

懸念される。

今回の実験の範囲では、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、好酸球が再現性良く観察され、アレルギー反応を示すものと考えられる。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問題になったことはないという。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り、非酸性下条件では、40 倍程度多い。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、アレルギー反応が外観から検出されにくいという。Ti 金属プレートや歯科のチタンインプラントの長期埋植後では、チタン金属の周囲組織にチタンの酸化物様粒子が観察されている。

今回の円形板埋植試験方法は、形状が大きいため検出力が高くなること、背部皮下ということでランゲルハンス細胞の寄与があること、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。

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、 γ ネイル、髄内釘、人工関節、人工歯骨など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。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、 α 相である純 Ti に、 α 相安定化元素と β 相安定化元素を適量添加することによって、 α - β 二相組織もしくは β 単相組織を得ることができる。 α - β 構造は強度が高く、疲労特性に優れ、また、 β 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。

初めに、各種 Ti 系金属材料の *in vitro* 試験について検討を行った。細胞毒性の検出感度が一般的に高いとされている直接接触法によるコロニー法を用いて細胞毒性を評価した。従来から使用されている Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性が認められたが、その他の Ti 系材料はいずれも細胞毒性が認められなかった。今回用いた Ti 系材料を構成する元素のうち、V は最も細胞毒性が強く、その他の構成元素の細胞毒性はいずれも V より 2-3 桁以上弱いことが確認されている。今回用いた Ti 系材料の内、構成元素として V 含むものは Ti-6Al-4V のみであり、唯一細胞毒性を示した。やはり従来から指摘されているとおり、Ti-6Al-4V は構成元素の V に起因すると考えられる細胞毒性が認められた。

次に、正常ヒト骨芽細胞の増殖および分

化に及ぼす Ti 系材料の影響について検討を行った。骨芽細胞の増殖と分化は、ほぼ同様な傾向を示し、Ti-6Al-4V が最も低く、Ti-Zr-8Nb が最も高くなった。CP-Ti より骨芽細胞の増殖が劣る Ti 合金は Ti-6Al-4V のみであり、Ti-6Al-4V だけが細胞毒性を示したというコロニー法による細胞毒性試験の結果とよく一致した。また、Ti-6Al-4V を除く Ti 合金は、CP-Ti に比べて、いずれも骨芽細胞の増殖および分化を増加させた。さらに、Ti 系材料の組成は骨芽細胞の分化レベルには影響せず、骨芽細胞の増殖が Ti 系材料の骨芽細胞適合性を決定することが示唆された。CP-Ti に比べて骨芽細胞の増殖を増加させた Ti 合金には、Mo、Zr、Nb、Ta のいずれかが添加されている。これらの元素は Ti 合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となり、不動態皮膜をより強固にするため、金属イオンの溶出を抑える働きがある。Ti 合金の骨芽細胞適合性を向上させるためには、V のような細胞毒性を示す元素を排除した上で、金属イオンの溶出を抑えるために不動態皮膜安定化元素を添加することが有効であろう。

引き続き、Ti-Zr 基合金の細胞毒性と骨芽細胞適合性について検討を行った。直接接触法によるコロニー法において、Ti-6Al-4V に弱い細胞毒性が認められたものの、Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金にはいずれも細胞毒性が認められなかった。また、純金属の Ti、Zr、Nb にはいずれも細胞毒性が認められなかったが、Al には非常に弱い細胞毒性が認められた。Ti-6Al-4V は細胞毒性が高い V を含むばかりでなく、弱いながらも細胞毒性を示した Al を含んでおり、やはり安全性に問題があると言わざるを得ない。一方、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、構成元素の純金属を含めて、いずれも細胞毒性が無く、安全性が

