
- 6) A. Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda and T. Hanawa: Mater. Sci. Eng **C24** (2004) 737-743.
- 7) M. Hanson and D. Lobner: Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop **126** (2004) 65-70.
- 8) T. Rae: j.bone.jt.surg **57-B** (1975) 444-450.
- 9) Nihonn Biyougakkai henn: Saibou tokisikorojii sikennhou (1991).