

# 生体用マグネシウム合金の リン酸カルシウム被覆

廣本 祥子\*

## 1. はじめに

患部の治癒後は不要になる、骨固定用プレート・スクリューや血管拡張用ステントなどの医療用デバイスのため、生体内で溶解、吸収、消失する材料が求められている。現在のステンレス鋼や Co-Cr 合金製ステントは、抜去できないため体内に留まることになり、再狭窄した際の新たなステント埋入の支障になっている。骨固定材は患部の治癒後に抜去することが多いが、患者の身体的、金銭的負担が大きい。そこで、ポリ L 乳酸 (PLLA) 製やリン酸カルシウムを複合化した PLLA 製の生体内溶解性デバイスが実用化されている。しかし、PLLA は強度が低いためにいくつかの課題があり、適用部位に限られる、プレート厚やステントのスレッド径が大きくなる、および生体内での分解に数年かかるなどが挙げられる。このため、強度・靱性に優れ、PLLA よりも短期間で溶解する生体内溶解性材料として Mg/Mg 合金が注目されている(図 1)。

Mg/Mg 合金は生体内環境で容易に腐食溶解し、骨と同程度のヤング率(40~45 GPa)を示すこと、Mg イオンは生体必須元素で毒性が低く、骨形成を促進する性質が報告されていること等から、骨固定材や血管拡張用ステントへの応用が検討されている<sup>(1)-(6)</sup>。既存の純 Mg, Mg-4Y-3RE (wt%) (WE43), Mg-3Al-1Zn (AZ31), Mg-4Li-4Al-2RE (LAE442)などが候補合金もしくは研究用として検討に用いられている。同時に、既存合金より比較的安価な元素で構成された、強度および耐食性に優れた生体用 Mg 合金の開発

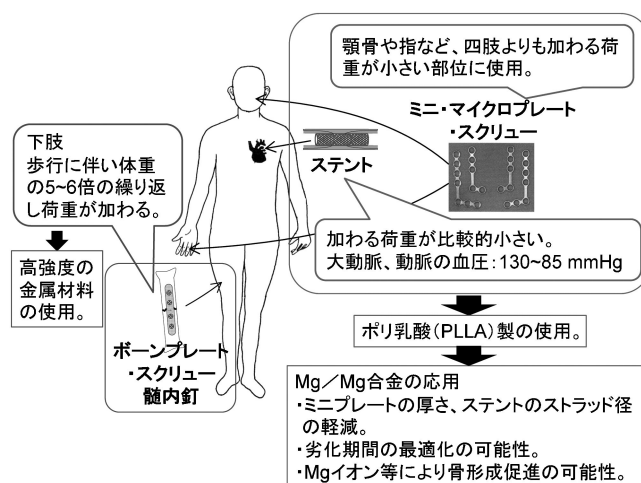


図 1 患部の治癒後には本来必要がなくなる医療用デバイス。

が盛んに行われている<sup>(4)(7)(8)</sup>。近年では、WE43の組成を基にした Mg 合金製のステントおよび骨ネジが、欧州の CE マーク<sup>†</sup>を取得した<sup>(9)-(11)</sup>。

Mg/Mg 合金を生体内に埋入すると、短期間のうちに腐食が始まり、Mg<sup>2+</sup> イオン、OH<sup>-</sup> イオンおよび H<sub>2</sub> ガスから成る腐食生成物が発生するとともにデバイス強度が低下する<sup>(12)</sup>。既存の Mg 合金製ステントでは腐食に伴う強度低下によるリコイルが報告されている<sup>(13)</sup>。埋入したデバイス周囲の血流や体液循環が少ない部位では、発生した腐食生成物が排出されにくいために、デバイス周囲の pH が上昇する、ガス溜まりができるなどの不具合が報告されている<sup>(12)(14)</sup>。

\* 物質・材料研究機構 構造材料研究拠点 腐食特性グループ；主幹研究員(〒305-0047 つくば市千現)  
Calcium Phosphate Coatings of Magnesium Alloys for Biomedical Application; Sachiko Hiromoto\*(\*Corrosion Property Group, Research Center for Structural Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba)  
Keywords: biodegradable magnesium alloys, calcium phosphate coatings, in vitro and in vivo corrosion property, self-healing property, cell viability, fatigue property

† CE マーク：医療機器を合法的に欧州市場で販売するためには、「欧州医療機器指令93/42/EEC」, 「体外診断医療機器指令98/79/EC」もしくは「能動埋め込み型医療機器指令90/385/EEC」のうち、該当するいずれかの指令要件に適合していることを立証する必要がある。CE マークは適合性が認証された製品に付与される。CE マークは製品の性能が優れていることを示すものではない。  
2016年10月25日[doi:10.2320/materia.56.62]

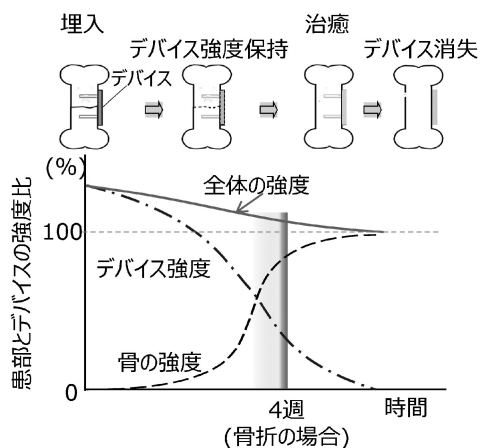


図2 生体用 Mg 合金に求められる劣化過程の一例。

そこで、生体内で患部が治癒するまで十分な強度を保持し(図2)、急激な腐食生成物の発生を抑制するため、腐食速度を抑制する様々な表面処理が検討されている<sup>(15)</sup>。