高いと考えられる。

次に、Ti-Zr 基合金の骨芽細胞適合性を正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を指標として評価した。Nb 含量にかかわらず Ti-Zr 基合金は、Ti-6Al-4V と比べて、いずれも骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。Ti-6Al-4V は骨芽細胞の増殖を抑制していることが確認された。また、純金属では、Ti、Zr、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、すなわち細胞数当たりの ALP 活性を求めたところ、Ti-Zr 基合金および Ti、Zr、Nb は、いずれも骨芽細胞の分化レベルを促進させることが分かった。一方、Al 上で培養された骨芽細胞の分化レベルは、顕著に低下することが分かった。これは、Al 塩が骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさない濃度で分化を特異的に阻害したという実験結果とよく一致している。さらに、Ti-Zr 基合金は Ti より骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。今回試料とした Ti-Zr 基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る。そのため、純 Ti よりも Ti イオンの溶出が抑えられ、骨芽細胞適合性も向上したと考えられる。

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。Al は弱い細胞毒性を示し、さらに、骨芽細胞の増殖、分化および分化レベルを抑制した。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 α - β 二相組織が得られて力学的強度が増し、8 mol% 以上の Nb を添加すると β 単相組織が得られて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。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、本研究において、細胞毒性が無く、骨芽細胞適合性にも優れ、ラット大腿骨埋植で炎症反応が無く、骨形成にも問題が無いなどが確認され、 β 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

Ti-Ni 合金の溶出挙動とステンレス鋼のそれを比較し、両合金では溶出のメカニズムが異なっていることが示唆された。

また、Ti-Ni 合金の溶接材と非溶接材との比較の結果、レーザー微細溶接による耐食性得の影響は大きくないと考えられた。

Ti-Ni 合金の SBF 浸漬試験により、いずれの試料表面上にも球状の HA が析出していることが確認され、Ti-Ni 合金は良好な生体適合性を有していることが示唆された。

本研究で新たに開発した Au-Pd 系合金に関して、力学的性質の評価、耐食性の評価 (0.9%NaCl 水溶液中での溶出試験とアノード分極試験)、ならびに、血液適合性試験の結果から、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ド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。

(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内場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

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 β 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。

人工弁置換術を行っている患者として、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。つまり検体数として全部で10名であり、この段階で各アレルの頻度を算出したり、健康人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

ECT試験によりUHMWPEの疲労特性評価が可能であった。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が、試験片寸法が大きき、製品から試験片を作製することができない。FPT試験は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が、試験片の加工が非常に困難であるほか、試験片の作製や試験に専用の装置を必要とする。

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 PLLA オリゴマー、及び、弾性形状が維持されている PLLA 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 PLLA オリゴマー及び弾性形状維持層 PLLA 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 PLLA オリゴマーで有意な上昇、弾性形状維持層 PLLA 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 PLLA 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が

ら、弾性形状維持層 PLLA 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。最も分解が進むのは埋入後3ヶ月であり、この期間では28日間で約30%が溶解されることが明らかになっている。製品の使用限量は2gとされており、その中のスズ濃度は10ppm未満であること、髄液は1日に500ml~600ml産生され交換されている(小林, 1985)ことを考えると、溶出するDBT濃度はアストロサイトに影響を及ぼす濃度よりはるかに低く、実際の臨床適用ではDBTによる影響は想定しにくいと考える。また、OT、PLLA 各種についても同様に実際の臨床における適用での影響は想定しにくいと考える。

11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

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、実際には生体内で使用するため、荷重状態は使用する患者によって変化するため、実験的手法によって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、部材を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、実際の生体内ではさらに複雑な負荷が発生する可能性がある。数値シミュレーションでは、こうした個々の部材の力学的性能を評価しながら器具として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変更の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

健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められない。

損傷菌については培養温度が低く、長い期間培養する必要がある。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。加熱滅菌での損傷回復の場合にはピルビン酸も損傷回復に有効であったが EOG ならびに放射線滅菌ではピルビン酸の有効性は余り認められなかった。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

