

してしまう。こうして小水疱 (spongiosis)ができる。表皮は基底層の分裂ででき、下層→上層に進んでいくので、こうしてできた小水疱はいつか上方に押し上げられて破れ、身体は[嫌いになった Ni]の体外排出に成功する。」という記述は、本実験の結果を肯定するものである。

#### 【合金材料からの溶出試験】

材料からの Ni 溶出実験データでは、1 週より 3 週でかなり増加する傾向はあり、Ni 材料の乳酸条件では 7 倍になっていた。Ti/Ni 材料では、Ni を 55%含むにも関わらず、Ni の溶出は全体的に微量に留まり、純 Ni 材料の 1/80 (食塩水条件)程度であった。この Ni の溶出の難易度の差が、今回の動物実験での組織反応の差に直接繋がっているものと思われる。

各材料からの Ti 溶出実験データからは、Ti の溶出は、Ti-6Al-4V 合金の方が Ti/Ni 合金より多い傾向があった。

#### 【チタン・アレルギー関連例】

今回、検索された事例は、必ずしも、Ti アレルギーと断定される例ばかりではなく、確定例は非常に少ないと思われる。Ti アレルギーが周知されていない(むしろ Ti はアレルギー性金属ではないと認識されている)状況があることも、事例報告が少なく、見逃される原因でもあるように感じられる。Ti イオンが不安定であり、アレルギー試験に適切な試験物質(金属塩)がないこと、Ti 金属自身も不動態を容易に表面に形成してしまうこと、がアレルギーの検出を非常に

難しくしていることもあろう。今後、Ti インプラントが汎用されるようになると、アレルギー患者も増えてゆくかもしれないことが懸念される。以前、純チタンを用いた同様な埋植試験を 8 ヶ月間実施した結果、材料周囲組織のリンパ球の浸潤の程度が高く、チタンの酸化物と思われる粒子状の黒い物質が周囲組織中に観察された (Ikarashi et al., Material Transaction, 2005, 10, 2260-2267)。Ti に関しては、長期の埋植試験で評価する必要がある。

#### 【まとめ】

今回のラット皮下埋植という、比較的メカニカルストレスのかからない条件での実験では、他の 3 種の金属材料には何らかの懸念点があったものの、Ti/Ni 合金に懸念すべき点は認められなかった。

一方で、純 Ni 金属の毒性・組織溶解性、及び純 Ti 金属でのわずかな肝臓重量減少と共に、Ti-6Al-4V 合金では、協力研究者の非常に注意深い病理観察によって、実験前は予想もしていなかった好酸球が再現性良く観察された。ラットでは寄生虫生息時以外では、好酸球の出現は稀であり、他の群では全く観察されていないことも考え合わせると、アレルギー反応を示すものと考えられる。

勿論、アレルギー反応と断定するには、周辺組織での金属含量分析、血中濃度分析など、さらなる分析が必要となるだろうが、Ti-6Al-4V 合金が、アレルギー反応を示

したとすると、どの金属に依るものか、ということになる。Al や V は、Ti-6Al-4V 合金からの溶出は皆無に近く、また、両金属のアレルギー反応が接触皮膚炎専門医で問題になったことはないと聞く。

残るは、Ti に依る、ということになる。Ti-6Al-4V 合金からの Ti の溶出は、Ti/Ni 合金より多い場合もある。特に非酸性下条件(食塩水)では、40 倍程度多い。純 Ti では、アレルギー反応が見られないことから、純 Ti の溶出実験で、Ti-6Al-4V 合金より、Ti の溶出が少ないという結果が出れば、さらに Ti アレルギーの可能性が高くなる。純 Ti は表面に不動態の被膜を形成することから特に不思議な現象とは思われない。

Ti アレルギーは起こりにくいという一般的な理解も多いが、最近では、Ti アレルギーも議論されるようになってきた。米国の不具合報告でも、ペースメーカ、人工歯根などで、Ti アレルギーと思しき報告が見られている。従来は、Ti に触れる機会が少なかったためもあるが、インプラント医療機器や、皮膚に接する家庭用品等で使用される機会が増えてゆくと、今後は Ti アレルギーが増加してゆく可能性も否定はできない。

そこで、Ti-6Al-4V 合金で作製された医療機器でのアレルギー反応の懸念が生ずるが、Ti-6Al-4V 合金製機器でのアレルギー反応はまだ知られていない。Ti-6Al-4V 合金は人工関節など、体内深部で使用されることが多く、アレルギーに関与する表皮に多いランゲルハンス

細胞の寄与が少ないためということも考えられる。また、今回のアレルギー反応も、結果的に試験法が高感度であったがために検出できたのであって、あくまでも弱い反応であり、実際に問題になる可能性は少ないと思われる。

Ti/Ni 合金では、好酸球が観察されなかったことから、アレルギー性は、Ti-6Al-4V 合金より弱い、即ち、Ti/Ni 合金での Ni によるアレルギー性も非常に弱い、という推測も成り立つ。正確には、Ni を適度に溶出する金属での実証が必要とは思われるが、一つの傍証ではあり得る。一方、米国の不具合報告で、1 件だけであるが、Ti/Ni 合金による Ti アレルギーの疑いが報告されており、むしろ Ti アレルギーに留意する必要があるかもしれない。

今回の円形板埋植試験方法は、以下の点で、感度の高いアレルギー検出法として期待できると思われる。①今回の研究材料は円形で四角形よりは周りの組織への影響が少ないこと。②形状が大きいため、ラット以上でないとは実験できない一方で、検出力が高くなること。③背部皮下ということで、表皮近傍であり、アレルギー反応に関与するランゲルハンス細胞の寄与があること。などの点である。四角形で硬い材料を皮下に埋植すると、背中から飛び出すことが多く、角のない円形で実験をおこなっている。

## 5. Ti 合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

金属材料は、骨スクリュー、骨プレー

ト、CHS、 $\gamma$  ネイル、髄内釘、人工関節、人工歯骨などのように高い力学的強度が要求される埋植医療機器に使用される。構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、近年、不具合の報告件数は増加傾向にある<sup>1)</sup>。不具合の内、人工関節では約 20%、骨接合用品では約 70% が機器そのものの破損による不具合である。また、厚生労働省や米国 FDA へ報告された不具合の統計的調査から、人工股・膝関節、骨プレート、骨スクリューに留意すべきことが指摘されている。こうした現状から、力学的特性や耐腐食性に優れた金属材料の開発研究が現在でも活発に行われている。特に医用金属材料として有望な Ti 合金は、 $\alpha$  相である純 Ti に、 $\alpha$  相安定化元素 (Al、O など) と  $\beta$  相安定化元素 (Mo、Nb、Ta など) を適量添加することによって相安定性を変化させ、 $\alpha$ - $\beta$  二相組織もしくは  $\beta$  単相組織を得ることができる。 $\alpha$ - $\beta$  構造は強度が高く、疲労特性に優れ、また、 $\beta$  構造は弾性率が低く、加工性に優れるといった特長がある。そのため、Ti 合金は様々な種類の埋植医療機器への応用が期待でき、医用金属材料の中でも特に開発研究が盛んである。しかしながら、力学的性能を向上させるための研究に比べ、臨床実態を反映する評価法の不足から生物学的安全性や有効性を向上させるための研究は遅れている。本研究では、金属材料の *in vivo* 試験成績と *in vitro* 試験成績との関係を明らかにし、より臨床実態を反映する生物学的安全性および有効性評価手法

