

されている。さらに、これら炎症性サイトカインの刺激を受けて骨芽細胞やストローマ細胞がRANKLを産生する機序、および単球・マクロファージ等の破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化す機序にもNF κ Bは大きく関与しているとされており、摩耗粉によって生じるオステオライシスのカスケードのあらゆる段階においてNF κ Bは重要な役割を果たすと言える。

近年、GFPの蛍光やluciferaseによる化学発光を高感度で検出可能な装置の開発が進み、またマウスの遺伝子改変技術の普及により、マウスを屠殺することなくin-vivoでこうした発光を検出・定量するイメージング技術が急速な進歩を遂げている。NF κ B/luciferaseトランスジェニックマウス(以下NF κ B/lucマウス)はNF κ Bの結合サイトを5回繰り返した配列の下流にluciferase cDNAを結合したconstructをtransgeneとしこれを過剰発現させたマウスで、炎症性疾患モデルの発症に伴い炎症部位が化学発光する性質を有し、関節炎や敗血症の評価が可能である。

一方、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)はTNF- α やIL-1などの骨吸収性サイトカインをこれらの最も上流で制御する因子と目される。Morandらのグループは、MIFがTNF- α の産生を促進すること、MIFノックアウトマウスではLPS刺激により炎症を惹起してもTNF- α 等の産生が抑制されることなどより、MIFがTNF- α をさらに上流で制御するサイトカインである可能性を提唱している(Morand EF, Arthritis Rheum 2003)。したがってインプラント周囲の骨溶解の病態に骨吸収性サイトカインのネットワークが関与する各種の疾患においてMIFが関与することは合理性がある。我々はこれまでの研究において、人工股関節ゆるみ滑膜組織においてポリエチレン磨耗粉を貪食・内包化した多核巨細胞が免疫組織学的にMIF陽性であること、in-vitroでマクロファージにparticleを添加するとその貪食に伴い容量依存性にMIFをタンパクおよびmRNAレベルで産生することを報告した(Onodera S, Immunology 1996)。これはオステオライシスにおけるMIFの関与を示す重要な知見と思われる。上記の事実とあわせて考えると、磨耗微粒子によって生じるオステオライシスにMIFが関与し、本MIFを標的とすることにより磨耗微粒子によって生じるオステオライシスを制御することが有望であると予想される。

我々は、摩耗粉に誘発されるオステオライシスにおいてNF κ Bが重要な役割を果たすことに着目し、このマウスに摩耗粉を負荷することにより、生じる炎症反応を可視化する可能性を着想した。本研究の目的はNF κ B/lucマウスおよびポリエチレン粉を用い、摩耗粉誘発性の炎症反応を可視化できるかどうか、また可視化した発光の定量値が実際の炎症反応を反映するかを検討することである。さらに摩耗粉誘発性の炎症反応へのMIFの関与を明らかにする手段として、MIFに対する自己抗体を産生させるMIF-DNAワクチンの開発を行った。

B. 研究方法

1. 摩耗粉刺激によるマウス頭頂骨骨吸収モデルの作成

1) 実験材料

Johnson Mathey Chemicals (Ward Hill, MA, USA)よりチタニウム微粒子を入手し、滅菌済みPBS液で洗浄後に2時間乾燥後に紫外線滅菌を2時間施行し、使用した。

2) 実験方法

全身麻酔下にて6-7週齢の雌Balb/Cマウスの頭頂骨の骨膜を剥離し、同皮質骨上に30mgチタニウム微粒子を1-cm x 1-cmに散布し、5-0 nylon糸にて骨膜および皮下組織、皮膚を閉創した。対照として別の動物にチタニウム微粒子を散布せず同処置を行ないSham手術とした。

3) 評価

処置後1週間にて以上の動物を屠殺し、ホルマリン固定標本をhematoxylin/eosin染色、酒石酸フォスファターゼ(TRAP)染色、MIFに対する免疫染色を行なった。また、頭頂骨の総RNAを抽出し逆転写した後にMIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLに関して、real time PCRによる遺伝子発現を検討した。内部コントロールとしてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。なお、すべての動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認後、同ガイドラインに従い施行された。

2. 摩耗粉刺激によるマウス頭部発光モデルの作成

1) 実験動物

NF κ B/lucマウスは米国Caliper Lifesciences社より購入した。本実験はすべて北海道大学医学研究

科動物実験プロトコールに準拠し施行された。

2) 実験方法

ポリエチレン摩耗粉として、ceridust 3615 (Clariant Japan, 平均粒径7 μ m)を、75%エタノールにて48時間処理後真空乾燥させて用いた。生後7-8週令のNF κ B/lucマウスを用い、腹腔内ネブタール麻酔(50mg/kg)後、頭部に5mm長の縦切開を加えたのち骨膜を剥離して、ポリエチレン摩耗粉5mgを散布後、5-0ナイロン糸にて皮膚を縫合した。皮切・骨膜剥離のみ行い摩耗粉負荷を行わないマウスをSHAM群とした。

3) 評価

マウスはd-ルシフェリン溶液(10mg/ml)を200 μ l尾静脈より注射後、2分にてIVIS imaging system(200 series, XENOGEN)により頭部の化学発光の検出を行った。イメージングした発光領域をカバーするROI(range of interest)を設定し付属ソフトにより発光量の定量を行った。

化学発光検出後、マウスを安楽死させ頭頂骨を摘出し、HE染色及びTRAP染色により組織学的検討を行った。また頭頂骨の一部はルシフェラーゼ活性検出キット(Piccagene)によりルシフェラーゼ活性を、一部は全RNAを抽出後リアルタイムPCRにより骨吸収性因子(TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、COX-2)およびGAPDHのmRNAを定量した。mRNA相対量はGAPDH値により補正した。

統計学的には群間の比較にはANOVAを用い、相関の検討には相関分析を用いた。いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

3. MIF-DNA ワクチンの開発

1) MIF-破傷風毒素発現プラスミドの作製

マウスMIFの第2ループ領域を既知のThエпитープで置換した改変マウスMIFを以下のように設計し作成した。マウスMIF cDNAをpCAGGS哺乳動物発現ベクターにクローニングした[免疫学的に活性のあるMIF抗原を作成するため、第2ループ領域を破傷風毒素のTヘルパー(Th)エピトープの配列に置換した。まず、マウスMIFの第2ループをコードする領域、則ちアミノ酸32-37(GKPAQY)、を取り除いてここにEcoRIサイトを導入した。次にこれらをEcoRIで消化して連結反応を行い、これを鋳型としてプライマー-MIF(U)とMIF(L)を使ってPCRを行った。得ら

れたDNAをpCAGGSにクローニングしMIFの第2ループ領域をEcoRIサイトに置換した変異MIF発現ベクターを得た。このサイトにEcoRI認識配列を両端に持つ破傷風毒素P30のcDNAを挿入した。TTXを組み込んだ改変MIF発現プラスミド(pMIF/TTX)の精製はアルカリ融解法と2度のCsCl密度勾配超遠心法により行った。

2) MIF/TTXの試験管内での発現

野生型MIFあるいはpMIF/TTXをCOS-7細胞にトランスフェクション試薬Effecten(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて導入した。24時間後の細胞のライセートをSDSポリアクリルアミド電気泳動してPVDF膜にブロッティングし、ウサギ抗MIF抗体と反応させ、ケミルミネッセンス・システムを用いてMIFタンパク質を検出した。

3) DNAの筋肉注射とエレクトロポレーション

エレクトロポレーション(電気穿孔法)による筋肉への遺伝子導入は基本的にAiharaらの方法にて行った。各マウスは、合計50 μ gの裸のプラスミドを投与し、血中の抗MIF抗体価および抗体の抗原特異性をELISAおよび競合的ELISAにて評価した。また、pMIF/TTX DNAワクチン投与によりマウス内で産生された抗MIF抗体が同様の抑制効果があるかを調べた。Balb/cマウス(4週齢, ♀)にpMIF/TTXワクチンもしくはpCAGGS(コントロール)を一回投与して6週後、それぞれのマウスはLPS(0111:B4, 1 μ g/ml)とD-ガラクトサミン(60mg/ml)の混合物200 μ lを静脈内投与した。1.5時間毎に尾静脈から血液サンプル(5 μ l)を採取し、TNF- α の血清中濃度をELISAにて測定した。

C. 研究結果

1. 摩耗粉刺激によるマウス頭頂骨骨吸収モデル

チタニウム微粒子を散布7日において、炎症性線維組織の過形成がチタニウム微粒子と頭頂骨の間に観察された(図1-1 A, B)。これら炎症性線維組織内にはMIF陽性細胞(図1-1 C, D)およびTRAP陽性である破骨細胞が多数認められた(図1-1 E, F)。

炎症性サイトカインのmRNAの発現に関してはsham手術後の標本と比較し、チタニウム微粒子投与後の頭頂骨ではMIF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANKLの遺伝子発現が有意に亢進していた増加した(図1-2)。

2. 摩耗粉刺激によるマウス頭部発光モデル

ポリエチレン粒子5mg 負荷後7日目のマウスの頭頂骨を組織学的に検討したところ、中央部前額断面像において矢状縫合部を中心とした線維性の肉芽組織の形成を認め、これは主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴っていた(図2-1)。ポリエチレン摩耗粉負荷後7日目にバイオイメージングで検討したところ、頭部に化学発光を認めた。定量評価では2mg以上の負荷により発光量は有意に増加し、5mg 投与群が最も発光量が多かった(図2-2)。また5mg 負荷後経時的に発光量を追跡したところ、sham 群と比べ負荷後3日目より発光量は有意に増加し、発光量は負荷後7日目で最大であった(図2-3)。

次に、経時的に化学発光を定量した後、頭頂骨を摘出し、矢状縫合にて縦に2分割し一方よりルシフェラーゼ活性を検出、また一方より全RNAを抽出して骨吸収性サイトカイン mRNA 定量を行った。IVIS による化学発光の定量値と実際の頭頂骨のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認め($r=0.833, n=19, p<0.0001$)、イメージング定量値はルシフェラーゼ活性を反映していることが確かめられた(図2-4)。

