

機関番号： 11301

研究種目： 基盤研究（B）

研究期間： 2008 ～ 2010

課題番号： 20390496

研究課題名（和文）

新しい生体吸収性マグネシウム合金を利用した複合機能性医用材料の開発と応用

研究課題名（英文）

The development and application of composite functional medical device using new biodegradable magnesium alloy

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

生体内分解特性を有するマグネシウム合金の医療応用を目指して、安全性と生体内挙動、さらに骨形成効果について、*in vivo*、*in vitro*での各種試験を行った。*In vitro*試験では、骨芽細胞のマグネシウムイオンによるアルカリフォスファターゼ活性の上昇が確認された。また *in vivo*試験では、ラット脛骨部皮下埋入試験で、合金組成によるガス発生量と吸収動態の違いが確認され、ガス発生と吸収速度の相関性が明らかになった。さらにウサギ脛骨内埋入試験では、吸収に伴って周囲の骨形成が確認された。以上の結果からマグネシウム合金の安全性と骨形成に対する効果が期待された。

研究成果の概要（英文）：

To apply biodegradable magnesium alloy for medical device, its biocompatibility and absorption velocity were examined *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, elevated activity of alkaline phosphatase was confirmed in osteoblast by magnesium ion addition. Magnesium alloy revealed the relationship between the degradation velocity and amount of gas formation. There was no pathological change in skin and bone tissue around magnesium alloy. The newly bone formation around magnesium alloy implant was seen *in vivo* examination. The biocompatibility and bone formation of magnesium alloy were confirmed by these results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：マグネシウム合金、生体吸収性、骨形成、動物実験

1. 研究開始当初の背景

生体に用いる金属材料はすぐれた機械的

強度、弾性、剛性などから、多くの臨床領域で必要不可欠な医用材料として利用されて

いる。顎顔面領域で用いる骨折固定材も同様に、力学的な負荷に耐えうる機械的強度に加え、生体内に埋入されるため生体安全性、賦形性などが必要で、チタンなどが利用されてきた。しかし金属材料は治癒後も生体内に残存することから、再手術による除去が必要な場合があり、患者の負担が大きいことなどが問題としてあげられていた。近年、生体内吸収性の高分子材料などが骨折固定材として開発されたが、強度不足により適応症例が限られ、治療中の破損や吸収期間が長いなどの問題がある。そこで金属材料として機械的強度を有しながら生体内で吸収されるマグネシウム合金の医療用生体材料としての開発と応用を検討することを目的として申請された。マグネシウム合金は、金属材料でありながら生体内で吸収される材料として、国内外で研究が行われ始めている。近年、国外ではドイツ)、中国、オーストラリアなどが開発に取り組み、また国内では大阪大学などが研究に着手しているが、使用を検討している材料は、工業用マグネシウム合金など機械的強度の低いものや有害性のある成分を含んだもので、医療用金属材料として問題が多い。そこで本研究グループは、世界に先駆け生体に安全な元素の添加と材料の微細組織制御により、機械的強度と生体内吸収性を兼ね備えた新しいマグネシウム合金の開発を進めてきた。すでに予備実験などから、生体内での材料の吸収や骨置換、また材料自体の強度などを幅広く調整できる技術を獲得し、これらについてもすでに特許を出願しており、早期の臨床応用の実現の可能性が高い。またマグネシウムは生体必須元素として安全性はもとより、硬組織にも含まれ骨格形成に重要な役割があることが知られ、局所、細胞レベルでの骨形成への役割、機序については不明な点が多いものの硬組織形成への効果も注目されている。本研究では、*in vitro*、*in vivo*の両系で多角的に検討し、金属材料として、機械的強度、賦形性、生体安全性に加え、生体吸収性、さらに固定部の速やかな骨形成を促す組織再生の効果の可能性を含むマグネシウム合金を新しい複合機能性生体用金属材料として開発、応用を目指す。

2. 研究の目的

(1) 生体安全性の確認

合金に対する組織反応を観察することで生体安全性について確認するために、ラットの体内に埋入する。まず樹脂包埋標本により合金-組織界面における構造、組織反応を病理組織学的に観察する。処理機構、炎症反応などを観察する。また全身臓器への沈着や排出経路を確認するため、遠隔臓器と血液、尿を採取し、有害作用がないことや排出経路、期間を確認する。

