

令和元年6月18日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04511

研究課題名(和文) 生体吸収性Mg合金のための欠陥修復型ポリマー修飾リン酸カルシウム被膜の開発

研究課題名(英文) Development of polymer-modified calcium phosphate coating with self-healing ability for biodegradable Mg alloys

研究代表者

廣本 祥子 (Hiromoto, Sachiko)

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

研究者番号：00343880

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)：生体内で溶解・吸収・消失する生体吸収性デバイスのためのMg合金において、その腐食溶解速度を制御する自己修復性ポリマー-リン酸カルシウム(Ca-P)複合被膜の開発を目的とした。Ca-P被膜は、Mg合金の腐食速度を抑制して高い骨伝導性を示す一方、埋入手術時のデバイス変形や骨ネジのねじ込み操作でできた被膜のキズが腐食の起点になる可能性が高い。本研究では、Ca-P被膜に粘性で親水性のポリエチレングリコールやポリアクリル酸を修飾すると、被膜の欠陥修復を促進することを明らかにした。ポリマー修飾は細胞接着を抑制したことから、デバイス用途に合わせた細胞接着性を示す表面の創出に応用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の自己修復被膜は、被膜の欠損部分を覆うポリマーや基材のインヒビターを放出するように設計されており、放出ポリマーにはポリ乳酸などの疎水性ポリマーが多い。生体材料表面は、生体適合性のために親水性であることが望ましい。本研究で示した親水性ポリマーがMg合金のCa-P被膜の修復を促進する性質は、Mg合金の自己修復被膜に高生体適合性ポリマーを用いて生体適合性の維持・向上ができることを示す重要な知見である。また、自己修復被膜は、Mg合金の局部腐食進展を防いで埋入初期の合金強度の保持期間を長くできるため、生体吸収性Mg合金の実用化を進展させる。この知見は、新しい自己修復被膜の設計指針になる。

研究成果の概要(英文)：Calcium phosphate (Ca-P) coatings were previously developed for biodegradable Mg alloys to control the corrosion speed. Ca-P coatings reduced the corrosion speed of Mg alloys and showed high bone conductivity; whereas, the alloy surface may be scratched during the implantation surgery, accelerating the corrosion. This study thus aimed to enhance the self-healing ability of Ca-P coatings by modifying Ca-P with polymers. It was revealed that the modification of Ca-P coatings with viscous and hydrophilic polymers such as polyethylene glycol and polyacrylic acid enhanced the repairing of the coating defects. The cell adhesion behavior was influenced by the type of polymer and polymer modification procedure, suggesting that the polymer modification is useful to control cell adhesion behavior according to the application of Mg alloy devices. The findings will be useful to design the biocompatible and self-healing corrosion protection coating for biodegradable Mg alloys.

研究分野：腐食防食科学

キーワード：生体材料 生体内溶解性金属材料 生体吸収性 リン酸カルシウム ポリマー複合化 自己修復 細胞接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

役目を終えたら溶解し、生体に吸収されて消失する、生体吸収性/生体内溶解性のマグネシウム (Mg) 合金の開発や臨床試験が、主に欧米や中国で行われている。動物埋入試験や臨床試験の結果として、比較的高耐食性の Mg-3Al-1Zn (AZ31) 合金や Mg-4Y-3(RE, Zr) (WE43) 合金でも、生体環境中での初期の腐食が速すぎること、および早期の局部腐食による強度低下が懸念されることが報告されている。

生体吸収性 Mg 合金のための耐食性被膜には、埋入手術時に被膜にできるキズからの局部腐食発生/進展が抑制される性質、埋入初期の局部腐食を抑制する性質、患部の治癒に合わせて基材 Mg 合金の腐食溶解を継続させる性質および生体適合性（骨伝導性など）が求められる。筆者らは、Mg 合金の腐食速度抑制を目指して、水酸アパタイト (HAp) およびリン酸八カルシウム (OCP) などのリン酸カルシウム (Ca-P) 被膜を開発した。そして、培養液中やマウス皮下で Mg 合金の腐食を抑制すること、および培養液中では被膜の欠損部に Ca-P が析出して欠損部が修復されることを明らかにした。そこで、Ca-P 被膜の欠損修復性を向上して埋入初期の局部腐食の発生と進展を抑制するとともに、被膜の透水性を保持して被膜下での基材 Mg 合金の均一な腐食を継続させるような被膜への改良が求められる。