骨吸収性因子の mRNA は、すべて経時的に有意な上昇を示した(図2-5)。発現量のピークは、TNF- α で負荷後10日であり、IL-1 β 、RANKL、およびcox-2では負荷後8日目であった。これら骨吸収因子の mRNA 発現量と化学発光のイメージング定量値の相関を検討したところ、相関係数および p 値は TNF- α ($r=0.842, p<0.0001$)、IL-1 β ($r=0.855, p<0.0001$)、RANKL($r=0.694, p<0.001$)、および COX-2 ($r=0.712, p<0.0005$)と、いずれも正の相関を認め、化学発光の強さは骨吸収因子 mRNA 発現量を反映することが示された(図2-6)。

3. pMIF/TTX ワクチンの構築とその試験管内発現

マウス MIF の第二ループ領域を破傷風毒素(TTX) P30 の外来性 Th エピトープで置換した DNA ワクチンを作製した。MIF の3次元構造に基づいて第二ループ領域(アミノ酸番号32の Gly から37の Tyr)を TTX エピトープの挿入箇所を選んだ。その理由としては、この領域の置換は他のループに比べて三量体 MIF 複合体の4次構造と抗原性にあまり影響しないと考えられたからである。MIF と TTX のキメラ cDNA を作成して発現プラスミド pCAGGS にクローニングした。この

コンストラクトが一時的にトランスフェクトされた COS-7 細胞で正しい蛋白を作り出すかどうか調べた。MIF/TTX キメラ蛋白は SDS 電気泳動上で野生型 MIF と似た移動度を示した。しかも、それは野生型 MIF に対して作られたウサギ抗体により認識した。このように、外来性 Th エピトープの挿入は、その分子の発現あるいはその MIF ドメインの抗原性に変化を与えなかった。

4. pMIF/TTX ワクチン接種による抗 MIF 抗体の産生と LPS による血清 TNF- α の増加抑制

pMIF/TTX DNA ワクチンが正常な MIF を認識するポリクローナル抗体を誘導するか否かを調べた。このために、Balb/c マウスの両足の前頸骨筋に0.9%生理的食塩水に溶解した50 μ g の野生型 MIF, pMIF/TTX, あるいはベクターDNA をエレクトロポレーション法で接種した。ワクチン接種から4週後に pMIF/TTX 接種マウスは正常 MIF に反応する自己抗体を持つようになった。これとは対照的に、野生型 MIF ワクチンとベクターのみのワクチンは12週後でも MIF に反応する抗体を産生しなかった。これらの差は、導入した外来性 TTX Th エピトープは T 細胞が自己蛋白を認識するように組み込んであることによる。そのため、pMIF/TTX ワクチンを導入したマウスにおいては MIF 自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができたと考えられる。

次に、pMIF/TTX DNA ワクチンによって産生された抗 MIF 抗体が正常マウス MIF との結合に関して中和活性を持つ抗 MIF モノクローナル抗体と競合するかどうかを調べた。競合的 ELISA の結果、ワクチン接種を受けたマウス血清のポリクローナル抗体をリコンビナントマウス MIF と前もって反応させておくと、抗 MIF 中和モノクローナル抗体 XIV143 のリコンビナントマウス MIF への結合を阻害した。従ってワクチン接種により誘導された抗体は確かに MIF に対する特異性を持つこと、さらにこの抗体が中和活性を持つという可能性が示唆された。

抗 MIF ポリクローナル抗体でマウスを前処置しておくと、後で LPS を静脈注射して誘導される血清 TNF- α のレベルが効果的に抑制されることが報告されている。そこで pMIF/TTX ワクチン誘導抗 MIF 抗体が同様の効果を持つかを調べた。pMIF/TTX で一度ワクチン接種を受けたマウスにその6週後に LPS を静脈注射し

た時、血清 TNF- α のレベルはベクターDNA を前処置した LPS 投与マウスよりも有意に低かった。これらの結果から、pMIF/TTX DNA による免疫は正常 MIF を特異的に認識する抗体を産生し、MIF の生物活性を中和している可能性が考えられた。

D. 考察

摩耗粉により生じるオステオライシスに関する評価実験系として、in-vitro ではマクロファージなどの培養細胞に摩耗粉を添加して培養上清中の骨吸収性サイトカイン濃度を計測するなどの手法が主である。また小動物を用いた in-vivo のモデルではマウスやラットを用い、皮下エアパウチに骨片及び摩耗粉を置く、ないしは頭頂骨上に摩耗粉を負荷するなどして、骨に生じた溶解を組織学的に評価する系が主流である。近年オステオライシスを予防すべく摺動面の素材をポリエチレン以外の材料（セラミックや金属など）に替える、また予防薬としてビスホスホネート製剤や炎症性サイトカインに対するインヒビター（抗体やデコイレセプターなど）等を用いるなどの検討が in-vivo レベルで盛んになされている。こうした実験の評価は主として組織学的ないしは分子生物学的解析を行うのが一般的であり、たとえば経時的解析を行うにあたり、実験動物は多数屠殺せざるを得ず、また同一個体における経時的変化をリアルタイムに観察するのは困難であった。

In-vivo バイオイメージングは、生体内で起こる炎症・再生・血管新生そのほかあらゆる現象に関し、レポーター遺伝子の反応を応用して生きたままリアルタイムで可視化する技術であり、今日、各種疾患モデルの評価に、多岐にわたって用いられている。NF κ B/luc マウスは 2002 年に初めて報告されたが、関節炎、敗血症、紫外線誘発皮膚炎、腸炎などの評価に用いられた実績があり、炎症の評価系として極めて有用であると思われる。

また、in vivo マウス頭頂骨骨吸収モデルを用いて、チタニウム微粒子投与による骨破壊誘発時に MIF の過剰発現が出現していることを初めて報告した。Lind らは polymethylmethacrylate およびチタニウム微粒子投与によりヒトマクロファージにおける in vitro での MIF の発現が亢進することを報告している。また、我々は種々の炎症性の病態において MIF は IL-1 や TNF- α などのサイトカインカスケ

ードの上流に位置することを明らかにしている。したがって、以上の in vivo ならび in vitro の所見は MIF が人工関節後に生じる微粒子に由来する骨破壊における炎症性サイトカインカスケードに重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

そこで MIF の生物活性を中和する目的で pMIF/TTX DNA ワクチンを開発した。本研究で用いた Th 修飾ワクチン法は、疾患の発症に関わる自己蛋白に対して免疫反応を惹起する手法としての可能性を証明している。T 細胞が自己蛋白を認識するように外来性 Th エピトープを組み込むことによって、自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができる。DNA ワクチンは、生体内で抗原を発現させて液性および細胞性免疫反応を引き起こす新しい手段で、前臨床の動物モデルにおいて DNA ワクチンの有効性はよく証明されている。DNA ワクチンは、構築と精製が比較的簡単であることから組み換え蛋白ワクチンより有利である。さらにこのアプローチは、有望な蛋白免疫物質を速くスクリーニングするのに有用である。

Th エピトープを持たない C-C ケモカインをコードするネイキド cDNA が自己抗体を産生させ、実験的アジュバント脳炎の発症を効果的に阻止することが知られている[。Th エピトープの助けなしに自己抗体が産生されるのは、そのプラスミド内の非メチル化 CpG モチーフのようなオリゴヌクレオチド配列が免疫アジュバントとして働き、それが抗原特異的免疫反応を促進するためと考えられる。しかし、Hertz らは、修飾されていないマウス野生型 IL-5 cDNA は抗体を産生させないと報告しており[、これは本研究でもマウス野生型 MIF cDNA は自己抗体を作り出さないことと一致している。このように、Th エピトープの適切な選択と cDNA の適切な箇所への挿入は効果的な DNA ワクチンの構築を成功させる鍵となったものと考えられた。さらに、DNA の運搬と DNA ワクチンの効果はエレクトロポレーションで増強される。Selby らは筋肉内にプラスミドを注射されたマウスは、免疫にエレクトロポレーションが使われた時、ルシフェラーゼの発現で 7.3 倍、抗体価で 8-20 倍増加することを示した。ワクチンマウス由来抗血清が抗 MIF 中和抗体を用いて行った MIF との競合的 ELISA において活性を示したことから、ワクチンによって MIF 活性を中和する抗体が

誘導されたこと、さらに LPS 刺激による血清 TNF- α レベルに対するワクチンの抑制効果はこの抗体誘導によってもたらされたことが考えられた。

本 Th 修飾 MIF-DNA は種々の MIF が主座となる病態解明の解析に有用となるものと考えられた。したがって、磨耗微粒子によって生じるオステオライシスモデルに対し、Th 修飾 MIF-DNA を用いてオステオライシスを抑制することは実験的には可能とされているが、このような薬物治療効果をイメージングにて観察することが可能かを検討中である。今後さらに研究を進め、この系が磨耗粉誘発性オステオライシスの評価・スクリーニングにどの程度有用であるか見極める必要がある。

E. 結論

磨耗微粒子によって生じるオステオライシスのモデルにおいて、磨耗粉負荷により生じる炎症反応の可視化を目指し、NF κ B/luciferase トランスジェニックマウスを用いたバイオイメージングを行った。ポリエチレン磨耗粉負荷により同マウスの頭部は経時的に化学発光を呈し、この発光は7日をピークに漸減した。この発光はルシフェラーゼ活性と正の相関を示し、実際のルシフェラーゼ活性を反映していることが示された。さらにこの発光は各種の骨吸収因子 (TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、COX-2) の mRNA 発現量とも正の相関を示し、この系において検出される化学発光の強さは骨吸収因子の mRNA 発現量をも反映することが示された。この系を用いることで、磨耗粉誘発性オステオライシスにおける分子メカニズムの解析や予防・治療効果の検討への応用が期待できるものと考えられた。さらにチタニウム微粒子によるマウス頭頂骨骨吸収モデルを用いて、MIF が微粒子に由来する骨破壊における炎症性サイトカインカスケードに重要な役割を担っていることを明らかにし、ヘルパーT エピトープをコードしたオリゴヌクレオチドをマウスMIF のcDNA シークエンスに導入した MIF デオキシリボ核酸 (DNA) ワクチンを開発した。In vivo でエレクトロポレーション法により MIF デオキシリボ核酸 (DNA) を投与したマウスでは LPS 投与により惹起される血清中 TNF- α の上昇が抑制された。これらの結果より Th 修飾 MIF-DNA は MIF が主座となる種々の病態解明に有用と考えられ、磨耗微粒子によって生じるオステオライシス

