

PS 粒子の取り込み量は $4.45 \cdot \mu\text{m}$ 粒子に比べて明らかに少ないことが観察された。

CHL 細胞はこれまで主に化学物質の安全性スクリーニングに使用され、ほとんどの場合溶解する物質が対象であったため、食食という概念はなかったが、本研究において特定のサイズの PS 粒子を積極的に食食することが判明した。ナノマテリアルは不溶性のものが多いが、CHL 細胞は食食機能を有していることからナノマテリアルの評価にも十分使えることが判明したと考えている。

3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

従来から骨系医療機器に使用されている Ti-6Al-4V は、構成元素のひとつである V に強い細胞毒性があり、安全性が疑問視されている。また、我々は、Ti-6Al-4V は V による骨芽細胞の増殖阻害に加え、Al による分化阻害を起こす可能性を明らかにした。近年、構成元素に V を含まないチタン合金や、V と Al を両方とも含まないチタン合金が数多く開発されている。

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、力学的強度が増す。また、8 mol% 以上の Nb を添加すると、 β 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がある。また、Ti-Zr-Nb 合金の構成元素である Zr 及び Nb には、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、耐腐食性が向上する。さらに、我々は、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は細胞毒性が無く、骨芽細胞適合性も高いことを明らかにした。また、骨に埋植しても炎症反応を起こさず、骨組織適合性にも問題が無いことを確認した。

一般に金属は、セラミックスのように骨組織と直接結合しない。そこで、骨の無機成分に類似したアパタイトコーティングや表面改質などにより、金属に骨と直接結合するような性質を付与する研究が活発に行われている。骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる。動物実験によって、擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現できることが確認されている。

擬似体液を用いるアパタイト形成能の評価法は、ISO 23317:2007: Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials として国際標準化されている。ISO 23317:2007 で用いる擬似体液は市販されておらず、調製が複雑な上、長期間保存することもできない。

一方、市販のカルシウムイオン及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液は、有機成分であるグルコースを含む点で ISO 23317:2007 で用いる擬似体液と大きく異なる。しかし、市販の調製済みのハックス平衡塩溶液は、アパタイト形成能の評価に用いる擬似体液として有用であり、簡便で再現性のある試験が期待できる。

ISO 23317:2007 では、材料表面に形成したアパタイトを、SEM 及び薄膜 X 線回折法を用いて経時的に測定する。SEM では定量的な解析ができず、薄膜 X 線回折法による定量的な解析は平滑な材料表面に限られる。したがって、ISO 23317:2007 では、アパタイトが形成されるまでに要した時間でアパタイト形成能を評価している。

FT-IR/PAS 法は、試料の前処理を必要としない非破壊的表面分析法のひとつで、試料セルに挿入可能な大きさであれば試料の形状にも制限がない。また、干渉計の可動鏡速度や変調周波数を変化させることで、デプスプロファイル解析も可能である。そのため、様々な形状の材料について、体液や擬似体液に浸漬したり、材料の上で骨芽細胞を培養したりした後、材料表面に形成したアパタイトを分析することができる。さらに、表面に形成したアパタイト量を正確に見積もった材料を、他の評価系の試料として生体内に埋植したりすることも可能である。表面処理したチタン合金を用いた検討において、SEM 観察だけでは材料表面に形成されたアパタイト量を推定することは困難であったが、FT-IR/PAS 法ではアパタイト量の定量的解析が可能であった。

チタン合金に骨結合性を付与する表面処置法として、アルカリ加熱処理技術が開発され、人工股関節に応用されている。最近では、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討されている。チタン合金は、水酸化ナトリウム処理により、チタン酸水素ナトリウムの層が材料表面に形成される。その後、塩化カルシウム溶液に浸漬すると、ナトリウムがカルシウムと置換し、チタン酸水素カルシウムに変化して、アパタイト形成能が高くなる。我々は、アルカリ性条件下でカルシウムへの置換が可能な水酸化カルシウム溶液によるカルシウム導入法について検討した。その結果、材料表面へのカルシウム導入量は、NaOH + CaCl₂ 処理より、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の方が多かった。さらに、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti のアパタイト形成能は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に高くなった。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + CaCl₂ 処理ではアパタイトを形成しなかったが、NaOH + Ca(OH)₂ 処理ではアパタイトを形成した。Zr 及び Nb 並びにこれら含有するチタン合金のアパタイト形成能は低いことが知られているが、NaOH + Ca(OH)₂ 処理は

Ti-Zr-8Nb 及び Zr にアパタイト形成能を付与することが可能であった。NaOH + Ca(OH)₂ 処理によるチタン合金への高いアパタイト形成能付与効果は、材料表面への高いカルシウム導入量に起因していると考えられる。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

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ナ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事が原因の一つかもしれない。また、パルナ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人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、血栓形成やパルナ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 29SNPs を選択しタイピングを行うこととした。これまでに対照となる日本人の健常人 (100 名) と人工心臓弁使用者 (10 名) の上記 29SNPs のタイピング結果が得られており、今後も久留米大学または大阪大学より供与される血液サンプルを用いて解析を続けていく。

今年度は、さらにワーファリン使用量の決定に関連する遺伝子多型として報告されているものを調査し、本研究における新たなターゲット SNP の選定の参考とすることにした。ワーファリン等を用いた抗凝固療法は機械弁を使用している限り生涯に渡り必要な治療であるが、これらの遺伝子多型が人工弁の機能不全の直接的な原因につながるかどうかは定かではない。しかし検討する SNP を決定するための 1 つの指標となり得るのではないかと考え、また薬の感受性に人種差があることも明らかであることから、欧米及び日本における最近の報告について調べた。その結果、ワーファリン使用量の決定に関わる遺伝子

多型は欧米人と日本人では必ずしも一致しない事がわかった。また、ワーファリンのみならず様々な薬物代謝に大きな役割を果たしている CYP2C9 の多型の一つ CYP2C9*3 は欧米人でも日本人でもワーファリン使用量との関連が示唆されているものの、日本人においてはワーファリン使用量と VKORC1 の多型 (-1639G>A, 1173C>T, 1542G>C) の方が CYP2C9 の多型よりもその貢献度が高いと報告されている。このため今後は、VKORC1 の日本人における多型について SNP タイピングを行うためにターゲットとなる SNP を選定していく。さらに、人工弁置換術を施されている日本人患者のワーファリン使用量決定に関わる多型 (1173C>T) も示されており注目すべきであろう。一方、パルナス形成に関わる多型については未だ不明のため網羅的解析も視野に入れていくべきであろう。人工心臓弁の不具合の有無や原因 (血栓形成によるものかパルナス形成によるものか等) によってアレルの頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成やパルナ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。また、機械弁と生体弁の選択や抗血液凝固療法の程度の決定にも利用できる事が期待される。

5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発

現在までに分析ができたものは 5 例と少なかったが、ここにその不具合要因を推定し、分類することが可能であった。

第一分類として、セメントレス仕様の人工股関節大腿骨コンポーネントにおける表面性状による影響が考えられた。この分類には OUH001 と OUH003 が該当する。これらのインプラントでは、セメントレス仕様にもかかわらず、ステム部でポーラス構造を持っていないため、新生骨とインプラントの結合性が低く、不具合に至った可能性が考えられた。一方で、若年の患者 (49 歳、53 歳) にもかかわらず 15 年以上の成績を得られているという点では、当時の技術水準から言えば及第点といえるのかもしれない。

第二分類として、セメント仕様の人工股関節大腿骨コンポーネントにおけるインプラント・セメント界面の不良が考えられた。この分類には OUH002 と OUH005 が該当する。これらの症例では術後早期に X 線写真によりセメント界面、あるいはセメントに問題が見られ、短期間 (5.3 年、2 年) で再手術となった。患者が比較的高齢 (69 歳、70 歳) であり、比較的活動性が低いと推定されるにもかかわらず、短期間で不具合を生じており、セメント手術手技のばらつきによる要因が推定された。

この 2 例の大腿骨コンポーネントには、カラーがあり、ステム部表面が粗面加工されていることから、ステムとセメントの固着性により安定性を保つタイ

プであると思われる。また、粗面加工されたステムではセメントのポイドなどの不良に対する許容度が低いとされている。これらの症例では、術後早期より Radiolucent line やセメントの破損が臨床上見られており、これが原因となってステムとセメントの界面が破綻し、不具合に至ったものと考えられた。このような不具合を防止するためには、例えば、セメントガンの使用などを含めた手術手技の改良が考えられる。また、ステムの表面加工は鏡面仕上げは、ステムセメント間での動きが生じてセメント摩耗や破壊が少なく、セメント手術手技のばらつきを許容すると考えられており、検討の余地はあると思われる。

従来報告されている典型的な不具合として、摺動面における UHMWPE コンポーネントの摩耗とその摩耗粉に対する生体反応による骨溶解がある。今回調査した 5 例では、このような要因により不具合を生じた症例は報告されなかった。ただし、摩耗量の推定のためには、詳細な形状計測が必要であり、現在のところ実施していない。OUH003 では、明らかに摩耗が進行しており、その他の症例も含めて、不具合の一因になった可能性は否定できない。