の確立を目指している。

ラット大腿骨骨幹部に形成した窩洞への各種金属材料の埋植試験では、いずれの試料においても炎症所見もみられず、材料の違いによる組織変化は認めなかった。埋植後初期の骨髄内損傷部位では膜性骨化の過程で、また、外骨膜部では軟骨内骨化により骨形成が観察された。新生された骨髄内の骨梁は、埋植後の経過で破骨細胞性骨吸収により骨量の減少を生じ、今回観察した埋植後 4 週において金属材料と骨髄組織を隔てる薄い骨組織のみがみられ、これらは骨折の治癒でみられる修復過程と類似した所見である。外骨膜側の骨形成の組織像についても各種金属材料埋植による明らかな相違は認められなかった。

前年度までに、今回対象とした金属材料について、チャイニーズハムスター由来線維芽細胞 V79 を用いた細胞毒性試験および正常ヒト骨芽細胞 NH0st を用いた骨芽細胞適合性試験を実施してきた。直接接触法によるコロニー法を用いた細胞毒性試験において、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金には細胞毒性が認められなかった。また、純金属の Ti、Zr および Nb には細胞毒性が認められず、Al に弱い細胞毒性が認められた。さらに、正常ヒト骨芽細胞 NH0st の増殖および分化に及ぼす影響を指標とする骨芽細胞適合性試験において、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。また、純金属の Ti、Zr および Nb は骨芽細胞の増殖および分化を促進させ、Al はどちらも

抑制した。また、骨芽細胞の分化レベルを、Ti-Zr 基合金、Ti、Zr および Nb は増加させ、Al は顕著に低下させた。これらの *in vitro* 試験成績は、今回の埋植試験において、他の材料に比べて、Al の引抜強度が低い傾向を示したこととよく一致した。V79 細胞を用いた直接接触法によるコロニー形成率とラット埋植試験における試料の引抜強度との相関関係 ( $r=0.9006$ ) について無相関検定を行なったところ、有意性が認められた ( $p=0.0009$ )。また、同様に、試料の上で培養した正常ヒト骨芽細胞 NH0st の石灰化物生成量とラット埋植試験における試料の引抜強度との相関関係 ( $r=0.7282$ ) についても有意性が認められた ( $p=0.0261$ )。試料の引抜強度が繊維芽細胞の増殖とより強く相関したことは、埋植した試料と皮質骨との間に結合組織が介在したことを反映していると考えられる。

Ti-Zr 基合金は、1~5 mol% の Nb を添加すると、 $\alpha$ - $\beta$  二相組織が得られ、力学的強度が増す。また、8 mol% 以上の Nb を添加すると、 $\beta$  単相組織が得られ、弾性率が小さくなる。このように、Ti-Zr 基合金は、Nb の添加量で力学的性質を制御できるという特徴を有している。特に、Nb を 8 mol% 以上添加した  $\beta$  型 Ti-Zr-Nb 合金のヤング率は 74 GPa ~90 GPa と、Ti-6Al-4V の 114 GPa や CP-Ti の 105 GPa より大幅に低い。人工股関節のステム部や髄内釘など骨内に挿入して使用する際、生体骨との変形ミスマッチを抑制するためには、弾性率の

小さい (生体骨により近い) 材料を使用する方が有利である。また、Ti-Zr-Nb 合金に含まれている Zr および Nb は、合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となって、不動態皮膜をより強固にする働きがあり、耐腐食性も向上する。さらに、今回のラット大腿骨埋植試験において、炎症反応も無く、骨形成にも問題が無いことが確認され、 $\beta$  型 Ti-Zr-Nb 合金の応用が益々期待できる。

## 6. ステント用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

### 1) 力学的性質の評価

二元系合金では Pd の添加濃度が増加するのに従って、最大引張強さが約 300 MPa から約 370 MPa まで増加しているのが認められた。今回の試験の範囲ではすべての試料はインゴット溶製後、圧延したままの状態、熱処理を行っていないため、Au 固溶体の圧延組織であり、析出強化の影響は見込まれない。このことから、この二元系での強さは主として Pd の固溶体強化によるものだと考えられる。またこの強化にともなう顕著な延性の低下は認められない。

低濃度固溶体の固溶強化理論は合金種によって種々報告されている。たとえば溶質原子濃度の 1/2 乗~1/3 乗に比例するものが多いが、ここでは実験データを最小二乗法近似した結果から、Pd 原子濃度の約 0.3 乗に比例する式に近似できる。その結果を図 5 中に示した。

図 6 に示したように Ag 添加による固溶強化は認められず、3mol%Ag を添加した合

金で強さの低下が認められた。しかしながら、図7に示したように、Ag添加の主たる目的であった延性の改善は認められた。

今後は強さと延性のバランスのよい合金設計に資するため、Au-Pd-Ag三元系の相安定性情報の調査を含め、適切なAg添加量の検討が課題のひとつとなる。

以上の結果から、Au-Pd二元系合金ではPdの添加により、溶質濃度のおよそ0.3乗に比例した固溶強化が認められ、Au-Pd-Ag三元系合金化によって、強さと十分な延性の合金が得られることがわかった。今後、更なる合金設計によって、より良好な強さと延性のバランスを併せもつ合金設計が期待できる。

さらに、最初に述べたとおり、この合金系の合金は適当な条件での時効熱処理によってAu<sub>3</sub>Pd金属間化合物相の析出強化が期待できることから、今後、種々の条件で時効熱処理を行い、力学的性質に及ぼす熱処理の影響を調査することが有益である。

## 2) 溶出試験による耐食性の評価

図8に示したように、本研究で開発した合金からはいずれもICPの検出限界範囲内での溶出量は認められなかった。また外観上も溶解の痕跡は認められなかった。

このことから、自己拡張型ステントとして使用されているTi-Ni超弾性合金や生体内での使用実績の高いTi-6Al-4V合金に比べて、本研究で開発したAu-Pd系の二元、三元合金の耐食性が極めて高い

