

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, 適用部位が限られる,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・靭性に優れ,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⁽¹⁾⁻⁽⁶⁾.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全な元素で構成 された,強度および耐食性に優れる生体用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⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾.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[†]を取得した⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾.

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、Mg²⁺ イオン、OH⁻ イオンおよび H₂ 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⁽¹²⁾.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⁽¹³⁾.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⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾.

^{*} 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⁽¹⁵⁾.

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.

- (a) 生体に安全である.
- (b) 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.
- (c) 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.
- (d) 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.
- (e) 被膜にも生体吸収性が必要になる可能性がある.
- (f) 基材の変形などで剥離しない高い密着性を示す.
- (g) 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.
- (h)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⁽¹⁶⁾⁻⁽²¹⁾,(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⁽²²⁾⁻⁽²⁵⁾.(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 台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H2発生量,重量減やMg²⁺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⁽¹⁶⁾⁻⁽¹⁹⁾.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⁽¹⁷⁾⁻⁽²¹⁾. 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(26)-(28). 一 方,表面処理した Mg 合金の大気中での疲労特性の報 告⁽²²⁾⁽²³⁾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 ティング腐食疲労に起因するものが多い⁽²⁹⁾.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⁽³⁰⁾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.

Ca/P 比	化 学 式
—	—
1.0	$Ca(HPO_4)2H_2O$
1.0	$Ca(HPO_4)$
) 1.33	$Ca_8H_2(PO_4)_6\!\cdot\!5H_2O$
1.50	α –Ca ₃ (PO ₄) ₂
1.50	<i>β</i> -Са ₃ (РО ₄) ₂
1.67	$Ca_5(PO_4)_3OH$
1.29 1.36	$\begin{array}{c} Ca_{18}(Mg,Fe)_2H_2(PO_4)_{14}\\ Ca_{18}(Mg,Fe)_2(Ca_{,})(PO_4)_{14} \end{array}$
) 1.67	$Ca_5(PO_4)_3F$
>1.67	$Ca_5(PO_4)_{3-x}(CO_3)_xOH$
	Ca/P 比 1.0 1.0 1.0 1.33 1.50 1.50 1.67 1.29 1.36) 1.67 >1.67

表1 様々なリン酸カルシウム化合物.

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⁽³¹⁾⁽³²⁾. 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⁽³³⁾. 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⁽³⁴⁾. 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⁽³²⁾.

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⁽³⁵⁾, 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⁽¹⁸⁾⁽²⁰⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾. 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⁽³⁸⁾⁻⁽⁴⁰⁾.

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⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾.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⁽⁴³⁾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⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁸⁾. (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⁽⁴²⁾⁽⁴⁴⁾.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 10 min 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(45).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⁽⁴⁶⁾. 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⁽⁴⁴⁾. 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 CO₃ 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1.2×10⁷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1.2×10⁷回試験後に破断しなかったの試験片の平行部BSEM像⁽²³⁾.

ことがわかった⁽⁴⁷⁾.

HAp 被覆 AZ31 (HAp-AZ31)の大気中疲労試験⁽²³⁾では, 10⁷ 回疲労強度は研磨まま 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, 10⁷ 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,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)⁽⁴⁸⁾. 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 pH9 まで上昇し、その後はほとんど変化しな かった.研磨まま 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 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 (25) (49)

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,HAp-および OCP-AZ31 を16週間埋入した⁽⁴⁸⁾.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, HAp-および OCP-AZ31 からの Mg²⁺ イオン溶出挙動⁽⁴⁸⁾.



図7 研磨ままおよび 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 AZ31 を埋入した部位には埋入4週頃から H₂ 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- κ 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⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾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H₂ ガスが異物反応や炎症反応を惹起しても,Mg²⁺ 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 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週頃からみられた膨れは 研磨まま AZ31 の腐食による H₂ 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 AZ31 の周囲には約 350 μm 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 μm と研磨ままの場合よりも薄く,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 AZ31 周囲では異物反応とある程度の炎症が惹起され



図8 マウス皮下に16週埋入した(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)⁽⁴⁸⁾.