モデルに対しする応用の可能性が期待できるものと考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

- 2) Hayashi R, Kondo E, Tohyama H, Saito T, Yasuda K.: In vivo local administration of osteogenic protein-1 increases structural properties of the overstretched anterior cruciate ligament with partial midsubstance laceration: a biomechanical study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Oct;90(10):1392-400.
- 3) Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Mizue Y, Hamasaka A, Abe R, Koyama Y.: A novel DNA vaccine-targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis. *Gene Ther.* 2008 Dec;15(23):1513-22.
- 4) Hayashi R, Kitamura N, Kondo E, Anaguchi Y, Tohyama H, Yasuda K: Simultaneous anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in chronic knee instabilities: surgical concepts and clinical outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Aug;16(8):763-9.
- 5) Onodera S, Oshima S, Nishihira J, Yasuda K, Tohyama H, Irie K, Koyama Y.: Active immunization against macrophage migration inhibitory factor using a novel DNA vaccine prevents ovariectomy-induced bone loss in mice. *Vaccine.* 2008 Feb 6;26(6):829-36.
- 6) Miyatake S, Tohyama H, Kondo E, Katsura T, Onodera S, Yasuda K.: Local administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits deterioration of mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. *J Biomech.* 2008;41(4):884-9.
- 7) Tohyama H, Yasuda K, Uchida H, Nishihira J.: The responses of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalised patellar tendon to IL-1beta are different from those of normal tendon fibroblasts. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 Sep;89(9):1261-7.
- 8) Okamoto S, Tohyama H, Kondo E, Anaguchi Y,

- Onodera S, Hayashi K, Yasuda K.: Ex vivo supplementation of TGF-beta1 enhances the fibrous tissue regeneration effect of synovium-derived fibroblast transplantation in a tendon defect: a biomechanical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2008 Mar;16(3):333-9.
- 9) Kondo E, Yasuda K, Tohyama H.: In vivo effects of partial electrothermal shrinkage on mechanical properties of the anterior cruciate ligament in rabbits. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2007 Nov;22(9):1037-44.
 - 10) Kondo E, Yasuda K, Ichiyama H, Azuma C, Tohyama H.: Radiologic evaluation of femoral and tibial tunnels created with the transtibial tunnel technique for anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 2007 Aug;23(8):869-76.
 - 11) Azuma C, Tohyama H, Nakamura H, Kanaya F, Yasuda K.: Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration of collagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. *J Biomech.* 2007;40(10):2184-90.
 - 12) Maeda E, Noguchi H, Tohyama H, Yasuda K, Hayashi K.: The tensile properties of collagen fascicles harvested from regenerated and residual tissues in the patellar tendon after removal of the central third. *Biomed Mater Eng.* 2007;17(2):77-85.
 - 13) Onodera S, Ohshima S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Iwakura Y, Matsuda I, Minami A, Koyama Y.: A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):521-30.
 - 14) Yoshikawa T, Tohyama H, Katsura T, Kondo E, Kotani Y, Matsumoto H, Toyama Y, Yasuda K. Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on mechanical characteristics of the semitendinosus tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med.* 2006 Dec;34(12):1918-25.
 - 15) Ikema Y, Tohyama H, Yamamoto E, Kanaya F, Yasuda K. Ex vivo infiltration of fibroblasts into the tendon deteriorates the mechanical properties of tendon fascicles but not those of tendon bundles. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2007 Jan;22(1):120-6.
 - 16) Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Minami A, Tohyama H. The effect of intraosseous graft length on tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction using flexor tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Nov;14(11):1086-93.
 - 17) Tohyama H, Yasuda K, Uchida H.: Is the increase in type III collagen of the patellar tendon graft after ligament reconstruction really caused by "ligamentization" of the graft? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Dec;14(12):1270-7.
 - 18) Onodera S, Sasaki S, Ohshima S, Amizuka N, Li M, Udagawa N, Irie K, Nishihira J, Koyama Y, Shiraishi A, Tohyama H, Yasuda K.: ransgenic mice overexpressing macrophage migration inhibitory factor (MIF) exhibit high-turnover osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2006 Jun;21(6):876-85.
 - 19) Yoshikawa T, Tohyama H, Enomoto H, Matsumoto H, Toyama Y, Yasuda K.: Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in patellar tendon grafts in the early phase after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Sep;14(9):804-10.
 - 20) Yasuda K, Kondo E, Ichiyama H, Tanabe Y, Tohyama H.: Clinical evaluation of anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction procedure using hamstring tendon grafts: comparisons among 3 different procedures. *Arthroscopy.* 2006 Mar;22(3):240-51.
 - 21) Katsura T, Tohyama H, Kondo E, Kitamura N, Yasuda K.: Effects of administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 and anti-TGF-beta1 antibody on the mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon *J Biomech.* 2006;39(14):2566-72..
 - 22) Ju YJ, Tohyama H, Kondo E, Yoshikawa T, Muneta T, Shinomiya K, Yasuda K.: Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament in rabbits. *Am J Sports Med.* 2006 Jan;34(1):84-91.

23) Tohyama H, Yasuda K, Beynnon BD, Renstrom PA.: Stabilizing effects of ankle bracing under a combination of inversion and axial compression loading. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006 Apr;14(4):373-8.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

24) 学会発表

無し

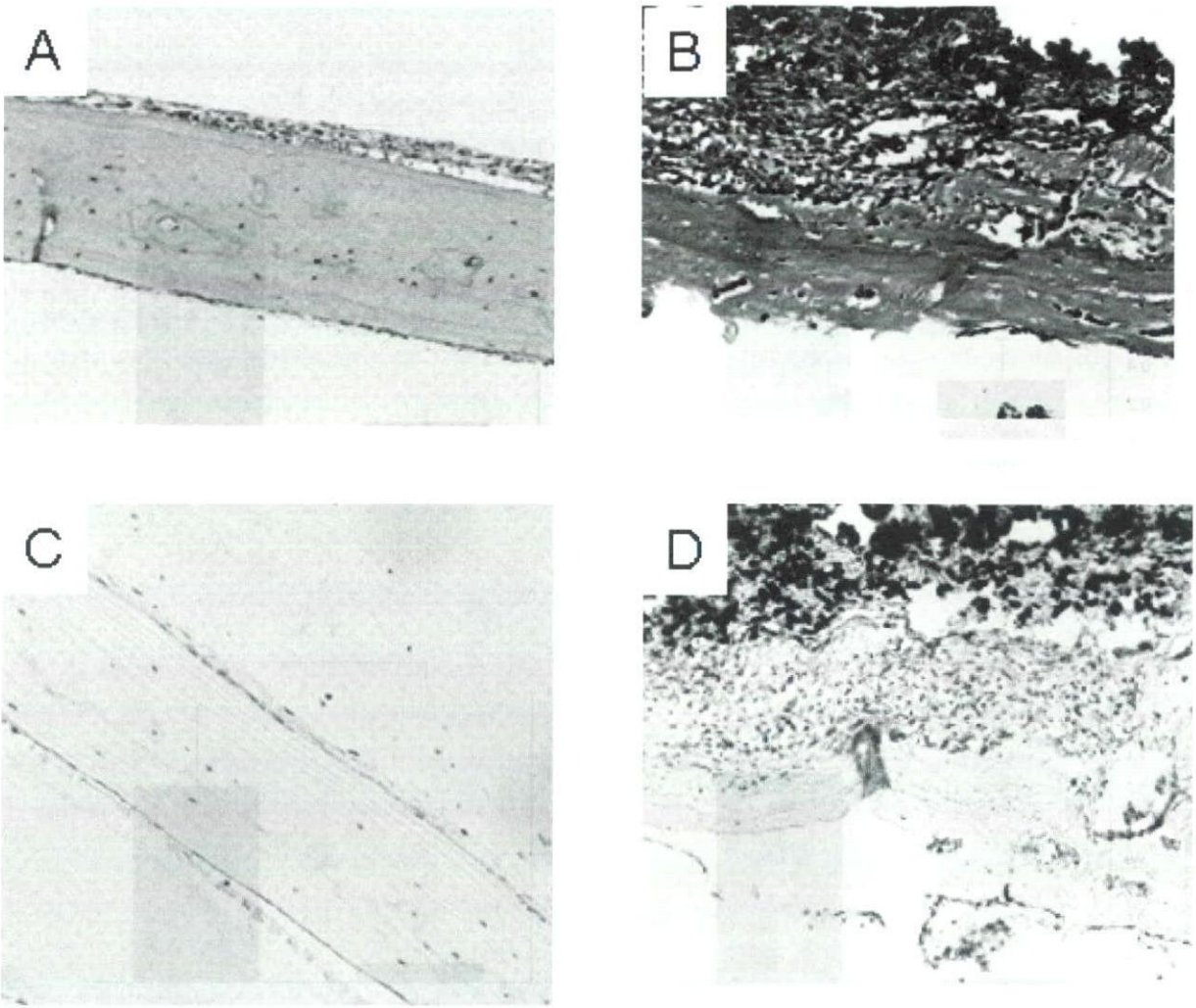


図1-1 チタニウム微粒子を散布7日におけるラット頭頂骨における組織像 (A) Sham手術後(HE 染色 x100)、(B) チタニウム微粒子散布後 (HE 染色 x100)、(C) Sham手術後 (MIF 免疫染色 x100)、(D) チタニウム微粒子散布後 (MIF 免疫染色 x100)、(E) Sham手術後 (酒石酸フォスファターゼ染色 x100)、(F) チタニウム微粒子散布後 (酒石酸フォスファターゼ染色 x100)