LLNA における各種非 RI 指標について検出感度を比較した。感作性物質をマウスの耳に塗布した後、耳介リンパ節の重量、リンパ節細胞数、BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量を測定し、SI 値を求めた。リンパ節細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は、BrdU 取り込み量やリンパ節重量の SI 値に比べ高い値を示した。リンパ節の T 細胞及び B 細胞比率を分析したところ、感作性物質では B 細胞数は増加するものの、刺激性物質でも同様の反応が認められた。フリーサイトメトリーによる判定には定量性や判定基準の設定などについて更に検討が必要である。抽出に用いる植物油は LLNA においてリンパ節活性化反応は示さなかった。生理食塩水での抽出液を塗布するため、界面活性剤、糊剤または有機溶媒添加法を検討した結果、SLS 溶液では弱い活性化反

応が認められ他の試験物質の反応に影響することがわかった。今回検討した中では Tween 80 を添加して塗布する方法が最も SI 値が高くなった。本法で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感作性は認めなかった。

タンパクアレルギーをアジュバントと混合して投与すると、血中総 IgE 抗体価の著しい上昇を示し、即時型アレルギー性の有無の評価と相関性が認められた。OVA では著しい抗体価の増加を認めたが、BSA による増加は少なかった。また、タンパク製医療機器の生理食塩水抽出液では抗体価は増加せず、即時型アレルギーを起こす可能性は少ないと判断した。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

米国の整形外科インプラントの不具合報告から、金属に関係するものを抽出し、再整理した。また、米国の全医療機器不具合報告を集計し、機器全体、及び埋植機器に関して解析を行い、各機器の不具合傾向を明らかにした。また、Ni、及び Ti アレルギーに関係するものを抽出し、整理した。さらに、厚生労働省に報告された不具合報告や回収情報の中で金属・合金に関するものをリストアップすると共に、全不具合報告を整理し、機器分類別に集計して、その傾向を掴んだ。一方、動物に埋植する金属材料円板の製造を行い、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。対照として用いた 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反応を、今回の埋植方法で検知できる可能

性が示唆された。

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

細胞毒性試験において、Ti-6Al-4V には細胞毒性が認められたが、その他の Ti 系金属材料には細胞毒性が認められなかった。また、骨芽細胞適合性試験において、Ti-6Al-4V は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を抑制した。しかし、その他の Ti 合金は、CP-Ti に比べて、骨芽細胞の増殖および分化を促進した。

Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、Nb 含量にかかわらず、いずれも細胞毒性が無く、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、Nb もいずれも細胞毒性が無く、骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。一方、Al は非常に弱い細胞毒性が認められ、骨芽細胞の増殖を抑制し、分化を顕著に阻害した。

ラット大腿骨埋植試験において、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、いずれも細胞毒性が無く、従来から使用されている Ti-6Al-4V と比べて骨組織適合性にも優れていた。さらに、大腿骨埋植試験において、炎症反応を起こさず、

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tent用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

Stent用Ti-Ni合金の溶接材の1.0%乳酸溶液中での耐食性は、非溶接材のそれと同程度であった。このことからレーザー微細溶接による耐食性得の影響は大きくないと結論付けた。

しかしながら、Ti-Ni合金の各種試験溶液中での溶出挙動は、溶液浸漬時間の経過にほぼ比例して溶出量が増加した。これに対し、ステンレス鋼では放物線則に従うような溶出挙動を示した。このことから同合金は生体適合性には優れているものの、生体内で溶出が続き、長期間に及べば生体への為害性の懸念が生じることが示唆された。

以上の結果を踏まえて、生物学的安全性、力学的安全性に優れた新しいStent用合金の候補としてAu-Pd系合金を開発した。この合金の耐食性がきわめて優れていることを見出し、また血液適合性の観点からも、既存のStent用合金と同等以上であることを見出した。この合金は適切な時効熱処理を行うことによって力学的性質を改善することができ、既存のStent用合金に匹敵するものになる可能性が示唆された。

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

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。

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。

チタンのパッチテストは純チタンプレート、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、健常者100名の血液由来DNAと人工心臓弁使用者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。患者の検体数が10（機能不全が認められる患者2名および認められない患者8名）であったため、これまでに得られた結果のみではアレル頻度を算出したり、健常人や機能不全の有無といった観点から比較するために統計学的解析を行う事は不可能であり、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。

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が、人工硬膜については残留濃度等を考慮すれば、現時点における人工硬膜の使用で大きな危険を伴うことはないと考える。また、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

