

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11651

研究課題名(和文) 次世代型生体吸収性ハイドロキシアパタイト表面被覆Mg合金の骨内変化に関する研究

研究課題名(英文) Intraosseous Changes in Next-Generation Bioabsorbable Hydroxyapatite Surface-Coated Magnesium Alloys

研究代表者

野添 悦郎 (NOZOE, Etsuro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：40208351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体吸収性を有するMg金属を用いた新しい骨接合デバイスの開発をめざし、申請者らが開発に関わったMg金属を含む骨接合材に適したMg金属の検索と金属表面にHA被膜を施した効果について検索することを目的に、ラットの左右大腿骨骨髓内に径1.5×長さ3mmの5種類のMg金属を埋入した。観察方法は、単純X線による経時的観察ならびに摘出した試料についてμCT撮影ならびにトルイジンブルー染色を行った非脱灰研磨標本について観察評価した。その結果、Mg金属の種類によって、その腐食吸収過程は異なっていた。HA被膜の有無による腐食過程への影響は、埋入初期に水素ガス発生を抑制する所見がうかがわれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体吸収材料は生体内に留置した材料の摘出が不要となることが最大の利点であり、口腔顎顔面領域でもその開発が望まれる。

本研究では、Mg金属の生体吸収性を有する骨接合材料開発を目指して、5種類のMg金属をラット大腿骨に埋入し骨内変化を観察するとともに、Mg金属の腐食・吸収に際しての水素ガス発生のコントロールを期待してHA被膜の効果を観察した。本研究結果により、Mg金属にHA被膜コーティングすることで、早期のMg金属の腐食を抑制できる可能性が見いだされ、現在使用されている高分子性生体吸収性材料に代わりうる次世代のデバイス開発につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop a new osteosynthesis device using bioabsorbable magnesium (Mg) metals. Specifically, we aimed to identify Mg metals that are suitable for osteosynthesis, including those with hydroxyapatite (HA) coatings. In this study, five types of Mg metals with and without HA coating, with a diameter of 1.5 mm and a length of 4 mm, were implanted in the left and right femur of mice. The mice were sequentially euthanized at four time points. The mice were evaluated before euthanasia using plain X-ray time-dependent observations, and the non-demineralized metal samples were collected for analysis using micro computed tomography and toluidine blue staining.

The results showed that the corrosion absorption process was remarkably different among different types of Mg metal samples. Moreover, the presence of an HA coating suppressed the generation of hydrogen gas at the initial stage of implantation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：生体吸収性材料 マグネシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療においては、審美的にも機能的にも補綴主導型の治療が求められ、歯槽骨の増生や上顎洞底挙上術の必要性が高まっている。しかしながら骨増生時十分量の移植が行われていても、経時的に増生部分の吸収が生じインプラント埋入が困難となる症例も少なくない。そのため増生後の骨吸収を防止する方策として、骨増生後咀嚼力などの外力から増生部分を保護する目的でチタン製プレートを用いているものの除去の必要があり、再度の骨増生術の困難な上顎洞底挙上術では使用できず、吸収性デバイスの開発が望まれる。また口腔外科領域において骨折など骨接合を必要とする治療において、一般的に用いられているチタン(Ti)製骨接合材(プレート・スクリュー)は、複数回の手術侵襲を避けたい心臓疾患などの合併症のある高齢者や若年者など、生体吸収性の骨接合材に対するニーズは増加している。

吸収性デバイスは、その性質として必要な一定期間用途に応じて働き、組織埋入後生体に為害作用なく吸収消失することが必要である。現在吸収性材料としてポリグリコール酸(PGA)やポリL乳酸(PLLA)に代表される高分子材料およびβ-TCPなどの吸収性セラミックが用いられている。高分子材料は整形外科や口腔外科領域でプレート・スクリュー骨接合材として利用されている。高分子材料では医療用金属と比べてその機械的強度が劣っている。また高分子材料は加水分解により吸収するとされるものの、臨床的には強度を失い崩壊して一部組織内に残存し、時に炎症性肉芽腫の形成を見ることがあるため骨接合部の被覆軟組織の薄い部分など使用上注意を要する。吸収性セラミックは、骨移植の際に吸収性の組織再生の足場として使用されているが、臨床的には完全には吸収されないことが多い。