摩耗量の増大を引き起こす、UHMWPE の酸化が、いずれの試料でも見られなかった。その一因として、長年の UHMWPE の酸化につながる、空気中におけるガンマ線照射滅菌が、1990 年ごろまでに使われなくなったことが考えられる。今回の症例では、3 例がガス滅菌と推定され、残りの 2 例も手術時期から、不活性ガス中または真空中におけるガンマ線滅菌であるものと考えられた。同様に、UHMWPE と相対する骨頭などの表面の傷が摩耗量の増大につながる事が報告されているが、摺動面に傷が見られる症例もなかった。術中に生じる骨片やセメントの一部が摺動面に入ることによって傷がつくと考えられるが、術中の管理を適切に行えばこのような問題は生じないものと考えられた。

不活性ガス中または真空中におけるガンマ線滅菌については、その良否について議論があるところである。ガンマ線照射による架橋効果により摩耗が減少するため有効であるとする考え方と、酸素非存在下でもフリーラジカルは発生し、材料内部に溶存する酸素や生体内の酸素と反応して、ゆっくりではあるが酸化が進行する危険性があるという考え方がある。本研究では OUH002 と OUH005 がガンマ線滅菌であったが、ともに埋植期間が短かったことと、摩耗量の推定ができていないことから、摩耗抑制効果については知見が得られなかった。一方、酸化の進行については、問題なるような酸化は見られなかったものの、やはり埋植期間が短かったため、更なる検討が必要であると思われる。

6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

今回、集計に用いた FDA の不具合データは、集計を目的としたものではないと明記されており、本研究はあくまでも報告者の責任において傾向を知るために解析を行ったものである。

実際の不具合解析では、個別の事例を精査することが本来の用途であり、数値解析はあくまでも 1 面的なものに過ぎないことを銘記すべきだが、傾向を知るには非常に有効な手段でもあることも事実である。

また、不具合報告が多い機器分類が、そのまま不具合の確率が高いということにはならない。実際の使用数が非常に多い可能性も十分にあり、仮に一定の確率で不具合が起こるとすれば、必然的に報告数も多くなるからである。尤も、使用数の調査は中々難しく、また、implant 機器の場合は、埋め込み時(使用時)と不具合の時期(報告年度)が異なる可能性があり、さらに比較が困難になってしまう。従って、今回の集計結果もあくまでも注意喚起のためであり、リスク評価の一環であることに留意する必要がある。

7. 吸収性材料(人工硬膜)による長期生体影響のリスクアセスメント手法開発

吸収性人工硬膜は頭蓋内で吸収されることから、触媒として使用される DBT、OT の脳への曝露を起こす。臨床適用の前段階の毒性学的評価については課題が残っていた。今回は、過去に確立した頭蓋骨くり抜き直径を 8mm と確定した上で、手術後の観察期間を 2 ヶ月とし、また術後の消毒と抗生物質投与を行い、より実際の臨床適用に近い形とすることを目的とした。

手術に成功したラットの体重は順調に増加し、明らかな臨床的な所見は見られなかった。昨年の一ヶ月の観察による膜の吸収量の平均値は、モデル品 PLGC 膜 3.5 mg、高濃度 OT 含有膜 8.5 mg、高濃度 DBT 含有膜が 4.1 mg であったのと比べ、今回の 2 ヶ月の吸収量はモデル品 PLGC 膜 6.3 mg、高濃度 OT 含有 PLGC 膜は 9.8 mg、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜は 5.9 mg となり、一月の延長でより吸収は起こっていると判断できる。また、特に高濃度の OT を含む膜は頭蓋骨内埋め込み後、構造が弱くなり崩れてしまうというのは昨年度研究と同様であった。

脳表面の観察から、昨年同様、全ての群に切り出し部分と一致した痕が見られ、一部には痕部の黄変、壊死変化が見られた。以上から手術の手技の問題は抗生物質の投与では解決できなかった。しかし、脳表面の損傷がひどい例の割合は control 群 1/11、モデル品 PLGC 膜群 3/11、高濃度 OT 含有 PLGC 膜群は 3/11、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜群で 2/10 であり、昨年と同じ切り出し直径で抗生物質投与を行わなかった場合の

control群0/10、モデル品PLGC膜群 2/10、高濃度OT含有膜群 3/10、高濃度DBT含有膜群 4/10に比べて統計学的に有意とは言えないものの、やや改善とも言える結果であり抗生物質投与の効果はあると考える。以上から2ヵ月のモデル実験として、今回の研究モデルは、脳表面の損傷の改善がなお必要とされるものの価値があると考えられる。

オープンフィールド試験は、新規環境下での移所運動活性(探索行動)、情動性を評価する。オープンフィールド試験では群間で有意差がなかった。これは過去3年と同様の結果であり、各群のn数が10に達しない問題点はあるが、少なくともそれぞれの膜の毒性を示す結果ではなかった。

PPI testでは認知、学習機能の影響を測定するが、影響は見られなかった。

以上より、問題点は残されているが、現時点でのこのプロトコールは、人工硬膜のリスクアセスメント手法として使用可能で、かつPLGC膜の安全性に対して今回の使用した膜については探索、情動、認知、学習機能に影響は大きくないことが示唆された。

今回の研究も問題点として3点挙げられる。ひとつは麻酔薬でネンプタールが製造中止で使用できなくなったため、手術の困難が増し、麻酔死が起こりやすくなったことである。麻酔薬の選択は課題が残った。二つめは、2ヵ月観察期間をおいたことで、ラットの体重増が週令を重ねると共に顕著で、結果として、オープンフィールド試験の移動距離や、探索行動、情動の指標となる行為の回数が大きく減じたことがある。6週令あたりで手術を実施することが必要なのかもしれない。三つめは、ここ3年は陽性の結果が出ていないので、高濃度DBTの陽性対照を目指した設定は不十分であるということである。今後DBT濃度の設定には陽性対照を設定するのであれば検討の余地がある。

過去の一連の研究において、in vivoのモデル実験が吸収性の人工硬膜について可能となった。今まで大きな毒性を示す結果は得られておらず、in vivoのこのモデル実験は、吸収性材料の評価によって重要なステップとなっている。今後、以前の実験で有意性が示されている脳部位別の神経伝達物質の変化についても検討をする必要はあろう。

謝辞

手技にご指導頂いた大阪市立大学医学部、脇谷滋之先生、行動学試験をご指導頂いた北里大学医療衛生学部、佐治眞理先生の深謝申し上げます。

8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究

今回の解析から得られた結果は、簡易モデルを持ちいて得られた応力分布状態と酷似しており、本解

析モデルの妥当性を示す結果となった。しかし、本モデルにはハムストリング等の筋肉がなく、実際の膝関節を再現しているとは言えない。屈曲動作はハムストリングの能動的収縮により生じるものであり、このような現象をシミュレーションモデルに導入するためには、Hillの筋肉モデル等の導入が必要不可欠である。Hillの筋肉モデルについては、現在、基本的動作等について検討中であり、筋肉モデルの導入が可能となれば、より現実的な膝関節モデルの構築が可能となる。

過去に開発した人工膝関節解析のための簡易モデルは、計算時間も比較的短く計算効率に優れるモデルであり、さらに、比較的簡単に様々な動作条件を考慮することが可能であるため、人工膝関節の基本的な動作確認とリスクアセスメントには大変有効である。しかし、骨と軟組織の力学的相互作用から成る膝関節の動きを正確に再現していると言い難く、そのためにはできる限り正確に膝関節構造を再現したモデルによる解析が必要である。簡易モデルと詳細な膝関節モデルを組み合わせることで、より高度なリスクアセスメント手法の開発が可能となるであろう。

9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

超音波による流速測定結果と数値流体解析結果について比較を行った。その結果、血流分配が血圧によって変化し、最も計測値に近いものは圧力を分配したものであった。

さらに、瘤内へ流入する血流は流入位置にステントストラットがあることによって妨げられ、動脈瘤ネック付近での血流速度に相違が生じることを見いだした。瘤内への流入する血流位置も、ステントストラットによって変えられていることが分かった。これはネック付近での血流の速度と向きの変化が動脈瘤内の壁ずり応力値に影響を与え、ステントストラットデザインによって動脈瘤内の血行動態に変化をおよぼしたと考えられる。

10. コンピュータシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発

ステントの力学適合性のコンピュータシミュレーション技術によるリスクアセスメント手法開発

(1) 人工股関節の形状モデル作成

実際の股関節製品を3次元形状測定装置で測定することによって、形状を良く再現した形状モデルを作成することができた。製品のCADデータを製造者から入手できるならばこのような形で形状モデルを作成する作業は生じない。しかし、その場合には、提供者との契約によって使用に制限がある等の問題が生じることも考えられる。本研究のように、計測

によって正確な形状モデルが得られれば、そのような問題が生じないため、今後製品の分析に有効に活用できるものと考えている。

形状測定の際には、人工股関節表面に微細な粒子を塗布したが、これは測定結果にはほとんど影響を与えないと考えている。VIVID 9i の測定精度は 50 μm であるのに対して、塗布した粒子の粒子径が 20 μm 程度と小さいためである。

(2) 血管内ステントの形状モデル作成について

現在のところ、測定精度 4 μm 程度のマイクロフォーカス X 線 CT を用いても十分正確な形状モデルを得られていない。今後、マイクロフォーカス X 線 CT の測定条件修正や、別の測定装置を用いた形状測定、あるいは SEM 等での観察を基にしたスケッチで CAD データを作成するなどの手段で形状データを構築したいと考えている。

(3) 歯科用骨固定材の形状モデル作成および力学シミュレーション

3-1 形状モデル作成

骨股関節と同様、実際の骨固定材を形状測定することにより、有限要素解析に用いるには十分正確な形状モデルを作成できた。ただし、骨固定材のように空孔部が存在する場合には、穴内側のデータを得ることができないため、その部分において生成形状の精度検証ができなかった。しかし、今回の測定では、測定データを基に推測した穴の直径が各穴でかなり一致していることなどから、空孔部においても十分正確に形状を再現できたと考えている。