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⁽¹⁷⁾. 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⁽²⁵⁾. 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. ヒツジの大腿骨骨顆に埋入した,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⁽²¹⁾.本論文のマウス皮 下とヒツジ大腿骨骨顆での体液循環量・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⁽⁴⁸⁾.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 $Mg(OH)_2$ 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 $Mg(OH)_2$ 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⁽²⁵⁾.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 ワイヤーは斑点状の腐食を示 した⁽⁵²⁾.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⁽⁴⁸⁾. (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 の糸状腐食孔, (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⁽²⁵⁾.

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 質骨および骨髄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、骨髄中は体液の流 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,骨髄に接している 部分が体液循環により最も速く腐食する(12).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⁽⁵³⁾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⁽⁵⁴⁾. 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(55), 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⁽⁵⁶⁾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⁽⁵⁷⁾.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⁽²⁵⁾.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⁽⁵⁸⁾. 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⁽⁵⁸⁾.緑(calcein 染色):生細胞,赤(propidium iodide 染色):死 細胞.

面全体にほぼ均一に接着,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,被膜のミクロ形態に起因することが示され た⁽⁵⁹⁾.

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 ー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⁻ イオンや H₂ 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(60).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⁽¹⁶⁾.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,骨折の治癒後にも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 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 被覆合金の大気中での疲労挙動,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.