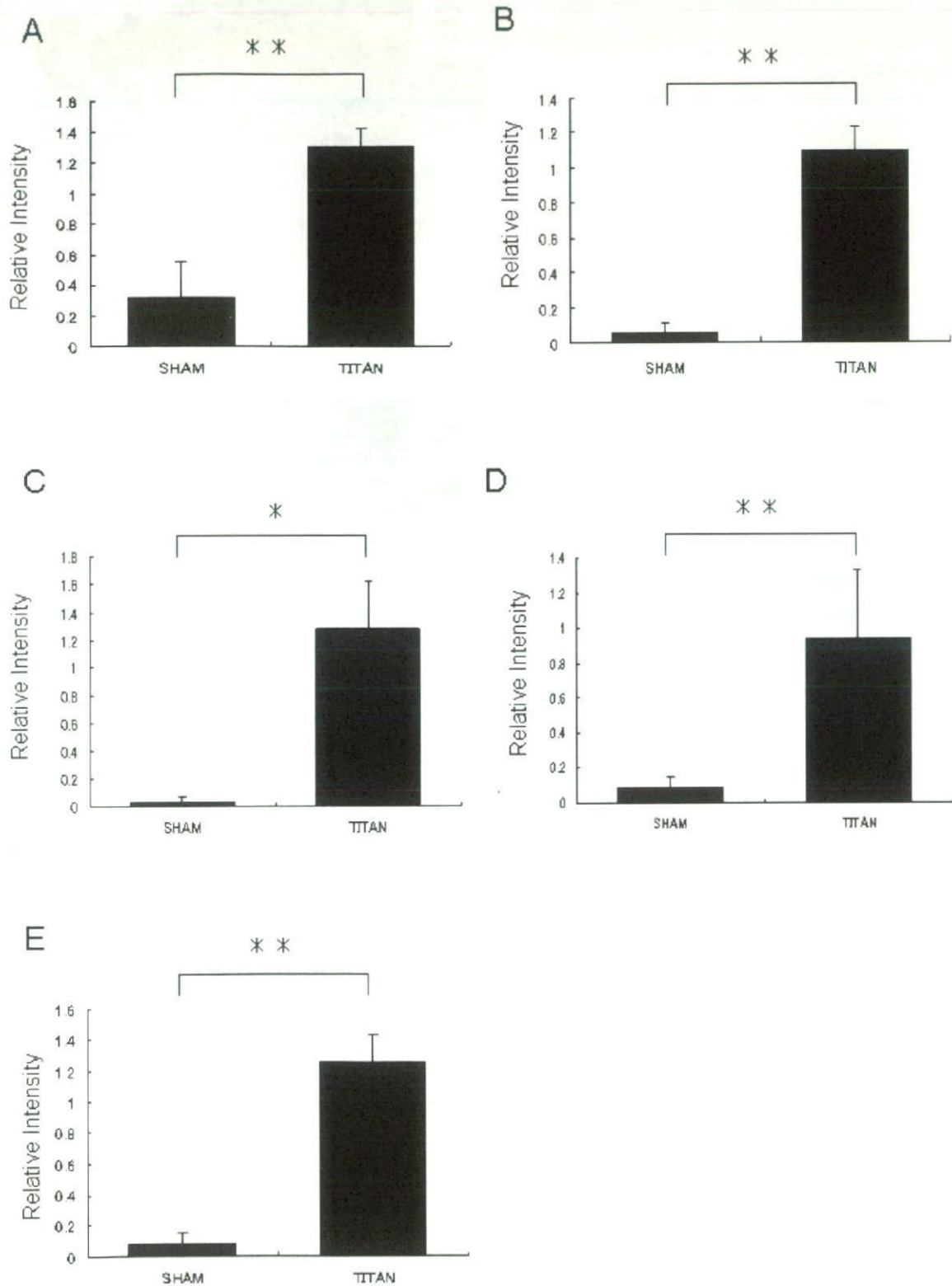


図1-2 Real time PCR によるチタニウム微粒子を散布7日におけるラット頭頂骨における炎症性サイトカインの遺伝子発現の定量的検討。(A) MIF, (B) TNF- α , (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) RANKL (n=4-6 per each bar, Mean \pm SD, * p<0.05, ** p<0.01).

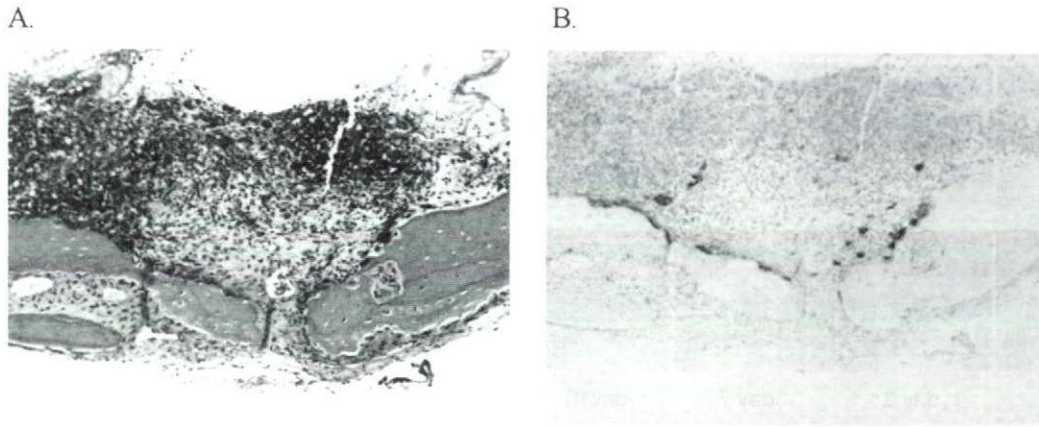


図 2-1 ポリエチレン粒子 5mg 負荷後 7 日目のマウスの頭頂骨の組織学的検討。A. HE : 矢状縫合部を中心とした線維性の肉芽組織の形成を認める。B. TRAP 染色 : この肉芽組織は主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴う。

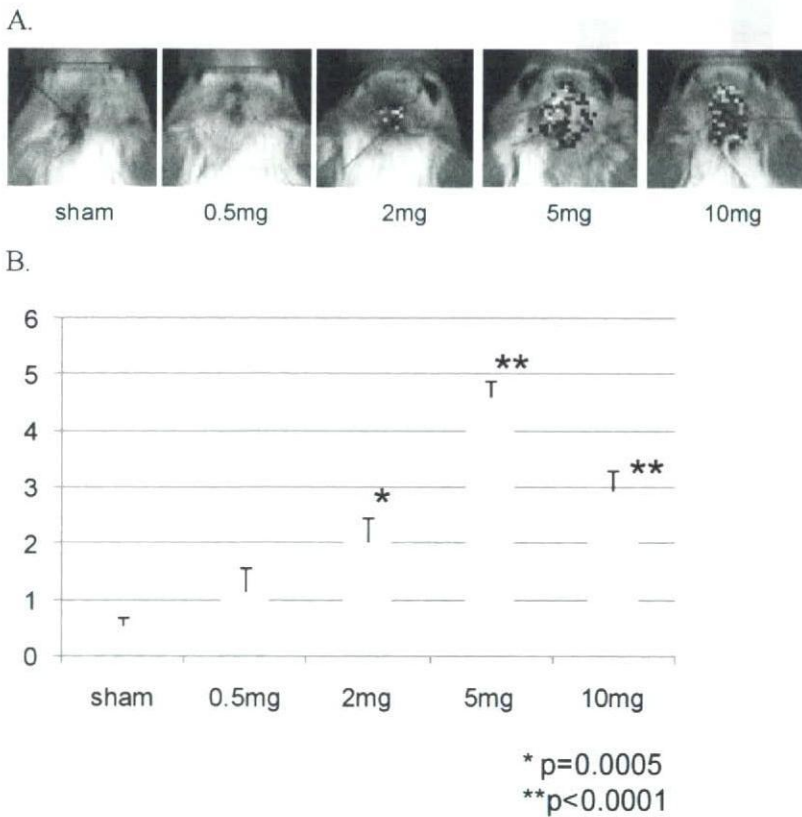
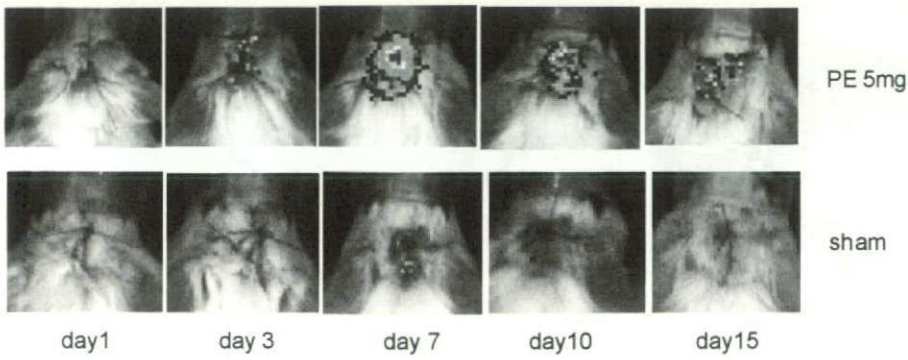


図 2-2 ポリエチレン摩耗粉負荷後 7 日目におけるバイオイメージングでの検討。A. ポリエチレン 2mg 以上の負荷により頭部に明瞭な化学発光を認める。B. ポリエチレン 2mg 以上の負荷により有意な発光量の増強を認め、5mg 負荷群で発光量が最大である。

A.



B.

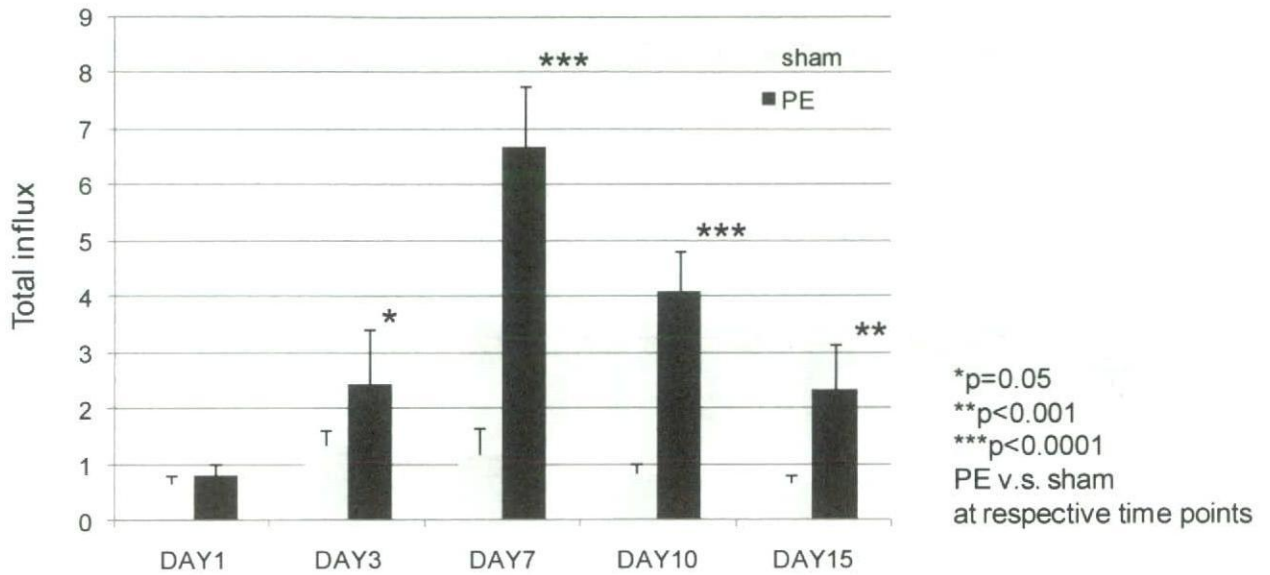


図 2-3 ポリエチレン摩耗粉 5mg 負荷後の経時的変化のバイオイメージングによる検討。A. 負荷後 3 日より明瞭な化学発光を認め、7 日目で最大に達し、以後漸減する。Sham 群では 7 日目にわずかな発光を認めるのみである。B. sham 群と比べ負荷後 3 日より有意な発光量の増強を認め、発光量は負荷後 7 日目で最大に達し、以後漸減するが、15 日目でも有意な増強を示す。