ポリエチレングリコール (PEG) は、生体適合性が高く、Ca-P 析出を促進する親水性ポリマーであり、水溶液は粘性を示す。親水性により Ca-P 被膜の透水性を保持しつつ、局部腐食箇所などの被膜欠損部への Ca-P 析出を促進することが期待される。また、ポリアクリル酸 (SPA) はアニオン性で、水溶液は粘性を示し、pH に依存して粘性が変化する。これらポリマーの粘性により、HAp 被膜欠損部で腐食が発生すると、欠損周囲の pH を高い状態で保持し、液中からの Ca-P や Mg(OH)₂ などの析出を促進することが期待できる。

2. 研究の目的

生体環境中で Ca-P 析出を促進する PEG などのポリマーを HAp 被膜に修飾し、生体内での被膜欠損箇所への Ca-P 析出を促進し、被膜の欠損修復性を向上させることを目的とする。親水性ポリマーを用いることで被膜の透水性を保持し、被膜下での基材 Mg 合金の腐食溶解を継続させ、患部の治癒後の基材消失を担保する。

ボーンプレートやスクリューなどの骨固定デバイスは、手術中に患部の形状に合わせて変形されたり、骨にねじ込まれたりするため、血液などに接した状態で材料表面にキズが入る恐れがある。そこで、被覆 Mg 合金の表面に大気中でキズを付けた場合の被膜の欠損修復挙動だけでなく、疑似体液中で *in situ* に発生する被膜のき裂修復挙動を検討した。

3. 研究の方法

3. 1 ポリマー修飾 HAp 被覆 Mg 合金の自己修復性

筆者らが開発した Ca-P 被覆溶液を用い、処理温度 60°C、1 時間で、AZ31 合金ディスク（径 15 mm、厚さ 2 mm）および AZ31 薄板引張り試験片（厚さ 300 μm）表面に HAp 被覆した。HAp 被覆前の AZ31 合金ディスクおよび薄板引張り試験片の表面は #1200 SiC 研磨紙で仕上げた。

修飾ポリマーには、ポリエチレングリコール (PEG : MW ~6,000) およびポリアクリル酸ナトリウム (SPA : MW ~60,000) を用いた。PEG 修飾は、室温の 50% wt/vol PEG 水溶液への 1 分間浸漬、SPA 修飾は、室温の 10% wt/vol SPA/pH 8 リン酸バッファーへの 10 秒間浸漬によるディップコーティングで行った。

HAp 被膜の欠損修復に及ぼす SPA の影響を検討するため、HAp 被覆 AZ31 (HAp-AZ31) および SPA 修飾 HAp 被覆 AZ31 (SPA-HAp-AZ31) ディスクの表面にカッターで金属に達するキズを付け、37°C の Hanks 液中への浸漬試験を行った。7 日間浸漬後、キズ周囲の電子顕微鏡 (SEM) 観察およびエネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を行った。

水溶液中で *in situ* に形成する被膜のき裂修復挙動を検討するため、疑似体液中での研磨まま AZ31 (Uncoated AZ31)、HAp-AZ31、SPA-HAp-AZ31 および PEG 修飾 HAp 被覆 AZ31 (PEG-HAp-AZ31) の低歪み速度引張り (SSRT : Slow strain rate tensile) 試験を行った。引張り試験機に取付けた試験片周囲を、37°C に加温した Hanks 液で満たし、自然浸漬電位 (ocp) を測定しながら 1 時間静置した後、引張速度 0.001 mm min⁻¹ で引張り試験を行った。破断後の試験片の平行部およびその断面の SEM 観察を行った。

PEG は生体適合性に優れ、すでに生体材料として使用されていることから、PEG 修飾条件の改善による AZ31 合金の Hanks 液中 SSRT 破断寿命の向上を試みた。分子量 6,000 の PEG の融点は 60°C 付近であることから、PEG 水溶液を 60°C に加温し、HAp-AZ31 引張り試験片のディップコーティングを行った。