Mgは生体必須元素であり生体内では溶解吸収されるため、医療用吸収性金属材料として近年急速に研究が進んでいる。現在血管内ステントの実用化研究が進んでいるとともにMgはTi製材料と同等の比強度をもち、ヤング率が骨の値と近似するため生体吸収性骨接合材としての利用が有望視されている。しかしMgは水と反応して急速に腐食が進み、その際水素ガスを生じて周囲のpHを上昇させる。20世紀初頭は純Mgを骨折部位に用いた際、術後8日で劣化し崩壊した上、多量のガスが発生することが確認されていた。近年、耐腐食性を向上させるためのMg合金の組成の改良や表面被膜処理の方法が研究されている。

Mg合金の組成については、アルミニウム(Al)、亜鉛(Zn)、カルシウム(Ca)やレアアースなどを少量含むものが研究され、これまで用いられた合金にはAlやZnが含まれるものが多い。しかしながら、Alの神経毒性の可能性が否定できず、最近ではAlを含まないMg合金の開発が推奨されつつある。またMg合金の組成の改良により耐腐食性の向上を図ったとしても、生体使用の際にはその耐腐食性は十分でなく表面被膜を形成する方法が必要である。

申請者は国内で初めてMg合金のHA表面処理と加工法を確立し、細胞培養液への浸漬やマウス皮下への埋入実験にて、Mg合金の腐食・吸収の制御が行えたことを確認した。また、Mg合金ネジへのHA被覆が可能であることも確認した。

しかしながら、骨接合材としてHA-Mg合金を使用する際には、HA-Mg合金の骨内および骨周囲におけるHA-Mg合金の強度、腐食(溶解)の様相の経時的な変化ならびに骨修復への効果を検証することが必要であり、本研究を行う着想に至った。

2. 研究の目的

マグネシウム(Mg)は生体必須元素であり生体内で腐食(溶解)・吸収され、またMg合金はその性状が骨の弾性と類似する特性を有する。そのため、20世紀初頭より生体内吸収性材料として注目されていたが、近年再びMg合金の組成の改良ならびに金属表面への被覆処理法の開発により、生体吸収性医療用材料としての開発研究が行われている。本研究はMg合金を歯科インプラント治療における骨増生術や骨接合材に利用することを目指して、申請者が開発・加工した次世代型生体吸収性ハイドロキシアパタイト(HA)被覆Mg(HA-Mg)合金の骨内および骨周囲におけるHA-Mg合金の強度、腐食(溶解)の様相の経時的な変化ならびに骨修復への効果を検証し、現在主に用いられているポリL乳酸製やチタン製の骨接合材に置き換わる次世代生体吸収性デバイスの開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

【Mg金属の埋入】

ネプタール腹腔内麻酔下にラット(Wistar系メス、15~19週齢)を用いて、左右大腿骨にMg金属を埋入した。埋入した金属は、純Mg及びMg合金4種類(Mg-Ca合金(XO8)、EW31、RE4およびWE43)で、いずれもHA被膜の無い金属と被膜の有る金属をそれぞれ左右大腿骨に1本ずつ埋入した。Mg金属の大きさは直径1.5×長さ約3mmであった。

【Mg金属の抽出】

Mg金属の取り出しは、安楽死ののち左右大腿骨と周囲筋組織等とを一塊にして抽出した。

抽出の時期は金属の性状を考慮して金属の種類によって異なった時期に抽出した。純Mgは埋入後2週、1, 2, 3か月、XO8は埋入後1, 2, 3, 4か月、EW31、RE4は埋入後1, 2, 3, 6か月、WE43は1, 2, 4, 6か月とした。10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し固定した後、大腿骨は金属とともにレジンブロック包埋した。