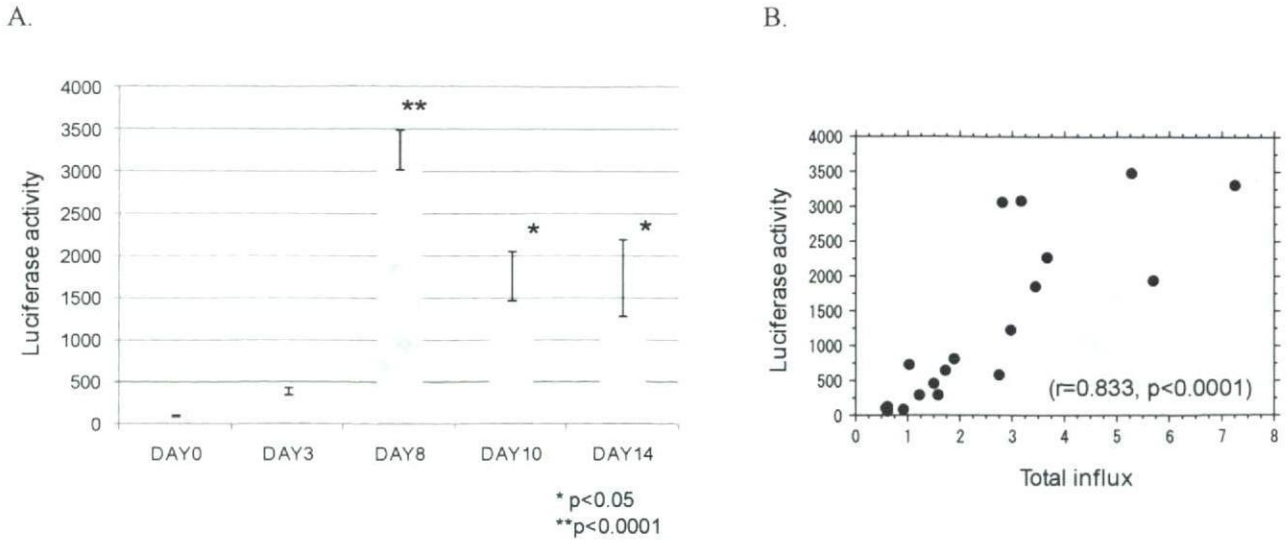


図 2-4 摘出頭頂骨のルシフェラーゼ活性。A. ルシフェラーゼ活性はポリエチレン粉負荷後 8 日目に有意に増大し、以後漸減する。B. 化学発光の定量値と実際のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認める ($r=0.833, n=19, p<0.0001$)。すなわちイメージングでの化学発光定量値は実際のルシフェラーゼ活性を反映している。

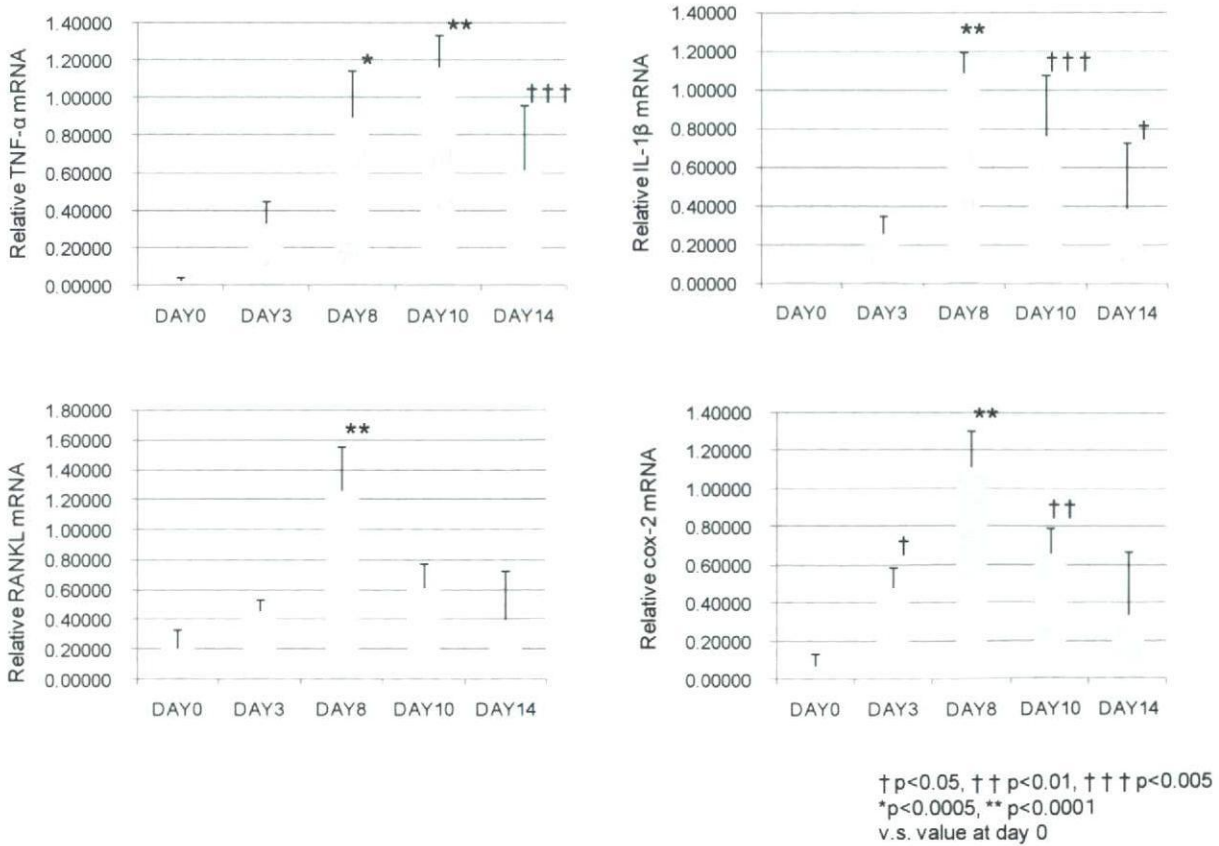


図 2-5 ポリエチレン 5mg 負荷後の頭頂骨における骨吸収性因子の mRNA の経時的変化。測定した骨吸収因子はすべて経時的に有意な上昇を示す。発現量のピークは、TNF- α で負荷後 10 日であり、IL-1 β 、RANKL、および COX-2 では負荷後 8 日目である。

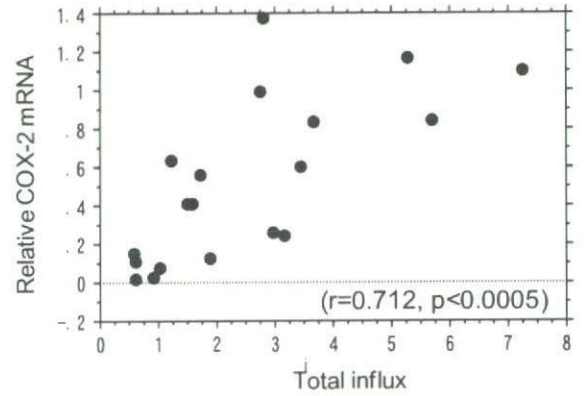
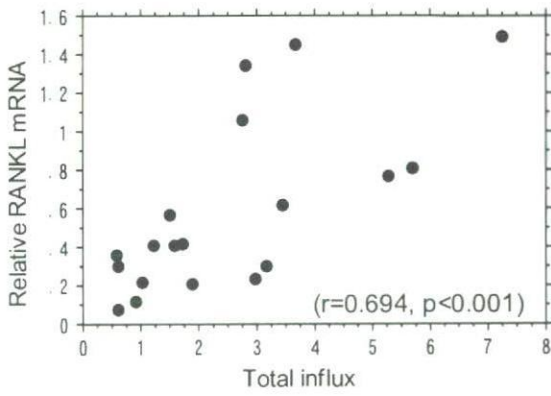
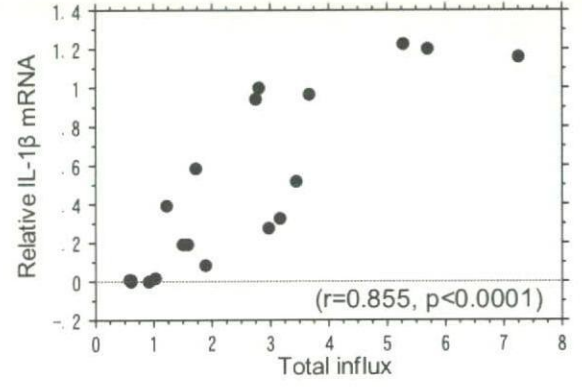
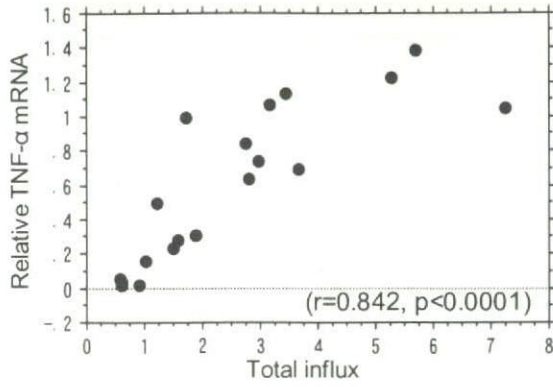


