

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21300183

研究課題名（和文）生体吸収性マグネシウム合金の生体内分解特性の解明と制御

研究課題名（英文）Understanding and control of biodegradability of bioabsorbable Mg alloys

研究代表者

山本 玲子（YAMAMOTO AKIKO）

独立行政法人物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：20343882

研究成果の概要（和文）：

マグネシウム合金の生体内分解特性は合金種により異なり、軟組織中に形成される空孔量は分解速度に依存すること、分解速度の大きい材料であっても病的な炎症反応等は惹起しないことが確認された。また、分解に伴い生じた水酸化物イオンによる局所的な pH 上昇が許容範囲を超えると、細胞増殖が抑制されるが、医療用生体吸収性高分子材料による被覆は、初期の分解速度を抑制し、細胞増殖性向上に有効であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Degradation properties of Mg alloys depend on the kind of alloys, which relates to the amount of gas cavity formed in the soft tissue surrounding the implant site. Extraordinary inflammation was not observed even for the Mg alloy having rapid degradation rate. The local pH increase due to the OH⁻ release accompanying the degradation may suppress cell growth when it goes over the acceptable range of cells. Coating of pure Mg with bioabsorbable medical polymers is effective to reduce initial degradation rate of pure Mg and successfully improves cytocompatibility.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料額

キーワード：生体機能材料、生体吸収性金属材料

1. 研究開始当初の背景

金属材料は強度・靱性・剛性などに優れているため、骨接合材やステント、人工関節等

として広く用いられてきた。しかし、たとえば骨接合材では骨折部の修復後は不要になるが、既存の医用金属材料は生体内に残存す

ることから除去には再手術が必要であり、患者にとって大きな負担となっていた。このようなデバイスには医療用生体吸収性材料を用いることにより、除去手術は不要となる。しかしながら、これまで開発された医療用生体吸収性材料は高分子・セラミック材料のみであり、機械的特性の不足から、金属材料の代替とはなりえなかった。

近年、生体微量必須元素の一つであるマグネシウムに注目し、その合金を医療用生体吸収性金属材料として用いる試みが行われている。マグネシウムは生体必須元素であり、体内で分解しても安全性が高いことが予想されるが、純マグネシウムは強度と耐食性に劣るため、工業用に開発されたマグネシウム合金の転用が検討されている。しかしながら、これらの工業用マグネシウム合金にはマグネシウム以外の金属元素が多量に添加されており、中には人体に対する影響が未知の元素も含まれるため、生体安全性が懸念される。

医療用生体吸収性マグネシウム合金の臨床応用を実現するためには、合金に対する生体反応を明らかにし、生体内における合金の分解速度を最適化する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では *in vitro* および *in vivo* の両方の系を用い、(1) 合金に対する生体反応を細胞および病理学的観点から明らかにすること、および生体内分解速度の最適化のために (2) マグネシウム合金の生体内分解特性ならびに分解速度制御因子を明らかにすることを目的とし、合金組成・組織の制御による最適化に資する。

3. 研究の方法

(1) 生体反応の解明

マグネシウム合金を生体内に埋入すると、腐食に伴う水素ガス発生により、周辺組織に空孔が発生することが知られている。空孔発生は、体内において発生した水素ガスの発生量と血流による拡散速度との関係で決まり、水素ガス発生量が低下するに伴い消失すると予想されるが、詳細に検討した報告はない。そこで、小動物埋入試験により、埋入初期における気孔発生とその盛衰について、X線マイクロCTを用いて検討する。また、周辺組織の病理学的観察を行い、炎症反応の惹起や組織修復の遅延などの影響の有無を検討する。同時に、血液・尿・各臓器を採取し、為害作用や溶出イオンの蓄積のないことを確認する。また、細胞培養試験を行い、合金表面と細胞の相互作用および溶出金属イオンがこれらの細胞の機能に及ぼす影響を検討する。