【観察方法】

(1) 単純X線による観察

Mg金属抽出までの間、金属埋入後3日、7日、14日、1か月、2か月、3か月、4か月、6か月時にセボフルラン吸入鎮静下に、歯科用X線撮影装置およびデンタルインスタントフィルムを用いて経時的にX

線撮影した。

(2) マイクロ CT による観察

大腿骨を埋入したレジブロックをマイクロ CT (skyscan1174 BRUKER 社) にて 6.6 μmピッチで撮影した。金属部分は骨内に埋入している金属中央部分の直径 1.0 mmの範囲の CT 値を HA 当量値として表した。

(3) Mg 金属ならびに骨の分割面の観察

マイクロ CT 撮影後、金属の腐食様相、金属周囲の骨の形状等を観察するため、非脱灰研磨トルイジンブルー染色標本を作製した。

以上の方法により、Mg 金属の X 線像の特徴、水素ガス発生に関連する画像所見、骨形成性、Mg 金属の腐食性について評価した。

4. 研究成果

・研究の主な成果

(1) Mg 金属の X 線像の特性について(図1、表1)

単純 X 線像による透過性の違いについて、純 Mg < X08 < EW31 RE4 < WE43 の順で、不透過性が高かった。

また、各 Mg 金属の埋入後1か月の試料における金属中心部の CT 値について HA 当量値も単純 X 線像と同様に前述の順に値が高くなっていた。

表 1 . マイクロ CT による金属中心部の CT 値 (HA 当量値) の比較

	Mg	X08	EW31	RE4	WE43
平均	0.89	1.03	1.98	2.02	3.34
SD	0.03	0.09	0.10	0.11	0.21

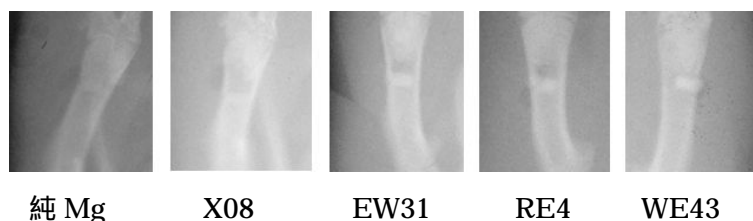


図 1 . X 線像における各金属の透過性の比較

単純 X 線像における X 線透過性は、純 Mg X08 < EW31 RE4 < WE43 であった。

(2) 水素ガス発生に関連すると思われる画像所見について

水素ガスの発生と関連する所見と単純 X 線と CT 像にて検索した(図2)。

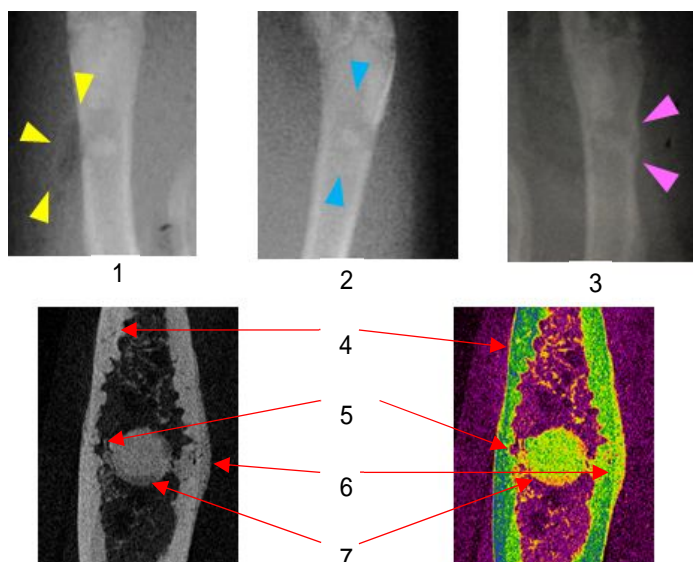


図 2 . 単純 X 線像と CT 像による金属周囲に見られる変化

- 1 : 軟組織内の X 線透過像
- 2 : 骨髄内の X 線透過像
- 3 : 金属埋入孔部の骨形成像
- 4 : 骨皮質内の細管形成像
- 5 : 皮質骨内面の骨吸収像
- 6 : 皮質骨表面の骨膜反応
- 7 : 腐食深度