3-2 医師による塑性変形を想定した力学シミュレーション

図 21 と図 22 とを比較すると、比較的相当塑性ひずみ小さい段階から、残留応力の分布が広がっていることが分かる。この残留応力は、骨固定材の疲労強度や応力腐食に影響を及ぼすことが予想される。また、骨に固定するためのスクリューを通す空孔部周辺の相当塑性ひずみ・残留応力が大きくなっている。特にこのような箇所において強度低下が懸念される。

1 1. ガイドワイヤーの臨床利用状況を考慮したリスクアセスメント手法開発

本試験はブタから採取した静脈片を展開し、試験治具に固定することで実施した。展開した静脈片は全周性に固定されている固定端となっており、生体内での静脈形態である扁平性や血管そのものの自由度が本試験と異なっている。そのため、取得された穿孔荷重を絶対値として解釈することは注意を要する。しかし、比較試験としてのダイレータ挿入角度に対する穿孔の有無や、相対的な穿孔荷重の比較はモデル試験として十分意味があるといえる。

1 2. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発

今年度は昨年度検討した医用材料の一種であるポリマーのアレルギー性の評価を h-CLAT による結果と LLNA の結果との間で比較検討した。その結果、h-CLAT で陰性であった P2 は LLNA でも陰性であり相関がみられた。しかしながら、h-CLAT で陽性であった P1, P3, P5 のうち単独で LLNA 陽性の判定基準を上回ったのは P3 のみであった。そこで陰性レベルの反応しかおこさない 0.01%DNCB とこれらポリマーを混合して塗布した結果、P1, P3, P5 いずれも LLNA 陽性の判定基準を上回った。一方、P2 は 0.01%DNCB と混合しても陰性のままであった。これらのことから h-CLAT と LLNA の結果には相関がある傾向があることが分かった。しかしながら、P3 以外のポリマーでは、それぞれの単独塗布では反応が弱かったことから、今回使用した条件では皮膚透過性が低かったことも考えられる。今後、ポリマーのサイズと皮膚浸透性の関連性、および感作性との関係を詳細に検討する必要があると思われる。来年度の課題として取り組みたいと考えている。

1 3. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

通常、in vitro で材料表面上に接触するのみの刺激では炎症系細胞の活性化は弱く、細胞が測定可能な量の炎症関連物質を産生しない可能性がある。そこで、実際の実験系では、細胞を材料上で培養した後、さらに PMA や LPS などの刺激剤を添加して活性酸素や炎症関連サイトカインを測定する。よって、本実験を始める前に、添加する適切な刺激剤の量を決定する必要がある。昨年度は、種々の濃度の刺激剤を添加した THP-1 からの活性酸素産生量を測定してみたが、今回の条件では全くその産生は確認されなかった。まず、今年度は、同じ細胞を用いて別の適切な炎症関連メディエータの探索を行ったが、現時点では適切と考えられるものが見つかっていない。そこで、別の種類の細胞を用いるための文献調査を行った。現時点までの調査では、ヒト血球系細胞が感度の点で適切と思われるので、来年度は倫理審査にその使用の可否の検討を申請し、引き続き今年度までと同様の検討を行い、本研究の目的に適した実験系の構築を行う予定である。

自己組織化膜を利用した単一官能基表面の構築は、この 10 年強の間に飛躍的に発展してきている。にも関わらず、その技術を利用して表面特性とリスクの関係を解明するためのレギュラトリーサイエンス研究は行われていない。前述したように、医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用、すなわち生体と材料との界面における現象を捉え、その機構を明

らかにすることが非常に重要である。材料表面の特性を決定する要因の一つとして表面の化学構成、すなわち表面官能基が考えられる。様々な官能基に対する生体反応を詳細に検討してその基礎的データを蓄積していくことは、様々な材料、特に高分子材料などの有機材料などから構成される医療機器のリスク評価を行うにあたって欠かすことができないと考えられる。そこで、本研究では、汎用性の高い医用材料ではなく、自己組織化膜を用いて調製した種々の表面官能基をもつモデル表面を使用して、官能基によって生じる細胞挙動変化の検討を行っている。昨年度は、まず、6種類の官能基からなる表面の調製を行い、その上で培養した市販のヒト正常骨芽細胞の増殖及び分化変化を検討した。今年度は、その挙動変化が官能基を介した相互作用の結果として生じるものかどうかを確認する目的で、表面特性の指標として用いられる水に対する接触角が骨芽細胞挙動に与える影響を評価した。

今回、メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬を混合した溶液を用いて、2種類の官能基を種々の比率でもつ表面の作製を行った。ここで問題となるのは、これら試薬の金表面への反応速度の違いである。各々の試薬間で異なるのは片末端の官能基のみであるので、その構造を考慮するとチオール基と金表面への反応はさほど差がないようにも考えられる。しかしながら、既にこれら試薬の反応性に関しては研究されており、片末端に極性基をもつものより非極性基をもつものが優先的に金表面に吸着すること、メチレン鎖が長いものの方が吸着しやすいことが報告されている。よって、単に2種類の試薬を混合して反応に用いたとしても、そのモデル表面上の官能基組成が試薬混合比と同一になることは考えられない。加えて、2種類の官能基同士、同一の官能基同士での相互作用は異なることが容易に予想されるため、各々の表面特性は予め確認しておく必要がある。事実、調製した4種類の混合官能基表面では、その混合比に応じた接触角の変化挙動が全くことなることが示されている。興味深いのは、アミノ基、あるいはリン酸基を用いた場合には、その接触角が比較的低い混合比の段階で平衡に達していることである。既報を考慮すれば、極性基試薬の反応性はメチル基試薬の反応性より劣っているはずなので、接触角変化が平衡に達したとしてもその際の混合比は極性基試薬量がかなり多いことが予想される。しかしながら、今回の検討では、極性基をもつ試薬の混合比が50%にも満たないところで接触角変化が平衡に達していた。このことは、複数の官能基が存在する場合には、極性基がより表面特性に影響を与えることを示唆している。また、官能基の表面における分布状態も表面特性に影響を与えうると考えられるが、接触角測定での平均値に対する分散が小さかったこと

から、表面上における特定官能基の大きな局在はないことが考えられる。すなわち、溶液中での特定試薬の分散状態が偏っていることや、反応時におけるメチレン基間の疎水性相互作用を阻害するような極性官能基とメチル基との間の相互作用がないことが予想される。もちろん、2種類の官能基が混合比に応じた分散状態で表面に存在しているかは不明であり、ミクロレベル、ナノレベルでの官能基局在が生じていることは考えられる。それら官能基の局在化で生じる相互作用の差も、観察された接触角変化に大きな影響を与えている可能性は十分考えられる。今後得られるデータを正確に解析するためには、ナノイメージング手法を用いて官能基の分散状態を明らかにする必要がある。

最も幅広い接触角変化が観察されたメチル基・水酸基表面を用いて、その上でNH0s1を培養してその増殖と分化変化を検討した結果、初期接着以外にその接触角に依存した挙動変化は認められず、むしろ水酸基の有無が細胞挙動に影響を与えることが示唆された。興味深いことに、骨芽細胞初期接着の接触角依存傾向は、骨分化誘導因子を培地中に添加した場合のみに認められた。つまり、骨芽細胞は分化状態に応じて材料への接着機構が異なる可能性が示唆されたことになる。これらの結果から、材料表面の自由エネルギーよりも表面に存在する官能基のほうに細胞分化により影響を与えることが考えられる。そこで、接触角の影響を排除する目的で、同程度の接触角をもつ4種類（メチル基と水酸基、カルボキシル基、リン酸基、あるいはアミノ基）の2官能基混合モデル表面上で骨芽細胞の分化挙動変化を予備的に検討したが、4週間培養中のALP活性変化に目立った差は認められず、4週間後のカルシウム沈着量にも有意な差は認められなかった。昨年度、単独官能基表面上においてはその官能基の種類に応じて分化挙動が異なっていたことを踏まえ、来年度はより詳細な検討を行うとともに、その表面上の官能基分布を何らかの方法で検討し、その両者から官能基と細胞との相互作用機構とその影響を明らかにしていく。

また、昨年度、興味深い分化挙動を示した硫酸基表面に関しては、最近、専用の試薬が市販されたことから、来年度、硫酸基も使用した同様の研究を行い、その効果を検討する予定である。

E. 結論

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

スルホン化プレートが示すNH0s1の分化促進作用は同プレートに吸着される蛋白質の機能により説明できる結果が得られたことから、プロテオミクス解析は医用材料の機能や生体適合性を評価する上で有

益な手法になることが示唆された。今後、候補蛋白質が及ぼす NH0st への影響を詳細に検討すると共に、細胞レベルの蛋白質発現解析などを行うことにより、医用材料のリスクアセスメント手法としてプロテオミクス解析が応用できるかどうか総合的に評価する。

2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

CHL 細胞は 0.1 から 9.2 \cdot m までの 11 種のサイズの PS 粒子のうち、0.92 から 4.45 \cdot m までの 5 種のサイズの粒子を好んで貪食し、これは細胞毒性、染色体数的異常（倍数体）誘発性を示す粒子のサイズと完全に一致していた。このことから、CHL 細胞は何らかのサイズ認識機構をもち、貪食した PS 粒子によって細胞質分裂が阻害され倍数体を誘発し、それが最終的に細胞死につながっていることが示唆された。