3. 2 ポリマー修飾表面の細胞適合性

PEG を修飾したポリマー表面は細胞接着を抑制すること、SPA の細胞適合性は不明であることから、PEG を研磨まま AZ31 表面に直接修飾した表面および SPA-HAp(90)-AZ31 表面での骨芽細胞培養試験を行った。#1200 SiC 研磨紙で仕上げた AZ31 ディスクを、40°C に加温した 5% PEG もしくは 50% PEG 水溶液に 1 時間浸漬し、5%PEG(40)-AZ31 および 50%PEG(40)-AZ31 試

料を作製した。SPA-HAp(90)-AZ31 試料は、処理温度 90°C、1 時間で HAp 被覆した AZ31 ディスクを、室温の 10% SPA/pH 8 リン酸バッファーに 10 秒間浸漬して作製した。

研磨まま AZ31、5%PEG(40)-AZ31、50%PEG(40)-AZ31、HAp(90)-AZ31 および SPA-HAp(90)-AZ31 ディスクを 24 well 細胞培養プレートに入れ、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を各 well に 1 mL の培養液とともに 50,000 cells 播種し、Day 1 に分化培地に交換した後、3 日間培養した。脱水固定後、ギムザ染色し、光学顕微鏡で細胞密度および形態の観察を行った。

4. 研究成果

4.1 ポリマー修飾 HAp 被覆 Mg 合金の自己修復性

図 1 に表面に平行なキズを 1~3 本付けた後、Hanks 液に 7 日間浸漬したディスク試料の外観写真を示す。HAp-AZ31 では、破線で囲んだ部分に示すように、キズの中央付近を起点とした糸状腐食

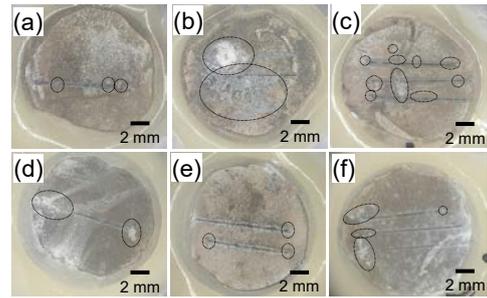


図1 Hanks液中7日間浸漬後の表面に1~3本のキズを付けた(a)-(c) HAp-AZ31および(d)-(f) SPA-HAp-AZ31 ディスクの外観。

食がみられた。キズが2本以上になると糸状腐食の発生頻度や糸状腐食の成長が大きい傾向がみられた。SPA-HAp-AZ31 では、キズ端部からの糸状腐食発生はみられたが、中央付近からの糸状腐食発生はみられなかった。

3本のキズの中央のキズの表面 SEM 像、および断面 SEM 像と EDS 分析の結果をそれぞれ図 2 および 3 に示す。SPA 修飾試料では傷内部への顆粒状物質の析出が顕著であり、EDS 分析より、顆粒状物質はリン酸カルシウムであることがわかった。HAp-AZ31 では、キズの内壁はリン酸カルシウムを主成分とする厚い堆積物で覆われていたが、内壁を起点とする孔食の発生もみられた。SPA-HAp-AZ31 のキズ内部では HAp-AZ31 よりも薄い均一なリン酸カルシウム堆積物層が形成され、内壁からの孔食の発生はみられなかった。キズ内壁からの孔食発生の有無は、図 1 の外観に示すキズの中央付近からの糸状腐食発生の有無と一致していた。これより、SPA 修飾でキズ部分でのリン酸カルシウム析出が促進され、より保護性の高い堆積層がキズを修復することが明らかになった。