三次元有限要素モデルを用いた数値シミュレーションによる脊椎固定器具の力学的安定性評価法を提案した。有限要素モデルを用いることで、実験では評価できない詳細な応力状態が評価可能となるため、力学的安定性を改善するための有効な設計指針が得られる。次に、疲労寿命推定シミュレーションを行い、部材ごとの疲労寿命評価を行った。時間的・コスト的にも大きな負担となる疲労強度評価を、短時間に、簡便に評価できる可能性を示した。さらに、数値シミュレーションを用いれば、様々な荷重条件が設定できるため、実験では困難な検討が可能となるので、さらに優れた性能を持つ器具へ改良するための有効な手段となる。

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、組織学的および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—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 β -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. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Masamune
Sakai, Tadahiko Mashino, Toshie Tsuchiya,
Biodegradable polymers in chondrogenesis of

- human articular chondrocytes, *J Artif Organs*, 2005, 8(3), 184-191.
26. Atsuko Matsuoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests, *J Biomed Mater Res*, 2005, 75(2), 439-444.
 27. Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide(PIPAAm), *Tissue Engineering*, 2005, 11(9-10), 1392-1397.
 28. 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, *Archives of Bioceramics Research.*, 2005, 5, 158-161.
 29. Ryusuke Nakaoka Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45, *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74(2), 181-6.
 30. Ken Nakazawa, Yoko, Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Yasuo Ohno, Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 518, 107-110.
 31. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets, *Key Engineering Materials*, 2005 288-289, 409-412
 32. 土屋利江, 再生医療・繊維工学・人工臓器に使用される医療用材料の安全性・有効性に関する基本的考え方, *繊維学会誌 (繊維と工業)*, 2005, 61, 148-149
 33. M. Nagahata, R. Nakaoka, A. Teramoto, K. Abe, T. Tsuchiya. The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 26, 5138-5144 (2005).
 34. R. Nakaoka, S. Ahmed, T. Tsuchiya. Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of Connexin 43 and 45. *J. Biomed. Mater. Res.*, 74A, 181-186 (2005).
 35. Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya. Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form. *Key Engineering Mater.*, 309-311, 1293-1296 (2006).
 36. Ryusuke Nakaoka, Susan Hsiong and David Mooney. Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts. *Tissue Engineering*, 2006, 12(9), 2425-2433.
 37. 長幡 操、寺本 彰、阿部康次、中岡竜介、土屋利江、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞のALPase活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果、*繊維学会誌*, 61, 98-102 (2005).
 38. 土屋利江編:再生医療における幹細胞とバイオマテリアル、松岡厚子 3章 ヒト間葉系幹細胞の一節を分担執筆、培風館 (平成19年4月発刊予定)
 39. Shintani, H: *Biocontrol Science*, 11(3), 91-106 (2006)
 40. 新谷英晴: *防菌防黴*, 34(10)、645-652 (2006)
 41. 新谷英晴: *防菌防黴*, 34(11)、731-740 (2006)
 42. 新谷英晴: *防菌防黴*, 35、印刷中 (2006)
 43. N. Bauu, T. Tsuchiya, and R. Sawada "Effects of a biodegradable polymer synth