ナノマテリアルの安全性評価において、分散が不十分で \cdot m サイズの凝集体で処理する場合もあると考えられるが、本研究で観察されたサイズ依存的毒性発現の可能性も考慮し、何らかの分散状態を示すデータとともに試験結果を慎重に評価する必要があると考えられる。

3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

ハンクス平衡塩溶液を用いて、FT-IR/PAS 法により表面処置したチタン合金のアパタイト形成能を評価した。

FT-IR/PAS 法は、材料表面に形成したアパタイト量を定量的に解析することが可能であった。また、アルカリ処置したチタン合金にカルシウム導入すると、アパタイト形成能が促進することを確認した。さらに、カルシウム導入法として、現在検討されている塩化カルシウム法に比べて、我々が考案した水酸化カルシウム法の方がアパタイト形成能の促進効果が高かった。

アパタイト形成能の定量的評価は、骨系医用材料のリスクアセスメントに有用である。アパタイト形成能が高く、骨結合性を有する材料の開発は、リスクの少ない骨系医療機器への応用が期待できる。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

人工心臓弁使用者の中で人工心臓弁の機能不全が認められる患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて SNP ジェノタイピングを行い両者を比較することで、人工心臓弁（機械弁）を体に埋植した際の機能不全の原因となり得る血栓形成やパルス形成に関わる遺伝子多型を探索する。

5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発

不具合により抜去された整形インプラントを入手し、5 例について分析を行った。また、臨床情報も入手し、総合的に解析を行うことで、各症例について不具合要因の推定を行った。従来、摺動面に起因する不具合要因がクローズアップされてきたが、今回調査した 5 例では、摺動面が第一要因と思われる症例はなく、生体骨との接合面に問題があると推定されたものがほとんどであった。整形インプラントの不具合要因は技術の進歩とともに変化することが考えられ、今後も継続的な調査が必要であると考えられた。

6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

米国の膨大な医療機器不具合報告の公開データを入手し、データベースに再構築後、機器の種類、不具合ごとに分類し、時系列に追うことで、不具合の傾向を掴んだ。特に、製品に問題があるとされた報告、Adverse Event を生じた事例に焦点を置き、報告数が多かった心臓血管系・整形外科系を中心に、頻出する機器分類・不具合内容をリストアップすると共に、注目すべき個別分類機器の不具合内容数について解析を行った。これらから、埋め込み型除細動器・ペースメーカー関連の電気的不具合、薬物溶出型冠動脈ステントでの閉塞、人工膝・股関節での摩耗・ゆるみ、人工股関節での脱臼、近年の埋め込み型注入器・止血機器・埋め込み型脊椎刺激装置の報告増加、などに最も注意を払うべきと思われた。

7. 吸収性材料（人工硬膜）による長期生体影響のリスクアセスメント手法開発

本年度研究では行動学試験では有意な変化が膜埋め込み群と対照群の間では見られず、過去の研究と合わせて考えると、この方法での評価では、人工硬膜の埋め込みに害があるとは言えない。モデル実験として 8mm の切り出しサイズは適当と考える。

8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究

CT 画像及び MRI 画像を基に詳細な 3 次元生体膝モデルを構築し、人工膝関節を組み込むことで TKA 後の生体膝モデルへと発展させ、3 次元有限要素解析モデルを構築した。構築した解析モデルを用いて簡単な屈曲動作を模擬した解析を行い、モデルの妥当性を検証した。その結果、このモデルを用いることで、生体内での人工膝関節の力学状態を明らかにし、脛骨インサートの摩耗や破損の原因を究明できる可能性があることが示唆された。

9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

血流障害能力の定量化をシミュレーションすることができ、リスクアセスメントに応用できる見通しがついた。ステント無しでは分岐部の状態に考慮した血流分配が必要であり、さらに脳動脈瘤のネック部分に留置したステントストラットを消去することでステント形状を変え数値流体解析によって動脈瘤内の血流シミュレーションを行うことで、ステントの性能の論理性を高めることができた。脳動脈瘤ネックの各ステントストラットによって、脳動脈瘤内における血流の流速および脳動脈瘤にかかる壁ずり応力分布を示された。今後海外とも連携をもち、リスクアセスメントの確立を目指す。

10. コンピューターシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発

ステントの力学適合性のコンピューターシミュレーション技術によるリスクアセスメント手法開発

光学式三次元形状測定装置とリバースモデリングソフトウェアを使用することで、人工股関節と骨固定材の製品から形状モデルを作成した。特に歯科用骨固定材においては、作成した形状モデルを用いて弾塑性有限要素解析を行った。その結果、変形操作によって、骨固定材がどのような相当塑性ひずみを受けているか、残留応力はどの程度存在するかを見積もることができた。

11. ガイドワイヤーの臨床利用状況を考慮したリスクアセスメント手法開発

挿入角度と荷重の関係

セルジンガー法の中でも特にガイドワイヤー、ダイレータ挿入時に関し、工学的側面から留意点を見出し提言することを目的に、医師の挿入力の調査とさらに臨床を模擬する評価系を構築、試験を実施した。試験の結果、以下の結論が得られた。

・ダイレータと血管の角度が 30° 未満では血管穿孔が起こる可能性は低い。

・挿入角度が 45° 以下では、10N 以上の力が作用しなければ、血管穿孔の可能性は低いが、ダイレータを繰り返し押し込むことにより血管が伸展、菲薄化し、血管が穿孔する可能性がある。

・挿入角度が 60° の場合 10N 以上の荷重が作用すると、ダイレータが血管を穿孔させる可能性が高い。

これらは、現実的には起こりづらい状況であるが、医師は十分にこれらについて留意する必要がある。

12. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発

動物実験の代替法を確立するためには、in vivo と in vitro の結果を比較・検討するような評価実験を

し、in vitro の系が in vivo の系の結果を十分に反映しているということを示さなければならない。そこで我々は生分解性ポリマーのアレルギー性の評価を in vitro の系である h-CLAT で行うことが可能であるかを検討するため、h-CLAT での結果と LLNA の結果の間で比較・検討した。その結果、両者の結果に相関を見いだすことができた。しかしながら今年度の結果はまだ予備段階的なものであり、今回の in vitro 評価法が医療機器およびその材料のアレルギー性を評価する in vitro の評価法として妥当であるかはさらなる検討が必要であるが、これまでに生分解性ポリマーにおけるアレルギー性を評価した報告はなく、この研究結果は in vitro でのリスクアセスメント手法開発に多いに役に立つと思われる。

13. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

市販の試薬を用いて、メチル基とその他の官能基からなる 2 官能基モデル表面の調製が可能であった。このモデル表面は、その官能基の存在比率に応じて表面特性が変化することが示された。これらの表面を用いて、接触角及び官能基が細胞挙動に与える影響を検討したところ、接触角よりも官能基がその挙動に比較的強い影響を与えることが示唆された。来年度は、硫酸基試薬も使用して同様の実験を行い、官能基が細胞挙動に与える影響を検討する。

昨年度に引き続き、モデル炎症系細胞の選択と実験系の構築を試みたが、適切な細胞及び実験系は判明しなかった。来年度は、他のヒト単球由来の細胞、あるいは新鮮血を用いて実験系の構築を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江 アクセサリー類を除く金属製品に含有する鉛及びカドミウムの分析調査 中毒研究 2008 21, 393-395
2. 中島晴信、沢辺善之、伊佐間和郎、土屋利江 高分子材料中のオクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ) の分析 大阪府立公衆衛生研究所研究報告 2008, 46, 97-102
3. 猪熊 宏幹、姜 有峯、菅原 桂、原 実生子、鄭 徳泳、土屋 利江、堤 定美：再生軟骨の非接触式体積弾性率測定装置の開発に関する研究、日本臨床バイオメカニクス学会誌、2008、29、126 (147—151)
4. 土屋利江：医療機器・細胞組織医療機器の品質・安全性、国立医薬品食品衛生研究所報告 2008、