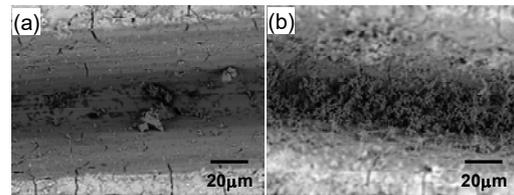


図2 平行に3本のキズを付けた後にHanks液に7日間浸漬した(a) HAp-AZ31および(b) SPA-HAp-AZ31の中央のキズのSEM像。

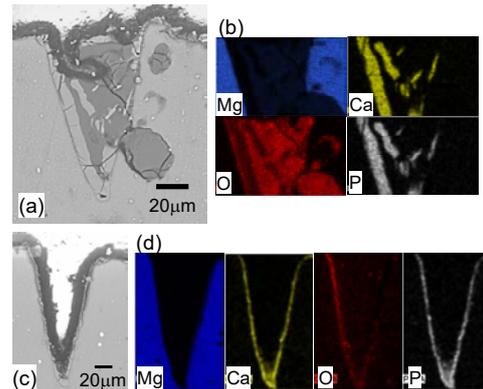


図3 Hanks液に7日間浸漬した(a, b) HAp-AZ31および(c, d) SPA-HAp-AZ31の中央のキズの(a, c) 断面SEM像および(b, d) EDSによる元素マッピング。

SPA もしくは PEG 修飾した HAp-AZ31 の Hanks 液中での SSRT 試験で得られた応力-ひずみ曲線を図 4(a)に示す。図 4(b)に 3 回の繰り返し試験で得られた平均の引張り破断寿命を示す。

HAp-AZ31 は研磨まま AZ31 よりも短い寿命 (小さいひずみ) で破断したのに対し、SPA および PEG 修飾により HAp-AZ31 に対して破断寿命 (ひずみ) がそれぞれ約 50%および約 40%改善した。SPA および PEG 修飾による HAp 被膜のき裂修復促進が示唆された。

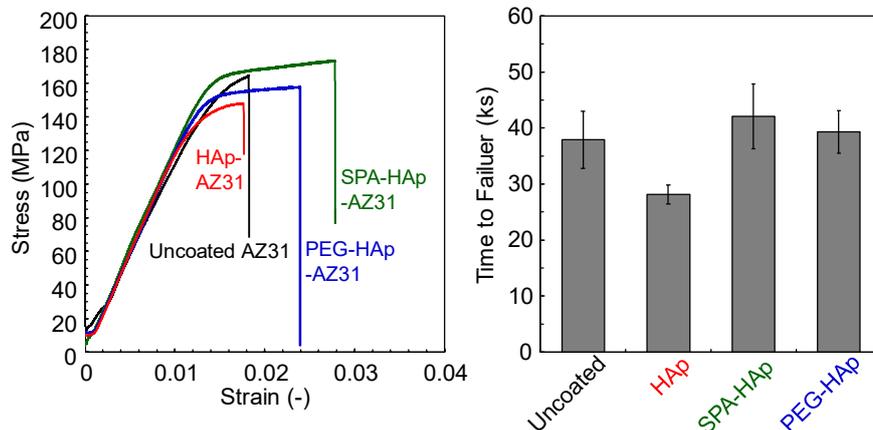


図4 Hanks液中でのuncoated-, HAp-, SPA-HAp-およびPEG-HAp-AZ31の(a) 応力-ひずみ曲線および(b) 破断までの時間。

図5に破断後の試験片より化学的処理で腐食生成物および被膜を除去した破面全体、図6にき裂発生点付近の破面および破面付近の平行部表面のSEM像を示す。破面全体像では、表面の被覆の種類にかかわらず、脆性と延性領域が観察された。脆性領域がき裂進展領域で、延性領域が急速破断領域と考えられる。AZ31合金は蒸留水や0.05-0.5wt% NaCl水溶液中で水素脆化を示す(Tuchscheerer et al., J. Mater. Sci., 50, 5104 (2015).) ことから、脆性領域では水素脆化が起こっていた可能性がある。HAp-AZ31の破面では、図6中に矢印で示すき裂発生点付近から脆性の破面が観察され、平行部表面のき裂開口部に明瞭な腐食はみられなかった。SPA-HAp-AZ31の破面では、き裂発生点付近は延性を示し、平行部表面のき裂開口部には10 μ m程度の底が丸い碗状の腐食孔が形成されていた。き裂発生点付近の延性領域は腐食孔の内壁と考えられる。PEG-HAp-AZ31の破面のき裂発生点付近には明瞭な延性領域はみられなかったが、平行部表面に数 μ mの碗状の腐食孔がみられたことから、き裂発生点付近に延性領域が残っている可能性がある。SPAやPEGの存在で、HAp被膜のき裂下でのMg合金の腐食が促進され、腐食孔の底部が丸くなったために応力集中が緩和され、き裂の伸展が抑制されたと考えられる。