図 2-6 骨吸収因子の mRNA 発現量と化学発光のイメージング定量値の相関。相関係数および p 値は TNF- α ($r=0.842, p<0.0001$)、IL-1 β ($r=0.855, p<0.0001$)、RANKL ($r=0.694, p<0.001$)、および COX-2 ($r=0.712, p<0.0005$)であり、いずれも正の相関を認める。すなわち化学発光の強さは骨吸収因子 mRNA の発現量を反映している。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

チタン合金の腐食生成物とその生体為害性に関する研究

分担研究者 浅岡憲三 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部教授
研究協力者 日浅雅博 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部助教
研究協力者 宇尾基弘 北海道大学歯学研究科准教授

研究要旨 生体内移植器具は、先端医療の中で重要な役割を果たしている。現状の器官を対象としたデバイスのみならず生体組織や細胞をターゲットにしたマイクロ・ナノマテリアルを新たに開発することが革新的低侵襲医療、予防医学の普及に欠かせない。この目的を達成するために、金属系のマイクロバイオマテリアルとしてアパタイト被覆マイクロチタン粒子の作製とチタン微粒子焼結体を作製することを試みた。その結果、治療に有効に寄与するタンパクや薬剤をアパタイト修飾チタンマイクロ粒子に含浸できる素材が開発できた。

次いで、歯科治療、骨代替材料、脈管系治療材料・機器にチタンおよびチタン合金が利用され、低侵襲医療に不可欠の材料になっていることを念頭に、チタン系医用合金の水素脆性による機能低下、遅れ破壊およびそうした現象に付随して生じる微粒子とその生体安全性評価について調べた。チタン合金の機能低下速度が、化学的環境、応力あるいはひずみの状態との関係で決まることを定量的に測定した。その結果、チタン合金の水素吸蔵の過程で発生する水素化物の腐食生成物であるマイクロ・ナノ粒子が移植デバイス周囲の生体組織の悪性腫瘍、粘膜疾患の発症に関与する可能性が危惧された。そこで、疑似体液の中で電気化学的にNi-Ti合金に対し水素が関与する応力腐食の加速試験を行い、その生成微粒子の状態分析、ならびに、その生体に対する為害性について評価を行った。その結果、Ni-Ti合金から生成した微粒子は、 TiO_2 と $Ni(OH)_2$ より構成されていた。細胞培養実験から、このNi-Ti合金腐食微粒子はマクロファージにより貪食されTNF- α の産生を促進した。マクロファージは異物処理後細胞死が誘導されるが、Ni-Ti合金腐食微粒子は骨芽細胞に対しても細胞増殖を阻害しアポトーシスを誘導した。

以上の研究を総括した結果、チタンおよびチタン合金を医用材料として用いるにあたっては、合金の使用環境と寿命、安全性の評価法に関するガイドラインの構築が重要であると結論した。

A. 研究目的

チタン系合金では、水素トライボロジーと水素脆性が問題になっている。生体材料としての応用分野では、前者は人工関節の摩耗粉の問題として、後者はデバイスの遅れ破壊、機能低下の問題として臨床

報告されている。人工骨におけるインプラントの脱落については、骨とインプラントとの弾性係数など力学的な性質の著しい違いや材料の構造設計が原因であるとの報告が多くなされてきた。しかし、最近では、摩耗粉の生体反応として捉える考え方が、一般的になりつつある。

口腔内、皮下、脈管系器官内など生体内環境はpH

や化学種が多様である。同時に、矯正用線、歯冠補綴物、人工歯根（インプラント）ステント、カテーテルなどの歯医用器材は応力やひずみが加わった状態で利用されることが多い。こうした条件の下では、耐食性に優れるチタンおよびチタン合金も応力腐食割れによる遅れ破壊が問題になり、その克服法あるいは材料使用のガイドラインの構築が課題になっている。とくに、Ni-Ti 合金は、超弾性や形状記憶機能をもつことから、医用材料として注目されているが、水素吸蔵により腐食することが知られている。そして合金の腐食により生じる溶出金属イオンと、それに付随して生成される微粒子は、金属アレルギーをはじめとする粘膜疾患や発癌の原因因子となりうる。そこで本研究では、Ni-Ti 合金より得られた腐食生成物微粒子の状態分析を行い、その生体に対する為害性について検討した。

B. 研究方法

白金を陽極に合金試料を陰極として直流電気を流すと、試料表面から水素が発生する。チタン系合金は水素吸蔵合金であるところから、合金はこの水素の一部を取り込む。そこで、電流または電圧とチャージ時間を制御することにより、合金中への水素チャージ量が制御できる。例えば、Ni-Ti 超弾性合金 (55 mass %Ni-Ti) を試料として、流す電流を $1\text{A}/\text{m}^2$ から $10\text{A}/\text{m}^2$ まで変化させて、24 時間チャージした後に合金を引張試験すると、図 1 に示すように、顕著な合金の機械的性質の低下が測定される。本研究では、生体内で利用されたときの、合金の応力（ひずみ）状態と機能劣化速度の関係、生体内に腫瘍や炎症があり合金周囲の化学的環境が変化したときの合金の機能低下速度について検討した。

実験 1 : Ni-Ti 超弾性合金 (55 mass %Ni-Ti) の生体内での機能劣化を調べる目的で、0.9%NaCl 溶液中で 2 時間 $10\text{A}/\text{cm}^2$ の電流を流して水素をチャージした。合金を大気中に 10 日間放置した後に、昇温脱離分析法による水素量の測定、X 線回折法 (XRD)、引張試験により、合金中の水素量、合金表面の生成物、機械的性質を調べた。

実験 2 : 実験 1 と同じ合金を、炎症による化学種の

変化を想定し、0.9 %NaCl 溶液に 1% H_2O_2 を加えた溶液に浸漬した。溶液中の合金に一定応力を負荷し、腐食破断するまでの時間を測定した。破断面の観察、腐食破面の解析、溶出イオンの測定から、合金の機能劣化を評価した。

実験 3 : 実験 1 と同じ合金を試料として、0.9 %NaCl 溶液中で 10V の電圧で電流を 24 時間流し、合金に水素をチャージした。チャージ後の水溶液中に生じた腐食生成物の粒度を分析し、Ni-Ti 合金の腐食により、イオンの溶出と生成微粒子の粒度を調べた。

実験 4 : マクロファージ貪食試験

α -MEM 10%FBS で維持したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に、細胞数に対し 1:100 となるよう腐食生成物数を調整し培地中に添加した。24 時間培養後、Wright-Giemza 染色を行い顕微鏡下で観察を行った。

実験 5 : Ni-Ti 腐食生成物の細胞増殖への効果

RAW264.7 細胞、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に対し腐食生成物を培地中に添加し 48 時間培養を行い MTT assay にて細胞数の計測を行った。

実験 6 : フローサイトメトリー

腐食生成物を添加し 24 時間培養後、培養細胞を回収した。回収した細胞は PBS で 2 回洗浄後、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (abcam) にて Annexin V 陽性細胞の検出を行った。

実験 7 : ウェスタンブロット

腐食生成物を添加し 24 時間培養後、培養細胞を PBS で 2 回洗浄後、RIPA buffer にてタンパク質を抽出、以下通法に従いバンドの検出を行った。

C. 研究結果

実験 1 : 合金中の水素量は、水素チャージ前は 10 mass ppm であった。水素をチャージした直後では 212 ppm、24 時間放置後でも 204 ppm であった。Ni-Ti 合金表面の XRD パターンから、水素をチャージすることにより、合金表面に水素化物が形成されたが、

10 日間大気中に放置した試料では水素化物が消失していた。この結果から、大気中に放置することで、水素が合金内部に拡散していることがわかった。

Ni-Ti 超弾性合金の変形は、ステージⅠ：母相 (B2) の弾性変形、ステージⅡ：マルテンサイト変態、ステージⅢ：マルテンサイト (B19') の弾性変形、ステージⅣ：マルテンサイトの塑性変形よりなる。こうした各ステージの変形への水素の影響について調べた結果を図2に示した。すなわち、各変形ステージまで合金にひずみを与え、その後除荷した。その結果、水素チャージした直後の試料では、マルテンサイト変態終了後の塑性変形中に合金は破断したが、大気中に放置し水素が拡散すると、超弾性の性質が復元することが確認できた。

実験2：1% H₂O₂ が加えられた 0.9% NaCl 溶液中で、Ni-Ti 超弾性合金に一定応力を負荷し、合金の腐食寿命を測定した結果を図3に示した。ここでの結果から、マルテンサイト相の合金は応力腐食寿命が短くなることがわかった。低応力の場合には、かなりの程度腐食が進行してからクラックの進展が生じることが推定され、高応力が負荷されたときには、局部的な腐食によるクラックの発生が進展して破断に至っていることがわかった。腐食領域以外の破面は延性破面に近い様相を呈していた。低応力で破断した試料では、クレータ上の腐食域が観察され、大動脈中に移植された Ni-Ti 合金のステントで見られる腐食パターン (J Endovasc Ther 8(2001)248-253) によく似た様相であった。試料から溶出した Ni および Ti イオンの ICP での測定結果をから、Ni イオンが Ti イオンに較べ優先的に溶出していることがわかった。また、溶液浸漬後の XPS 解析からも Ni イオンの溶出が推定できた。ここでの溶液浸漬により合金表面の元素分布を AES で調べた結果からは、表面酸化膜が厚くなっていること、酸化膜中の Ni イオンが低くなっていることが明らかになった。

実験3：通電中の試料表面からは、水素が発生している。そして、停止後の試料表面には、溶液中で生じた腐食生成物が試料表面に付着してきた。時間の経過とともに腐食生成物は溶液中に飛散し、溶液中に微粒子が浮遊し始めた。その後、試料および電極を除去し、容器内で溶液を十分に攪拌して、腐食性

生物の粒度を測定した結果を図4に示した。ここで示されているように、溶液中には 10 nm ~ 100 nm の微粒子と μm および 100 μm 程度の大きな粒子が生じることがわかった。

実験4-7：Ti 及び Ni K-edge XANES スペクトルより、生理食塩水中での Ni-Ti 合金の電気分解により得られた腐食生成物微粒子は主として、TiO₂ と Ni(OH)₂ より構成されるものと推察された (図5)。

