

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02116

研究課題名(和文) 生体吸収性マグネシウム合金の分解に伴う空孔形成挙動の評価手法開発

研究課題名(英文) Development of new evaluation method for gas cavity formation behavior accompanying biocorrosion of Mg alloys

研究代表者

山本 玲子 (YAMAMOTO, AKIKO)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・首席研究員

研究者番号：20343882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生体吸収性金属材料としてMg合金の適用が広範な分野で急速に進められている。しかし、分解に伴う水素発生により組織中に空孔が形成され、インプラント周辺組織の正常な修復を妨げる例が報告されている。従来の生体吸収性高分子・セラミックス材料には分解に伴い水素を生じるものではなく、組織中の空孔形成リスクの適切な評価法はない。そこで本研究では、in vitroにおいて人体内環境の再現による空孔形成挙動の解明を行う。さらに、in vivoでの空孔形成量・組織障害性データと合わせ、空孔形成リスクの適切な評価手法の確立を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mg合金は、体液中の水と反応して容易に分解するため、生体吸収性金属材料としてステント・骨接合材等幅広い領域での医療応用が期待されている。これらのデバイスは、損傷部位の修復後には不要になるが、除去には再手術が必要であり、患者の肉体的・金銭的負担であった。Mg合金製デバイスの実用化は、このような負担の解消に有用である。本研究で開発した空孔形成挙動観察手法は、Mg合金の空孔形成挙動に影響を及ぼす生体内環境をin vitroにて再現可能であり、Mg合金製デバイスの適切な空孔形成リスク評価に適用可能であり、Mg合金製デバイス開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Biomedical application of magnesium (Mg) alloys for biodegradable metallic devices is widely investigated since they are easily corroded by reacting with water in the body fluid. Recently Mg alloy bone fixture devices are commercialized, but gas cavity formation in the surrounding tissue is reported in their clinical cases. Some of them resulted in the delay of fracture healing. Gas cavity formation may depend on the balance between the generating rate of H₂ by a Mg alloy device degradation and its diffusion rate in the tissue. This balance can differ with implanting tissues, patients' conditions, and animal species. It is difficult to predict the clinical results from the in vivo animal tests. In this study, we developed an in vitro model tissue system to observe the gas cavity formation behavior following the biocorrosion of a Mg alloy sample.

研究分野：生体材料学

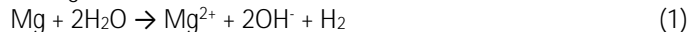
キーワード：生体吸収性金属材料 水素発生 空孔形成 リスク評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管用ステントや骨接合材、手術時に使用される縫合糸・ステープラー等の医療用埋植材は、埋植時には生体組織を保持する必要があるが、治療部位の修復後には不要になる。血管用ステントや骨接合材では主に非吸収性の金属材料が用いられており、不要になった埋植材を除去手術により取り除かねばならない。しかし、手術の負担が大きい場合や抜去が困難な例では、埋植材を体内に残したままにすることもある。その場合、異物である埋植材が残存するため炎症が遷延化し、ステントでは再狭窄が、骨接合材等では骨吸収や感染を引き起こすことが懸念されている。そのため、生体内で分解・吸収される材料の適用が望まれるようになった。既に生体吸収性高分子・セラミックス材料やこれらの複合材が縫合糸やステント、骨補填材、荷重負荷のない部位の骨接合材料として実用化されている。しかし、機械的強度の不足から、全ての非吸収性金属材料製品の代替には至っていない。そこで、金属材料であり、かつ体内での分解が期待できるマグネシウム (Mg) 合金の医療応用が検討されている。

Mg の腐食反応を(1)式に示す。腐食が進むに伴い OH⁻イオンが発生し、溶液の pH が上昇する。それに伴い Mg(OH)₂ の溶解度が低下し、試料表面に析出 (沈殿) する。Mg(OH)₂ により試料表面が被覆されると拡散障壁となって Mg が水と反応できなくなり、腐食速度が低下する。