とおもわれるが、AuおよびPdともに、金属アレルギーとして知られている点が気になる。ステント用合金として生体内で使用したときには、一定のメカニカルストレスもかかり、更に、金属に感作しているヒトは、ステントの再狭窄率が高いことが報告されている。このステント材料単独での使用よりも複合化させることにより、安全性を保つ手段を講じる必要があると考える。

## 3) アノード分極試験による耐食性の評価

12Pd合金のアノード分極の結果を図9に示した。-1.0 V vs. SCE から 1.0 V vs. SCE まで掃引したが、およそ 0.8 V vs. SCE 付近までアノード電流が計測されなかった。0.8 V vs. SCE 付近から急速に電流が増加しているが、これは試料から

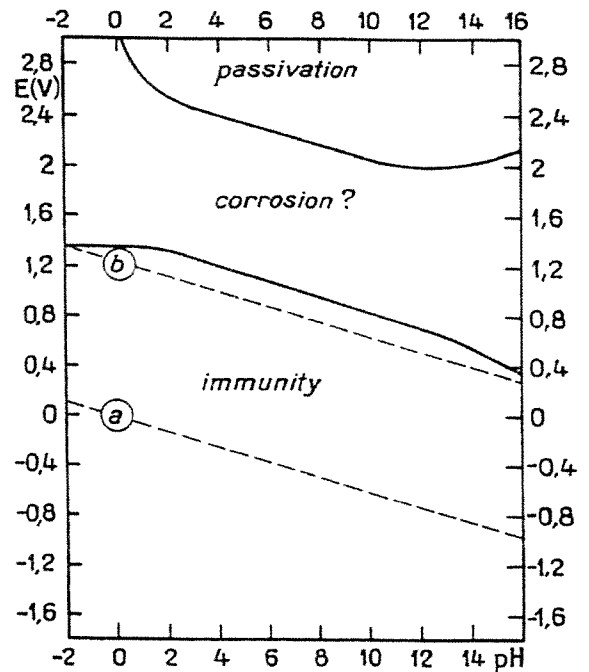


図20 Auの電位-pH線図  
(Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions, NACEより)

の活性溶解ではなく  $O_2$  の発生によるもので、本実験の範囲ではこの合金の腐食電位を評価することができなかつた。Au（純金）で行った試験でも、ほぼ同じ結果が得られた。これはこの 12Pd 合金の耐食性が Au（純金）と同様極めて高いことを意味している。比較のために行った Cu のアノード分極試験ではおよそ  $-0.3\text{ V vs. SCE}$  でアノード電流が増加しており、この電位が Cu の腐食電位であることが認められた。

$25^\circ\text{C}$  の溶液中で Au に与えられた電気化学的条件（電位と溶液の pH）に従って、理論上起こる電気化学的現象を分類して示した電位 - pH 線図（いわゆる Pourbaix 線図）を図 20 に示す。本研究で使用した  $0.9\% \text{NaCl}$  水溶液は pH 7 であるので、この Pourbaix 線図によると、図中の破線 b で示した  $O_2$  の発生はおよそ  $0.8\text{ V}$  で始まることになる。それに比べ Au が溶解する領域は  $1.0\text{ V}$  以上となっており、つまり、 $0.9\% \text{NaCl}$  水溶液中で Au に付加する電位を徐々に増加させていくと、Au の溶解に先立って  $O_2$  が発生することになる。これが、図 9 で見られた  $0.8\text{ V vs. SCE}$  付近からの急速な電流増加が Au の溶解によるものではなく  $O_2$  の発生によるものだとする根拠である。すなわち、12%Pd を含んだ Au であっても、Au（純金）と同程度の耐食性を有していると言うことができる。

比較材とした Cu の Pourbaix 線図によれば、 $O_2$  の発生よりもずっと低い電位、すなわちおよそ  $0\text{ V}$  で酸化物 ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) が生成して不働態化が始まり、さらにおよ

そ  $0.25\text{ V}$  で溶解が起こるとされている。実際にはこれよりもやや低い  $-0.3\text{ V vs. SCE}$  で Cu の腐食が認められた。

以上の結果と、溶質試験の結果を総合して、本研究で開発した Au-Pd 系の合金は生体内で安全に使用できると結論付けることができる。

#### 4) 血小板粘着試験

血小板粘着試験の SEM 観察結果では、8Pd 合金から 12Pd 合金までは、血小板の粘着は少なかったが、14Pd 合金と 16Pd 合金で粘着量の増加が認められた。

比較材のステンレス鋼では、8Pd 合金から 12Pd 合金に比べ血小板の粘着がやや多く、また一般に生体適合性が良好な純 Ti の場合、フィブリン・ネットワークの形成がとくに顕著であった。

以上の結果から、8Pd 合金から 12Pd 合金までの各合金では、血小板の粘着が抑制されていることが認められ、このことから 8Pd 合金、10Pd 合金、12Pd 合金は貴金属製ステント用の素材として有望であることが示唆された。

## 7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

### 1) 金属アレルギーを評価するパッチテスト試料

本邦においても、ニッケル、クロム、コバルト、マンガン、銅による皮膚不具合例は、臨床経過、組織学的検討、X 線マイクロアナライザーによる組織内金属の検出、パッチテスト結果、原因インプラント除去による皮膚症状の改善効

果などによって、アレルギー機序による因果関係が明確な症例が報告されている。したがって、これらの金属ではパッチテスト試料が決定できており、ヒトにおける安全性評価方法の基本的評価法は確保されていると言える。しかし、近年汎用されるようになったチタンをはじめとするアレルギー症例が極めて稀な金属については、金属のアレルギーを証明する確実な評価法がまだ確立できていない。2006年9月に開催された欧州皮膚科学会で純チタンプレート、また別の報告では10%酸化チタンパラフィン基剤でチタンに対する明らかなアレルギー反応を呈した症例の報告がなされた。今回、日本大学松戸歯学部歯科生体材料学講座、早川 徹先生より提供を受けニッケルアレルギーの検出に有用であることが証明された。チタン症例でも検討する予定である。

## 2) インプラントによる皮膚障害の診断基準

インプラントによる皮膚障害の診断基準を作成することが、安全性評価法開発のゴールデンスタンダードとなる。この点については、岡田らあるいはRostokerらの提唱した診断基準がある。後者の基準の金属除去後2カ月で治癒するとする条件は、これまでの報告例の臨床経過をみると、短い可能性が高い。本研究において、さらに多くの症例を集積して、診断基準を提案したい。

## 3) インプラントによる皮膚障害頻度は低い

藤田保健衛生大学病院は病床数1505床の最大規模の病院である。平成16年度の実績では循環器では年間心臓カテーテル検査は1600件、ステント257件、ペースメーカー植え込み手術59件、植え込み型除細動機植え込み手術10件、整形外科での人工股関節置換術は88件、人工膝関節置換術は42件、人工骨頭置換術は32件である。今回の当科で把握しているインプラントによる皮膚科的症例は過去8年間に10例であった。そのうちで金属のアレルギー機序で発症したと考える症例は確実1例、可能性2例であり、全体に占める割合は少ない。