- 126, 1-18.
5. 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江：キャピラリー電気泳動法によるアルカリ性洗浄剤中のナトリウムイオン、カリウムイオン及びモノエタノールアミンの分析、国立医薬品食品衛生研究所報告、2008、126 (71-75)
 6. 迫田 秀行、鄭 徳泳、佐藤 道夫、土屋 利江、脇谷 滋之、天正 恵治 微小試験片を用いた人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価。日本臨床バイオメカニクス学会誌、2008、29、367-372
 7. 迫田 秀行、鄭 徳泳、佐藤 道夫、土屋 利江、脇谷 滋之、天正 恵治 人工関節の不具合要因分析。日本臨床バイオメカニクス学会誌、2008、29、361-365
 8. 土屋利江、再生医療の現状、再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル=開発から臨床まで、土屋利江編、培風館、印刷中
 9. 澤田留美、松岡厚子、松田良枝、土屋利江：ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養期間中の変化について、*c-myc* をターゲットとした遺伝子発現解析と染色体異常解析— 薬学雑誌 2008、128(12)、1851-1856
 10. Kazuhiko Machida, Hiroshi Suemizu, Kenji Kawai, Tsuyoshi Ishikawa, Rumi Sawada, Yasuyuki Ohnishi, Toshie Tsuchiya, Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors, *J. Toxicol. Sci (Letter)* 2009, 34(1), 123-127
 11. Bayar Hexig, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Safety Evaluation of Surgical Materials by Cytotoxicity Test, *J. Artificial Organ s* (2008) accepted
 12. 土屋利江：細胞組織再生品のガイドライン、進みつづける細胞移植治療の実際（下巻）—細胞移植治療の現状とその周辺要素の理解—、メディカルドリ、大阪(2008)、pp236-243.
 13. 土屋利江：“医療機器の安全性に関する非臨床試験と GLP について”、医薬品 GLP ガイドブック 2008、薬事日報社、東京(2008)、 pp21-46
 14. Takashi Yamada, Rumi Sawada and Toshie Tsuchiya, The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes. *Biomaterials* 2008, 29/26 3503-3513
 15. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka, and Toshie Tsuchiya, Different effects of [60] fullerene brain injection and i.p. injection on the brain monoamine and behavior in the rats., *J. of Nanoscience and Nanotechnology* 2008 8, 1-9.
 16. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Misao Nagahata-Ishiguro, Rumi Sawada, Nasreen Banu and Tsutomu Nagira, Remarkable enhancing action by sulfated hyaluronan on Connexin-26, -32, and -43 gene expressions during the culture of normal human astrocytes, *Journal of Biomedical Materials Research:Part A*, in press.
 17. Tomomi Ito, Rumi Sawada, Yoko Fujiwara, Toshie Tsuchiya, FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- β signaling. *Cytotechnology* 2008, 56, 1-7.
 18. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Toshie Tsuchiya: Intracerebral microinjection of stannous 2-ethylhexanoate affects dopamine turnover in cerebral cortex and locomotor activity in rats. *Journal of Biomaterial Materials Research: Part B-Applied Biomaterials* accepted *J Biomed Mater Res B : Appl Biomater.* 2008 87B(2) 381-386
 19. Kumada H., Haishima Y., Watanabe K., Hasegawa C., Tsuchiya T., Tanamoto K., Umemoto T.,:Biological properties of the native and synthetic lipid A of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Oral Microbiology Immunology* 2008, 23, 60-69.
 20. Matsuoka A., Haishima Y., Hasegawa C., Matsuda Y. and Tsuchiya T.: Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the *in vitro* chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2008, 86, 13-22.
 21. 土屋利江、粒子特性評価法及び毒性評価法—*in vitro*、「ナノ粒子・微粒子の毒性評価研究の動向と暴露対策の現状」技術情報協会、2007、371-380
 22. 中岡竜介、松本富美子、宗林さおり、柳橋哲夫、土屋利江、視力補正を目的としないカラーコンタクトレンズの細胞毒性、衛研報告 2007、125、61-64.
 23. Shigeyuki Wakitani, Masashi Nawata, Amu Kawaguchi, Takahiko Okabe, Kunio Takaoka, Toshie Tsuchiya, Ryusuke Nakaoka, Hiroya Madsuda, and Kyosuke Miyazaki, Serum Keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown. *Rheumatology* 2007 46:1652-1656,
 24. Ahmed, S. and Tsuchiya, T. *In vitro* cytotoxic effects of tin compounds on normal human

- astrocytes, In: K. Ikura et al. (eds.) *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 2008, Volume 15, pp.185-190. Springer, the Netherlands.
25. Banu, N. and Tsuchiya, T., Effects of tin compounds on human chondrogenic activity in vitro, In: K. Ikura et al. (eds.) *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 2008 Volume 15, pp.191-196. Springer, the Netherlands.
 26. 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、2007、241-244 日本組織工学会監修、日本医学館。
 27. 土屋利江、次世代医療機器審査 WG 平成 17 年度のまとめと 18 年度の間報告、日本歯科再生医学会誌、2007、vol.4、No.2、132-133
 28. Nakaoka, R. and Tsuchiya, T., The responses of osteoblasts and chondrocytes cultured on an alginate gel modified with nano-patterned cell adhesive peptides, *Proceedings of the 5th International Symposium on Nanotechnology*, 34-35 (2007)
 29. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T., FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 1, 108-114.
 30. 澤田留美、伊藤友美、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および安全性評価について、*薬学雑誌*、2007、127、5 851-856
 31. 山口照英、土屋利江、細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価、*薬学雑誌*、2007、127、5、839-840
 32. 土屋利江：細胞組織医療機器開発総論、*薬学雑誌*、2007 127、847-850
 33. Banu N, Tsuchiya T, Sawada R., Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes., *J Biomed Mater Res A*. 2007, 82, 1, 263-264.
 34. 土屋利江、俵木登美子、スペシャル対談日本の医療機器の研究開発と制度の動向、*バイオテクノロジージャーナル*、2007、3-4、198-203
 35. 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.
 36. 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、再生医療技術の最前線、岡野光夫、大和雅之監修、2007、pp241-248. シーエムシー出版
 37. 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.
 38. 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.
 39. 山越葉子、中澤憲一、土屋利江、原子間力顕微鏡 (AFM) による蛋白質のイメージング、*日本臨床*、2007、二号、270-277
 40. 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 Artif Organs*. 2007;10(1):22-28.
- ## 2) 学会発表
1. 靛島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、橋本宣子、脇田比呂美、中島敏治、斉藤博久、松田良枝、土屋利江。ヒト細胞に対するスルホン化材料の機能解析に関する研究。日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008 年 11 月・東京)。
 2. 靛島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、浅見仁美、山口透、土屋利江。スルホン基含有新規温度応答性細胞培養プレートの開発に関する研究。日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008 年 11 月・東京)。
 3. 中岡竜介、靛島由二、土屋利江。種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について。日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008 年 11 月・東京)。
 4. A. Matsuoka, Y. Matsuda, R. Nakaoka, Y. Haishima, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya: How small aggregates must be prepared in an in vitro safety evaluation system for nanomaterials? *International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes"* (ISNT2008) (2008 年 6 月、札幌)
 5. 松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、靛島由二、土

- 屋利江：ポリスチレンサイズ標準粒子の細胞毒性と遺伝毒性
日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008 (平成 20 年 11 月)
6. 松岡厚子、浅倉真澄、中井誠、藤島沙織、松田良枝、湯田坂雅子、飯島澄男、田中勲、土屋利江：ナノ材料の細胞毒性に及ぼす粒子径の影響について
日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008 (平成 20 年 11 月)
 7. A. Matsuoka, Y. Matsuda, K. Isama, T. Tsuchiya: Cytotoxicity and genotoxicity of eleven size-different polystyrene particles
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)
 8. A. Matsuoka, Y. Matsuda, M. Yudasaka, S. Iijima, I. Tanaka: Development of an in vitro safety evaluation system for nanomaterials - 3 Single-walled carbon nanohorns and multi-walled carbon nanotubes
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)
 9. M. Asakura, T. Sugiyama, K. Nagano, A. Matsuoka, S. Fukushima: Development of an in vitro safety evaluation system for nanomaterials-1-Titanium dioxide
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)
 9. 松岡厚子：ナノマテリアルの in vitro 安全性評価系の開発と課題
第 3 回ナノマテリアルの環境・健康影響評価および管理技術研究会 (平成 21 年 1 月 27 日)
 10. 伊佐間和郎、葩島由二、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、土屋利江：DEHP を含む PVC の紫外線照射により生成する毒性物質の同定、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
 11. 伊佐間和郎、鹿庭正昭、土屋利江：アクセサリ一類を除く金属製品に含有する鉛量の調査、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
 12. 中島晴信、沢辺善之、伊佐間和郎、土屋利江：高分子材料中のオクチル酸スズ (2-エチルヘキササン酸スズ) の分析、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008 年 11 月、佐賀)
 13. 伊佐間和郎、葩島由二、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、柚場俊康、土屋利江：DEHP を含む PVC の紫外線照射により生成する毒性物質の同定、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 (2008 年 11 月、東京)
 14. 伊佐間和郎、河上強志、鹿庭正昭、土屋利江：アクセサリ一類を除く金属製品に含有する有害金属の分析調査、日本薬学会第 129 年会 (2009 年 3 月、京都)
 15. 迫田秀行、鄭徳泳、脇谷滋之、天正恵治、佐藤道夫、土屋利江：人工関節の不具合要因分析 第 34 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 34, 126 (2007 年 12 月、東京)
 16. 迫田秀行、土屋利江：微少試験片を用いた人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価 第 34 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 34, 127 (2007 年 12 月、東京)
 17. 迫田秀行：微小試験片を用いた人工関節用 UHMWPE 疲労特性評価法 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・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」成果発表会 (2008 年 2 月、東京)
 18. 迫田秀行、鄭徳泳、脇谷滋之、天正恵治、佐藤道夫、土屋利江：微小試験片による抜去人工関節 UHMWPE の疲労特性評価 日本機械学会 2008 年度年次大会, 852- (2008 年 8 月、横浜)
 19. 迫田秀行、石川格、脇谷滋之、天正恵治、鄭徳泳、佐藤道夫、土屋利江：人工関節の不具合要因分析 第 2 報 人工股関節 第 35 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 35, 48 (2008 年 11 月、大阪)
 20. 迫田秀行、石川格、脇谷滋之、天正恵治、鄭徳泳、佐藤道夫、土屋利江：微少試験片を用いた高密度架橋ポリエチレンの疲労特性評価 第 35 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 35, 70 (2008 年 11 月、大阪)
 21. 佐藤道夫、土屋利江：医療機器の不具合情報について、第 45 回全国衛生化学技術協議会年会 (2008.11).
 22. 角田正史、辻雅善、木村幸子、張瑩、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一郎、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2008) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究 (第 2 報)：人工硬膜埋め込みラットの行動学試験を用いた神経毒性評価. 日本衛生学雑誌, 63(2), 457.
 23. 角田正史、辻雅善、木村幸子、張瑩、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一郎、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治 (2008) 人工脳硬膜の安全性評価に関する研究：ポリ乳酸ラクチド膜埋め込みラットの神経伝達物質を用いた毒性評価. Biomedical Research on Trace Elements, 19(2), 195.
 24. 石川 格：コンピュータシミュレーションによる