(2) 生体内分解速度制御因子の解明

生体吸収性高分子・セラミックス材料とは異なり、マグネシウム合金の生体内分解速度には、体液の化学的組成の他に、血流量（疑似体液の流体力学環境）が影響すると考えられる。しかし、マグネシウム合金の生体内分解特性の評価法は確立されておらず、また合金組成・組織が分解特性に及ぼす影響も解明されていない。そこで、*in vitro* 試験により、合金の生体内分解速度に影響を及ぼす因子を明らかにすると同時に、合金組成・組織が分解速度に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 細胞適合性評価

マグネシウムの腐食に伴い、マグネシウムイオン (Mg^{2+})、水素および水酸化物イオン (OH^-) が生じるため、体液の pH 上昇が懸念される。体内では主として炭酸緩衝系により体液の pH は 7.4 に保たれているが、埋入された Mg 合金の分解速度が大き過ぎると、体液の恒常性が保てず、周辺組織に影響を及ぼす恐れがある。

純マグネシウムについて、従来の医用金属材料（耐食合金）と同様の試験条件で細胞増殖試験を行うと、培養液の pH が上昇し、細胞は全く生存できない。しかし、体液の pH 恒常性を考慮した条件で細胞増殖試験を行うと、純マグネシウム上であっても細胞は増殖する。さらに、純マグネシウムを医療用生体吸収性高分子で被覆すると、初期の急激な腐食反応が抑制されるので、細胞増殖性は向上する。このことは、純マグネシウムの細胞適合性には、腐食に伴う培養液の pH 上昇が大きく影響することを示唆している。

一方、AZ 系の工業用マグネシウム合金では、Al 含有量が増加すると大気中の耐食性が向上することが知られているが、細胞適合性については AZ31 合金が最も高く、AZ61 や AZ80 合金上では細胞は増殖できない。培養液中の Mg^{2+} 溶出量は AZ31 合金よりも AZ61、AZ80 合金の方が小さいため、Al 含有量の高い AZ 系合金では、細胞適合性は合金の分解速度以外の因子が支配していることを示唆している。

そこで、AZ91 合金について、シラン処理により表面に有機層を形成したところ、細胞増殖が可能になることが確認された。形成された有機層の厚さは nm オーダーであり、下地である AZ91 合金の分解特性に殆ど影響を及ぼさない。しかし、未処理ならびにシラン処理表面へのアルブミン吸着量に変化していたことから、合金表面に形成された有機層は合金表面へのタンパク質吸着挙動を変化させることにより、細胞適合性を向上させていることが示唆された。以上から、合金の種類によっては、合金組成元素が耐食性を低下させなくても、細胞適合性に影響を及ぼすこ

とがあること、またこのような例では、表面修飾により初期の細胞適合性向上が可能であることが示された。

マグネシウム合金の細胞適合性は、体内の腐食挙動および表面特性が影響する。この原則は、従来の医用金属材料と同じであるが、従来材は耐食合金であり、腐食挙動の影響が相対的に小さいのに対し、マグネシウム合金では前者の影響が非常に大きい点に留意が必要である。また、マグネシウム合金では前者の影響は埋入部位により変化するため、埋入環境を考慮して評価すべきであることが示唆された。

(2) 小動物埋入試験

マグネシウム合金を生体内に埋入すると、腐食に伴う水素ガス発生により、周辺組織中に空孔が形成されることが知られているが、その発生と消失について、詳細に検討した報告はない。そこで、純マグネシウム、WE43 および ZK61 合金をラット脛骨近傍に埋入し、生体内環境における分解挙動をマイクロ X 線 CT を用いて詳細に検討した。その結果、いずれも試料についても埋入 1 日目の段階で、試料周辺における空孔形成が観察された。純マグネシウムについては、埋入 1 日目の空孔量が最も大きく、その後減少した。WE43 合金は、埋入 1 日目の空孔量は純マグネシウムより小さいが、その後埋入 7 日後くらいまではほぼ同量であった。しかし、両試料とも、埋入 56 日後には空孔が消失した。試料残存率については、埋入 56 日の時点で純マグネシウムの方が WE43 合金よりも小さく、分解が進んでいた。