その理由について、インプラントによる皮膚科的不具合例を経験するためには、金属イオンが溶出する必要がある。すなわち、パッチテスト陰性の症例における皮膚科的不具合例は感染症、金属の摩耗、金属の腐食が考えられる。インプラントによる皮膚科的障害例が少ないことは、水分や酸の状態が感染などの条件に変化しイオン化傾向が変化していくと考えられる。インプラント自体に不具合がある場合とない場合では金属アレルギーの有病率に差があることを述べており、インプラントの緩みや不具合が障害例に関連していることを示唆している。

ヒト末梢血単球を用いた感作性試験において、感作性の高いニッケルとSLSと比較したが、ニッケルでCD54、CD86の発現が高い結果であった。すなわち、THP-1

細胞を用いた実験において、金属アレルギーによる感作性マーカーの発現増加を認めた。同様の手法により、ヒト末梢血探求を用いて、ニッケルによる感作性マーカーの発現増加を認めていた。

しかし、インプラントは生体内に長く埋め込まれ、その安全性が患者一人一人の生命と健康に直接大きく関与するものであり、より良い製品の開発は国民の健康と QOL(Quality of life)の向上に極めて重要な課題といえる。今後はさらに残された課題に取り組む予定である。

## 8. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

心臓弁膜症の治療の一つとして、現在人工弁置換手術が行われているが、人工心臓弁の機能不全は直ちに患者の生命を危機にさらす重大な問題である。機能不全の原因としてこれまでに血栓形成とパルサス形成などが挙げられている。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために、置換手術後は抗血液凝固薬及び抗血小板薬を服用し続けなければならないが、服用していても機能不全につながる血栓が形成されることもある。それは個人の遺伝的背景の違いによって、薬に対する感受性の違いが見られるのかもしれない。また、パルサス形成についてはその原因は未だ明らかにされておらず、血栓形成と同様な個体差による可能性も否定できない。

そこで本研究は、人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐ方法の確立を目指して、血栓形成やパルサス形成の原因となり

得る遺伝子多型を探索することを目的とした。人工心臓弁を現在使用している患者の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGF $\beta$ やそのレセプターなど 11 遺伝子を対象とし、計 29SNP を選択しタイピングを行った。昨年度までに日本人の健常人 100 名分のタイピングデータを対照として比較検討した。

今年度は、使用している人工心臓弁に機能不全の疑いがある患者 2 名と使用中の人工弁に今のところ不具合の見られていない患者 8 名の血液から抽出した DNA を用いて SNP タイピングを行った。つまり人工弁置換術を行っている患者の数としても全部で 10 名であり、現段階で各アレルの頻度を算出したり、健常人 100 名のデータとの統計学的解析を行うのは不可能である。そのため、今後も引き続き人工心臓弁使用患者からの血液検体を集め、機能不全が見られた患者と見られない患者それぞれ 100 検体以上の収集を目指し、その上で最終的な解析を行う予定である。アレルの頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成やパルサス形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。人工心臓弁機能不全発症の分子メカニズムは未知であり、予防法も開発されていないため、今後遺伝子の多型を同定し、人工心臓弁の不具合発症との関連を調べることに



よって予防法の確立を目指していく。

## 9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

### 1) 加速酸化

加速酸化の方法により酸化劣化の進行に差があることがわかった。本研究では Method B のほうが酸化劣化の評価法としては厳しい条件であった。どちらの方法が臨床的に妥当かは今後、抜去インプラント解析などを行い検討する必要があると考えられるが、従来より市販されている EOG 滅菌品（サンプル B）や現在開発が進んでいる抗酸化能を付与した製品（サンプル H）ではいずれの加速酸化の方法でも酸化劣化が進行していないことや、より長期間の使用に耐える次世代型インプラントの開発が望まれている状況では、より厳しい条件での評価が望まれる。その意味では、現在も行われている Inert ガス中のガンマ線滅菌（サンプル D）でも、酸化劣化の原因になるとして既に行われなくなった空気中におけるガンマ線滅菌（サンプル C）と同様に酸化劣化が進行することが Method B による加速酸化で示されており、注意を要すると思われる。

### 2) 疲労試験

引張疲労試験では UHMWPE 特有の粘弾性特性のために、その伸びが試験機の可動域を超えてしまうことがわかった。そのため、たびたび試験を中止して再取り付けを行い、試験を再開する必要があった。また、最取り付けに要する時間が異なると、再開後の挙動も多少異なること

がわかった。市販の疲労試験機の可動域は今回使用した装置とほぼ同様に、いずれの試験機を使用しても同様の問題は生じると考えられた。さらに、300 万サイクルでも破断にいたらず、試験に時間がかかることも問題と考えられた。

CCT 試験では、初期クラックの製作が困難であること、試験片の変形のために初期クラック長さの測定が困難であることがわかった。

これに対し、ECT 試験では、上記のようなほかの試験法で生じた問題が起らず、UHMWPE の疲労特性評価が可能であった。

その結果、EOG 滅菌品（サンプル B）や VEPE（サンプル H）では Virgin 品（サンプル A）とほぼ同様の疲労特性を示した。また、推定された Kth の数値も他の試験法で測定した文献とほぼ一致した。これに対し、酸化劣化が進行したサンプルでは Kth の推定ができないほど疲労特性が低下していた。このことは人工関節用 UHMWPE において酸化劣化を防ぐことが重要であることを示すと同時に、今回開発した疲労特性試験法が有効であることを示している。

人工関節用 UHMWPE の疲労特性の評価方法として、コンパクトテンション（CT）試験片を使用する方法や Fatigue punch testing（FPT）試験が報告されている。CT 試験は線形弾性材料の試験法として規格化されており、Kth など疲労特性を絶対的に評価することが可能である。しかし、理想的な力学状態を実現するために試験片寸法が大きく、実際の製品から試験片

を作製することができない。従ってCT試験による研究は専用加工された試験片を用いたものに限られ、抜去品や製品の分析には使われない。FPT試験はこのような問題を解決し、抜去品などの機械特性を評価するために開発された試験法である。試験片は直径6mm、厚さ0.5mmの円板を使用する。試験片の寸法が小さいため、抜去品や製品の内部での機械特性の違い、例えば摺動面からの深さによる機械特性の変化などを評価することが可能である。この試験法の問題点は、専用の治具が必要であることのほか、試験片の加工が非常に困難であることである。特に0.5mmの厚さに精度よく一様に切り出すためには、専用の装置を必要とする。また、試験片に加える荷重値が低いので、使用する疲労試験機についても専用の装置が必要になる。