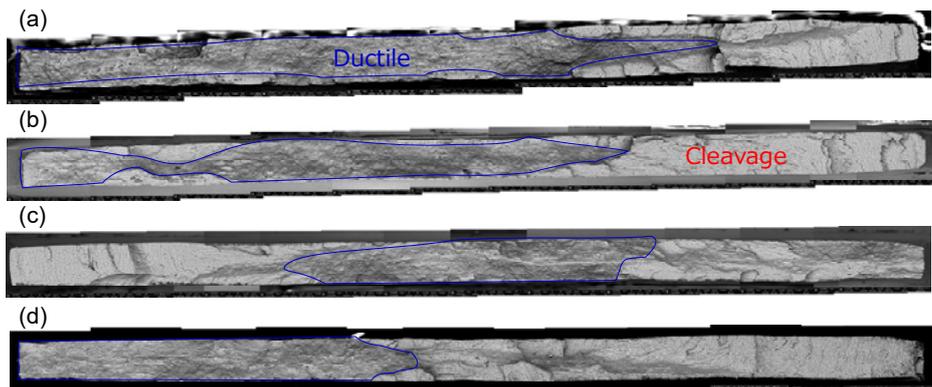


図5 Hanks液中でのSSRT試験で破断した(a) uncoated、(b) HAp-、(c) SPA-HAp-および(d) PEG-HAp-AZ31の破面のSEM像。

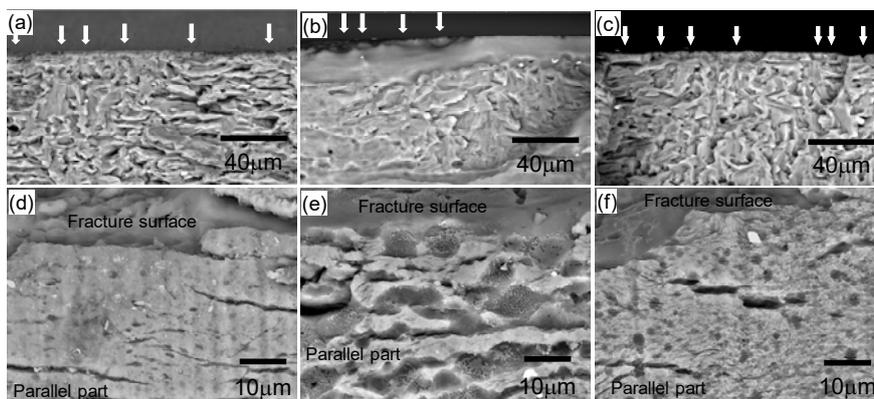


図6 Hanks液中でのSSRT試験で破断した(a, d) HAp-、(b, e) SPA-HAp-、(c, f) PEG-HAp-AZ31の(a-c) 破面におけるき裂発生点付近のSEM像および(d-f) 破面付近の平行部の表面SEM像。

4. 2 PEG修飾温度がPEG-HAp被覆Mg合金の自己修復性に及ぼす影響

図7にPEG修飾温度を60 $^{\circ}$ Cにした場合のHanks液中での応力-ひずみ曲線を示す。室温で修飾した場合よりも、60 $^{\circ}$ C修飾では破断ひずみが低下し、60 $^{\circ}$ C修飾でPEG濃度を50%から5%に減少すると破断ひずみがわずかに改善した。PEG水溶液はpH 5.5付近の弱酸性であることから、加温によりPEG水溶液中での基材AZ31の腐食が発生した可能性が考えられる。PEG修飾によるHAp被膜の欠損修復促進およびこれによるMg合金の強度特性の改善には、さらに検討が必要である。