## 2. 生体用 Mg 合金の表面処理

### (1) 生体用 Mg 合金の表面処理

生体用 Mg 合金の表面処理材および表面処理 Mg/Mg 合金に求められる主な性質をまとめる。

- 生体に安全である。
- 必要な期間にわたって基材 Mg/Mg 合金の強度を保持し、患部の治癒状態に合った速度で基材を腐食溶解させる適切な耐食性を示す。
- 生体適合性が高く、劣化生成物も炎症等の不具合を惹起しない。
- 骨形成促進、抗血栓性、薬物徐放性や抗菌性などの使用部位に応じた生体機能が求められるデバイスもある。
- 被膜にも生体吸収性が必要になる可能性がある。
- 基材の変形などで剥離しない高い密着性を示す。
- 手術器具等で表面に傷が付いても腐食や疲労の促進が小さい。もしくは被膜が自己修復機能を示す。
- 表面処理が基材の強度や疲労強度を大きく損なわない。求められる生体機能は使用部位に依存し、骨固定材用の Mg 合金には骨形成能や骨伝導性を付与するために主にリン酸カルシウム(Ca-P)被覆が、血管拡張ステント用の Mg 合金には薬物徐放のためにポリカプロラクトン(PCL)や PLLA 等の生分解性ポリマー被覆が検討されている(図3)。

開発した処理表面の諸特性評価としては、(b)の耐食性や(c)の生体適合性を評価した報告が多く<sup>(16)-(21)</sup>、(f)の密着性に関する報告もあるが(g)および(h)の基材合金の機械的性質に表面処理が及ぼす影響に着目している報告は少ない<sup>(22)-(25)</sup>。(e)の被膜の生体吸収性の必要性を明確に述べている報告はないが、PCL および PLLA は生分解性であり、後述する Ca-P 被膜の一部については生体内での溶解性が明らかになっている。

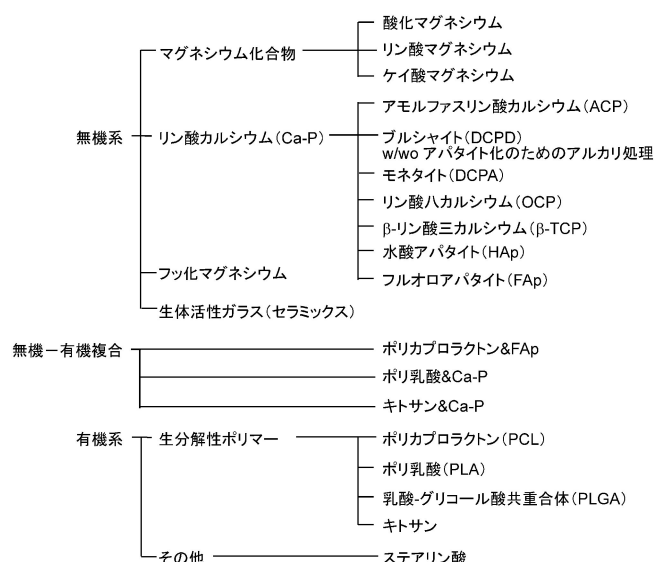


図3 生体用 Mg 合金の耐食被膜として検討されている材料。

表面処理 Mg 合金の *in vitro* 耐食性試験として、疑似体液中での  $H_2$  発生量、重量減や  $Mg^{2+}$  イオン濃度の測定、電気化学測定による耐食性試験が行われており、毒性、生体適合性、骨形成能評価試験として細胞培養試験が行われている<sup>(16)-(19)</sup>。動物埋入による *in vivo* 試験では、マイクロ X 線コンピュータ断層撮影法(X 線 CT)による基材合金の体積変化測定および劣化形態観察、抜去後の周囲組織の組織観察や、抜去サンプルの重量減測定や強度試験などが行われている<sup>(17)-(21)</sup>。表面処理なしの Mg/Mg 合金の疲労強度は疑似体液中で大幅に低下することが報告されている<sup>(26)-(28)</sup>。一方、表面処理した Mg 合金の大気中での疲労特性の報告<sup>(22)(23)</sup>はあるが、疑似生体環境下での報告は寡聞にして知らない。既存の生体用金属材料の不具合は腐食疲労やフレッキング腐食疲労に起因するものが多い<sup>(29)</sup>。今後は、表面処理した Mg/Mg 合金の模擬生体環境下での疲労試験が必要と考えられる。また、き裂発生点になり得る腐食孔を早期に補修する被膜の自己修復能も今後着目されると考えられる。

また、(b)耐食性と(c)生体適合性については、比較的短期間の挙動の検討はされているが、材料の形状が崩れるほど大きく劣化が進んでからの生体適合性は検討されていない。PLLA では埋入1年以上経過後の分解生成物による炎症が起こる場合がある<sup>(30)</sup>ことから、Mg 合金においても劣化生成物の生体適合性が重要である。

### (2) 生体用 Mg 合金のリン酸カルシウム被覆

生体用 Mg 合金の表面処理法には、工業用 Mg 合金の場合と同様に、化成処理、陽極酸化、メッキ処理、電気泳動堆積および塗装などが検討されている。被覆材には生体安全性を考慮し、生体材料としての使用実績がある材料が主に検討されている(図3)。骨固定材表面には、既存の生体用金属材料の骨適合性被膜として使用実績があるリン酸カルシウム(Ca-P)被膜に関する検討が盛んである。

表1 様々なリン酸カルシウム化合物.