ECT試験では、抜去品や製品から切り出すことが可能な大きさの試験片を使用できる。また、その形状は単純で、機械加工で容易に作製可能である。疲労試験機は市販の一般的なものでよく、金属製コンポーネントの疲労試験用の装置を共通で使用できる。一回の試験はおよそ1日で終了し、通常、常時観察する必要もない。このように、ECT試験は、簡便で適用範囲が広く、有効な評価方法であると考えられる。

## 10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

毒性評価に培養細胞を使う手法は、その簡便性で有用とされているが、神経毒

性に関しては、確立されているものは少ない。今回、実際の神経系細胞由来の培養細胞として、アストロサイト系細胞であるCRL-2534を用いた。CRL-2534は、生後8ヶ月のマウスの小脳の培養から、自然に形質変換し確立された培養系で、type IIIのアストロサイトである(Alliot and Pessac, 1984)。この細胞について毒性評価に使用できるかを検討した。

そのために、まず細胞死に関して検討することとし、トリパンブルー色素排除法に加えて、細胞突起を有する形態から顕微鏡によるカウントが困難である可能性を考え、培養上清中のLDH濃度についても細胞の生存の指標として使用した。曝露前には、90%以上の細胞生存率が得られ良好な細胞培養の状態であった。また、細胞死以外に機能面の指標を検討することとして、グルタミン酸の培養上清中の放出量(Alliot et al., 1996)を検討した。さらに、低濃度での増殖抑制の可能性を考え、DBT、OTについて細胞の増殖評価も検討した。増殖評価は、細胞にTetraColor ONEを添加することにより生成され放出されたホルマザン量が、生細胞に比例することを原理に、上清中ホルマザン量をTetraColor ONEの取り込みとして評価し、増殖の結果である生細胞数を評価して行った。

本研究では、以前にDBT(Tsunoda et al., 2006)及びTBT(Nakano et al., 2004)の毒性を評価したマクロファージ系細胞のJ774.1細胞への曝露実験をふまえて、アストロサイト系細胞に対するDBTの曝露濃度を決定した。一方、OTに関しては、

触媒として使用された場合の濃度の高さと、神経毒性の報告がないことから、曝露濃度は DBT に比べて高値に設定した。また、PLLA に関しては、スズとの相互作用を考慮して、Nacalai 社製の製品に加えて、スズを含まないもの、大量に含むもの、さらに、形態の違うものとして、ゲル状のオリゴマー、及び、弾性形状が維持されているオリゴマーを比較した。

DBT は、細胞の生存率及び上清中 LDH を検討した実験で  $0.5 \mu\text{M}$  曝露で対照群に比べ有意な差を示し毒性が示された。DBT に対する感受性が高いとされるマクロファージ系細胞 J774.1 の DBT の生存率の有意な低下と同じ濃度 (Tsunoda et al., 2006) で有意な差が認められたことから、アストロサイトは DBT に対して、マクロファージと同様の高い感受性を持つと言える。さらに、細胞生存率実験で生存率の低下を示さなかった  $0.25 \mu\text{M}$  で細胞上清中のグルタミン酸量の増加を示した。これは、細胞が機能障害 (グルタミン酸受容体機能障害) をきたし、グルタミン酸を細胞外へ大量に放出したか、上清中のグルタミン酸を取り込む機能が損なわれたため起こった可能性が考えられる。また、増殖評価でも  $0.25 \mu\text{M}$  で細胞増殖の抑制を示した。以上から、CRL-2534 を用いた評価系で、少なくとも DBT については、上清グルタミン酸測定による評価及び細胞増殖の評価は、細胞生存率と同様の有用な指標として評価できると考える。

一方、OT は  $100 \mu\text{M}$  の濃度でも細胞の生存、機能面に影響はなかった。しかし、 $100 \mu\text{M}$  では、細胞増殖を抑制することが

示されたため、毒性が全くないわけではないと考えられる。

PLLA についての実験においては、PLLA5000 及び PLLA3000 で、細胞の生存、機能面の両方で毒性を示さなかった。しかし、S3 に関しては、細胞の生存率及び上清中 LDH について  $10 \mu\text{g/ml}$  でも有意性が認められ、細胞の生存への影響が示された。また、細胞の生存率の低下を示さなかった  $5 \mu\text{g/ml}$  でグルタミン酸量の低下を示した。S3 が毒性を示したことは、大量のスズの影響か、PLLA が大量のスズの存在下でスズとの相互作用により毒性を強めた可能性がある。上清中グルタミン酸の低下は、細胞が機能障害をきたし、グルタミン酸の細胞外への放出機構が損なわれたため起こった可能性がある。

ゲル層オリゴマー及び弾性形状維持層 P オリゴマーに関しては、 $50 \mu\text{g/ml}$  の濃度においても細胞の生存に影響を生じさせなかったが、グルタミン酸量では  $50 \mu\text{g/ml}$  の濃度において、ゲル層オリゴマーで有意な上昇、弾性形状維持層オリゴマーで有意な低下が示された。このことから、機能面からの検討を行うことで、神経毒性の評価がより信頼性の高いものとなることが示唆された。また、グルタミン酸産生の評価で、ゲル層オリゴマーが 3 時間後で有意なグルタミン酸量の増加を示したことから、弾性形状維持層オリゴマーに比べて毒性が強い可能性が示唆されたと考える。この形態の違いによる毒性変化の可能性は、他の材料の評価においても注意すべき点かもしれない。

今回の実験結果から、DBTは $0.5\mu\text{M}$ より細胞死、 $0.25\mu\text{M}$ より機能変化、増殖抑制が示された。DBT dichlorideの分子量が303.84であることを考慮すると、 $0.5\mu\text{M}=1.52\times 10^{-2}\mu\text{g/ml}$ となる。人工硬膜製品は、生体内に埋入後、頭蓋内で加水分解され髄液中に溶解する。

## 11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

有限要素解析法を用いた数値シミュレーションによって、脊椎固定器具の疲労強度の推定を試みた。有限要素解析は、実験が不可能な場合、実験前の予備検討などの目的で様々な分野で利用されている。本研究で評価した脊椎固定器具をはじめとするインプラントの実験的評価法はASTMやISOによって定められているが、実際には使用する患者によって体内の荷重状態が変化するため、実験的に耐久性を評価するのは大変難しい。有限要素法による数値シミュレーションを用いれば、時間的・コスト的な面だけでなく、同じ条件下で様々な境界条件や器具の仕様・材料の変更にも即座に対応した解析が可能となる。

インプラントの力学的安定性を評価するためには、応力や歪などの相対的な比較よりも、実験との一致性が確認されたモデルによる絶対値的な評価が重要となる。本研究では、実験的評価を再現した三次元有限要素モデルによって、圧縮荷重による変位量を比較した結果、実験結果の誤差範囲に収まり、モデルの妥当性が検証された。さらに、妥当性を検証し