4. 3 ポリマー修飾表面の細胞適合性

図8に、uncoated AZ31、5%PEG(40)-AZ31、

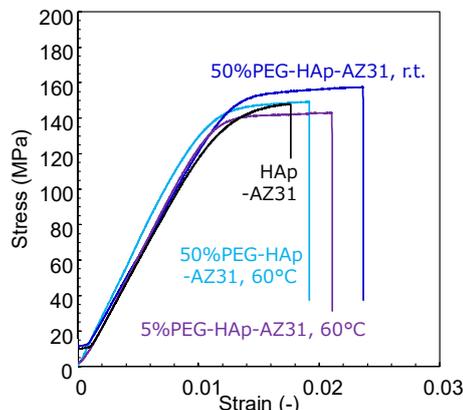


図7 60 $^{\circ}$ Cの50%PEGもしくは5%PEG水溶液で修飾した50%PEG-HAp-AZ31および5%PEG-HAp-AZ31、室温でPEG修飾したPEG-HAp-AZ31およびHAp-AZ31のHanks液中での応力-ひずみ曲線。

50%PEG(40)-AZ31、HAp(90)-AZ31 および SPA-HAp(90)-AZ31 表面で 3 日間培養した骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の光学顕微鏡像を示す。5%PEG 修飾表面と研磨まま AZ31 表面とでは、細胞密度に顕著な差はみられなかったが、50%PEG 修飾表面での細胞密度は研磨まま AZ31 表面におけるよりも低く、PEG 修飾で細胞接着が抑制されることがわかった。一方、PEG 修飾表面でも細胞は良く伸展し、細胞形態には PEG 修飾の影響はみられなかった。PEG 修飾液の濃度で細胞接着挙動が変化したことから、PEG 修飾はデバイスの用途に適した細胞接着性を示す表面の創出に応用できることが明らかになった。

HAp(90)-AZ31 に SPA 修飾すると、細胞密度が減少し、白い腐食生成物が増加した。SPA 修飾表面の細胞は研磨まま AZ31 表面の細胞と同程度に良く伸展していたが、HAp(90)-AZ31 表面の細胞はさらによく伸展していた。SPA はアニオン性のため、細胞の接着および伸展を抑制することが示唆された。

得られた結果より、生体吸収性 Mg 合金の HAp 被膜の欠損修復促進のためのポリマーには、細胞適合性の観点から SPA よりも PEG の方が適していると考えられる。前述のように PEG の効果は修飾温度により変化することから、今後は PEG の最適な修飾条件の検討が必要である。