体内に埋植された材料は、組織・細胞間を満たす間質液 (組織間液) や血液と接することになる。血漿が毛細血管から組織中に浸出して間質液となり、リンパ管を介して血管中に戻るため、これらの体液組成はほぼ一致している。血漿の pH は主に炭酸緩衝系の働きにより一定に保たれている。また、血漿に含まれる炭酸イオン・リン酸イオンは、中性付近の pH でも不溶性塩を形成する。したがって、体内に埋植された Mg についても試料表面に炭酸塩・リン酸塩が析出し、腐食速度は低下すると考えられる。一方、体液に含まれるアミノ酸などの有機低分子は Mg の腐食を促進するが、血清タンパク質は腐食を抑制することが報告されている¹⁾。

(1)式に示すように、Mg の腐食に伴い水素が生成する。発生した水素は体液に溶解、血流により拡散し、肺から外気へ排出されると考えられる。しかし、体液中の気体溶解量には上限がある。体液には既に酸素や二酸化炭素、窒素が溶解しており、その割合は体内における分圧に依存する (Henry の法則)。発生した水素が体液に溶解すると、分圧の低下により溶けきれなくなった窒素や酸素、二酸化炭素が分離し、水素と共に組織中に滞留、すなわち空孔 (気体溜まり) を形成すると予想される。水素の発生量に対し、血流による拡散が十分大きい場合には、空孔の形成は生じないであろう。血流量は組織により異なり、同じ組織でもヒトと動物間で、また個々の患者によっても違うため、空孔形成挙動には埋植部位や種差および患者依存性があると考えられる。

Mg 合金製埋植材の臨床例において、組織中の空孔形成が報告されている。骨接合用中空コンプレッションスクリューによる外反母趾矯正例では、埋入後 6 週時点で 39 例中 38 例、12 週では 78% の症例で骨組織中に空孔形成が認められた (図 1)²⁾。軟組織中の空孔形成はやや少なく、術後 6 週で 59%、12 週で 30% であった。39 例中 7 例でスクリューの早期分解が報告されており、うち 1 例は 6 週時点でスクリューの破断が確認され、9 週で再手術が行われた。

本スクリューによる舟状骨骨折治療例では、5 名中 3 名で顕著な吸収性嚢胞 (骨組織内の空孔) が確認され、骨折部の癒合に 6 ヶ月かかったため臨床試験が中止された³⁾。舟状骨骨折は血行が悪いため治りにくく、骨癒合まで 3 ヶ月かかることもあるが、本例での 6 ヶ月は Mg 合金スクリューの適用により骨癒合が遅れたことを示している。

高純度 Mg 製スクリューの臨床例では、腐食・空孔形成挙動の埋植部位依存性が報告されている⁴⁾。ヒト大腿骨頭への骨グラフト固定では空孔形成は観察されなかったが、中足骨や脛骨遠位端内果の骨折固定では空孔が確認され、1 週間で消失した。さらに、臼蓋欠損部の自家骨修復例では空孔が術後 1 ヶ月まで確認されており、埋植部位および患者依存性が明らかである。

生体内における空孔形成は血流阻害等を招き、埋入部位・周辺部位における損傷組織の治癒・回復に悪影響を及ぼす恐れがあり、大きな空孔形成ならびに長期間にわたる空孔滞留は避けるべきである。Mg 合金製デバイスの医療応用を進めるためには、埋植部位における空孔形成リスクを適切に評価することが必須である。