名称	Ca/P比	化学式
アモルファス(ACP)	—	—
ブルシャイト(DCPD)	1.0	Ca(HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
モネタイト(DCPA)	1.0	Ca(HPO <sub>4</sub> )
リン酸八カルシウム(OCP)	1.33	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·5H <sub>2</sub> O
α-リン酸三カルシウム(α-TCP)	1.50	α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
β-リン酸三カルシウム(β-TCP)	1.50	β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
水酸アパタイト(HAp)	1.67	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH
ウィットロカイト	1.29 1.36	Ca <sub>18</sub> (Mg, Fe) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> Ca <sub>18</sub> (Mg, Fe) <sub>2</sub> (Ca <sub>1</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub>
フルオロアパタイト(FAp)	1.67	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> F
炭酸アパタイト	>1.67	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3-x</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>x</sub> OH

表1に示すように, Ca-PはCa/P比によって様々な結晶構造を示し, 溶解性も異なる<sup>(31)(32)</sup>. 一般に, Ca/P比が小さいほど溶解性が高い. 水酸アパタイト(HAp)は骨の主成分であるが, 骨のアパタイト構造には炭酸やMgイオンなどが多く含まれる. β-リン酸三カルシウム(β-TCP)は生体内で溶解性を示し, HApとの混合比率で溶解速度を調節できる<sup>(33)</sup>. リン酸八カルシウム(OCP)は生体内でのHApの前駆体であり, 人工骨としての使用が検討されている<sup>(34)</sup>. ブルシャイト(DCPD)もHApの前駆体で, アルカリ処理をするとモネタイト(DCPA)に転化する. 様々なCa-Pのうち, 人工関節のステムや人工歯根表面の骨適合性向上にはHApが, 人工骨にはHApとβ-TCPの混合物が, 骨セメントにはCa欠乏HApやDCPDが使用されている<sup>(32)</sup>.

既存デバイス表面の骨適合性向上にHApが用いられていることから, Mg合金表面にもHAp被覆が有力な候補として考えられている. 一方, MgイオンはHAp構造の形成を阻害するため<sup>(35)</sup>, 化成処理や陽極酸化などの水溶液中でのMg合金のCa-P被覆では, DCPDやアモルファスCa-P(ACP), β-TCP(おそらくMgイオンが構造に取り込まれている.)が形成したとの報告が多い<sup>(18)(20)(36)(37)</sup>. HAp被膜の形成にはHAp粒子の電気泳動堆積や, 化成処理や陽極酸化で作製したDCPDやACP被膜のアルカリ処理や熱処理による転化が行われている<sup>(38)-(40)</sup>.

### 3. HApおよびOCP被覆

MgイオンによるHAp結晶化阻害を抑制するため, 処理溶液にCa錯体を用いて高濃度のCaイオンを溶解したところ, 純MgおよびMg合金(AZ31, AZ61, WE43)表面に結晶性の高いHAp被膜が形成された<sup>(41)(42)</sup>. 処理溶液のpHを酸性にすると結晶性の高いOCP被膜が形成された. 処理溶液のpHがCa-P結晶相に及ぼす影響は, Ca-P粉末の合成における影響<sup>(43)</sup>と同様であった. 処理前後で溶液のpH

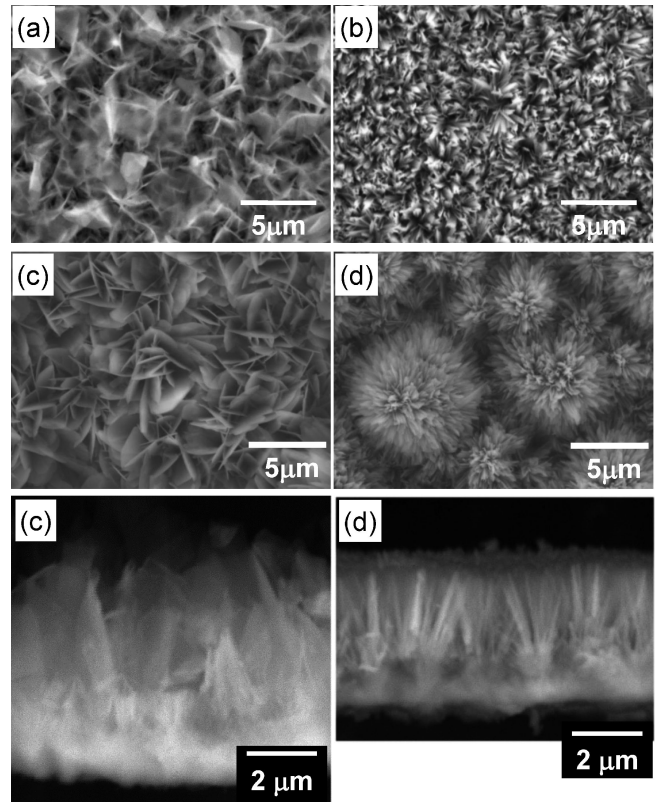


図4 純MgおよびAZ31表面に形成したHApおよびOCP被膜の形態<sup>(44)(48)</sup>. (a) OCP被覆純Mgの表面反射電子顕微鏡(BSEM)像, (b) HAp被覆純Mgの表面BSEM像, (c) OCP被覆AZ31の表面BSEM像, (d) HAp被覆AZ31の表面BSEM像, (e) AZ31のOCP被膜断面BSEM像, (f) AZ31のHAp被膜断面BSEM像.

変化はほとんどなかったことから, 処理溶液中での基材Mg/Mg合金の腐食は浸漬直後の迅速なCa-P被膜形成により抑制され, 設定したpHの下で被膜のCa-P結晶が成長したと考えられる.