一方、ZK60 合金については、埋入 1 日目から 5 日目にかけて空孔量が減少する傾向が見られたが、7 日目から 28 日目にかけて、空孔量が増加し、埋入 56 日目では再び減少していた。残存率については、埋入合金の中で最も減少しており、埋入 56 日後には 0.3 以下であった (70%以上が分解していた)。

ZK60 合金は、析出物を有する多相合金で、工業用マグネシウム合金の中では耐食性の低い合金であり、いわば陽性対照として埋入試験を行った。本埋入試験においても、純マグネシウム、WE43 合金と比較して生体内の分解速度が大きかった。周辺軟組織中の空孔形成は、埋入材の分解反応に伴い水素が発生し、その分圧が上昇することにより、体液に溶解していた大気 (窒素、酸素、二酸化炭素等) が溶解できなくなり、気体として軟組織中に吐き出されることにより形成される。そのため、空孔の形成は分解速度と、埋入周辺部位からの水素の拡散、すなわち血流量に依存する。純マグネシウムおよび WE43 合金については、埋入 1 日目では埋入材の腐食に伴う水素発生量が血流による拡散量よりも大

きいため、空孔が形成されるが、埋入期間の増加に伴い空孔量が減少していることから、腐食に伴い発生する水素発生量が血流による拡散量を下回っていると推測される。In vitro における浸漬試験では、浸漬開始直後の分解速度が最も高く、浸漬日数の増加に伴い分解速度が低下することが確認されており、本埋入試験結果と一致する。一方、ZK60 合金については、埋入 1 日目から 5 日目までは空孔量が減少しているため、水素発生量も減少したことが推測されるが、埋入 7 日目から 28 日目までは空孔量が増加したことから、分解速度が増加したことが推測される。多相合金では、析出相と母相の間で微小ガルバニ電池を形成し、腐食が促進されることが知られており、おそらくそのために分解速度が上昇したと推測される。

以上から、マグネシウム合金の生体内における分解挙動は合金種により異なること、埋入周辺軟組織中に形成される空孔量は埋入材の分解速度によることが示された。

埋入周辺部位の組織観察については、分解速度が大きく、大きな空孔形成を示した ZK60 合金についても、病的な炎症反応は観察されず、埋入 56 日後には Ti やポリ乳酸等の埋入試験でも観察される線維性組織の形成が認められた。また、血清中の Mg^{2+} 濃度や各臓器についても、異常は認められなかった。

(3) 生体外分解特性評価

Mg 合金の適用例として、循環器・硬組織分野が検討されているが、いずれの場合も体内における最適分解速度は解明されていない。また、Mg 合金の生体内における分解特性を評価する手法も確立されていない。

そこで、体液の緩衝効果を考慮し、疑似体液としてヒト血漿とほぼ同組成の細胞培養液に血清を添加 (E-MEM+FBS) して用い、体内と同様に二酸化炭素 (CO_2) 濃度を 5% に保つ環境にて Mg 合金の分解特性および細胞適合性の評価を行った。ヒト (あるいは哺乳動物) 体内では、炭酸緩衝系により体液の pH を 7.4 に保っている。また、体液中に含まれるリン酸や炭酸により、溶出したマグネシウムイオンが不溶性のマグネシウム塩を形成し、試料表面を覆うことにより、分解反応を抑制している。体液中にはカルシウムイオンも含まれており、核形成や局所的な pH の上昇によりリン酸カルシウム、炭酸カルシウムも析出する。疑似体液として Hanks 液を用いた場合、溶液中の炭酸イオン濃度が血漿とは異なり、また炭酸緩衝系の効果も得られない。そのため、E-MEM+FBS とは分解挙動が異なることを明らかにした。