埋入した Mg 金属付近の軟組織内に見られる X 線透過像について(図3)

金属埋入孔付近に見られた X 線透過像の変化について観察した。HA 被膜のない金属において、埋入後 2 週間以内に X 線透過像が最大になり、その後は減少していた。HA 被膜がある金属では、埋入後1か月まで、HA 被膜のない金属と比べて、X 線透過像は少ない傾向が認めら

れた。

骨髓内の X 線透過像について(図4)

骨髓内の X 線透過像について経時的に観察したところ、X 線透過像は、経時的に大きくなる傾向を示したが、埋入4か月以降、縮小する金属も認められた。

HA 被膜のある金属では2週ないし1か月まで、X 線透過像がみられないものが多かった。

CT 像における皮質骨部の変化(図5)

CT 像にて観察される 皮質骨内の細管構造、皮質骨内面の骨吸収像、皮質骨表面の骨膜反応について合計点数を算出し観察した。皮質骨部分での X 線像の変化については埋入後1か月で変化がみられ、WE43 を除き、埋入3か月以降、HA 被膜のある金属の方が皮質骨部分での所見がみられていた。

(3) 骨形成性について(図6)

単純 X 線像にて、Mg 金属埋入部に骨が増生する像がみられ、HA 被膜が有るほうが、埋入後2週ないし1か月まで、骨増生像のみられるものが多かった。

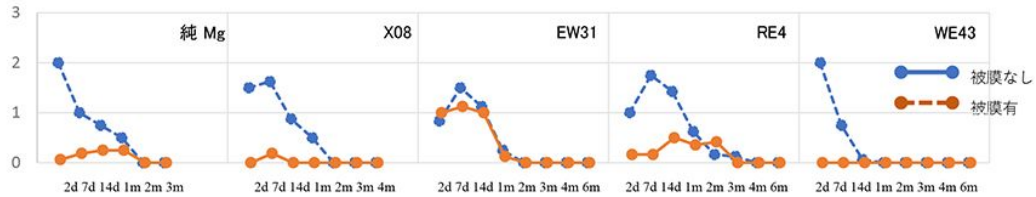


図3: 軟組織内X線透過像の有無(デンタルX線による評価);
いずれの金属も、HA被膜の有るものが、1か月時まではX線透過像は少なかった。



図4: 骨髓内X線透過像の有無(デンタルX線による評価);
WE43以外、14日ないし1か月時まで、骨髓内のX線透過像は被膜の有る方が少なかった。

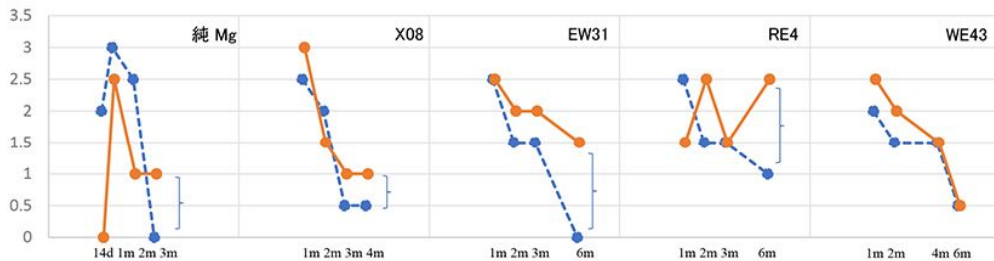


図5: CT像における皮質骨部の変化;
WE43以外、3か月以降被膜ありの方が、骨皮質部分の変化が認められた。

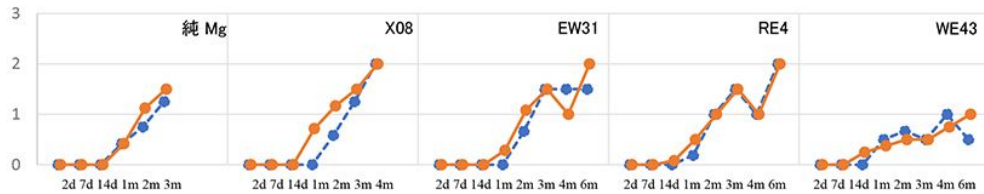


図6: デンタルX線における金属埋入孔部の骨増生の有無;
純Mg以外、14日ないし1か月時まで、埋入孔部の骨増生像はHA被膜の有る方が多かった。

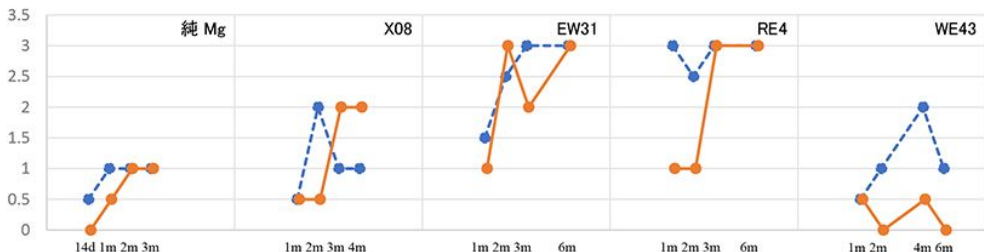


図7: CT像におけるMg金属の腐食開始時期と腐食の深度;
被膜有の方が、初期には腐食深度が浅い傾向を認めた。

(4) Mg 金属の腐食性について(図7)

マイクロ CT 像にて抽出試料の腐食像の有無と腐食深度について検索した。腐食の開始時期は、最初の金属抽出時(2 週もしくは1か月)には、HA 被膜の有りにしにかかわらず、金属の腐食がみられた。

腐食深度については、HA 被膜が有るほうが、埋入後早期において腐食深度が浅かった。

(5) 非脱灰研磨標本(トルイジンブルー染色)の評価(図8)