被膜の基本的な構造は基材合金の種類によらず, 被膜は2層構造を示し(図4(c), (d)), 緻密な内層と棒状HAp結晶もしくは板状OCP結晶の多孔質の外層で構成されていた<sup>(42)(44)</sup>. 表面観察では, HAp被膜は棒状結晶が, OCP被膜は板状結晶が緻密に表面を覆っていた(図4(a)-(d)). 純Mg表面でHAp被膜形成過程を観察したところ, 処理溶液浸漬10min後にはドーム状の結晶が表面を均一に覆っており, ドーム表面には非常に細い針状HAp結晶が形成されていた<sup>(45)</sup>. 処理時間の増加に伴い, ドームおよび表面の針状HAp結晶の両方が成長し, 被膜厚さが増加した. OCP被膜も同様の形成過程を示したが, OCP被膜は浸漬2時間ほどで成長が鈍化した<sup>(46)</sup>. それぞれの被膜の断面透過電子顕微鏡観察および電子線回折より, 内層はナノ結晶が凝集してできており, 内層から成長した棒状もしくは板状結晶はそれぞれ比較的結晶性の高いHApおよびOCP結晶のc軸が優先的に成長したものであることがわかった<sup>(44)</sup>. HAp被膜のX線光電子分光測定およびフーリエ変換赤外吸光分析より, 被膜中には微量のNaおよびCO<sub>3</sub>イオンが取り込まれている

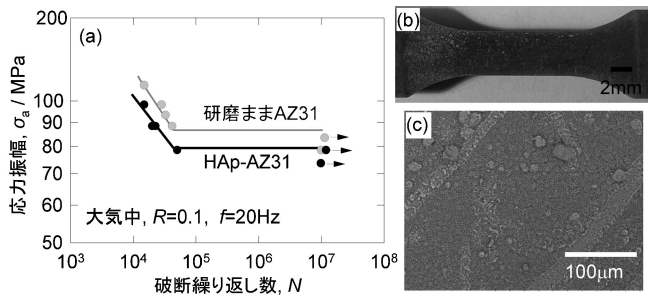


図5 HAp被覆AZ31の(a)大気中S-N曲線, (b) 78.5 MPaで $1.2 \times 10^7$ 回試験後に破断しなかったの試験片の外観写真, (c) 78.5 MPaで $1.2 \times 10^7$ 回試験後に破断しなかったの試験片の平行部BSEM像<sup>(23)</sup>.

ことがわかった<sup>(47)</sup>.

HAp被覆AZ31(HAp-AZ31)の大気中疲労試験<sup>(23)</sup>では、 $10^7$ 回疲労強度は研磨まますAZ31で約90 MPa、HAp-AZ31で約80 MPaであり、HAp被覆によりわずかに低下することがわかった(図5(a)). 一方、 $10^7$ 回繰り返し荷重付与後の試験片表面の顕微鏡観察では、HAp被膜にき裂も剥離もみられなかった(図5(b), (c)). HAp-AZ31の大気中引張り試験ではひずみ1.5%までは被膜にき裂も剥離も生じなかった。これらの結果より、開発したHAp被膜は高い密着性を示すことがわかった。

#### 4. HApおよびOCP被覆Mg合金の腐食挙動

##### (1) 細胞培養液への長期浸漬(in vitro 試験)

研磨まます、HAp-およびOCP-AZ31を細胞培養液中に長期間浸漬し、培養液のMgイオン濃度を定期的に測定した(図6)<sup>(48)</sup>。培養液は4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES)でpH 7.6付近に緩衝したが、浸漬1週間ほどでpH 9まで上昇し、その後はほとんど変化しなかった。研磨まますAZ31は培養液浸漬直後から明らかなMgイオン溶出がみられたが、HApおよびOCP被覆により浸漬4~7日間はMgイオン溶出が抑制された。HAp-およびOCP-AZ31は浸漬6週以降、ほぼ一定のMgイオン溶出速度を示した。被覆試料の溶出速度は研磨まますAZ31よりも50%以上低く、HApおよびOCP被覆により生体環境でのMg合金の腐食速度を抑制できることが明らかになった。また、HAp-AZ31はOCP-AZ31よりも低い溶出速度を示したことから、被膜の種類により腐食速度を調整できる可能性が示された。HApおよびOCP被覆による腐食抑制効果は、Mg-xCa(mass%)合金および純Mgにおいても確認された<sup>(25)(49)</sup>。

##### (2) マウス皮下埋入試験(in vivo 試験)

炎症反応の大きさに応じて蛍光発光するように遺伝子改変したマウスの皮下に、研磨まます、HAp-およびOCP-AZ31を16週間埋入した<sup>(48)</sup>。発光レベルはCa-P被覆の有無に関わらず低く、316Lステンレス鋼を埋入した場合と同程度で