- esized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes, *J. Biomed. Mater. Res.* 77A, 84-89 (2006).
44. Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe T, Tanigami A. Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints. *Cell Transplant* 13 (4) : 331-336,2004
 45. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplant* 13(5): 595-600,2004
 46. Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K. Fibroblast growth factor-2 promotes repair of partial thickness defects of immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cart*12(8):636-641,2004
 47. Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43 (8):390-395,2004
 48. Nawata M, Wakitani S, Nakaya H, Tanigami A, Seki T, Nakamura Y, Saito N, Sano K, Hidaka E, Takaoka K. Use of bone morphogenetic protein-2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 52:155-163,2005
 49. Nakamura Y, Tensho K, Nakaya H, Nawata M, Okabe T, Wakitani S. Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhanced bone morphogenetic protein (BMP-2) induced ectopic bone formation in mice. *Bone* 36(3):399-407,2005
 50. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol* 167:97-105,2005
 51. Nakaya H, Shimizu T, Isobe K, Tensho K, Okabe T, Yoshikawa H, Takaoka K, Wakitani S. Microbubble-enhanced ultrasound exposure promotes uptake of methotrexate into synovial cells and enhanced anti-inflammatory effects in rabbit antigen-induced arthritic knees. *Arthritis Rheum* 52(8):2559-2566,2005
 52. Ohta H, Wakitani S, Tensho K, Horiuchi H, Wakabayashi S, Saito N, Nakamura Y, Nozaki K, Imai Y, Takaoka K. The Effects of heat denaturation on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Bone Mineral Metabolism* 23:420-425,2005
 53. Nakamura Y, Wakitani S, Saito N, Takaoka K. Expression profiles of BMP-related molecules induced by BMP-2 or -4 in muscle-derived primary culture cells. *J Bone Mineral Metabolism* 23:426-434,2005
 54. 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
 55. 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

56. 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
 57. 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
 58. Yoshiaki Ikarashi, Kazuhiro Toyoda, Eiko 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- β gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) — Relation between TGF- β and hMSCs multidifferentiation—」 The 19th 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. *Bioceramics*18, 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. *Bioceramics*18, 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. *Bioceramics* 18, 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. 27th 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. 27th 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. 5th 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 7th 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一学官産の連携を」 第 2 回未来医療交流会 (2005.4) 大阪
 26. 齧島由二, 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シン規格値の設定. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006 年 11 月・東京).
 27. 齧島由二, 長谷川千恵, 岡野理紗, 村松知明, 村井敏美, 中川ゆかり, 土屋利江. ヒト細胞を使用した in vitro 発熱性物質試験法の有用性評価. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006 年 11 月・東京).
 28. 齧島由二. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」成果発表会 (2006 年 3 月・東京).
 29. 齧島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 佐々木和夫, 矢上 健, 土屋利江. 菌体成分含有コラーゲンの生体親和性と組織再生に対する影響. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005 年 11 月・京都).
 30. 齧島由二. エンドトキシン汚染: 測定のポイントについて. 第 2 回医療機器フォーラム (2004 年 10 月・東京).
 31. 齧島由二, 長谷川千恵, 小園 知, 伊佐間和郎, 佐々木和夫, 矢上 健, 土屋利江. エンドトキシン不活化処理を施した天然医用材料の生体親和性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004 年 11 月・筑波).
 32. 伊佐間和郎, 齧島由二, 長谷川千恵, 小園