非脱灰研磨標本の観察にて以下の結果がみられた。

金属腐食の強い金属で、気泡の発生が多かった。

HA 被膜のある金属よりも被膜のない金属の方が早期に気泡の発生がみられる金属が多かった。

HA 被膜のある金属では、やや遅れて気泡の発生を見たが、その発生量は、被膜のない金属と同等もしくはそれ以上であった。

6か月経過した金属、早期に気泡が発生した(腐食の生じた)金属では、骨髄内での修復もみられた。

金属の違いについては、WE43 が、耐腐食性が強く、安定していた。EW31 と RE4 は腐食が早かったが、試料によって吸収速度に差がみられた。

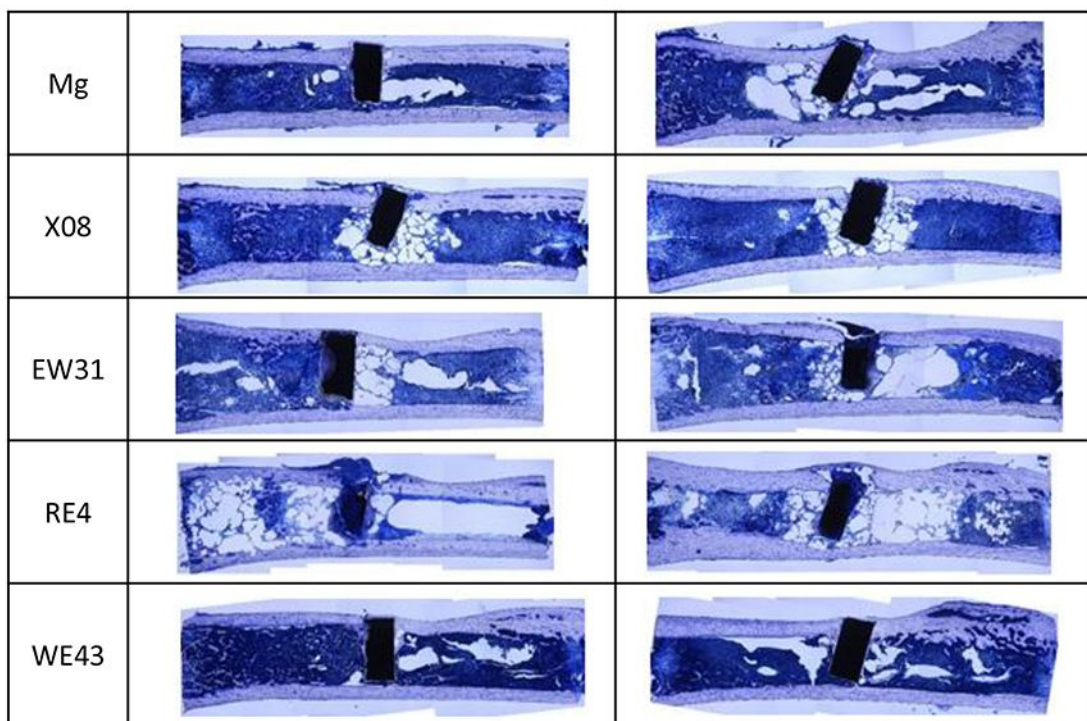


図8：埋入2か月時の非脱灰研磨トルイジンブルー染色標本像

・得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回の成果としては、埋入初期において HA 被膜の効果により、Mg 金属の腐食速度がコントロールされる可能性が示唆された。この点は、国内外ともに同様の研究は見られず、今後の生体吸収性 Mg 金属の開発にとって極めて有用な結果であり、国内外を問わずインパクトは大きい。また5種類の Mg 金属を用いたが、金属により腐食の時期、程度が様々であった。現在実用化されている WE43 が腐食吸収速度の遅い金属であり、我々が開発した EW31、RE4 の腐食速度は WE43 よりも早く、より早い腐食吸収の求められる場面での適応に期待が持てた。この点についても、他に報告はなく新しい知見となった、

・今後の展望

HA 被膜による Mg 金属の腐食速度のコントロールの可能性が示唆されたが、HA 被膜が組織内に残存する所見がみられた。このことは、HA 被膜が吸収されないことにある。すでに我々は、吸収性を有する炭酸アパタイト(CA)による Mg 金属への被膜形成にも成功しており、今後、被膜の材料としての CA 被膜 Mg 金属の腐食様相の分析を行うことが必要であると考えている。

・当初予期しない事象による新たな知見

HA 被膜の有る Mg 金属では、腐食に伴う水素ガスの発生がコントロールされること、HA 被膜があることで金属周囲に骨増生が生じやすいであろうことを想定していた。埋入早期においては水素ガスのコントロールと骨の増生の傾向が窺われたが、埋入初期を経過したのちの水素ガスの骨髄内貯留範囲が被膜のない金属よりも、被膜の有る金属の方がむしろ大きい傾向であった。