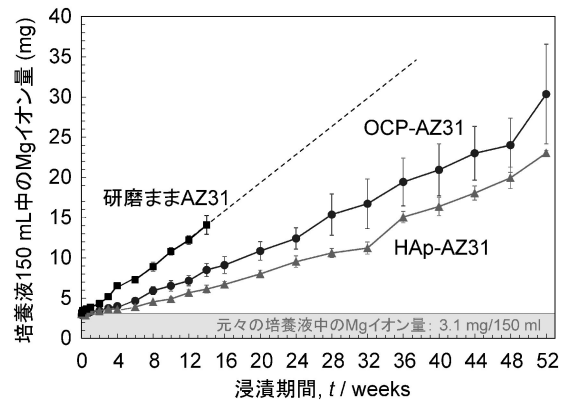


図6 培養液中での研磨まます、HAp-およびOCP-AZ31からのMg<sup>2+</sup>イオン溶出挙動<sup>(48)</sup>。

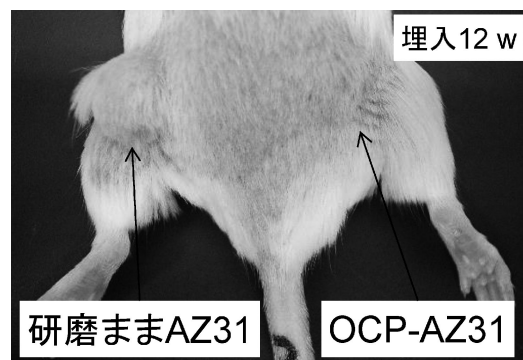


図7 研磨まますおよびOCP-AZ31を埋入したマウスの外観(埋入12週)。

あったことから、研磨まますおよびCa-P被覆AZ31による炎症反応レベルは低かったことが示唆された。一方、研磨まますAZ31を埋入した部位には埋入4週間頃からH<sub>2</sub>ガスによると考えられる膨れがみられた(図7)ことから、腐食が進行していたことがわかる。Mgイオンは、免疫反応において中心的な役割を果たす転写因子NF- $\kappa$ Bの細胞質から核への移行を阻害して炎症反応を抑制すること<sup>(50)(51)</sup>が報告されている。したがって、生体に埋入したMg合金の腐食は、pH上昇やH<sub>2</sub>ガスが異物反応や炎症反応を惹起しても、Mg<sup>2+</sup>イオンが炎症を抑制する可能性がある。

埋入16週目に抜去した研磨まますAZ31は透明なカプセル状の軟組織に覆われており、カプセル内にはガスと少量の体液がみられた。これより、埋入4週間からみられた膨れは研磨まますAZ31の腐食によるH<sub>2</sub>ガス発生のためであったことがわかる。Ca-P被覆AZ31を埋入した部位には膨れは発生せず、16週目に抜去した試料表面には周囲組織が直接付着しているようにみえた。各試料周囲の組織観察では、研磨まますAZ31の周囲には約350  $\mu$ mの厚い線維組織が形成され、多くの細胞浸潤がみられた(図8(a))。Ca-P被覆AZ31周囲にも線維組織は形成されていたが、厚さは150~200  $\mu$ mと研磨まますの場合よりも薄く、細胞浸潤の度合いも低かった(図8(b), (c))。これらの結果より、マウス皮下での研磨まますAZ31周囲では異物反応とある程度の炎症が惹起され

線維組織形成抑制、細胞浸潤抑制

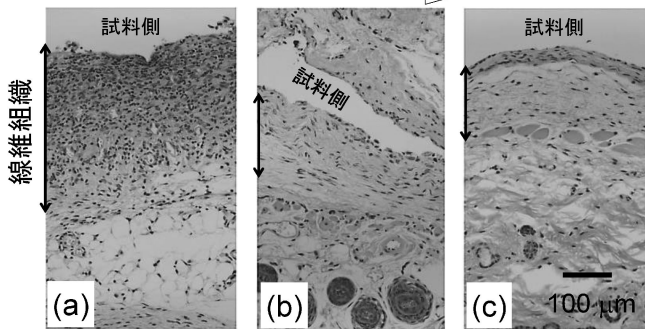


図8 マウス皮下に16週間埋入した(a) 研磨まま, (b) OCP-および(c) HAp-AZ31の周囲組織の断面(ヘマトキシリン-エオジン染色)<sup>(48)</sup>.

たが, Ca-P 被覆により AZ31 の腐食が抑制され, 異物・炎症反応が抑制されることが明らかになった.

本論文と同様の方法で純 Mg に作製した HAp 被膜は, ウサギの頸骨骨幹部に埋入した純 Mg 周囲でのガス溜まりの形成を抑制した<sup>(17)</sup>. 培養液に浸漬した HAp 被覆 AZ31 は HAp 被覆純 Mg よりも低い Mg イオン溶出速度を示した<sup>(25)</sup>. これより, 基材に純 Mg より高耐食性の Mg 合金を用いることで, 骨内でのガス溜まりの形成をさらに抑制できると考えられる. ヒツジの大腿骨骨髄に埋入した, プラズマ電解酸化(PEO)で Ca-P 被覆した W4(Mg-4Y-<0.25RE)合金は, 周囲にガス溜まりを形成した<sup>(21)</sup>. 本論文のマウス皮下とヒツジ大腿骨骨髄での体液循環量・速度の違いはわからないが, ガス溜まり形成抑制にはある程度保護性の高い Ca-P 被膜でなければならないことがわかる.

(3) 培養液中とマウス皮下での Ca-P 被覆 AZ31 の腐食形態

培養液中に52週間浸漬した試料とマウス皮下に16週間埋入した試料の腐食形態を比較した<sup>(48)</sup>. 培養液中では深さ約 350 μm の糸状腐食がみられ(図9(a), (c), (e)), 断面観察では孔の壁面に Mg(OH)<sub>2</sub> が堆積していたが孔内は空洞だった(図9(e)). マウス皮下では深さ約 300 μm, 径数百 μm の丸い腐食孔がみられ(図9(b), (d), (f)), 孔内には主に Mg(OH)<sub>2</sub> の腐食生成物が残存していた(図9(f)). 環境によって Ca-P 被覆 AZ31 の腐食形態が変化することが示唆された.