(2) 合金の生体内分解挙動

生体内での吸収過程は、材料の第二成分の組成の違いや埋入部位の組織の種類によって異なると考えられ、使用用途や使用部位に応じた材料吸収の違いについて、マイクロCTによる吸収量の経時的変化の定量、マイクロCTによる発生ガス吸収を確認する。

(3) マグネシウムの骨芽細胞活性効果

合金による骨形成の評価は、マグネシウムイオンの骨芽細胞への影響を評価することで検討を行う。*in vitro*系では、マウス、ヒト由来細胞を用いる。骨芽細胞分化誘導系では、ALP活性を測定し、マグネシウムおよび合金へのカルシウム添加による骨形成への影響を検討する。

(4) マグネシウム合金の生体内骨形成

マグネシウムインプラントを脛骨に埋入し、周囲組織の反応を骨形成を中心として観察する。特にマイクロCTや組織標本作製して、細胞、組織学的な観点で観察を行う。

3. 研究の方法

(1) 生体内組織反応観察

ラットを用いて、全身および局所麻酔下にて10×2×1mmのプレート状マグネシウム合金(純マグネシウム、ZK、WE、開発合金)を脛骨部皮下、骨膜下に埋入した。埋入後、1、2、4、8週後、過剰麻酔にて屠殺し、マイクロCT撮影後、樹脂包埋し標本作製観察した。

(2) 生体内分解挙動

(1)の実験でのマイクロCT撮影データから残存金属の体積を測定する。腐食生成物層があることが確認されているが、CTの計測データでは、その層を除外し、腐食生成物層は樹脂包埋組織標本にて確認を行う。

(3) マグネシウムの骨が細胞活性評価

純マグネシウムを水溶液に溶かし、水溶液中のイオン濃度をそれぞれ300、1000ngの溶液を作製する。培養液中に混合し、5日後の骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ、RUNX2のmRNA量を測定する。

(4) マグネシウム合金の生体内骨形成

ウサギ脛骨に円形のあなを開け、円柱状(直径2mm、長さ7mm)のマグネシウム合金を埋入する。埋入後、4、8週で過剰麻酔にて屠殺を行い、マイクロCT撮影後、樹脂包埋し、組織標本作製する。

4. 研究成果

(1) 生体内での合金と組織反応

埋入部は、一部の合金で肉眼的にガス発生に伴う腫脹がみられた。しかし発赤などの著明な炎症所見はみられなかった。合金は、徐々に表面にて不規則に腐食、崩壊がみられた。また一部最表層に腐食生成物と思われるX線不透過性の層がみられた。ガスは材料周

囲に大きい物は単膨性または多膨性にみられたが、少ない物は合金と組織の間にわずかな隙間が観察される程度であった。合金の種類の違いにより、吸収とガス発生は異なる挙動を示した。

図1. 皮下埋入の合金周囲に形成されたガス

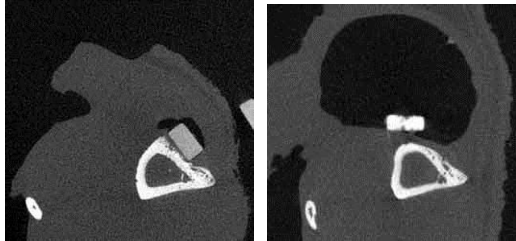
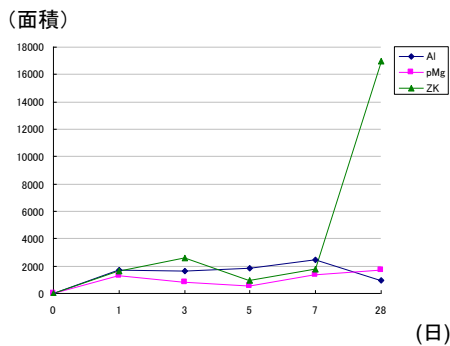
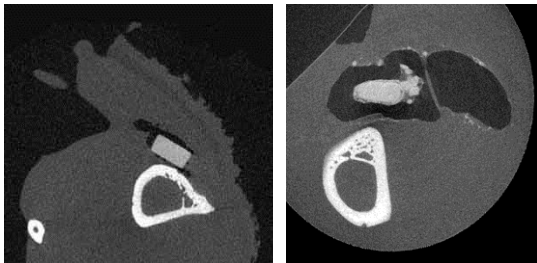


図2. ガス発生量の経時的変化（断面積）



吸収は速いものでは1か月程度で半分以上吸収されるが、吸収が遅い合金は、4か月後もあまり吸収が進んでいなかった。さらにガス発生量の著明な合金ほど腐食、吸収速度が速く、ガス発生量は、吸収速度の調整によって制御できると考えられた。図3は、左が開発合金、ガス発生量は少なく、合金も形状が保たれている。右はZKで、大量のガスが発生し、合金の形状は変化し、角が取れて不規則な形状を示した。