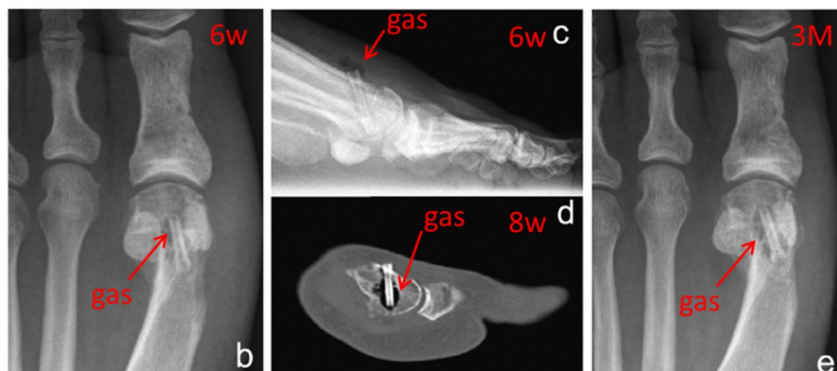


図 1 Mg 合金製中空コンプレッションスクリューによる空孔形成例

2. 研究の目的

本研究では、生体組織環境を再現することにより、Mg 合金埋入による空孔形成挙動ならびにその制御因子の解明と、in vitro における評価手法の確立を目的とする。

前述したように、組織中の空孔形成挙動は水素発生量と拡散速度のバランスに依存し、血流の影響を受ける。組織中の血流量は、埋植部位は勿論、個人差や種差もあるため、十分な事前評価が難しいと予想される。既出の骨接合用中空スクリューにおいても、前臨床試験として動物埋植評価を実施しているが、臨床試験において高率で空孔形成が確認されたことは、動物埋植試験では空孔形成リスクが十分に評価できていないことを示している。

そこで、本研究では in vitro にて生体内組織環境を再現し、Mg 合金の腐食に伴う空孔形成挙動の解明を行う。溶出イオン・ガスの拡散速度の異なる環境を構築し、組織中の拡散速度と腐食ならびに空孔形成量の関係を明らかにし、生体組織における空孔形成制御因子を検証する。従来の生体吸収性材料において、体内で水素発生を伴うものはなく、ISO 等の材料評価法において体内に形成される空孔を評価する手法は存在しない。Mg 合金による空孔形成挙動評価を世界に先駆けて実施し、Mg 合金製医療デバイスの開発に資することを旨とする。

3. 研究の方法

Mg 合金埋植による空孔形成リスクを適切に評価するためには、空孔形成挙動の観察手法を確立すること、さらに空孔形成挙動に影響を及ぼす主要因子である組織中溶出イオン・ガス拡散速度の制御手法開発が必要である。

成人男性では体重の約 60%を体液が占めており、生体組織は細胞外マトリックスと呼ばれるタンパク質の網目構造の中に、細胞が点在している状態である。すなわち、体液をタンパク質でゲル化したマトリックスに細胞が存在していると捉えることができる(図2)。そこで、疑似体液に増粘剤を加えてゲル化し、その中に Mg 合金試料を浸漬することで、生体内と同様に腐食に伴う空孔形成挙動を観察可能ではないか、との着想を得た。さらに、増粘剤濃度を変えることによりゲル中のイオン・ガス拡散速度を制御でき、組織間の血流量の違いが及ぼす影響を再現できると考えた。