マクロファージ (Macrophage, MΦ) は白血球の一つであり死に至った細胞を消化するだけでなく、生体内に侵入した細菌、ウイルス等の異物を補食し抗原提示を行い、炎症をはじめとする免疫機能の中心的役割を担う細胞である。そこで腐食性生物をマクロファージ cell line RAW264.7 が貪食するかの検討と炎症性サイトカインの一つである TNF の産生への影響を ELISA 法で検討した。結果チタン合金腐食粉末の貪食像が確認され、また粒子数の用量依存的に TNF の産生が増加することが確認された (図6)。このことからチタン合金腐食粉末がマクロファージによる炎症の惹起に関与しうることが考えられた。また、マクロファージによる貪食のみならず、腐食生成物微粒子はマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に対し、細胞表面に接着する像が確認された。

次にチタン合金腐食粉末の細胞増殖への影響について、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞と骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞で MTT Assay を用い検討した。その結果、RAW264.7 細胞において、添加する腐食粉の用量依存的に細胞増殖を抑制したのと同様に、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞においても腐食粉の添加で、添加する腐食粉末数の用量依存的に細胞増殖を障害した。この結果からチタン腐食粉はマクロファージのみならず骨芽細胞に対しても何らかの細胞増殖への障害活性を有することが考えられた。

チタン腐食が細胞に対し細胞死を誘発するか否かを、フローサイトメトリーにて Annexin V の発現を解析することで検討した。その結果 RAW264.7 細胞では 14.9% から 19.3% へ腐食粉末の添加により Annexin V 陽性細胞の増加が認められ (図7上)、さらに MC3T3E-1 細胞においても同様に、10.5% から腐食粉末添加によって、18.7% と Annexin V 陽性細胞の増加を認めた (図7下)。このことからチタン腐食粉は、マクロファージによる貪食後の細胞死のみ

ならず、骨芽細胞に対してもそのアポトーシスを誘導することが予測された。

D. 考察

Ni-Ti 合金の物性の特徴を整理すると、Ni-Ti 合金は、温度に依存した相変態をする。すなわち、オーステナイト相の合金を冷却すると、マルテンサイト変態を生じ、マルテンサイト相となる。低温のマルテンサイト相の合金を加熱すると、逆変態し、オーステナイト相となる。マルテンサイト相の合金を変形し、オーステナイトに逆変態させると合金は変形前の形状に復帰することから、この合金は形状記憶合金と呼ばれている。

オーステナイト相の合金を引張るとある応力状態でマルテンサイト相変態が生じ、ひずみが一定の状態に変態が進行する。合金がマルテンサイト相になった後、合金は弾性変形そして塑性変形を生じて破断する。各ひずみの状態で力を除荷すると、ひずみが回復する。こうした変形が超弾性変形と呼ばれている。

こうした Ni-Ti 合金を医療の中で利用するには、生体安全性が重要な問題である。こうしたことから、多くの研究者によりイオンの溶出、生体親和性について調べられてきた。われわれは、世界ではじめて水素吸蔵合金であることに着目し、水素吸収と形状記憶、超弾性機能の低下、それにとまう腐食現象、腐食生成物の粒度、化学組成に着目した研究を展開した。こうした研究は、医療用機器として利用するときの寿命、破壊そして生体安全性評価の基本的問題である。そこで、生体内での合金機能の低下と付随して生じる腐食生成物とその生体安全性に焦点を絞り、研究を進めた。

その結果、細胞障害により誘発される細胞死が確認された。このプロセスを決定する過程にはおもに2つの経路が主要な役割を担う。1つはミトコンドリアを介する経路で Bcl-2 ファミリーがこのミトコンドリアを介する経路の主要な担い手である。Bcl-2 ファミリーには Bcl-2, Bcl-xL 等の抗アポトーシス因子、Bad, Bax, Bid 等のアポトーシス誘導因子がありこれらが複雑にクロストークすることで制御されている。もうひとつは FASL TRAIL TNF などのリガンドに対する受容体デスレセプターから caspase の自

己および、その下位の caspase の限定分解経路であり caspase についてもその分解活性を阻害する FLIP, XIAP, Mcl-1 等の抗アポトーシス因子により調節されている。そこで Ni-Ti 合金腐食粉末により誘導されるアポトーシスがどのようなシグナル経路を介するかを、MC3T3-E1 細胞に Ni-Ti 合金腐食粉末を添加し24時間培養後、蛋白を回収しウエスタンブロットで検討した。その結果、図8に示すように、cleaveされた caspase3, 8, 9の腐食粉末添加による発現上昇が確認され、それにつづく PARP の cleave が確認された。しかし Bcl-xL, Bcl-2, FLIP, Mcl-1, XIAP といった抗アポトーシス因子の発現には変化が認められなかった。このことから、チタン腐食粉末による骨芽細胞に対するアポトーシス誘導には caspase3, 8, 9 が関与することが考えられ、デスレセプターを介する経路、ミトコンドリア経路の双方が関与するものと予測される。しかしながら、これらの因子を調節するシグナル経路の上流の因子につきましては更なる検討が必要である。

E. 結論

Ni-Ti 超弾性合金は、生体内環境で水素が関与した機能劣化が生じる。この機能劣化は、合金の機械的性質の劣化、強度、寿命の低下をまねく。他方、こうした力学的性質の低下は合金表面の局部腐食と関係しており、局部腐食によりイオンの溶出、腐食生成物の生成を促進する。ここで、生じる微粒子はナノ、マイクロ粒子であり、この微粒子が細胞や組織と反応して粘膜疾患や癌を発症する可能性が危惧される。

本研究により、骨代替材料では生体親和性の評価が材料開発の重要な指針となるが、循環器、消化器系のバイオマテリアルの開発では免疫学的立場からの材料評価が重要な指針であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y Sakamoto, K Asaoka, M Kon, T Matsubara and K Yoshida: Porous titanium compacts as biomaterials for hard tissue replacement. *Porous Metals and Metal Foaming Technology (JIMIC4)*, pp.55-58, 2006
2. 坂本裕紀, 瀬崎英孝, 吉田憲一, 浅岡憲三: チタンの耐食性と機械的性質に及ぼす熱処理の影響. 日本歯科産業学会誌 20(2)

3-13, 2006.

3. K Yokoyama, T Ogawa, K Asaoka and J Sakai: Hydrogen Absorption of Titanium and Nickel-Titanium Alloys During Long-Term Immersion in Neutral Fluoride Solution. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 78B(1) 204-210, 2006.

4. T Ogawa, K Yokoyama, K Asaoka and J Sakai: Effects of moisture and dissolved oxygen in methanol and ethanol solutions containing hydrochloric acid on hydrogen absorption and desorption behaviors of Ni-Ti superelastic alloy. *Materials Science and Engineering A* 22(1-2) 218-226, 2006.

5. K Yokoyama, T Ogawa, K Asaoka and J Sakai: Fracture of sustained tensile-loaded Ti-0.2% Pd alloy in acid and neutral fluoride solutions. *Materials Science and Engineering A* 419(1-2) 122-130, 2006.

6. Y Sakamoto, K Asaoka, M Kon, T Matsubara and K Yoshida: Chemical surface modification of high-strength porous Ti compacts by spark plasma sintering. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 16(2) 83-91, 2006.

7. K Asaoka and K Maejima : Effect of surface oxide films on degradation of titanium, *Materials Science Forum*, Vol.539-543, pp.3649-3654, 2007

8. K Yokoyama, T Ogawa, K Takashima, K Asaoka, Sakai J: Hydrogen embrittlement of Ni-Ti superelastic alloy aged at room temperature after hydrogen charging. *Materials Science and Engineering A*, 466(1-2)106-113, 2007.

9. K Yokoyama, T Ogawa, A Fujita, K Asaoka, J Sakai: Fracture of Ni-Ti superelastic alloy under sustained tensile load in physiological saline solution containing hydrogen peroxide. *Journal of Biomedical Materials Research A* 82A(3)558-567, 2007.

10. 浅岡 憲三 : チタンのキャラクタリゼーションと生体内での遅れ破壊, *歯科材料器械* Vol.26, No.4, pp.334-339, 2007

11. K Asaoka: Effects of surface oxide films on hydrogen absorption and mechanical properties of titanium, *Dentistry in Japan*, Vol.43, pp.99-103, 2007

12. K Takashima, K Yokoyama, K Asaoka, Sakai J: Effects of potential on hydrogen absorption and desorption behaviors of titanium in neutral fluoride solutions. *Journal of Alloys and Compounds* 431(1-2)203-207, 2007.

13. K Yokoyama, M Tomita, K Asaoka, J Sakai: Hydrogen absorption and thermal desorption behaviors of Ni-Ti superelastic alloy subjected to sustained tensile-straining test with hydrogen charging. *Scripta Materialia* 57(5)393-396, 2007.

14. M Tomita, K Yokoyama, K Asaoka, J Sakai: Hydrogen thermal

desorption behavior of Ni-Ti superelastic alloy subjected to tensile deformation after hydrogen charging. *Materials and Engineering A*, 476, 308-315, 2008.

15. Asaoka K, Maejima K. Hydrogen-related degradation of mechanical properties of titanium and titanium alloys. *J ASTM Int.* (in Press)

16. Hosoki M, Bando E, Asaoka K, Takeuchi H, Nishigawa K. Assessment of allergic hypersensitivity to dental materials. *Biomed Mater Eng.* (in press)

2. 学会発表

1. 浅岡 憲三 : 生体内のチタンと水素, 材料における水素有効利用研究会, Vol.18, p27, 沖縄, 2006

2. 浅岡 憲三 : アバタイト修飾マイクロチタン粒子の開発, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, 札幌 2006

3. 浅岡 憲三: チタン摩耗粉・微粒子と体内動態, ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発研究班会議, 支笏湖, 2006

4. 浅岡 憲三 : 金属系バイオマテリアルの機能設計, 歯科における産学連携講演会、大阪, 2006

5. 浅岡 憲三 : 10年後の歯科医療への提言, — 歯科理工学と関連領域とのコラボレーション: 歯科理工学の立場から: 金属材料は —, *日本歯科理工学会近畿・中四国支部夏期セミナー*, 2006

6. 林 裕史, 吉田 憲一, 浅岡 憲三 : チタン粉末の比表面積とアバタイト修飾特性に関する研究, *日本歯科産業学会誌*, Vol.20, No.1, 57 頁, 北九州, 2006

7. 坂本 裕紀, 瀬崎 英孝, 吉田 憲一, 浅岡 憲三 : チタンの熱処理, 腐食と機械的性質に関する研究, *日本歯科産業学会誌* Vol.20, No.1, 56 頁, 北九州, 2006

8. 横山 賢一, 浅岡 憲三 : 中性フッ化ナトリウム水溶液に長時間浸漬した Ti 合金の水素吸収, *歯科材料器械* Vol.25, No.2, 174 頁, 東京 2006

9. 浅岡 憲三 : チタンと水素, *チタンと歯科臨床* Vol.4, No.1, 39 頁, 郡山, 2006

10. 藤原 江美, 今 政幸, 浅岡 憲三 : リン酸カルシウムセメント中へのストロンチウムアバタイトの導入, *日本バイオマテリアル学会大会予稿集* Vol.28, 東京, 2006.