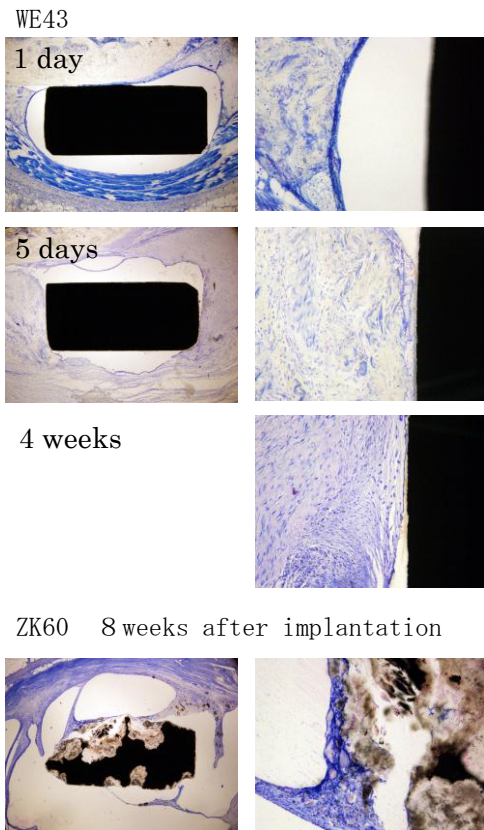
図3. ガス発生と分解量



組織標本でも、埋入された合金の周囲には、ガスが発生し、合金が分解される様子が確認された。図4は、WEとZKを埋入した組織の標本で、埋入初期は、金属表面の反応に伴うガス発生がみられ、金属と組織の間は解離し

ている。時間経過とともに表面に腐食生成物が形成され、その表面にはフィブリンの析出さらに線維性組織が接触している。病理組織学的には炎症反応は軽度であった。埋入初期には炎症反応はみられたが、埋入による外科的侵襲による影響によるものと考えられた。吸収の速いZKでは、空孔壁内に腐食生成物がみられ、腐食生成物の破壊、吸収も合金分解の特徴と考えられた。

図4. 埋入合金周囲の組織



ウサギ脛骨面埋入試験より、屠殺時、採取した血液、尿のマグネシウム濃度については、マグネシウムの分解と相関せず、基本的に一定値を示した。速やかな排出が行われていると思われた。

図5. 血中濃度の推移

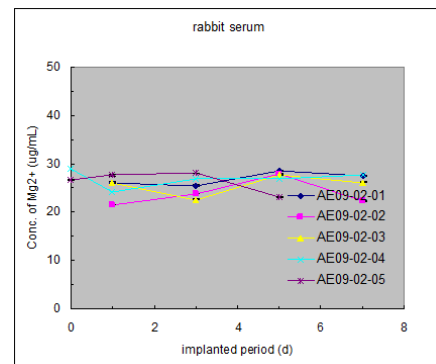
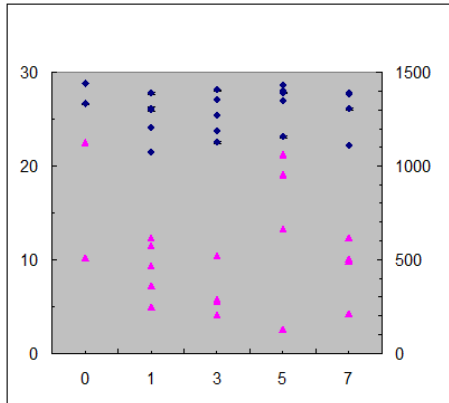
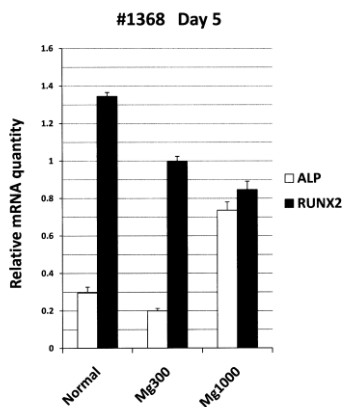


図6. 尿中濃度の推移



マグネシウムイオンに対する細胞反応について in vitro 試験を行った。結果として、マグネシウムイオンを含む培地で、アルカリフォスファターゼの活性が上昇した。しかし塩化物イオンを含むなど、培地の調整について改善する必要があると考えられた。