マウス皮下では試料表面に軟組織が付着していたことから, 試料表面の体液の拡散が抑制されていたと予想した. そこで, ゼラチンを 20 mass/vol% 添加して拡散を抑制した培養液中に HAp-AZ31 を 4 週間浸漬し, 腐食形態を観察した<sup>(25)</sup>. 試験片の縁で発生した糸状腐食はみられた(図10(a))が, 試料中央付近には径 100 μm 程度の腐食孔が多数みられた(図10(b)). 断面観察では, HAp 被膜下に数 μm のマイクロピットがみられた(図10(c)). フィブリンマトリクスを巻いて引張り試験を行った Mg ワイヤは斑点状の腐食を示した<sup>(52)</sup>. これらの結果より, 拡散が抑制された環境では,

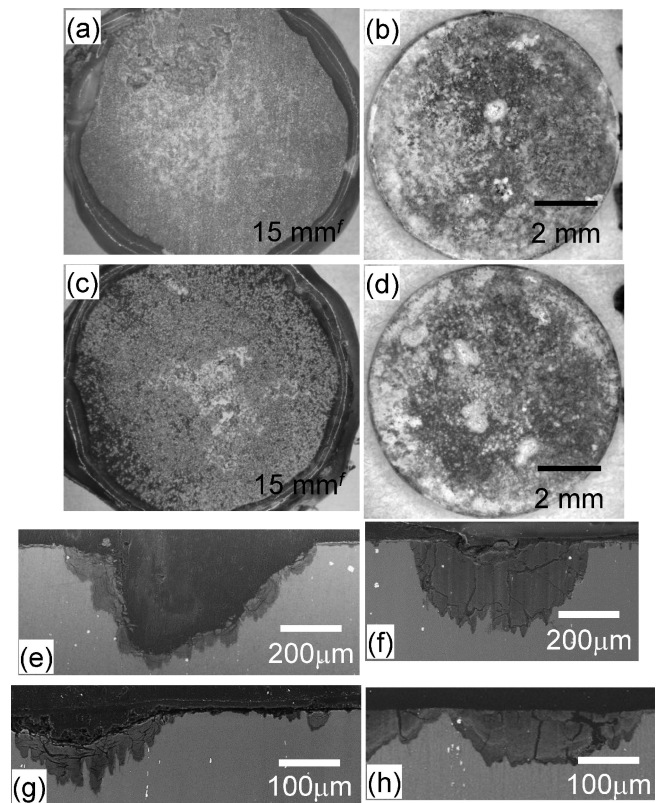


図9 培養液に52週間浸漬もしくはマウス皮下に16週間埋入した試料の外観写真および断面 BSEM 像<sup>(48)</sup>. (a) 培養液浸漬 OCP-AZ31, (b) マウス皮下埋入 OCP-AZ31, (c) 培養液浸漬 HAp-AZ31, および(d) マウス皮下埋入 HAp-AZ31 の外観写真. (e) 培養液浸漬 HAp-AZ31 の糸状腐食, (f) マウス皮下埋入 HAp-AZ31 の大きな腐食孔, (g) 培養液浸漬研磨まま AZ31 の糸状腐食とその周囲, および(h) マウス皮下埋入 HAp-AZ31 の断面 BSEM 像.

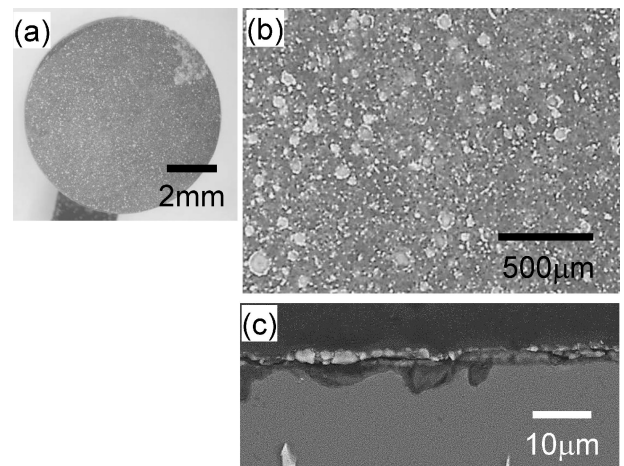


図10 20 mass/vol%ゼラチンを添加した培養液に4週間浸漬した HAp-AZ31 の(a) 外観写真, (b) 実体顕微鏡写真, および(c) 断面 BSEM 像<sup>(25)</sup>.

腐食は深さ方向に進展することが示唆された.

培養液中では試料表面はバルクの液に接しているため, 親水性の Ca-P 被膜では全面で緩やかな液の浸透が起こると考

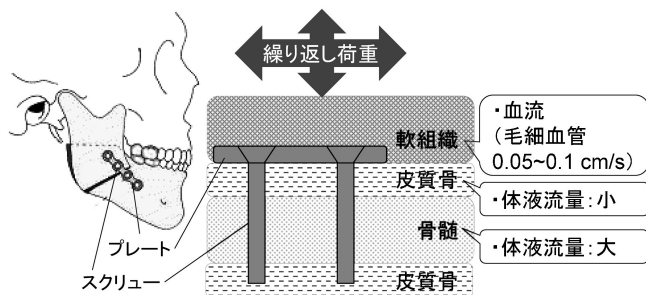


図11 骨固定材が接する生体組織の一例。

えられる。被膜の欠陥部や基材 Mg 合金の介在物などを起点に腐食が発生すると、腐食はいずれの方向にでも成長できるため、糸状腐食を呈する。このとき、被膜が破損した箇所では腐食生成物は容易に沖合へ拡散できるため、腐食孔に腐食生成物はほとんど残存しない。一方、マウス皮下では試料表面に軟組織が付着していたため、体液との接触が局在化したり被膜への体液の浸透が抑制されたりして、発生した腐食の成長方向を限定してしまったと考えられる。また、付着した軟組織により腐食生成物の沖合への拡散が阻害される。このため、腐食は深さ方向に進展し、腐食孔内に腐食生成物が残存したと考えられる。周囲の拡散状態が Mg 合金の腐食形態に及ぼす影響についてはさらに検討が必要である。