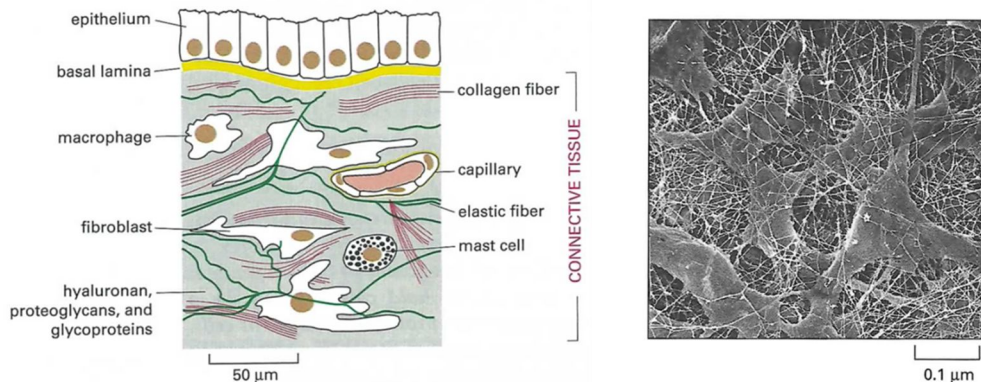


図2 結合組織の構造(左)と結合組織中の線維芽細胞の走査型電子顕微鏡像(右)⁵⁾

そこで、ヒト血漿組成に基づき開発された Eagle 最小必須培地 (E-MEM) に牛新生児血清を 10%添加して疑似体液とし、さらに増粘剤を添加して疑似組織を調製した。Mg 合金試料を封入後、生体内模擬環境 (37℃、5%CO₂) 下に一定期間静置し、疑似組織中の試料周辺をマイクロ X 線 CT にて撮影し、空孔形成挙動観察を試みた。血漿同様 E-MEM は炭酸緩衝系により pH 恒常性を有し、5%CO₂ 下で pH7.4 前後を示す。しかし、大気中の CO₂ 濃度は約 0.04%であるため、大気中で調整した疑似組織の pH は 7.8 前後である。そこで、pH 指示薬を含む疑似組織を大気中で調整後、5%CO₂ 下に置き、疑似組織表面から内部への CO₂ 拡散を pH 指示薬の色の変化により捉え(図3)疑似組織中の CO₂ 拡散の可視化を試みた。さらに疑似組織中の増粘剤濃度を変化させ、水素発生量・拡散速度と空孔形成挙動の関係を検討した。得られた結果を動物埋植試験結果と比較し、開発手法の妥当性を検証した。

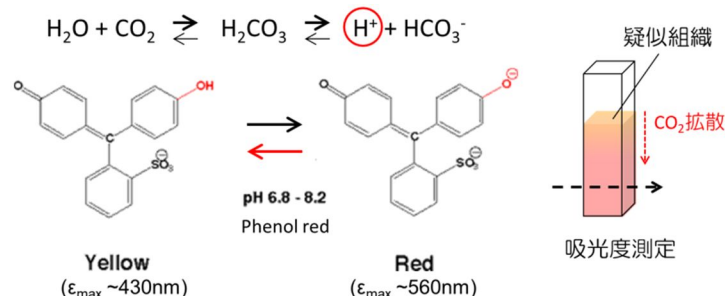


図3 疑似組織中 CO₂ 拡散測定

4. 研究成果

(1) 疑似組織中空孔形成挙動観察手法の確立

疑似体液中浸漬試験では、Mg 試料の腐食により発生した水素はしばらく試料表面に吸着した気泡の状態で見られるが、気泡が大きくなるにつれ浮力が増すため試料から脱離し、液面に向けて上昇、環境中に拡散・消失する。一方、疑似体液中に増粘剤を添加して作製した疑似組織中では、浸漬時間の経過に伴い Mg 試料周辺に空孔を形成していることが観察された。マイクロ X 線 CT 像より形成された空孔の体積を測定でき、空孔形成挙動を経時的に観察することが可能であった(図4)。増粘剤として寒天を用いた場合には、浸漬 7d 程度で空孔により疑似組織が破断し、空孔内のガスが消失する現象が見られたが、増粘剤を適切なものに変更することにより、4 週間の長期にわたる空孔形成挙動観察が可能となった。

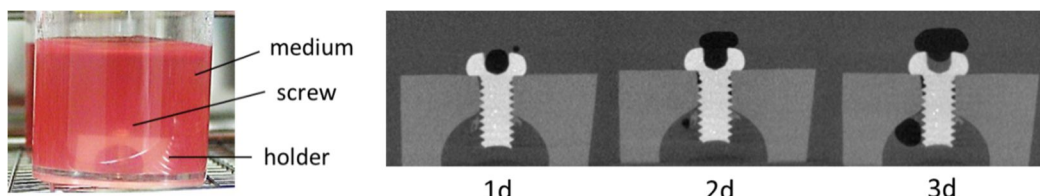


図4 疑似組織中 Mg 合金試料浸漬(左)とマイクロ X 線 CT による空孔形成挙動観察例(右)