たモデルによって、耐久性について評価した。脊椎固定器具のスクリーネジ部分の耐久性、結合アームを組み合わせた場合の耐久性についてそれぞれ評価した結果、部材の組み合わせによって、耐久性が低下する傾向が示された。これは、個々の部材における負荷状態と、部材を組み合わせた場合の負荷状態の違いによるものであり、実際の生体内の荷重状態はさらに複雑になると考えられる。数値シミュレーションでは、こうした個々の部材および器具としての力学的性能の評価が可能であり、より優れた性能へと改良するための設計指針を検討する有効な手段となる。

## 12. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

ミニブタの膝関節はヒトのそれよりやや小さいものの、ヒトとほぼ同様の手術を施行することが可能であった。

今回、欠損放置、担体のみ充填、担体+細胞移植と3群を作成し、比較できた。まだすべてのサンプルを評価できていないが、細胞移植群が最も良好な修復をしめした。

組織学的評価のみならず、MRIでも評価した。ミニブタの標本の大きさは、MRIを施行するに十分であり、従来からあるMRIでの軟骨撮影条件である3DFLASH法でも、修復組織の充填度、表面の不整度と評価することが可能であった。また新しいdiffusionという方法で評価したところ、細胞移植群ではコントロールに比較して良好な改善をうかがわせる変化が認めら

れた。

ミニブタでは組織が大きいので、様々な力学的試験の施行が可能である。これらのデータと組織学的および MRI 評価を比較し、その相関を明らかにすることが可能である。それにより、組織標本を採りにくいヒトでの修復を、MRI や力学的試験で類推できるようになると考えられる。

## E. 結論

### 1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

大腸菌乾燥菌体コラーゲンシートの腹腔内埋植試験を行った結果、菌体添加量に比例して炎症反応が増強されることが明らかとなり、腹腔内に適用する生体材料にも適切な LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。

大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを背部皮下に埋植した際に誘導される炎症反応は菌体重量として同用量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体によっても惹起されることが確認された。一方、大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを骨欠損部に埋植した時に観察される骨再生の顕著な遅延は LPS を持たない黄色ブドウ球菌乾燥菌体含有コラーゲンシートでは起こらないことが明らかとなった。

生体適合性を改善した高純度酸処理ゼラチンシートを徐放担体として使用し、*in vivo* 抗菌試験を実施した結果、CAP-18/LL-37 類縁体 (18-mer LLKKK 置換体) は、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対して顕著な抗菌活性を示し、新規抗菌成分として有効であることが確認された。

### 2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

滅菌方法ならびに菌、暴露時間 (損傷の程度) に拠って損傷回復に要する回復剤が異なる。損傷菌生育培地に、乳酸カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、グルコースなどの添加が損傷回復に有効であり、培地メーカー間の生育性能の差を少なくさせる効果がある。複合アミノ酸の主たる効果は L-アラニンに拠ると考えられる。

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

医療機器の抽出に用いられる植物油が LLNA によるリンパ節活性化反応に影響があるかどうか検討した。アセトン、A00(4:1)、A00(1:4) 及びオリーブ油について比較した結果、A00(1:4) 及びオリーブ油塗布群はわずかにリンパ節重量及び ATP 量が高い値をとるが、有意な差はなかった。それぞれの溶媒に HCA を溶解して試験したところ、A00(4:1) を溶媒としたときに最も SI 値が高くなった。生理食塩水を抽出液として用いたときのマウスへの塗布方法として、界面活性剤、糊剤の添加、及び有機溶媒混合法を検討した。溶媒対照群として SLS 溶液は若干値が上がるものの他の方法では大きさ差はなかった。HCA を各種溶に加えて塗布したところ、DMSO 単独での発光量が他のものより大きくなり、結果として HCA の DMSO 溶液で SI 値は低くなった。粘性、入手のしやすさから考えると、今回試験した中では、水溶液に T80 を添加して塗布する方法が適切と思われた。コラーゲンを主とする

医療機器の抽出液について試験したが、溶媒群と反応性に差はなく、これらの医療材料の皮膚感作性はないと判断した。

複数の化学物質を併用したときの感作性反応を調べた。EMC を前処理した場合、感作性物質のリンパ節活性化反応は変化なかった。SLS を前処理すると、低濃度での感作性反応が増強されることがわかった。皮膚浸透量を増加させるような物質を併用あるいは混合した場合、他の試験物質の反応に影響することが示唆された。

タンパク質及びタンパク製医療機器の即時型アレルギー性を評価した。生理食塩水による抽出液をアジュバントとともに腹腔内に注射した後、血清中の総 IgE 抗体価を測定した。陽性タンパク質 OVA は著しい抗体価の上昇を示したが、BSA による上昇率は少なかった。FBS に関しては若干の総 IgE 抗体価の上昇を示し、アレルギー性が疑われた。試験した医療機器に関しては総 IgE 抗体価が増加するものではなく、即時型アレルギーを起こす可能性は少ないと評価した。

#### 4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

動物に埋植する金属材料円板(Ti/Ni, Ti, Ni)の製造を行い、Ti-6Al-4V 合金を対照として、最大 16 週間の背部皮下埋植を行った。また、比較のために溶出試験との対比を行った。Ni の毒性が顕著であることを再確認したが、Ti/Ni 合金においては、特段の毒性現象は認められなかった。対照として捉えていた Ti-6Al-4V 合金では、Ti によると思われるアレルギー

症状を観察した。これらのことから、従来検出が難しかった金属材料のアレルギーを、今回の埋植方法で検出できる可能性が示唆された。また、米国の医療機器不具合報告から、Ti アレルギーに関するものを抽出し、整理した。

#### 5. Ti 合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

ラット大腿骨埋植試験を実施し、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の骨組織適合性について検討した。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、いずれも組織に炎症反応が無く、窩洞部の骨形成も自然であった。また、純金属もいずれも組織に炎症反応が無かったが、Nb において引抜強度の増加傾向および Al において引抜強度の低下傾向がみられた。

埋植試験における試料の引抜強度は、in vitro 試験の直接接触法による繊維芽細胞 V79 のコロニー形成率および正常ヒト骨芽細胞 NH0st の石灰化物生成量と相関した。直接接触法による細胞毒性試験および骨芽細胞を用いた適合性試験の有用性が確認された。

Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属も含めて、いずれも炎症反応を起こさず、また、骨組織適合性にも全く問題が無かった。Ti-Zr-Nb 合金は力学的性質にも特徴があり、生物学的安全性および有効性の高い金属材料として、埋植医療機器への応用が大いに期待できる。