11. K Asaoka and K Maejima : Effect of surface oxide films on degradation of titanium, *International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (THERMEC 2006)*, Vancouver, July 2006.

12. A Wada, K Yoshida and K Asaoka: Grinding efficiency of titanium

- by dental abrasive. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 65, Awaji, 2007.
13. E Fujihara, F Kawano, K Hamada and K Asaoka: Preparation of strontium-containing Hydroxyapatite bone cements mixed with strontium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 66, Awaji, 2007.
 14. Y Sakamoto, H Sezaki, K Yoshida and K Asaoka: Relationship between corrosion and mechanical properties of annealed titanium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 67, Awaji, 2007.
 15. Y Naito, D Nagao, K Hamada, K Asaoka and T Ichikawa: High formability of newly developing biomedical porous titanium. The 1st Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century" p. 68, Awaji, 2007.
 16. 浅岡 憲三: マイクロチタン粒子のキャラクタリゼーション. ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発研究班会議, 鳴門, 2007
 17. 和田 晃, 吉田憲一, 浅岡憲三: チタン補綴物の研削に関する基礎的研究 日本機械学会中国四国支部 第45期総会・講演会予稿集, 徳島, 2007
 18. SH An, WJ Kim, Kenzo Asaoka, TY Kwon and Kyo-Han Kim : Heat-treated TiO₂ nanotubes: Hydroxyapatite growth, *International Dental Materials Congress 2007*, p.315, Bangkok, Nov. 2007
 19. K Asaoka : Mechanism of delayed fracture of titanium implant in vivo, *International Dental Materials Congress 2007*, p.158, Bangkok, Nov. 2007.
 20. K Hamada, EHonda and K Asaoka : MRI-Artifact-Free Gold Alloy for Biomedical Application, *International Dental Materials Congress 2007*, Bangkok, Nov. 2007.
 21. E Fujiwara, F Kawano, K Hamada and K Asaoka : Solubility of Strontium and Carbonate-substituted Calcium Phosphate Bone Cement Mixed with SrCl₂ Solution, *International Dental Materials Congress 2007*, Bangkok, Nov. 2007.
 22. Y Naito, K Hamada, D Nagao, Y Tomotake, T Ichikawa and K Asaoka : Bioactivity of Porous Titanium Produced Using Moldless Process, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, July 2007.
 23. E Fujihara, K Hamada and K Asaoka : Effects of Calcium Concentration on Hydrothermal Surface Modification of Titanium, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, June 2007.
 24. K Hamada, Y Naito, DNagao, Y Tomotake, T Ichikawa and K Asaoka : Moldless Process of Producing Porous Titanium for Dental Applications, *6th International Symposium on Titanium in Dentistry*, Kyoto, June 2007.
 25. K Asaoka : Stress-corrosion cracking of titanium (Ti) implants by hydrogen absorption, *Workshop on metallic corrosion of small implants*, Norfolk, May 2007.
 26. Y Naito, D Nagao, T Ichikawa, K Asaoka and K Hamada : High formable porous titanium for biomedical applications, *International Association for Dental Research*, New Orleans, March 2007.
 27. 藤原 江美, 河野 文昭, 浜田 賢一, 浅岡 憲三 : 高溶解型ストロンチウム含有炭酸アパタイトセメントの試作, 第29回日本バイオマテリアル学会, 349頁, 2007年11月.
 28. 浅岡 憲三, 前島 邦光 : チタン表面のキャラクタリゼーション, 第29回日本バイオマテリアル学会, 223頁, 2007年11月.
 29. 金村 篤謙, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一 : 過酸化水素含有生理食塩水中におけるNi-Ti 超弾性合金の耐食性の向上 — 硝酸浸漬による表面改質 —, 日本金属学会 2007 年秋季大会 2007 年 9 月.
 30. 長岡 彬, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一 : Ti及びNi-Ti合金の表面改質に伴う水素吸収の評価 日本金属学会 2007 年秋季大会 2007 年 9 月.
 31. 富田 美穂, 横山 賢一, 浅岡 憲三, 酒井 潤一 : Ni-Ti 超弾性合金の水素吸収と昇温放出挙動に及ぼす繰返し変形の影響, 日本金属学会 2007 年秋季大会 2007 年 9 月.
 32. 内藤 禎人, 浜田 賢一, 市川 哲雄, 浅岡 憲三 : モールドレス成形および焼成したチタン多孔体の基礎的評価 第49回日本歯科理工学会学術講演会 2007年5月.
 33. 藤原 江美, 河野 文昭, 浜田 賢一, 浅岡 憲三 : ストロンチウム含有炭酸アパタイトセメントの溶解性 第49回日本歯科理工学会学術講演会 2007年5月.
 34. 浜田 賢一, 浅岡 憲三 : MRI アーチファクトフリー生体用合金の研究(第1報) -候補合金と基礎的評価-, 第49回日本歯科理工学会学術講演会 2007年5月.
 35. 浅岡 憲三, 宇尾 基弘, 亘理 文夫 : チタン合金の水素吸蔵と溶出微粒子, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会 Vol. 5, 29頁, 2007年12月.
 36. 浅岡 憲三, 浜田 賢一, 藤原 江美 : チタンの表面処理とキャラクタリゼーションの変化, ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用研究会, Vol. 4, 2007年8月.
 37. K Asaoka : Porous titanium as bio-functional Biomaterials, *international Symposium on Emerging Biomaterials in Tissue Engineering*, Cheonan, Nov. 2008.
 38. E Fujihara, K Hamada, K Yamashita, F Kawano and K Asaoka : Preparation of biodegradable calcium phosphate cement using a-TCP

- with low crystallinity, *The International Symposium on Oral Science to Improve the Quality of Life*, Tokushima, Sep. 2008.
39. K. Asaoka and M. Uo : Formation of fine particles related with mechanical degradation of Ni-Ti superelastic alloys in biological fluids, *Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008)*, Sapporo, June 2008.
 40. K. Asaoka and K. Maejima : Analysis of water on titanium surface by thermal desorption spectroscopy, *8th World Biomaterials Congress*, Amsterdam, June 2008.
 41. E. Fujihara, F. Kawano, K. Hamada and K. Asaoka : Resorbable calcium phosphate bone cement precipitated strontium and carbonate apatite, *8th World Biomaterials Congress*, Amsterdam, May 2008.
 42. K. Hamada, E. Honda and K. Asaoka : Properties of MRI-Artifact-Free Gold Alloy for Biomedical Application, *8th World Biomaterials Congress*, Amsterdam, May 2008.
 43. K. Asaoka : Hydrogen related degradation of mechanical properties of titanium and titanium alloys, *2nd Symposium on fracture and fracture of medical metallic materials and devices*, Denver, May 2008.
 44. 内藤 禎人, 浜田 賢一, 浅岡 憲三, 市川 哲雄 : モールドレス成形および焼成可能なポラスチタンの開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 2008 年 11 月.
 45. 藤原 江美, 関根 一光, 浜田 賢一, 山下 菊治, 河野 文昭, 浅岡 憲三 : ストロンチウム含有アパタイトセメント存在下での骨芽細胞様細胞の培養. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 2008 年 11 月.
 46. 浜田 賢一, 菅田 栄一, 浅岡 憲三 : 生体用非磁性金-白金基合金の開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 2008 年 11 月.
 47. 浜田 賢一, 菅田 栄一, 浅岡 憲三 : 生体用非磁性金-白金合金の特性. 日本金属学会 2008 年秋季大会. 2008 年 9 月.
 48. 浜田 賢一, 藤原 江美, 浅岡 憲三 : 水酸化カルシウム溶液中で高温水熱処理したチタンのアパタイト析出能. 第 52 回日本歯科理工学会学術講演会. 2008 年 9 月.
 49. 藤原 江美, 関根 一光, 浜田 賢一, 河野 文昭, 浅岡 憲三 : 高溶解型ストロンチウム含有アパタイトセメントの細胞毒性評価. 第 52 回日本歯科理工学会学術講演会. 2008 年 9 月.
 50. 堀内 信也, 日浅 雅博, 川上 恵美, 藤原 慎視, 浅岡 憲三, 田中 栄二 : 水硬性リン酸亜鉛セメントのアパタイト置換を応用した新しいバイオマテリアルの開発. 第 67 回日本矯正歯科学会学術大会. 2008 年 9 月.
 51. 日浅 雅博, 安倍 正博, 浅岡 憲三, 松本 俊夫 : M-CSFR の ectodomain shedding による破骨細胞分化の抑制. 第 17 回硬組織再生生物学会学術大会. 2008 年 8 月.
 52. 藤原 江美, 関根 一光, 浜田 賢一, 山下 菊治, 河野 文昭, 浅岡 憲三 : ストロンチウム含有アパタイトセメントの特性. 第 17 回硬組織再生生物学会学術大会. 52 頁. 2008 年 8 月.
 53. 浜田 賢一, 藤原 江美, 浅岡 憲三 : 水酸化カルシウム水溶液中での水熱処理によりチタンの表面改質. 第 17 回硬組織再生生物学会学術大会. 40 頁. 2008 年 8 月.
 54. 浅岡 憲三 : 医用ステント合金の腐食と寿命. 日本金属学会中国四国支部講演大会. 2008 年 8 月.
 55. 浅岡 憲三 : Ni-Ti 超弾性合金の劣化と腐食生成物. 第 22 回日本歯科産業学会・学術講演会. 2008 年 7 月.

G. 知的所有権の取得状況

無し