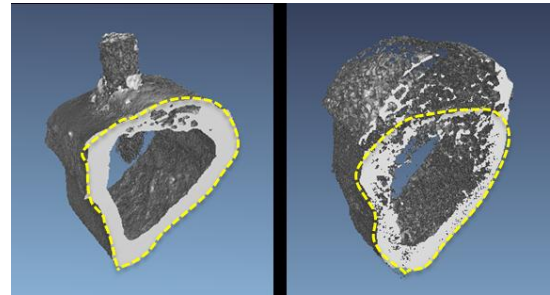
図7. マグネシウムイオンによる ALP 活性および RUNX2 の発現



スクリー状のカルシウム系、アルミニウム系のマグネシウム合金をウサギ脛骨に埋入したものについて、カルシウム系合金の長期埋入で、合金の分解が進むと同時に脛骨外に半球状に新生骨の形成が確認された。マイクロ CT 像では、合金の吸収について、アルミニウム系に比べカルシウム系の吸収が早く、さらに部位別では、骨髄腔内露出部、皮下露出部、皮質骨内の順で吸収が進んでいた。骨髄腔内では、アルミニウム系でも吸収が進んでおり、円錐状に残存していた。一方カルシウム系は長期経過では、ほぼ分解され、分解された合金片と思われる不透過像が散見された。ガス発生については、いずれの合金も長期経過においては明らかな貯留はみられず組織学的にも為害作用を示さないと

われた。

図8. 骨内インプラントの周囲骨形成：左はAl系合金、右はCa系合金で、黄色い線が埋入前の脛骨断面形態



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0件)

〔学会発表〕(計7件)

1. 清水良央、山本玲子、向井敏司、白井暢子、狩野充浩、千葉亜耶美、金高弘恭、菊地正嘉、マグネシウム合金の生体材料応用、日本実験力学会 2008 年次講演会、2008 年 6 月 30 日-7 月 2 日、北海道札幌市

2. 清水良央、山本玲子、向井敏司、白井暢子、狩野充浩、岡山啓昌、金高弘恭、菊地正嘉、生体吸収性マグネシウム合金の生体内動態に関する研究、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 23-25 日、東京

3. 清水良央、山本玲子、向井敏司、白井暢子、狩野充浩、工藤忠明、金高弘恭、菊地正嘉、In vivo biodegradation and biocompatibility evaluation of magnesium and magnesium alloys、The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai、平成 21 年 1 月 15-16 日、宮城県仙台市

4. 山本玲子、清水良央、白井暢子、向井敏司、生体吸収性マグネシウム合金の生体内埋入試験による分解挙動観察、日本金属学会 2009 年春期大会、平成 21 年 3 月 28 日-30 日、東京

5. 清水良央、市川博之、生体材料評価のための in vivo 実験-生体吸収性金属材料の評価法について-、日本金属学会 2010 年春期大会、平成 22 年 3 月 29 日、茨城県つくば市

6. 向井敏司、山本玲子、清水良央、生体吸

収性を有する高強度マグネシウム合金の機械的性質、日本金属学会 2010 年春期大会、平成 22 年 3 月 29 日、茨城県つくば市

7. Shimizu Yoshinaka, Kanetaka Hiroyasu, Yamamoto Akiko, Mukai Toshiji, Sato Takumi, Kano Mitsuhiro, Kudo Tada-aki, Zhang Ye, Ichikawa Hiroyuki, Kumamoto Hiroyuki, The application of biodegradable membrane made of magnesium alloy to rat bone defect, The 4th International symposium for interface oral health science, 2011 年 3 月 7、8 日、宮城県仙台市

〔図書〕（計 1 件）

1. Shimizu Yoshinaka, Yamamoto Akiko, Mukai Toshiji, Shirai Yoko, Kano Mitsuhiro, Kudo Tada-aki, Kanetaka Hiroyasu, Kikuchi Masayoshi、Medical application of magnesium and its alloys as degradable biomaterials、Interface Oral Health Science 2009、Springer、2010、318-320

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

向井 敏司 (MUKAI TOSHIJI)
独立行政法人物質・材料研究機構・新構造
材料センター・グループリーダー
研究者番号：40254429

山本 玲子 (YAMAMOTO AKIKO)
独立行政法人物質・材料研究機構・生体材
料センター・グループリーダー
研究者番号：20343882

(3) 連携研究者

該当者なし