- 歯科用骨固定材のリスクアセスメント. 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・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」成果発表会(2009年1月, 東京)
25. 植松美幸, 有田誠, 岩崎清隆, 田中隆, 太田友博, 梅津光生, 土屋利江: 頸静脈に対するガイドワイヤーおよびダイレータの挿入角度による血管穿孔可能性を評価する試験法の構築, 第46回日本人工臓器学会大会(2008).
 26. M., Uematsu, M., Arita, K., Iwasaki, T., Tanaka, T., Ohta, M., Umezu, T., Tsuchiya, "Development of Evaluation Test Method for the Possibility of Central Venous Catheter Perforation Caused by the Insertion Angle of a Guidewire and a Dilator", The 13th International Conference on Biomedical Engineering (2008)
 27. 鄭連淑, 加藤玲子, 土屋利江: 生分解性ポリマーの遅延型アレルギー性の *in vitro* と *in vivo* 試験による評価 2008年11月17~18日 東京
 28. 鄭連淑, 加藤玲子, 土屋利江: Skin sensitizer assessments of Local Lymph Node Assay using biodegradable polymers 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月5~6日 東京
 29. 中岡竜介, 配島由二, 土屋利江「種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、東京、2008年11月16、17日
 30. Atsuko Matsuoka, Yoshie Matsuda, Ryusuke Nakaoka, Yuji Haishima, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Toshie Tsuchiya. How small aggregates must be prepared in an *in vitro* safety evaluation system for nanomaterials? International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008), Sapporo. 2008. 6. 16, 17.
 31. 土屋利江、「次世代医療機器事業報告・再生医療品の発ガン性評価」第6回医療機器フォーラム、東京、2008年10月18日
 32. 土屋利江、「レギュラトリーサイエンスの構築開発から 製品化まで」平成20年度医療機器・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究成果発表会 東京、2009年1月16日
 33. 土屋利江, 石川烈, 澤田留美, 町田一彦, 末水洋志, 大西保行「高感度、高精度腫瘍細胞検出方法の開発と国際標準化に関する研究」第8回日本再生医療学会総会 2009年3月5日 東京

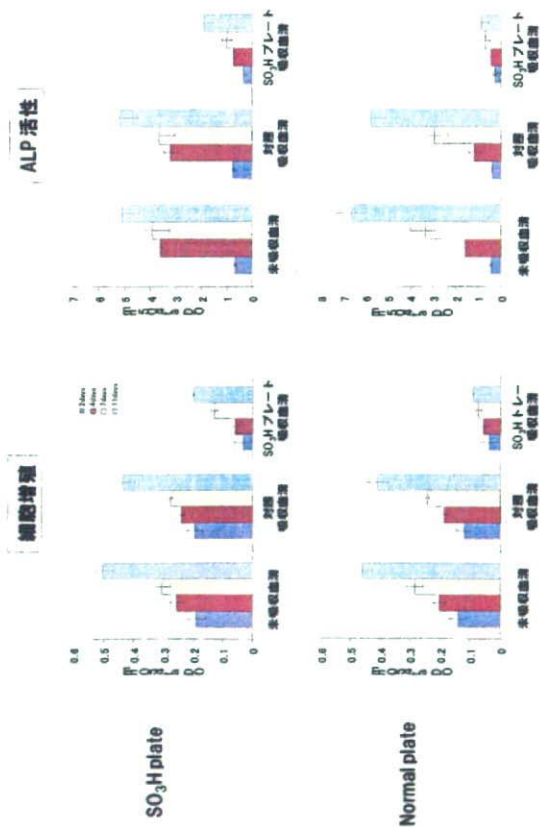


図 1 吸収血清を使用した NHOst の培養実験結果.

表 1 LC-MS/MS 解析による血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の同定結果

血清蛋白質				スルホン化プレート吸着蛋白質				
Code	Score	Sequence coverage	Code	Score	Sequence coverage	Code	Score	
ALBU	1333	65	ALBU	981	53	BIPT2	88	13
TRFE	491	25	CO3	702	13	HABP2	86	8
AIAT	472	33	FETA	582	34	VTDB	86	2
FETUA	316	32	HBBF	482	82	BLVRB	84	10
FETA	280	21	APOH	458	42	ENGA	84	9
VTDB	186	13	IPSP	348	29	IBP2	82	7
HBBF	172	21	TSP1	368	12	FA9	80	6
TTHY	146	24	PEDF	385	36	PLMN	77	4
APOA1	139	22	CFAH	268	10	CO4	76	3
ENDP1	118	5	APOA1	262	53	FETUA	75	9
FETUB	112	7	THRB	257	13	PRDX6	75	7
AIAG	111	17	COMP	189	12	B2MG	57	31
A2MG	110	14	RETB	166	20	ANT3	53	6
HBA	84	10	TETN	233	42	FIBA	51	7
AMBP	70	8	AIAT	232	14	CO9	50	2
ANT3	58	6	APOE	180	19	CO1A2	50	1
RETB	53	10	HBA	178	53	FINC	39	1
APOH	45	4	AMBP	147	11	SC81G	39	11
SYCP3	42	8	TAGL2	102	15	GPX3	38	5
BRD2	42	1	CD14	99	4	GBG2	38	9
			PPIA	93	10	IGF2	37	5

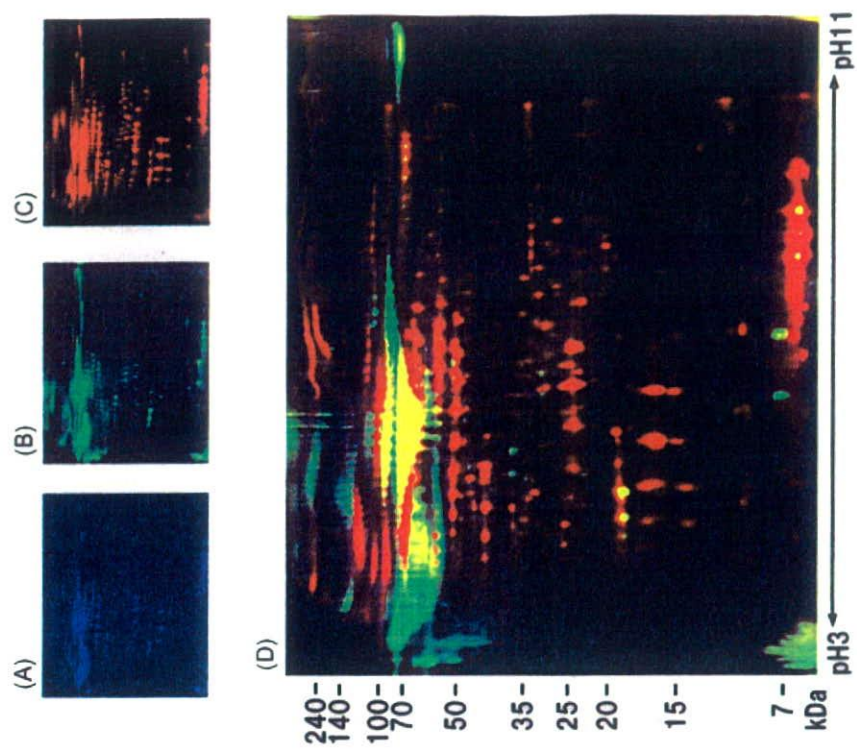


図 2 血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動.
(A) 内部標準 (Cye2), (B) 血清蛋白質 (Cye3), (C) スルホン化プレート吸着蛋白質 (Cye5), (D) B+C.

表2 PS粒子 (4.45 μm)の染色体異常試験

Treatment time (h)	Mass concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Polyploidy (%)	Frequency of cells with structural aberrations (%)*						
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total
24	0	5	1	2	2	0	0	0	4
	50	7	1	0	0	0	0	0	1
	100	12	0	0	0	0	0	0	0
	200	14	1	0	0	0	0	0	1
	300	16	0	0	0	0	0	0	0
	400	14	0	0	0	0	0	0	0
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	50	12	0	0	0	0	0	0	0
	100	15	1	0	0	0	1	0	2
	200	36	1	0	0	0	0	0	1
	300	37	2	4	0	0	0	2	6
	400	23	2	2	0	0	0	0	4

*表2の脚注参照。

表3 PS粒子 (5.26 μm)の染色体異常試験

Treatment time (h)	Mass concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Polyploidy (%)	Frequency of cells with structural aberrations (%)*						
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total
24	0	5	1	2	2	0	0	0	4
	200	3	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	6	0	0	0	0	0	0	0
	800	6	0	0	0	0	0	0	0
	1000	6	1	1	0	0	0	0	1
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	200	3	0	0	0	0	0	0	0
	400	5	0	1	0	0	0	1	1
	600	9	1	0	0	0	0	1	2
	800	9	1	0	0	0	0	0	1
	1000	13	0	1	0	0	2	0	4

*The structural aberrations were classified as follows; ctg, chromatid and chromosome gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; f, fragmentation; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges. Red figures indicate positive response.