(2) 疑似組織中 CO₂ 拡散速度評価

疑似組織表面から一定距離におけるフェノールレッドの酸性色域(415nm)ならびにアルカリ性色域(560nm)の吸光度の経時変化測定により、5%CO₂ 下静置時間の増加に伴い、フェノールレッドの酸性型の増加と、アルカリ型の減少を確認した(図5)。すなわち、本法により疑似組織中の CO₂ の拡散挙動の可視化が可能であることが確認された。

図2より、フェノールレッド酸性型の濃度変化が疑似組織中の CO₂ の濃度変化に比例すると仮定すると、疑似組織表面からの距離 L における吸光度変化(J)は、下記の式で表される。

$$J = (A - A_0) / t = C_0 \sqrt{D/\pi t} \quad (2)$$

A および A₀ はそれぞれ時間 t および t = 0 における吸光度、C₀ は疑似組織に対する CO₂ の飽和濃度、D は拡散係数である。C₀√(D/π)を K とおくと、J を t の平方根の逆数(1/√t) に対してプロットした際の傾きから K を求めることができ、増粘剤濃度の増加に伴い K は低下した。すなわち、増粘剤濃度により疑似組織中の拡散速度制御が可能であることが示された。

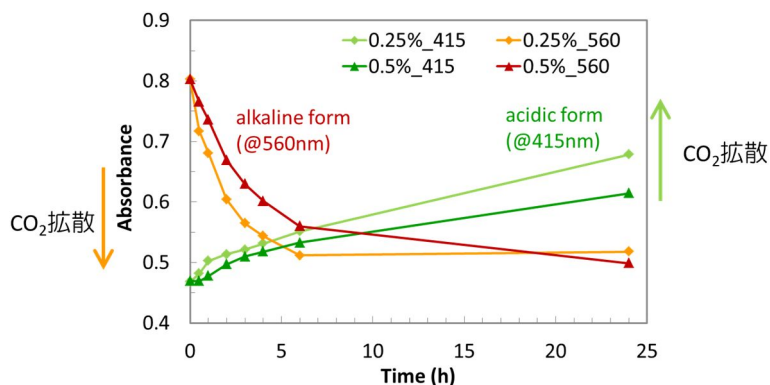


図5 5%CO₂ 下静置時間と疑似組織の吸光度変化

(3) 疑似組織中拡散速度と空孔形成・腐食挙動との関係

純 Mg 試料について、疑似組織中の増粘剤濃度を变化させ浸漬試験を行い、空孔形成量を調べたところ、浸漬時間の増加に伴い空孔形成量が増加する傾向が認められた。そこで、初期の空孔形成量の増加速度を求め、疑似組織中の増粘剤濃度との相関を調べたところ、増粘剤濃度が高いほど空孔形成速度が大きくなること、すなわち疑似組織中の拡散速度の低下に伴う空孔形成量の増加が確認された。

浸漬終了後の試料を回収し、試料表面に形成された不溶性塩除去後の重量減から腐食量を求めたところ、疑似組織中増粘剤濃度の増加に伴い腐食量が増加する傾向が認められた。回収試料の表面観察から、増粘剤濃度が高い疑似組織に浸漬した試料において局部腐食が多数観察され、腐食量の増大は局部腐食の発生増加によると推察された。興味深いことに疑似体液浸漬時の腐食量は、今回用いた増粘剤濃度範囲の中程度結果と一致した。すなわち、増粘剤濃度が低い疑似組織は疑似体液中よりも腐食を抑制し、増粘剤濃度が高い疑似組織は腐食を促進することが確認された。