- (3) Y. F. Zheng and X. N. Gu: JOM, 63(2011), 105-108.
- (4) Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid and M. Glogauer: Materials, 8(2015), 5744-5794.
- (5) 山本玲子: 軽金属, 58(2008), 570-576.
- (6) D. M. Vasconcelos, S. G. Santos, M. Lamghari and M. A. Barbosa: Biomaterials, 84(2016), 262-275.
- (7) N. Li and Y. F. Zheng: J. Mater. Sci. Tech., 29(2013), 489-502.
- (8) N. Ikeo, R. Nakamura, K. Naka, T. Hashimoto, T. Yoshida, T. Urade, K. Fukushima, H. Yabuuchi, T. Fukumoto, Y. Ku and T. Mukai: Acta Biomater., 29 (2016), 468-476.
- (9) J. M. Seitz, A. Lucas and M. Kirschner: JOM, 68 (2016), 1177-1182.
- (10) Biotronik SE & Co. KG: BIOTRONIK Announces CE Mark for Magmaris, the First Clinically-Proven Bioresorbable Magnesium Scaffold (2016), https://www.biotronik.com/files/ F284043E451B1C61C1257FD2004B5842 / \$FILE / 160615 _ BIOTRONIK_PR_Magmaris_CE_Approval_EN.pdf.
- (11) Syntellix AG: The Best implant For Your Patients, (2016), http://www.syntellix.de/en/doctor/product-information.
- (12) T. Kraus, S. F. Fischerauer, A. C. Hanzi, P. J. Uggowitzer, J. F. Loffler and A. M. Weinberg: Acta Biomater., 8(2012), 1230 - 1238.
- (13) E. Tenekecioglu, V. Farooq, C. V. Bourantas, R. C. Silva, Y. Onuma, M. Yilmaz and P. W. Serruys: BMC Cardiovasc. Disord., 16(2016), 38.
- (14) F. Witte, H. Ulrich, M. Rudert and E. Willbold: J. Biomed. Mater. Res. A, 81A (2007), 748-756.
- (15) H. Hornberger, S. Virtanen and A. R. Boccaccini: Acta Biomater., 8(2012), 2442-2455.
- (16) J. N. Li, Y. Song, S. X. Zhang, C. L. Zhao, F. Zhang, X. N. Zhang, L. Cao, Q. M. Fan and T. T. Tang: Biomaterials, 31 (2010), 5782-5788.
- (17) S. M. Kim, J. H. Jo, S. M. Lee, M. H. Kang, H. E. Kim, Y. Estrin, J. H. Lee, J. W. Lee and Y. H. Koh: J. Biomed. Mater. Res. A, 102A(2014), 429-441.
- (18) L. P. Xu, F. Pan, G. N. Yu, L. Yang, E. L. Zhang and K. Yang: Biomaterials, 30(2009), 1512-1523.
- (19) Q. Wang, L. L. Tan, W. L. Xu, B. C. Zhang and K. Yang: Mater. Sci. Eng. B-Adv, 176 (2011), 1718-1726.
- (20) S. Shadanbaz, J. Walker, T. B. Woodfield, M. P. Staiger and G. J. Dias: J. Mater. Sci. Mater. Med., 25(2014), 173-183.
- (21) U. Thormann, V. Alt, L. Heimann, C. Gasquere, C. Heiss, G. Szalay, J. Franke, R. Schnettler and K. S. Lips: Biomed. Res. Int., (2015), Article ID 943603, 15 pages.
- (22) M. P. Sealy, Y. B. Guo, R. C. Caslaru, J. Sharkins and D. Feldman: Int. J. Fatigue, 82(2016), 428-436.
- (23) S. Hiromoto, M. Tomozawa and N. Maruyama: J. Mech. Behav. Biomed Mater., 25(2013), 1-10.
- (24) Z. J. Jia, P. Xiong, Y. Y. Shi, W. H. Zhou, Y. Cheng, Y. F. Zheng, T. F. Xi and S. C. Wei: J. Mater. Chem. B, 4(2016), 2498-2511.
- (25) S. Hiromoto: Corros. Sci., 100 (2015), 284-294.
- (26) X. N. Gu, W. R. Zhou, Y. F. Zheng, Y. Cheng, S. C. Wei, S. P. Zhong, T. F. Xi and L. J. Chen: Acta Biomater., 6(2010), 4605-4613.
- (27) P. Maier, O. Anopuo, F. Malchau, G. Wienck and N. Hort: Light Metals Technology V, (2011), 495-498.
- (28) M. Kramer, M. Schilling, R. Eifler, B. Hering, J. Reifenrath, S. Besdo, H. Windhagen, E. Willbold and A. Weizbauer: Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biolog. Appl., 59 (2016), 129-135.
- (29) 佐藤道夫:平成15年度厚生労働科学研究費補助金(医療品等医 療技術リスク評価研究事業)分担研究報告書 整形外科インプ ラントの不具合データに関する研究(医療用具の有効性・安全 性評価手法の開発に関する研究), (2003).
- (30) 真野隆充, 諸冨彰彦, 森 悦秀, 堀永大樹, 宮脇雄一郎, 上 山吉哉: J. J. Jaw Deform., 17(2007), 272-275.
- (31) P. G. Koutsoukos and G. H. Nancollas: J. Cryst. Growth, 53 (1981), 10-19
- (32) L. L. Hench and S. M. Best: Biomater. Sci., Elsevier, (2013), 128-161.