生体の部位によって体液循環が異なることから、Mg 合金の腐食形態は埋入部位によって異なることが示唆された。例えば骨固定材は、図11に示すように一つの部材が軟組織、皮質骨および骨髓と異なる部位に接して使用される。軟組織中に比べて皮質骨中は体液の流量が小さく、骨髓中は体液の流量が大きいと考えられる。上記の結果は、少なくとも片面が軟組織に接するボーンプレートでは、腐食が深さ方向に進行する可能性を示唆している。また、軟組織に覆われるステントのストラッドでも、腐食が深さ方向に成長しやすい可能性がある。骨に貫通させるスクリューでは、骨髓に接している部分が体液循環により最も速く腐食する<sup>(12)</sup>。疑似体液の流れによる Mg 合金の腐食促進は検討されている<sup>(53)</sup>が、流速が腐食形態に及ぼす影響はほとんど検討されていない<sup>(54)</sup>。AZ61 合金ではショットピーニングでできた深さ 10 μm 程度の孔が疲労き裂の起点になり<sup>(55)</sup>、AM60 合金では陽極酸化でできた数 μm の凹がき裂の起点になる<sup>(56)</sup>ことが報告されている。Mg 合金製デバイスに同様のサイズの腐食孔が形成された場合、疲労強度の低下につながる可能性がある。このため、環境が Mg 合金の腐食形態に及ぼす影響の検討は、Mg 合金の強度保持を考える上で重要と考えられる。

#### (4) 培養液中とマウス皮下での研磨まま AZ31 の腐食形態

研磨まま AZ31 も培養液中では糸状腐食を示し、マウス皮下では腐食生成物層の厚さのバラツキが大きい全面腐食を示した(図 9(g), (h))。マウス皮下での腐食層の厚い部分の厚さは、培養液中での糸状腐食の深さと同程度であった。培養液中とマウス皮下では浸漬期間や液の循環挙動が大きく異なる

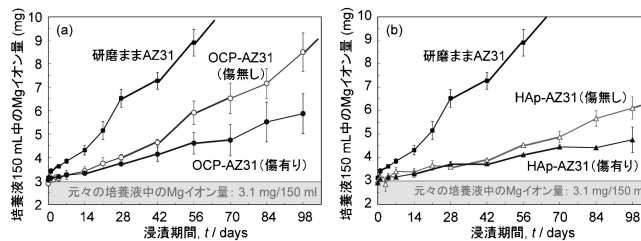


図12 傷を付けた(a) OCP-および(b) HAp-AZ31 の培養液中での  $Mg^{2+}$  イオン溶出挙動<sup>(25)</sup>。比較のため、図 6 の研磨まま AZ31 および傷無し HAp-AZ31 の結果を合わせて載せた。

ため、両環境での腐食速度の単純な比較はできない。しかし、培養液中と試験期間が 1/3 程度のマウス皮下での腐食層の厚さが同程度であったことから、マウス皮下での腐食の深さ方向への成長速度が大きいことが示唆された。Mg-Nd-Zn-Zr 合金表面で免疫細胞のマクロファージを培養すると、マクロファージが産生する活性酸素で腐食が約 2 倍促進された<sup>(57)</sup>。マウス皮下で研磨まま AZ31 周囲に形成された線維組織には多くの細胞浸潤がみられたことから、炎症性細胞が研磨まま AZ31 の腐食に影響を及ぼしたと考えられる。細胞が Mg/Mg 合金の腐食に及ぼす影響は、今後の検討課題の一つである。

#### (5) 傷を付けた HAp-AZ31 の細胞培養液浸漬試験

医療用デバイスの表面は、手術器具で挟んだり、デバイスを患部の形状に合わせて変形させたり、骨にねじ込んだりする時に傷付くことがある。HAp-および OCP-AZ31 の表面にカッターで基材合金が露出する深さの傷を付け、培養液中での腐食挙動を検討した<sup>(25)</sup>。浸漬 1 時間後では、傷有り試料の培養液はピンク色(アルカリ)に変化しており、傷無し試料の培養液はオレンジ色(中性付近)を保っていたことから、傷有り試料の方が初期の腐食はより進行したことがわかった。しかし、浸漬 4~6 週までの Mg イオン溶出量は、傷有り試料と傷無し試料の間に顕著な差はみられず、4~6 週以降は傷有り試料の Mg イオン溶出量の方が小さかった(図 12)。浸漬後の傷部分の断面の組成分析より、傷内の表層に Ca および P が検出され、その下側に  $Mg(OH)_2$  の腐食層が形成されていた。これより、培養液浸漬直後に傷内部の腐食による pH 上昇で Ca-P が析出し、保護性の被膜として働いたと考えられる。なお、傷を付けた HAp-AZ31 を 0.9% NaCl に浸漬したところ、顕著な腐食の促進はみられず、傷の内部に P および微量の Ca が検出された。これらの結果より、HAp 被膜は自己修復機能を持つ可能性が示唆された。

### 5. HAp 被覆 Mg 合金表面での細胞挙動

Ca-P 被覆表面での細胞増殖挙動の検討のため、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 を HAp-および OCP-AZ31 表面で 6 日間培養した<sup>(58)</sup>。培養液は 2 日間毎に交換した。いずれの Ca-P 被覆表面でも、MG-63 細胞は径 15 mm のディスク表