これは HA 被膜があることで、埋入部位の骨形成が早期に起こり、水素ガスの逃げ道がなくなったことによるものと考えられた。水素ガスの骨髄内の貯留は、塞栓症、感染症や骨折につながる可能性があり、プレート・スクリューの形状、設置場所などの配慮が必要となることが推測され、今後の検討課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野添悦郎、廣本祥子、花田幸太郎、古閑 崇、吉村卓也、嶋 香織、岐部俊郎、久米健一、中村典史
2. 発表標題 次世代型生体吸収性ハイドロキシアパタイト表面被覆Mg合金の骨内変化に関する研究
3. 学会等名 第63回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣本 祥子 (HIROMOTO Sachiko) (00343880)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・構造材料研究拠点・主幹研究員 (82108)	
研究分担者	花田 幸太郎 (HANADA Kotaro) (00357790)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・上級主任研究員 (82626)	
研究分担者	岐部 俊郎 (KIBE Toshiro) (50635480)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
研究分担者	久米 健一 (KUME Kenichi) (60650067)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	

6. 研究組織(つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	嶋 香織 (SHIMA Kaori) (10343526)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授 (17701)	
研究分担者	西村 正宏 (NISHIMURA Masahiro) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
研究分担者	中村 典史 (NAKAMURA Norifumi) (60217875)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	