- (33) 袴塚康治,入江洋行:バイオマテリアル,24(2006),100-107.
- (34) 鈴木 治:バイオマテリアル, 34(2016).
- (35) A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti and N. Roveri: J. Inorg. Biochem., 49(1993), 69-78.
- (36) Y. Song, S. X. Zhang, J. A. Li, C. L. Zhao and X. N. Zhang: Acta Biomater., 6(2010), 1736-1742.
- (37) J. Niu, G. Yuan, Y. Liao, L. Mao, J. Zhang, Y. Wang, F. Huang, Y. Jiang, Y. He and W. Ding: Mater. Sci. Eng. C, Mater. Biolog. Appl., 33(2013), 4833-4841.
- (38) D. Gopi, N. Murugan, S. Ramya and L. Kavitha: J. of Mater. Chem. B, 2(2014), 5531-5540.
- (39) J. Zhang, C. S. Dai, J. Wei and Z. H. Wen: Appl. Surf. Sci., 261 (2012), 276-286.
- (40) C. L. Wen, S. K. Guan, L. Peng, C. X. Ren, X. Wang. and. Z. H. Hu: Appl. Surf. Sci., 255 (2009), 6433-6438.
- (41) S. Hiromoto: Electrochim. Acta, 54(2009), 7085–7093.
- (42) S. Hiromoto and M. Tomozawa: Surf. Coat. Tech., 205 (2011), 4711 - 4719
- (43) 門間英毅, 金澤孝文: Yogyo-Kyokai-Shi, 86(1978), 72-76.
- (44) M. Tomozawa and S. Hiromoto: Acta Mater., **59**(2011), 355-363.
- (45) M. Tomozawa and S. Hiromoto: Appl. Surf. Sci., 257 (2011), 8253-8257.
- (46) S. Hiromoto: Surface Modification of Magnesium and Its Alloys for Biomedical Applications -Modification and Coating Techniques-, Woodhead Publishing, (2015), 59-80.
- (47) N. Ohtsu, S. Hiromoto, M. Yamane, K. Satoh and M. Tomozawa: Surf. Coat. Tech., 218(2013), 114-118.
- S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, M. Yamane and N. Ohtsu: (48)Acta Biomater., **11**(2015), 520–530.
- (49) 廣本祥子,花田幸太郎,松崎邦男,山崎智彦:日本金属学会 秋期(第155回)講演大会,日本金属学会,名古屋,2014.
- (50) B. Rochelson, O. Dowling, N. Schwartz and C. N. Metz: J. Reproductive Immunology, 73 (2007), 101-107.
- (51) Z. H. Liu, J. J. Zhang, X. J. Huang, L. N. Huang, S. T. Li and Z. P. Wang: The J. Surg. Res., **179**(2013), E189–E195.
- (52) P. K. Bowen, J. A. Gelbaugh, P. J. Mercier, J. Goldman and J. Drelich: J. Biomed. Mater. Res. B, 100B(2012), 2101–2113.
- (53) J. Levesque, H. Hermawan, D. Dube and D. Mantovani: Acta Biomater., 4(2008), 284–295.
- (54)S. Hiromoto, A. Yamamoto, N. Maruyama, H. Somekawa and T. Mukai: Mater. Trans., 49(2008), 1456–1461.
- (55) M. S. Bhuiyan, Y. Ostuka, Y. Mutoh, T. Murai and S. Iwakami: Mater. Sci. Eng. A-Struct., 527 (2010), 4978-4984.
- S. A. Khan, Y. Miyashita, Y. Mutoh and T. Koike: Mater. Sci. (56)Eng. A, 474(2008), 261-269.
- (57) J. Zhang, S. Hiromoto, T. Yamazaki, J. Niu, H. Huang, G. Jia, H. Li, W. Ding and G. Yuan: J. Biomed. Mater. Res. A, 104 $(2016),\,2476\text{--}2487.$
- (58)廣本祥子,山崎智彦:第37回日本バイオマテリアル学会大 会,日本バイオマテリアル学会,京都,2015.
- (59) S. Hiromoto, T. Yamazaki: Sci. Tech. Adv. Mater. (in press).
- (60) J. Wang, F. Witte, T. F. Xi, Y. F. Zheng, K. Yang, Y. S. Yang, Z. D., J. Meng, Y. Li, W. R. Li, K. M. Chang and L. Qing: Acta Biomater., 21 (2015), 237-249.

攻修士課程修了

2002年 博士(工学) 北海道大学

ザンヌ 訪問研究員

構)入所

1997年

1997年



廣本祥子

専門分野:金属表面化学,腐食防食,生体材料学 ◎主に生体用金属材料の表面改質および腐食特性評価 のほか、コンクリート中の鉄筋用の新規腐食試験の 開発に従事している.

**************** 早稲田大学大学院理工学研究科応用化学専

2003年10月~2004年9月 スイス連邦工科大学ロー

2009年4月~現在 物質·材料研究機構 主幹研究員

金属材料技術研究所(現:物質·材料研究機