- 知, 佐々木和夫, 土屋利江. ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2003年12月・大阪).
33. 新谷英晴: 第33回日本防菌防黴学会年次大会 (2006)
34. 五十嵐良明, 劉麗, 鹿庭正昭, 土屋利江. Local lymph node assay におけるアイソトープを用いない各種エンドポイントの比較. 第33回日本トキシコロジー学会学術年会(2006)
35. 大森崇, 出原賢治, 小島肇, 寒水孝司, 有馬和範, 後藤浩彦, 花田智彦, 五十嵐良明, 猪田健人, 金澤由基子, 小阪忠司, 牧栄二, 森本隆史, 篠田直樹, 武吉正博, 田中正志, 浦谷衛, 宇佐美雅仁, 山中淳, 米田知史, 吉村功, 湯浅敦子. 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)バリデーション研究. 日本動物実験代替法学会第20回大会(2006)
36. Idehara K., Omori T., Kojima H., Sozu T., Arima K., Goto H., Hanada T., Ikarashi Y., Inoda T., Kanazawa Y., Kosaka T., Maki E., Morimoto T., Shinoda S., Shinoda N., Takeyoshi M., Tanaka M., Uratani M., Usami M., Yamanaka A., Yoneda T., Yoshimura I., Yuasa A. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2007)
37. 佐藤道夫, 土屋利江: 医療機器の不具合報告について(2), 第43回全国衛生化学技術協議会年会(H18.11.2).
38. 伊佐間和郎, 小林郁夫: 有効性・安全性に優れた新規チタン合金の開発と評価手法の開発, 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業研究成果発表会 (2006年3月10日, 東京)
39. Kobayashi E, Takatsugu M, Uenishi K, Kobayashi KF. Effect of laser micro welding on corrosion behaviour of biomedical alloy wires in a pseudo-physiological environment. 7th World Biomaterials Congress. Sydney, Australia, May 2004.
40. Yoneyama T, Fukushima O, Doi H, Kobayashi E, Hamanaka H. Ion release from Ti-Ni alloy with electrolytic treatments. 7th World Biomaterials Congress. Sydney, Australia, May 2004.
41. 福島修, 米山隆之, 土居壽, 小林郁夫, 埴隆夫. 電解処理液の組成を変えて電解処理を施したTi-Ni合金の耐食性について. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004, つくば, 2004年11月.
42. 小林郁夫. 生体材料としての形状記憶合金. 三重県産業支援センター平成16年度地域研究地域研究開発拠点支援事業「機能材料開発・応用に関する専門部会」第3回研究会・講演会, 津, 2005年3月.
43. 小林郁夫, 土居壽, 米山隆之, 埴隆夫. Ti-Zr-Nb合金の擬似生体環境中での耐食性. 日本金属学会2005年春期(第136回)大会, 横浜, 2005年3月.
44. 土居壽, スリマナーポン ヴィリポン, 米山隆之, 小林郁夫, 埴隆夫. レーザー溶接したTi-6Al-7Nb合金鑄造体の引張試験による溶接特性. 第46回日本歯科理工学会学術講演会, 長崎, 2005年9月.
45. 伊佐間和郎, 小林郁夫, 土屋利江. Ti-Zr基合金の正常ヒト骨芽細胞を用いた骨組織適合性評価. 第27回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2005年11月.
46. Kobayashi E. Alloy design of new biomedical alloys. Tel Aviv University JSPS AA Science Platform Program Seminar: Medical Engineering for Human Amenity to Perform Multi-Facet Type Diagnosis and Treatment and Design of New Biomedical Alloys, Tel Aviv, Israel, March 2006.
47. Kobayashi E. Acceleration and

- inhibition of bone formation on implant materials by surface modification. The 2nd Korea-Japan Joint Workshop on Biomedical Materials, Incheon, Korea, October 2006.
48. Kobayashi E, Ogo M, Doi H, Yonayama T, Noda K, Hanawa T. Calcium phosphate precipitation by galvanic current between titanium and gold pseudo-body fluid. International Conference on Processing and Manufacturing of Advanced Materials (THERMEC '2006), Vancouver, Canada, July 2006.
49. 小林郁夫, 安藤美由季, 田中勇太, 土居壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴隆夫. 仮骨形成を防止するTi合金製内固定材の表面処理. 日本金属学会 2006年春期(第138回)大会, 東京, 2006年3月.
50. 土居壽, 米山隆, 田中勇太, 坂本晴美, 福島修, 小林郁夫, 埴隆夫. Ti-40Zr合金のアノード分極試験による耐食性の評価. 第47回日本歯科理工学会学術講演会, 東京, 2006年4月.
51. 小林郁夫, 清水めぐみ, 土居壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴隆夫. ステンツ用 Au-Pd 系合金の力学的性質. 日本金属学会 2006年秋期(第139回)講演大会, 新潟, 2006年9月.
52. 小林郁夫, 伊藤知佳, 土居壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴隆夫. ステンツ用 Au-Pd 系合金の耐生体環境性と血液適合性. 日本金属学会 2006年秋期(第139回)講演大会, 新潟, 2006年9月.
53. 小林郁夫, 清水めぐみ, 伊藤知佳, 堤祐介, 土居壽, 米山隆之, 小林雅博, 埴隆夫. ステンツ用 Au-Pd 系合金の力学的性質と血液適合性. 第28回日本バイオマテリアル学会大会, 2006年11月27日~11月28日, アルカディア市ヶ谷.
54. 小林郁夫. Au を主成分とする新しいステンツ用合金の特性評価. 5th IBB BioFuture Research Encouragement Prize 研究発表会, 2007年1月30日, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所.
55. T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, T. Tsuchiya 「TGF- β gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) — Relation between TGF- β and hMSCs multidifferentiation—」 The 19th annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2006. 9)
56. 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)
57. 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)
58. 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)
59. Wakitani S. Autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for cartilage repair. International Cartilage Symposium Hiroshima, 2004.2.12, Hiroshima
60. 縄田昌司, 脇谷滋之, 中谷宏幸, 中村幸男, 天正恵治, 岡部高弘, 加藤博之, 高岡邦夫. BMP と diffusion chamber による異所性軟骨誘導と骨軟骨欠損修復への応用. 第17回日本軟骨代謝学会, 2004年3月 新宿
61. 中嶋正明, 脇谷滋之, 原田恭治, 園部正人, 谷上信, 富田直秀. 肺性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関節軟骨の再生に及ぼす影響 (part1). 第3回日本再生医療学会, 2004年3月 幕張
62. 原田恭治, 富田直秀, 中嶋正明, 脇谷滋之. 肺性幹細胞 (ES 細胞) 移植後の関節運動が関