## 6. ステント用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

貴金属合金製ステント用の開発を目指し、Au-Pd 二元合金、ならびに Au-Pd-Ag 三元合金を開発した。開発した合金の力学的評価の結果、Au-Pd 二元系合金では Pd の添加により、溶質濃度のおよそ 0.3 乗に比例した固溶強化が認められ、Au-Pd-Ag 三元系合金化によって、強さと十分な延性の合金が得られることがわかった。開発合金の耐食性に関しては、0.9%NaCl 水溶液中での溶出試験とアノード分極試験により、既存の生体用合金である Ti-Ni 超弾性合金や Ti-6Al-4V 合金よりも優れた耐食性を有していることを明らかにした。

また、血液適合性試験を行い、開発した二元系合金が優れた、従来材 (Ti-Ni 合金や 316L 型ステンレス鋼) と同様の優れた血液適合性を有していることを見いだした。

以上の結果から、開発した Au-Pd 二元合金、ならびに Au-Pd-Ag 三元合金が新しい貴金属合金製ステント用の素材として有望であると結論付けた。

## 7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

- 1) 金属アレルギーのためにインプラントによる皮膚科的症例をきたす頻度は極めて低い。
- 2) 金属アレルギーによる皮膚症状を発症させるためには、金属は溶出し、イオン化している必要がある。
- 3) タンのパッチテストは純チタンプレート

ート、酸化チタン、錯体でも作成できる可能性が高い。

ヒト単球を用いた感作性代替法は、今後の研究の発展が期待できる、

## 8. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成やパルス形成の原因となる遺伝子多型を探索することを目的として、人工心臓弁使用者 10 名の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や生体における炎症反応などに関連する遺伝子など 11 遺伝子について計 29SNP を選択し、タイピングを行った。検体数が 10 であったため、今年度得られた結果のみではアレル頻度の算出や統計学的解析は不可能であり、今後も引き続き人工心臓弁使用患者からの血液検体を集め、SNP タイピングを行い最終的な解析を行っていく予定である。

## 9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

人工膝関節のデラミネーション破壊や高機能化、架橋ポリエチレンの臨床応用、長寿命化のニーズなどを背景に、UHMWPE の疲労特性評価の重要性が増している。本研究で開発した ECT 試験法は、簡便であるだけでなく、抜去品や製品からも試験片を作製可能であるなど応用範囲が広く、また、Kth など疲労特性パラメータの推定も可能であった。

ECT 試験の結果、酸化劣化した製品は疲労特性が大幅に低下することがわかった。また、現在市販されている製品でも酸化劣化する可能性のあるものがあり、引き続き検討する必要があることが示唆された。

#### 10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

DBTについては低濃度での神経毒性が示され、注意が必要ではある。人工硬膜については使用する量に基づいてリスク評価をする必要がある。アストロサイトを使った神経系毒性評価は、細胞死の他、機能面、増殖の検討も有用と考える。

#### 11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

本研究の結果、脊椎固定器具をはじめとする整形外科インプラントの力学的耐久性評価の手法として、有限要素解析を基にした数値シミュレーション技術の有効性が示された。数値シミュレーションによって、実験的評価だけでは得られない情報が得られ、インプラントの性能向上のための重要な指針となる。

#### 12. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

ミニブタ膝関節に骨軟骨欠損を作成し、欠損放置、担体移植、および担体+細胞移植群を作成して、肉眼的、組織学およびMRIによる評価を行った。

従来のMRI撮影法でも修復組織の評価が可能であり、組織学的評価と比較可能

であった。

#### F. 健康危険情報

骨粗しょう症を持つ患者において、脊椎固定器具の繰り返し負荷条件の下でのリスクが予想以上に高い恐れがあるので、究明を急ぐべきである。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. 土屋利江、再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について、岡野光夫編、CMC 出版 印刷中
2. 土屋利江、ティッシュエンジニアリングとガイドライン、ティッシュエンジニアリング2007、岡野光夫、田畑泰彦編、印刷中
3. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture. J. Biomed. Mater. Res. 2007, 80, 257-267.
4. 土屋利江 編集、再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル、培風館、2007 印刷中
5. 土屋利江、細胞組織医療機器開発総論、薬学雑誌、印刷中
6. 澤田留美、伊藤友実、土屋利江、細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について、薬学雑誌、印刷中
7. 土屋利江、俵木登美子、特別対談、医療機器開発の推進を目指した日本の動向、バイオテクノロジージャーナル、羊土社、2007
8. D.Y. Jung, Y.B. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi, A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of



- cultivated cartilage tissues Key Engineering 2007, 342-343, 853-856.
9. Tsutomu Nagira, Misao Nagahata-Ishiguro and Toshie Tsuchiya, Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression. Biomaterials 2007, 28, 844-850.
  10. 山越葉子、中澤憲一、土屋利江、原子間力顕微鏡, 特集号 分子イメージングー現状と展望、日本臨床、2007、2号、270-277
  11. Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Synthesis of novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial Organs in press..
  12. Rumi Sawada, Tomomi Ito and Toshie Tsuchiya, Changes in expression of genes related to cell population in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. J. Artificial Organs, 2006, Vol.9, 179-184.
  13. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers, J. Biomed. Mater. Res. 2006, 79A, 409-417.
  14. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics, Key Material Eng. 2006, Vol.309-311, 263-266.
  15. Masato Tamai, Ryusuke nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, Bioceramics, Key Material Eng. 2006. Vol. 309-311, 97-100..
  16. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form, Bioceramics, Key Material Eng. 2006, Vol. 309-311, 1293-1296.
  17. Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya, The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap junctional intercellular communication, Biomaterial, 2006.27, 1437-1443.
  18. Ahmed, S., Tsuchiya, T., Kariya, Y\*1.: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides Animal Cell Technology, 14, 81-85 (2006)
  19. Banu, N., Tsuchiya, T., Ahmed, S., Sawada, R.: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage Animal Cell Technology, 14, 87-92 (2006)
  20. Li, Y.P., Nagira, T., Tsuchiya, T.: Increase in the insulin secretion of HIT-T15 cells: Gap Junctional Intercellular Communications Enhanced by Hyaluronic Acid Animal