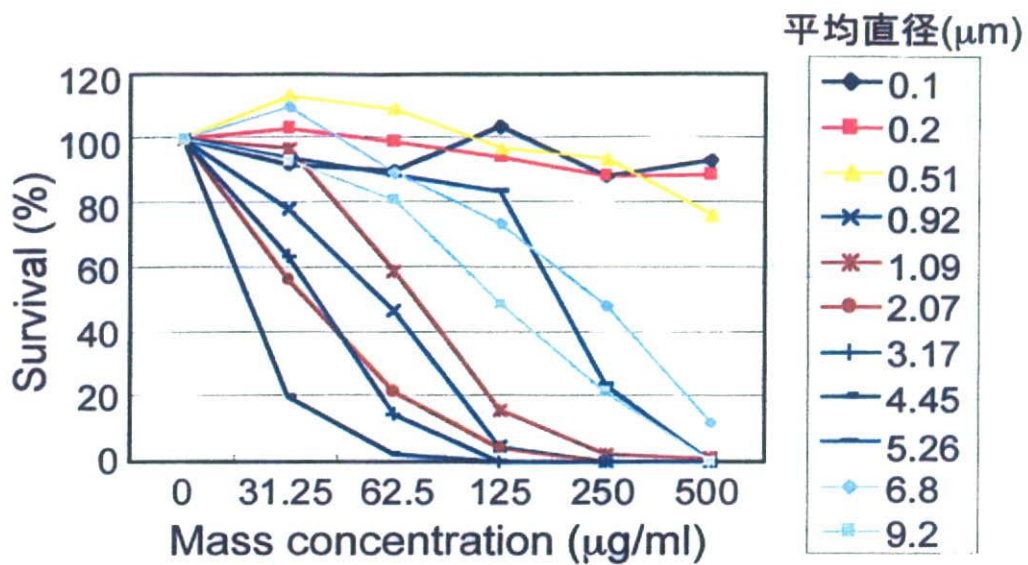


図3 PS粒子の細胞毒性

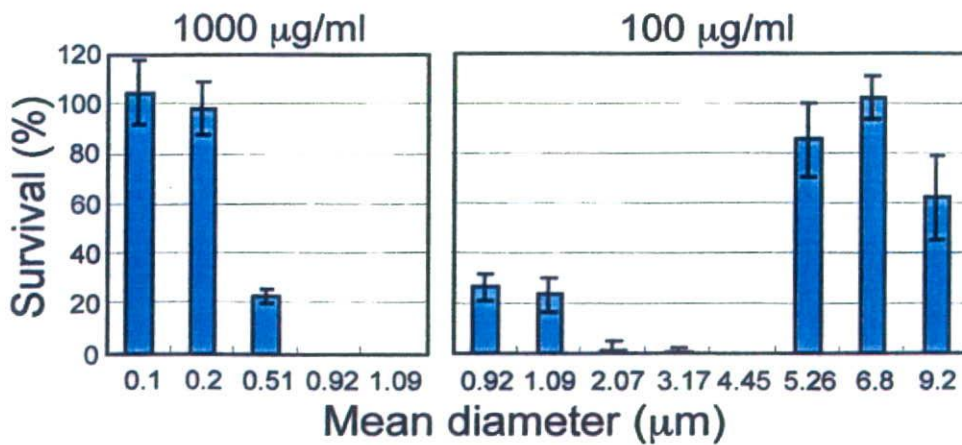
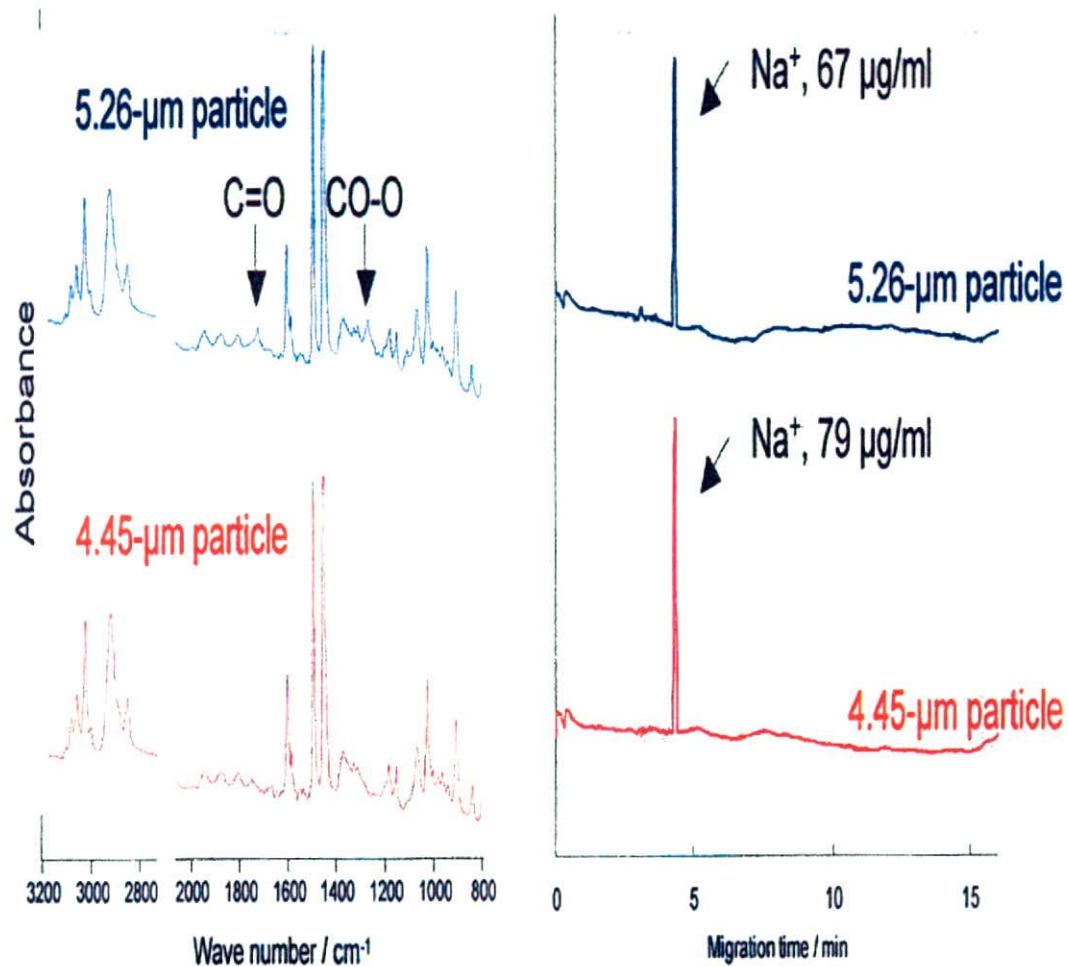


図4 特定濃度でのPS粒子の細胞毒性



FT-IR/ATR spectra of the particles

Capillary electropherograms of the dispersion vehicles

図 5 PS粒子の表面解析および分散媒の性状

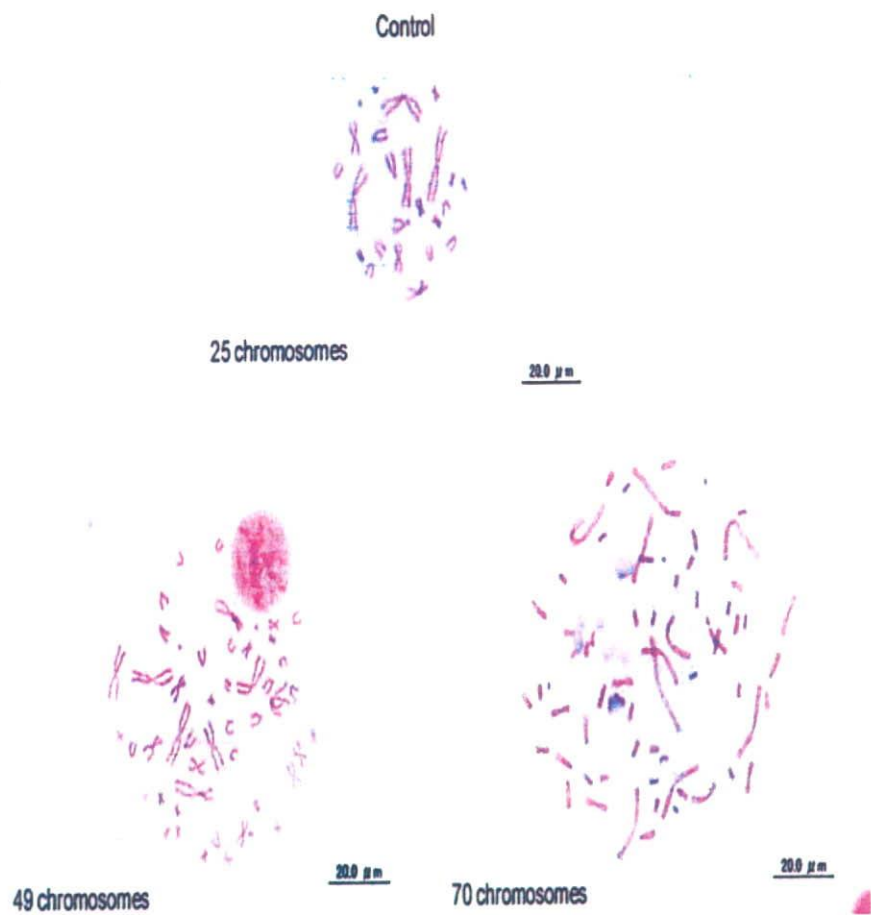
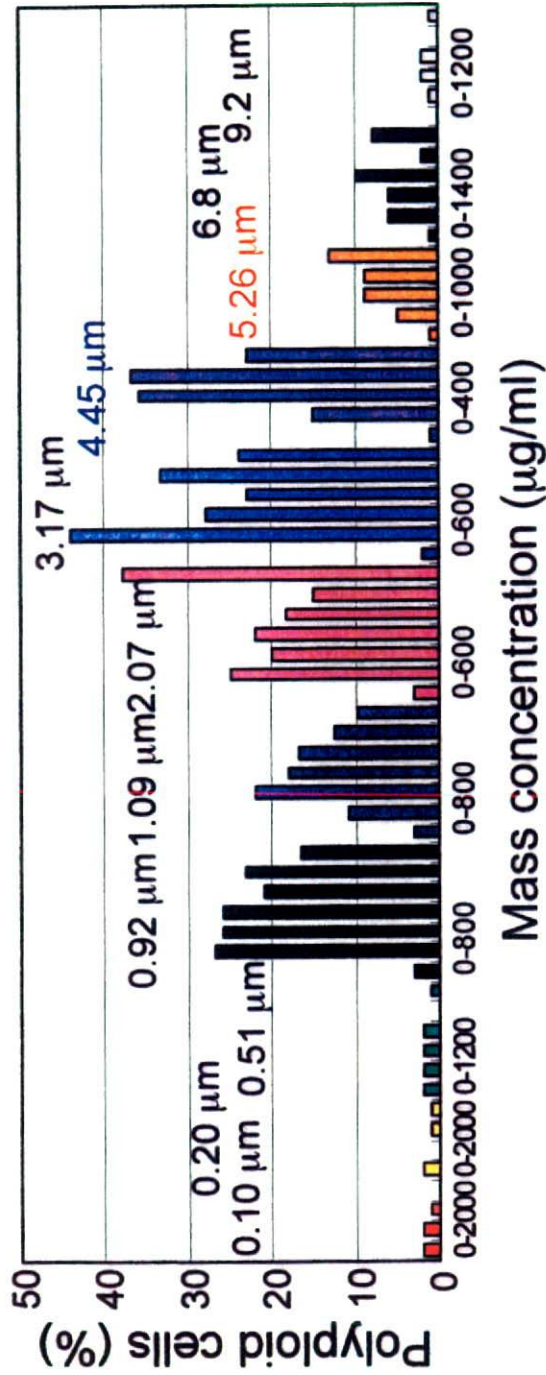