- 節軟骨の再生に及ぼす影響 (part2: 正常修復との対比). 第3回日本再生医療学会、2004年3月 幕張
63. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞による関節軟骨の再生. 第32回日本リウマチ関節外科学会、2004年10月 奈良脇谷滋之. ES細胞からの軟骨分化. 第19回日本整形外科学会基礎学術集会、2004年10月 高輪
64. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植移植による関節軟骨欠損の修復の成績を臨床評価の問題点. 第30回日本膝関節学会、平成17年2月 東京
65. 天正恵治、中村幸男、岡部高弘、中谷宏幸、脇谷滋之. 軟骨修復におけるBMP-2とFGF-2の相互作用の検討. 第4回日本再生医療学会、平成17年3月 大阪
66. 山本浩司、中嶋正明、原田恭治、脇谷滋之、門林義幸、富田直秀. 胚性幹高木睦、近藤真一、服部裕美、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之. 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化培養における細胞形態によるアグリカン発現率の診断. 第4回日本再生医療学会、平成17年3月 大阪
67. 天正恵治、中村幸男、岡部高弘、中谷宏幸、脇谷滋之. 異所性骨形成におけるBone Morphogenetic Protein -2とFibroblast Growth Factor-2の相互作用の検討. 第18回日本軟骨代謝学会、平成17年3月 吹田
68. 脇谷滋之、中村幸男、天正恵治、岡部高弘、中谷宏幸. 成長因子投与による関節軟骨欠損修復. 第78回日本整形外科学会、平成17年5月 横浜
69. 脇谷滋之. 関節軟骨の再生 (ワークショップ 再生医療は今 ~世界の現状~). 第26回日本炎症再生学会、平成17年7月 新宿
70. 中谷宏幸、清水富長、岡部高弘、高岡邦夫、吉川秀樹、脇谷滋之. Sonoporation (超音波遺伝子導入法) を用いた家兎関節炎モデル炎症滑膜へのMTX導入による抗炎症効果. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
71. 中谷宏幸、寺本彰、岡部高弘、吉川秀樹、阿部康次、脇谷滋之. 多材高分子複合スポンジを用いた Scaffold による軟骨欠損修復. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
72. 五十嵐昇、富田直秀、遠藤ミゲル雅崇、脇谷滋之、山本浩司、寺村聡、勝呂徹. 骨髄間葉系幹細胞採取針の開発 (Part1). 第20回日本整形外科学会基礎学術集会、平成17年10月 伊勢
73. 脇谷滋之、村上成道、山崎宏、加藤博之、大串始、高倉義典. 骨髄間葉系細胞による関節の再建 (パネルディスカッション 関節の再生). 第32回日本股関節学会、平成17年11月 新潟
74. 五十嵐昇、富田直秀、脇谷滋之、山本浩司、玉田靖、勝呂徹. 生体環境設計による軟骨再生 (シンポジウム 軟骨再生の実現可能性). 第27回日本バイオマテリアル学会大会、平成17年11月 京都
75. 脇谷滋之、増田茂樹、富田直秀、土屋利江. 関節軟骨欠損修復評価法の問題点 (シンポジウム 軟骨再生の実現可能性) 第27回日本バイオマテリアル学会大会、平成17年11月 京都
76. Wakitani S. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation. Cartilage Symposium. 29th Annual Scientific Meeting of Singapore Orthopaedic Association, Nov 10-11, 2006, Singapore
77. Wakitani S. Articular cartilage repair with bone marrow mesenchymal cell transplantation. 大阪スポーツ医学シンポジウム, Nov 21, 2006, Osaka
78. 山本貴士、鄭徳泳、中井隆介、Ron Sekel、丘進卿、堤定美. 人工股関節まわりの骨リモデリングのシミュレーション. 日本機会学会第18回バイオエンジニアリング講演会、平成18年1月13-14日、新潟