- Cell Technology, 14, 263-269 (2006)
21. Sawada, R., Ito, T., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells *Animal Cell Technology*, 14, 325-329 (2006)
22. Nakamura, N., Tsuchiya, T.: Effect of biodegradable polymer poly(L-LACTIC ACID) on the cellular function of human astrocytes *Animal Cell Technology*, 14, 331-337(2006)
23. 盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕美、中村俊、土屋利江、ナノレベルイメージングによる分子構造と機能解析、日本臨床、2006、64巻、358-364.
24. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada, Effects of biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular cartilage, *J Biomed Mater Res*, 2006, 77A, 84-89.
25. Shintani, H: Importance of Considering Injured Microorganisms in Sterilization Validation, *Biocontrol Science*, 11(3), 91-106 (2006)
26. 新谷英晴：損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について[5]放射線滅菌に拠る損傷ならびにその耐性、防菌防黴、34(10)、645-652 (2006)
27. 新谷英晴：損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について[6]、化学薬剤に対する微生物の損傷と回復、防菌防黴、34(11)、731-740 (2006)
28. 鶴田京子、松永佳世子：男女の金属接触皮膚炎、*J Visual Dermatol* 5:704-708, 2006
29. 松永佳世子：歯科と皮膚科の連携には5つのCO, *J Visual Dermatol* 5:1071, 2006
30. Nakamura Y, Nakaya H, Saito N, Wakitani S. Co-ordinate expression of BMP-2, BMP receptors and Noggin in normal mouse spine. *J Clinical Neuroscience* 13(2): 250-256,2006
31. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Nakaya H, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H. Immunohistochemical localization of alpha-smooth muscle actin during rat molar tooth development. *J Histochem Cytochem* 54(12):1371-1378,2006
32. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Autologous bone marrow stromal cell implantation for an athlete: a case report. *Osteoarthritis Cart* in press
33. Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, Wakitani S. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. *J Biosci Bioeng* in press
34. Wakitani S, Ohgushi H, Machida H, Nakaya H, Murakami N, Yamasaki H, Kato H, Kawaguchi A, Okabe T, Tensho K. Autologous culture expanded bone marrow stromal cell transplantation for cartilage repair. In. *Bone marrow transplantation. New Research* (Davidson DF, ed.), Nova Science Publishers, New York, pp97-108, 2006
35. 川口杏夢、脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植に

- よる軟骨再生. 医学のあゆみ  
216(6):455-457,2006
36. 川口杏夢、脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植による軟骨再生 —現状と展望—. MB Orthop 19(6):68-73,2006
  37. 脇谷滋之. 関節軟骨の再生医療. ティッシュエンジニアリング2006、田畑泰彦、岡野光夫編、東京、日本医学館、p120-125、2006.
  38. 脇谷滋之、三岡智規、堀部秀二. 関節軟骨欠損に対する骨髄間葉系細胞移植術の中・長期成績. 整形・災害外科 49:1087-1092,2006
  39. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復. 関節軟骨の再生と修復. II. 臨床に向けた応用. 関節 4 月増刊 25:70-74,2006
  40. Yoshiaki Ikarashi, Kazuhiro Toyoda, Equo Kobayashi, Hisashi Doi, Takayuki Yoneyama, Hitoshi Hamanaka, Toshie Tsuchiya, Improved Biocompatibility of Titanium-Zirconium (Ti-Zr) Alloy: Tissue Reaction and Sensitization to Ti-Zr Alloy Compared with Pure Ti and Zr in Rat Implantation Study. Materials Transaction, 2005, 10, 2260-2267.
- 2) 学会発表
1. 土屋利江、再生医療ガイドライン化、第 6 回日本再生医療学会 (2007,3)
  2. 土屋利江、細胞組織医療機器開発総論、第 126 回日本薬学会 (2006.3)
  3. 土屋利江、再生医療ガイドラインの現状、日本組織工学会(2006.9)
  4. 土屋利江、バイオマテリアル微粒子の細胞機能への影響、第 3 回ナノトキシコロジーアセスメントと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会(2006.12)
  5. T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, T. Tsuchiya 「TGF- $\beta$  gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) —Relation between TGF- $\beta$  and hMSCs multidifferentiation—」 The 19<sup>th</sup> annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2006. 9)
  6. 澤田留美、土屋利江「医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発を目指した SNP 解析」 第 44 回日本人工臓器学会 (2006. 11)
  7. 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「幹細胞を用いた細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性評価に関する研究」 第 6 回日本再生医療学会 (2007. 3)
  8. 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の増殖機構に及ぼす低酸素培養の影響について」 第 6 回日本再生医療学会 (2007. 3)
  9. 土屋利江：「医用材料・医療器具の安全性」バイオメディカルエンジニアリング—工学技術による新しい医療の創出—(2006.2) 東京
  10. 玉井将人、中岡竜介、伊佐間和郎、土屋利江：「Nb イオン置換型新規ハイドロキシアパタイトセラミックスの合成とその骨形成能」第 4 回ナノテクノロジー総合シンポジウム(JAPAN NANO 2006) (2006.2) 東京
  11. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Novel role of different tin products on chondrogenesis of human articular

- chondrocytes. JSAO 2005, 2005.12, Tokyo
12. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Effect of stannous 2-ethylhexanoate in human normal astrocytes. JSAO 2005, 2005.12, Tokyo
  13. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Cytotoxicity of Various calcium Phosphate Ceramics. Bioceramics18, 2005 12, Kyoto
  14. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya: Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts. Bioceramics18, 2005 12, Kyoto
  15. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Differentiation of human osteoblasts was enhanced by co-culture with hydroxy apatite microspheres but not with alumina and polymeric microspheres. Bioceramics18, 2005 12, Kyoto
  16. 中岡竜介、土屋利江: 「ナノ蛍光イメージングによる細胞-多糖 Scaffold 間相互作用観察の試み」第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11) 京都
  17. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya: Novel role of modified hyaluronic acid on normal human astrocytes. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
  18. Banu Nasreen, Toshie Tsuchiya: Effects of various kinds of tin catalysts on chondrogenesis of human articular. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2005.11, Kyoto
  19. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics. 5<sup>th</sup> Asian BioCeramics Symposium (ABC2005), 2005 10, Sapporo
  20. Sadami Tsutsumi, Duk Young Jung, Yu Bong KANG, Toshie Tsuchiya: A NOVEL NON-DESTRUCTIVE METHOD TO MEASURE ELASTIC MODULI OF CARTILAGE CELLS IN SITU. The 7<sup>th</sup> International Conference on Cellular Engineering, 2005.9, Korea
  21. 中岡竜介、土屋利江: 軟骨組織再生を目指した新規アルギン酸ゲルの in vitro 機能評価、第8回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  22. 松岡厚子、土屋利江: 「In vitro 培養ヒト間葉系幹細胞の安全性評価法の開発」第8回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  23. Ahmed Saifuddin, Toshie Tsuchiya, Effect of modified hyaluronic acid on the cellular function of normal human astrocytes. 第8回日本組織工学会 (2005.9) 東京
  24. 土屋利江: 「わが国の医療機器規制の動向」第2回次世代医療システム産業化フォーラム 2005 (2005.5) 大阪
  25. 土屋利江: 「再生医療実用化に向けて-学官産の連携を-」第2回未来医療交流会 (2005.4) 大阪
  26. 靱島由二, 小園 知, 長谷川千恵, 岡野理紗, 村松知明, 佐々木和夫, 土屋利江. 医療機器・医用材料の適用例に応じてエンドトキ