図6 PS粒子 (4.45 μm)によって誘発された倍数体

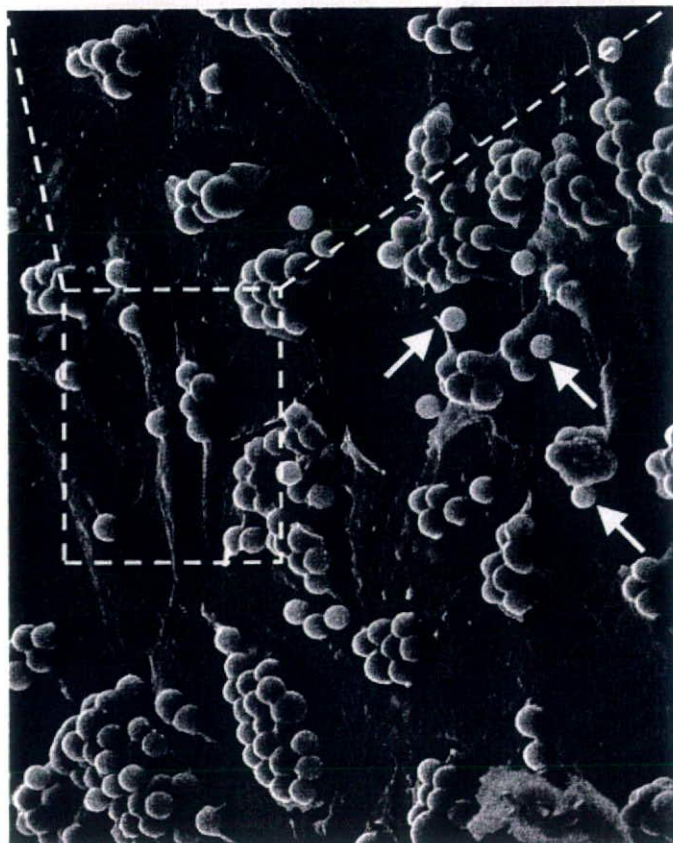


Mass concentrations indicate their range tested. Details are as follows:
 0, 1500, 1750, and 2000 µg/ml for the 0.10- and 0.20-µm particles
 0, 400, 600, 800, 1000, and 1200 µg/ml for the 0.51- and 9.2-µm particles
 0, 300, 400, 500, 600, 700, and 800 µg/ml for the 0.92- and 1.09-µm particles
 0, 100, 200, 300, 400, 500, and 600 µg/ml for the 2.07-µm particles
 0, 200, 300, 400, 500, and 600 µg/ml for the 3.17-µm particles
 0, 100, 200, 300, and 400 µg/ml for the 4.45-µm particles
 0, 400, 600, 800, and 1000 µg/ml for the 5.26-µm particles
 0, 600, 800, 1000, 1200, and 1400 µg/ml for the 6.8-µm particles

図7 PS粒子の倍数体誘発頻度



SEM (X3000)



SEM (X1000)

図8 PS粒子(4.45 μm)を貪食したCHL細胞

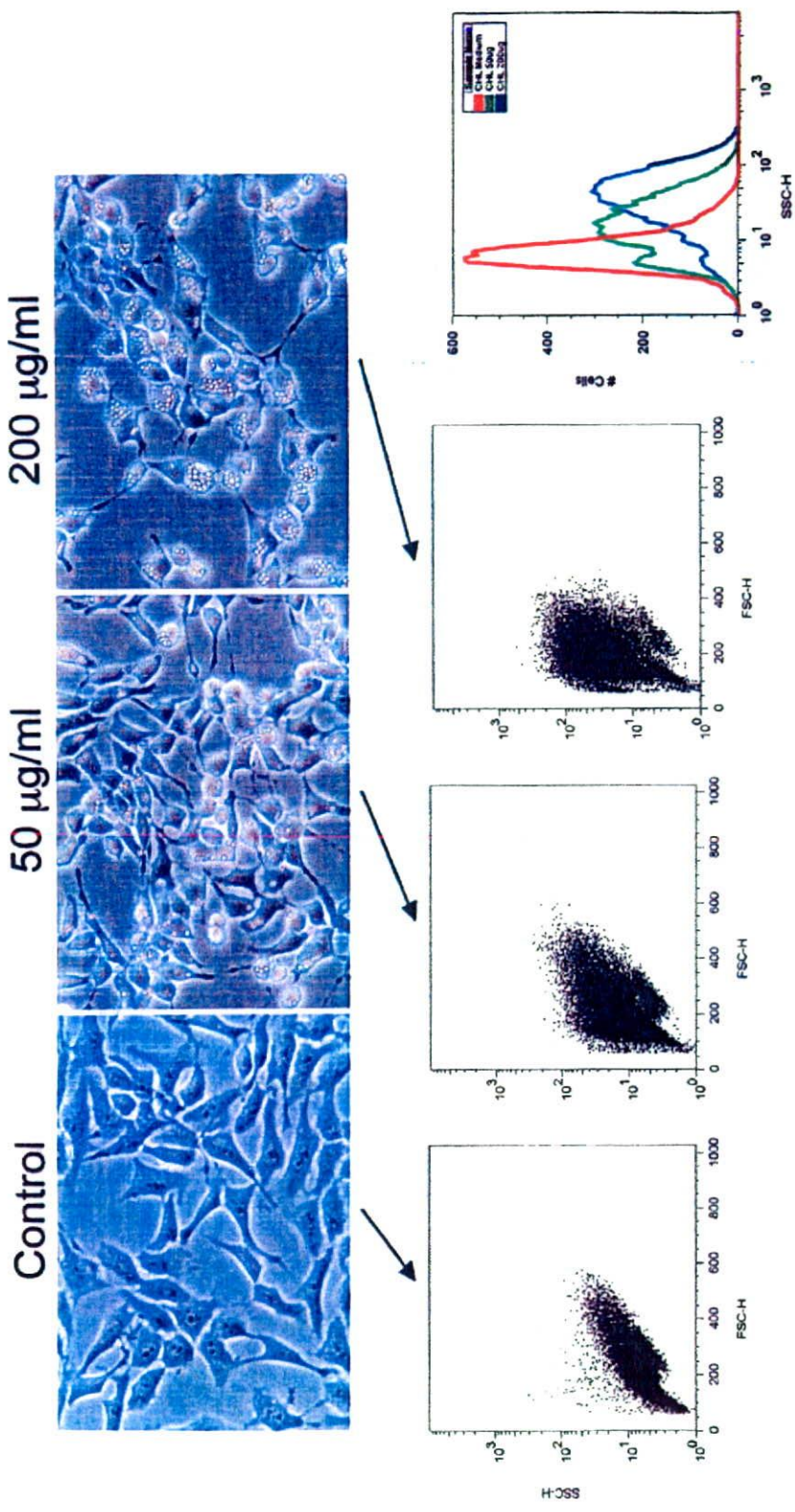


図9 PS粒子(3.17 µm)取り込みの様子とフローサイトメーター解析