79. 村上成道、山崎宏、中村恒一、井坪俊郎、加藤博之、脇谷滋之、町田浩子、大串始. 離断性骨軟骨炎に対する自己骨髄間葉系細胞移植による軟骨欠損修復. 第18回日本肘関節学会、平成18年1月27日、名古屋
80. 加藤博之、脇谷滋之、村上成道、山崎宏、中村恒一、町田浩子、大串始. 上腕骨離断性骨軟骨炎に対する骨髄間葉系細胞移植の試み. 第44回信州上肢の外科研会. 平成18年2月15日、松本
81. 高木睦、近藤真一、小泉覚、梅津洋介、藤原政司、脇谷滋之. 顕微鏡画像による間葉系幹細胞からの軟骨細胞への分化度診断の試み. 第5回日本再生医療学会、平成18年3月8-9日、岡山
82. 鍵田恵梨奈、藤原政司、脇谷滋之、高木睦. 軟骨細胞三次元培養におけるプロテオグリカン関連糖の添加効果. 日本農芸化学会2006年度大会、平成18年3月25-28日、京都女子大学
83. 脇谷滋之. 軟骨再生の現状と将来(シンポジウムS4レギュラトリーサイエンス部会 細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性の評価). 第126年会日本薬学会、平成18年3月28日-30日、仙台
84. 脇谷滋之. 軟骨再生医療の現状と将来(シンポジウム3運動器移植・再生医療の現状と展望、全国アンケート調査を含めて). 第79回日本整形外科学会、平成18年5月18日-21日、横浜
85. 脇谷滋之. 関節軟骨再生の現状と問題点(ミニシンポジウム). 第24回日本骨代謝学会、平成18年7月5日-7日、東京
86. 韓東旭、Bae Young Yoon、松村和明、脇谷滋之、縄田昌司、玄丞侏. Cold preservation of human osteochondral tissues in EGCC-added storage solution. 第9回日本組織工学会、平成18年9月7日-8日、京都
87. 脇谷滋之. 軟骨(パネルディスカッション). 第25回日本運動器移植・再生医学研究会. 平成18年9月23日. 東京国際フォーラム
88. 脇谷滋之. 骨髄間葉系細胞移植における関節軟骨再生(特別シンポジウム2関節軟骨の再生) 第回日本リウマチ関節外科学会、平成18年11月11日、朱鷺メッセ
3. その他
1. 新谷英晴: 滅菌工程の保証、生物学ハンドブック、コロナ社、土戸哲明等(編)、東京、pp.261-266、(2005) .
2. 新谷英晴: 医療用品の滅菌方法、滅菌バリデーションならびに滅菌保証、日本薬局方収載試験法設定と現場での適用、技術情報協会、東京、pp.167-244、(2004) .
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 出願国: 米国
公開番号: US-2006-0115458-A1
公開日: 2006年6月1日
発明の名称: Material for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing material for repairing biological tissues (生体組織補填材および生体組織補填体ならびに生体組織補填材の製造方法)