Mg ワイヤについて、疑似体液中浸漬 (in vitro) 試験、ブタ大動脈内腔および血管壁に Mg ワイヤを挿入し、疑似体液を還流する (ex vivo) 試験、ならびにラット大動脈内腔・血管壁への埋植 (in vivo) 試験を実施し、それぞれの結果を比較した論文が発表されている⁶⁾。血管壁(軟

組織)への埋植では ex vivo と in vivo 間で腐食量に差は見られず、in vitro とほぼ一致した。しかし、血管内腔への挿入では in vivo よりも ex vivo の方が、腐食量が大きかった。In vivo では、内腔へ挿入された試料は血栓で覆われ、5d では全体が新生内膜に取り込まれており、血栓形成のない ex vivo よりも腐食が抑制されたと考えられる。In vivo においても、血管内腔に挿入された試料の方が血管壁に埋植された試料よりも腐食量が小さかったと報告されている。

この報告の結果は、生体組織による被覆が Mg の腐食抑制効果を有することを示しており、さらに試料周辺に形成される組織によって腐食抑制効果が異なることも示唆している。本研究の成果に基づき解釈すると、組織中拡散速度の違いが腐食抑制効果に差をもたらしていると考えられる。大動脈壁では血管内皮・平滑筋細胞が細胞外マトリックスを介して接する規則正しい構造を有するが、血栓は血小板や白血球・フィブリン繊維が短時間に集積した無秩序な塊であり、時間経過とともに新生内膜として新たに構造化されていく。この組織構造の差が組織内における溶出イオン・ガス拡散の違いをもたらし、結果として腐食抑制効果に差が現れた可能性がある。生体組織による腐食抑制効果は、疑似組織としてフィブリンを用いた試験でも報告されており⁷⁾、本研究で開発した疑似組織も含めて、生体内における腐食特性評価手法としての有用性が期待される。

さらに、Mg-Al 合金について、増粘剤を添加した疑似組織中浸漬試験を実施したところ、純 Mg 同様に疑似組織中増粘剤濃度の増加に伴い空孔形成速度ならびに腐食量が増加する傾向が認められた。しかし、増粘剤濃度の影響 (= 拡散速度感受性) は、Mg よりも小さかった。このことは、Mg 合金試料によっては生体組織の拡散状況の影響を受けにくいものがある、すなわち、埋植部位や個人差の影響が小さいものがありうることを示唆している。