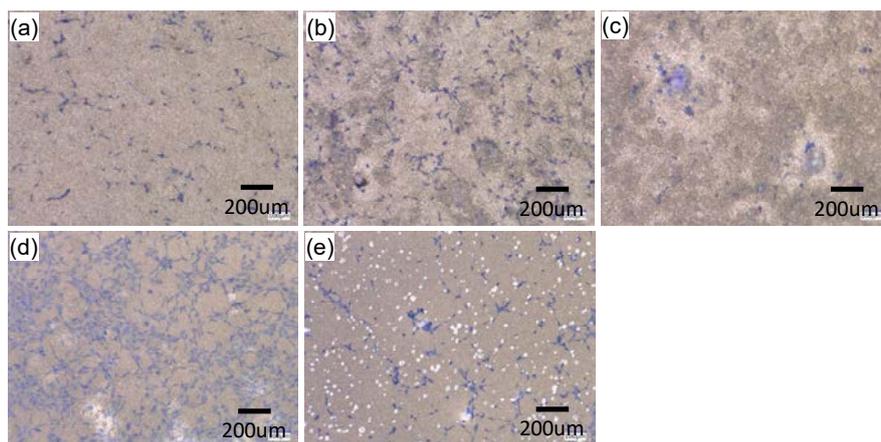


図8 (a) uncoated AZ31、(b) 5%PEG(40)-AZ31、(c) 50%PEG(40)-AZ31、(d) HAp(90)-AZ31および(e) SPA-HAp(90)-AZ31表面で3日間培養した骨芽細胞様細胞の光学顕微鏡像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- 1) 廣本祥子, 生体内溶解性マグネシウム合金の表面処理, 表面技術, 69, 323-328 (2018).
- 2) 土井康太郎, 廣本祥子, 生体用マグネシウム合金の腐食評価と表面改質, 電気化学, 86, 236-241 (2018).
- 3) S. Hiromoto, K. Doi, Self-Healing Behavior of Sodium Polyacrylate-Hydroxyapatite Coatings on Biodegradable Magnesium Alloy, CORROSION, 査読有, 73, 1461-1477 (2017).
- 4) S. Hiromoto, T. Yamazaki, Micromorphological effect of calcium phosphate coating on compatibility of magnesium alloy with osteoblast, Science and Technology of Advanced Materials, 査読有, 18, 96-109 (2017).

〔学会発表〕(計11件)

- 1) 廣本祥子, Mg合金に被覆したポリマー複合化水酸アパタイト被膜の自己修復挙動, 第1回日本金属学会 第4分野講演会「金属系バイオマテリアルサイエンス」, 仙台 (2018). (招待)
- 2) 廣本祥子, 生体用 Mg合金の表面被覆と諸特性の検討, 第23回課題研究成果発表会 軽金属の表面処理と新しい展開, 大阪 (2018). (招待)
- 3) 廣本祥子, 生体用マグネシウム合金のリン酸カルシウム被覆による腐食速度制御, 平成30年度技術講演会 マグネシウム合金の医療分野への展開, 東京 (2018). (招待)
- 4) A. Roguska, S. Hiromoto, Evaluation of polyethylene glycol coating for biodegradable magnesium alloy stents, 東北大学金属材料研究所秋山研究室セミナー (2018). (招待)
- 5) A. Roguska, S. Hiromoto, Corrosion behavior of polyethylene glycol coated WE43 magnesium alloy, 日本金属学会 2018年春期 (162回) 講演大会, 千葉 (2018).
- 6) 廣本祥子, 野田なほみ, 山崎智彦, リン酸カルシウム被覆 AZ31合金の劣化に及ぼす様々な細胞の影響, 日本金属学会 2018年春期 (162回) 講演大会, 千葉 (2018).
- 7) A. Roguska, F. Marquet, S. Hiromoto, Corrosion behavior of hydrophilic polymer coated biodegradable magnesium alloy in culture medium, 日本金属学会 2017年秋期 (第161回) 講演大会, 札幌 (2017).
- 8) S. Hiromoto, K. Doi, Effect of Combination of Anionic Polymer with Calcium Phosphate Coating on Corrosion Behavior of Magnesium Alloy in Physiological Solution, 232nd ECS Meeting, National

Harbor, USA (2017).

- 9) 廣本祥子, P.-E. Smanio-Besombes, P. Girin, 生体用 Mg 合金の水酸アパタイト被膜へのポリマー複合化による自己修復能の促進, 日本金属学会第 160 回春期講演大会 (2017).
- 10) S. Hiromoto, In vitro and In vivo Corrosion Behaviour of Calcium Phosphate Coated Magnesium Alloy, Corrosion-Aqueous, Gordon Research Conference 2016, New London, USA (2016). (招待)
- 11) S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, Corrosion behavior of calcium phosphate-coated biomedical magnesium alloy under in vitro and in vivo environments, PRiME 2016, Honolulu, USA (2016).

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 廣本祥子, 3 節 生体吸収性 Mg 合金のリン酸カルシウム被覆, 生体吸収性材料の開発と安全性評価, 技術情報協会, p.14-p.20 (2017). (ISBN: 978-4-86104-689-6)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 積層体、及び、積層体の製造方法
発明者: 廣本祥子, 染川英俊, 荏原充宏
権利者: 国立研究開発法人物質・材料研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2018-163437
出願年: 2018
国内外の別: 国内

〔その他〕

https://samurai.nims.go.jp/profiles/hiromoto_sachiko

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山崎 智彦

ローマ字氏名: YAMAZAKI Tomohiko

所属研究機関名: 物質・材料研究機構

部局名: 機能性材料研究拠点

職名: 主幹研究員

研究者番号 (8 桁): 52419264