体内では腐食に伴い生成した OH^- や Mg^{2+} 、水素が血流により拡散するため、埋入部位の血流量により体液の緩衝能 (pH 変化) や試

料の分解特性が変化することが予想される。そこで、血流を想定し疑似体液を攪拌した状態で浸漬試験を行い、合金組織が分解特性に及ぼす影響を検討した。その結果、単層合金の場合では、鋳造材と塑性加工材を比較した結果、加工材の方が分解速度は小さいことが判明した。鋳造材よりも加工材の方が結晶粒径は小さく、その分結晶粒界は多くなる。しかし、マグネシウム合金の生体内模擬環境下での腐食は粒内で起こり、また不純物・介在物の存在や合金元素の偏析が大きく影響する。塑性加工により微細組織を作製することにより、全体の均質性が向上し、不純物・介在物等も小さくなったためではないかと考えられる。

一方、多相合金では塑性加工により新たな析出物の形成、あるいは不純物・介在物塊が大きくなる場合があった。そのため、塑性加工材よりも鋳造材の方が分解速度は大きくなった。塑性加工そのものよりも、加工後の合金組織、特に不純物・介在物の存在状態やカソードとなりうる析出物の状態により、分解挙動が変化することが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. A. Witecka, A. Yamamoto, H. Dybiec, W. Swieszkowski, “Surface characterization and cytocompatibility evaluation of silanized magnesium alloy AZ91 for biomedical applications”, *Science and Technology of Advanced Materials*, 査読有, 13 巻, 2012, 64214. DOI:10.1088/1468-6996/13/6/064214.
2. L. Xu, A. Yamamoto, “Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 査読有, 93 巻, 2012, 67-74. DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.12.009
3. L. Xu, A. Yamamoto, “In vitro degradation of biodegradable polymer-coated magnesium under cell culture condition”, *Applied Surface Science*, 査読有, 258 巻, 2012, 6353-6358. DOI:10.1016/j.apsusc.2012.03.036
4. 山本玲子, “生体内分解性材料としてのマグネシウム合金の医療応用”, *表面技術*, 査読有, 62 巻, 2011, 204-210.

[学会発表] (計 19 件)

1. A. Yamamoto, “Effect of nanostructure at the biointerface on cellular response”, WUT-NIMS-HHT Joint Symposium, 2012/10/16, ワルシャワ工科大 (ワルシャワ・ポーランド)
2. A. Witecka, A. Yamamoto, H. Dybiec, W. Swieszkowski, “Improvement of cytocompatibility of magnesium alloy AZ91 by surface modification”, IUMRS-ICEM2012, 2012/09/24 - 2012/09/28, パシフィコ横浜 (横浜市).
3. A. Yamamoto, “Biocompatibility evaluation of Mg alloys for biomedical application”, 3rd WUT-NIMS-EMPA workshop 2010, 2010 年 9 月 9-10 日, EMPA (スイス)
4. 山本玲子, “医療用生体吸収性マグネシウム合金の研究開発動向”, 軽金属学会 第 118 回春期大会, 2010 年 5 月 22-23 日, 関西大学 (大阪市)
5. A. Yamamoto, “Cytocompatibility Evaluation of Biodegradable Magnesium Alloys”, 22nd European Conference on Biomaterials (ESB2009), 2009 年 9 月 9 日, Beaulieu, Lausanne, Switzerland.
6. A. Yamamoto, “Biocompatibility Evaluation of Biodegradable magnesium alloys”, ICMAT & IUMRS-ICA, 2009 年 6 月 30 日, Suntec, Singapore (シンガポール)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 玲子 (YAMAMOTO AKIKO)
独立行政法人物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・グループリーダー
研究者番号：20343882

(2) 研究分担者

向井 敏司 (MUKAI TOSHIJI)
神戸大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：40254429
清水 良央 (SHIMIZU YOSHINAKA)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30302152

(3) 連携研究者 なし