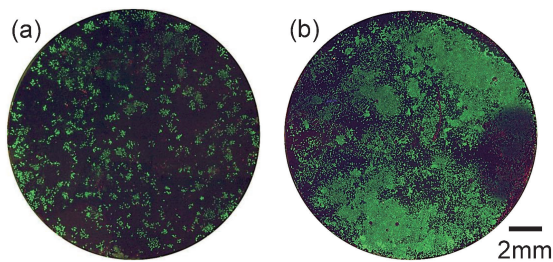


図13 (a) OCPおよび(b) HAp-AZ31 表面で6日間培養したMG-63細胞の蛍光染色像<sup>(58)</sup>。緑(calcein染色)：生細胞，赤(propidium iodide染色)：死細胞。

面全体にはほぼ均一に接着，増殖した。HAp表面での細胞密度の方がOCP表面よりも高かった。両被膜表面での細胞増殖挙動の違いは，被膜のマイクロ形態に起因することが示された<sup>(59)</sup>。

培養6日後，HAp表面を細胞は密に覆っていたが，死細胞が集まっている箇所もしくは細胞が剥離した箇所が局在していた(図13(b))。OCP表面では細胞はコロニー状に分散しており，死細胞もほぼ均一に分散していた(図13(a))。HAp-AZ31の死細胞が観察された箇所に腐食孔が観察される場合もあったが，電子顕微鏡でも腐食の発生(被膜の破壊)が観察されない箇所もあった。OCP-AZ31表面ではほぼ均一に分散した腐食孔が観察され，死細胞の分散状態に近かった。Mg合金の局部腐食が，周囲の細胞に大きな損傷を与えることが明らかになった。HAp-AZ31表面の顕著な腐食のなかった箇所では，被膜下の基材で腐食が発生し，腐食生成物のOH<sup>-</sup>イオンやH<sub>2</sub>ガスなどが被膜中を拡散して細胞に何らかの損傷を与えたと考えられる。

Mg合金表面の毒性評価はISO01993に準拠した抽出法で検討されることが多い。しかし，生体内で劣化しないことを前提とした材料を想定して作られた評価法のため，Mg合金のin vivo試験での結果と一致しないことがよくあった。このため，近年，ISOの抽出法よりも抽出液の希釈率を高くすることが提案された<sup>(60)</sup>。抽出法は試験体の劣化生成物が抽出液全体で希釈されるため，試験片全体の平均的な毒性評価には優れているが，局部腐食箇所での毒性を評価していない可能性がある。試験体表面で直接培養した細胞の生細胞アッセイも行われているが，試験体表面からトリプシンなどで剥がした細胞を培養プレートに移した後にアッセイを行っている<sup>(46)</sup>。この方法でも試験体表面での細胞の局所的な損傷は検出できない。局部腐食を示すMg合金の様な試験体では，直接培養条件を工夫し，細胞を染色するなどして，試験体表面全体での細胞の状態を観察する必要もあると考えられる。

## 6. HApおよびOCP被覆Mg合金の課題

培養液への浸漬試験およびマウス皮下埋入試験より，HApおよびOCP被覆が生体内環境でのMg合金の腐食を

抑制することが明らかになった。一方，16週間マウス皮下埋入後でも試験片形状はよく保たれ，Ca-P被膜の内層は残存し，また，局部腐食箇所以外でのCa-P被膜下での腐食の進行は小さかった。これより，骨折の治療後にもHApおよびOCP被覆AZ31は長期間残存する可能性がある。また，基材の腐食がさらに進行するのに伴い，堆積した腐食生成物および残存した被膜が薄片化し，炎症を惹起する恐れがある。今後の検討課題は，より生体吸収性の高いCa-P被膜の開発，使用部位の体液循環を模擬した環境でのCa-P被覆Mg合金の腐食挙動の検討，細胞がCa-P被覆Mg合金の腐食挙動に及ぼす影響の検討，およびCa-P被覆Mg合金の劣化生成物が特に免疫系細胞に及ぼす影響の検討であると考えられる。

## 7. ま と め

Mg/Mg合金表面へのHApおよびOCP被覆法，被膜の構造，HAp被覆合金の大气中での疲労挙動，HApおよびOCP被覆Mg合金の培養液中およびマウス皮下での腐食挙動および被膜表面での細胞増殖挙動について述べ，現状のHApおよびOCP被膜の課題に言及した。HAp被覆による疲労強度の低下は小さかった。HApおよびOCP被覆により，培養液中でもマウス皮下でもMg合金の腐食が抑制され，異物，炎症反応が抑制された。一方，環境によって腐食挙動(形態)が異なることから，デバイスの使用部位に応じて腐食試験環境を構築する必要性，および細胞がCa-P被覆Mg合金の腐食に影響を及ぼす可能性が示唆された。現状のHApおよびOCP被膜は生体内での残存期間が長すぎる可能性がある。被膜の溶解性を改善するとともに，Ca-P被覆Mg合金の劣化生成物が周囲の生体組織に及ぼす影響についての検討が求められる。さらに，HApおよびOCP被膜が自己修復機能を有する可能性が示唆されたが，同機能を促進するような被膜の改良も求められる。

生体用Mg合金の実用化には表面処理による劣化速度の制御は欠かせない。使用部位ごとに必要な特性を満足させるには，Ca-Pだけではなく様々な被覆材の検討が必要である。一方，開発した材料の評価試験の基準が整っていないことが実用化への研究の足かせとなっている。実用化へは課題が多く残っているが，一つ一つ解決することでMg合金製デバイスの実用化が進むことを期待する。

本論文の内容は，物質・材料研究機構の友澤方成博士(現：東レリサーチセンター)，田口哲志博士，井上元基博士(現：明治薬科大学)，山崎智彦博士と共同で行った研究の結果をまとめたものである。ここで共同研究者に謝意を表したい。

## 文 献

- (1) F. Witte: Acta Biomater., **6**(2010), 1680-1692.
- (2) S. Virtanen: Mater. Sci. Eng. B-Adv, **176**(2011), 1600-1608.