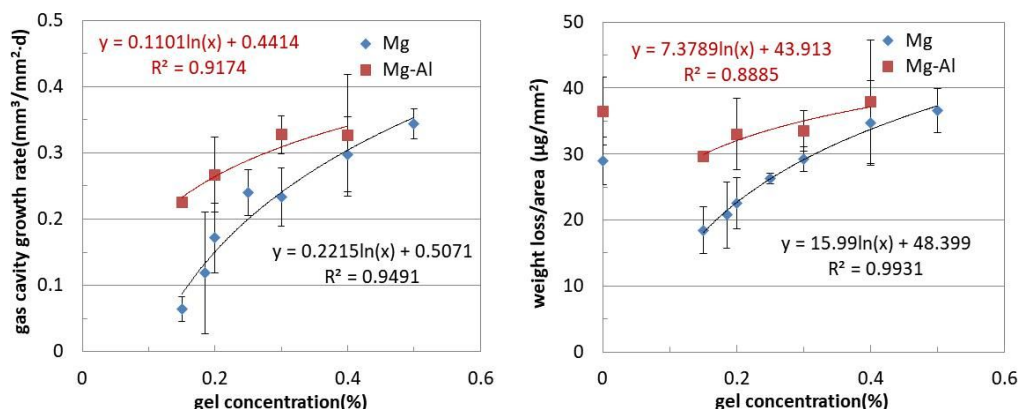


図6 疑似組織の増粘剤濃度と空孔形成速度(左)および腐食量(右)の関係

(4) in vivo 埋植試験結果との比較

Mg-Al 合金について、試料をラット頭蓋骨骨膜下(骨組織中)、背部皮下(脂肪組織中)、および大腿骨近傍(筋組織中)に埋植し、空孔形成量と試料体積をマイクロ X 線 CT 撮影像により求めた結果、埋植部位により空孔形成量ならびに試料減量が異なることが判明した。埋植組織の血流量は頭蓋骨骨膜下が最も少なく、大腿骨近傍の筋組織中が最も高いと推測される。空孔形成量・試料減量はともに頭蓋骨骨膜下が最も大きく、大腿骨近傍の筋組織中が最も少なかった。すなわち、組織中血流量とは反比例の関係があることが確認された。組織中血流量が高いほど、拡散速度は大きいと考えられる。したがって、in vivo 埋植試験における空孔形成量は、組織中の拡散速度が小さいほど大きく傾向がある。この傾向は、疑似組織中の空孔形成挙動と一致している。さらに、腐食量についても同一の傾向が認められた。疑似組織中4週浸漬後の腐食減量は頭蓋骨骨膜下ならびに背部皮下の値とほぼ一致し、埋植試料の形状の違いを考慮すると、疑似組織中の浸漬試験は組織中の腐食量推定に有用であると判断できる。

以上から、本研究で開発した疑似組織中の浸漬試験法はマイクロ X 線 CT 撮影による空孔形成挙動観察を可能にし、また生体組織による腐食抑制効果の検証にも有用な、優れた評価手法であると言える。今後、臨床ならびに動物埋植データとの相関性の検証を進め、適切な試験条件の明確化が求められる。

《参考文献》

- 1) A. Yamamoto, et al. : Mater. Sci. Eng. C, 29(2009)1559-1568.
- 2) C. Plaass et al. : J Orthopaedic Rec., 34(2016)2207-2214.
- 3) R. Meier et al. : Handchir. Mikrochir. Plast. Chir., 49(2017)37-41.
- 4) D. Zhao et al. : Biomater., 112(2017)287-302.
- 5) B. Alberts et al. : Molecular biology of the cell(4th ed), Garland Science(2002)1090-1091.
- 6) J.Wang et al. : Acta Biomater., 50(2017)546-555.
- 7) P.K.Bowen et al. : J. Biomed. Mater. Res. 100B(2012)2101-2113.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山本玲子	4. 巻 48
2. 論文標題 マグネシウム合金製医療用デバイスの臨床例からみた課題	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アルトピア	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kicheol Hong, Hyeji Park, Yunsung Kim, Michal Knapek, Peter minarik, Kritian Mathis, Akiko Yamamoto, Heeman Choe	4. 巻 98
2. 論文標題 Mechanical and biocorrosive properties of magnesium-aluminum alloy scaffold for biomedical applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 213-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2019.06.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山本玲子、菊田明美、Fillip Witkowski, Wojciech Swieszkowski
2. 発表標題 生体吸収性マグネシウム合金の分解に伴う空孔形成挙動評価手法開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Yamamoto
2. 発表標題 Current status on research and development for biomedical application of biodegradable metals in Japan
3. 学会等名 9th Biometal-Symposium on Biodegradable Metals for Biomedical Applications（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akiko Yamamoto
2. 発表標題 Designing in vitro tests towards the realization of medical devices
3. 学会等名 TERMIS-AP +ABMC7 2019 ((招待講演) (国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本玲子、菊田明美、Filip Witkowski,Wojciech Swieszkowski
2. 発表標題 生体吸収性金属材料の分解に伴う空孔形成挙動評価のための疑似生体組織開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 玲子
2. 発表標題 In vitroにおける材料特性評価とその課題
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Yamamoto
2. 発表標題 Designing in vitro evaluation methods for materials biomedical application
3. 学会等名 The 6th Seminar for Young Researchers ((招待講演))
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本玲子 他61名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 315
3. 書名 無機 / 有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与	

〔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	清水 良央 (Shimizu Yoshinaka) (30302152)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	