

の部分に大きな力が加わったためと思われた。

FTIR 測定の結果は、ガンマ線照射あり (55kGy)、結晶化度 78%、最大酸化度 4.9 であり、空気中でガンマ線照射滅菌が行われ、酸化劣化が進行したものとされた。

破断面の SEM 観察結果、つめ 2 の破断面は起伏にとんだ特徴を示していた。背面側とつめの両端で破断の終端部位を示すシャーリップが観察され、き裂は摺動面側中央部から開始したものとされた。途中までき裂が入っていたつめ 1 と破断していたつめ 3~5 はほぼ同様の破断面であった。つめ両端近傍の内部に破断の開始点が観察された。その周囲には同心円状に疲労破壊の特徴であるビーチマークが観察された。背面側には伸長ディンプルとシャーリップが観察された。従って、これらのつめでは、つめ両端の内部から破断が開始し、疲労によりき裂が進展、背面側で破断が終了したものと推定された。破断の途中であったつめ 1 とつめ 3~5 の破断面が類似していたことから、つめ 2 が破断した後、つめ 1、3~5 のき裂が成長していったものと推定した。

破断面の特徴の再現を目的とした力学試験の結果、応力比を負に設定し、き裂の閉口を生じさせた領域では、二つの破断面の間の接触により破断面の一部が変形し、暗い色で観察されることがわかった。これが繰り返し生じることにより、ビーチマークと同様の縞模様が形成されることが確認され、OUH008 で観察されたビーチマークは、疲労破断の途中で二つの破断面が圧縮力により接したためと確認された。

インプラントの分析から、以下のように推定された。空気中におけるガンマ線照射滅菌のため酸化劣化が進行していた。摺動面の摩耗に加え、継続的なリムにおけるインピンジメントの発生のため、リム部のデラミネーションが進行した。この症例の場合は、ある時点でアウターカップの回旋が起こらなくなり、摩耗の進行やインピンジの発生が 1 ヶ所に限定されてしまった。そのため、インピンジした部分と反対側に繰り返し大きな力が加わった。これに、摩耗のため生じた肉厚の減少や、骨頭を挿入する際につめが変形するように作製した切れ込みによる強度低下が加わり、つめ 2 が破断した。その結果、周辺のつめにも無理な力が加わるようになり、疲労により次々に破断した。

この症例は様々な要因が絡み合って不具合の発生へとつながったものと思われる。初めに、空気中でのガンマ線照射滅菌に起因する UHMWPE の酸化劣化が挙げられる。これがその後の摩耗の促進、デラミネーションの発生、最終的な破断に寄与する材料の力学特性の低下につながった。次に、アウターカップの回旋の停止が挙げられる。デラミネーションが全

周にわたり認められることから、当初は回旋が機能していたが、ある時点で回旋が停止した。そのため、同一箇所でのインピンジと極度のデラミネーションの発生、また、その反対側への摩耗の進行が生じた。回旋が停止した理由は、爪が不均一に損傷をうけネックに固定されたものと推察される。また、UHMWPE ライナーの摩耗が不均一に進行した場合、最も摩耗が進行した方向で摺動する方が安定になり、回旋が固定することも考えられた。摺動面の摩耗の進行は破断部分の肉厚の減少を招き、破断の一因となった。また、骨頭を UHMWPE ライナーにはめ込むために設けられたと思われるライナー外周の切欠きも破断の原因となった。最後に、インピンジによるリム部を支点としたこの原理による引き抜きの力が骨頭からつめに生じ、破断に至ったものと思われた。

(4) OUH009

64 歳女性、大腿骨頸部骨折のため、バイポーラ型人工骨頭置換術を施行。0.3 年経過して、脱臼のため、再置換となった。

アウターカップの摺動面にはいくつか傷が見られたが、抜去のためについてものかどうかはわからなかった。UHMWPE ライナーは厚さ約 10.5mm の C 型の UHMWPE 製リングにより骨頭を保持する機構であり、リム部は全て C 型リングに覆われている構造であった。ライナー、リングともに変色、き裂、デラミネーションなどは見られなかった。ライナーの摺動面には光沢があり、若干の摩耗が示唆されたが、肉眼で認められるような多量の摩耗は認められなかった。リムにはほぼ全周にわたって機械加工痕が残っていた。ごく一部に傷があったが、傷は浅く、慢性の脱臼やインピンジはなかったものと思われた。骨頭には傷がなかった。

FTIR 測定の結果、ガンマ線照射なし (推定照射量 1kGy、誤差の範囲)、結晶化度 64%、最大酸化度 0.6 であり、ガンマ線照射以外により滅菌が行われたものと思われた (表 4)。

以上の結果、UHMWPE の劣化は見られず、摩耗や破損、傷なども見られなかったため、インプラントの分析からは不具合につながる要素が認められなかった。このことは、再置換理由が脱臼であったという診療情報とも合致した。

(5) OUH010

66 歳女性、大腿骨頸部骨折のため、バイポーラ型人工骨頭置換術を施行。14 年経過して、転倒によるステム周囲骨折のため、再置換となった。

アウターヘッドの摺動面のリム近傍に斑点状の傷が多数あった。線状ではなかったため、third body wear ではないと思われたが、抜去のためについてものかどうかは判断できなかった。UHMWPE ライナーは

厚さ 11.5mm の C 型リングで骨頭を保持する機構であった。ライナー、リングともに多少変色していた。摺動面は光沢があり、摩耗が示唆された。骨頭をあてると、吸着力が発生することから、摩耗の進行により骨頭と同径の新たな摺動面が形成されているものと思われた。リングには全周にわたりインピンジの痕跡があり、アウターヘッドの回旋が示唆された。デラミネーションの発生やその他の傷は見られなかった。骨頭に傷は見られなかった。ステムはセメントレス仕様で、近位部約 1/3 が粗面加工になっていた。粗面部の片側には骨の付着があり、良好な固定性が示唆されたが、反対側の側面には骨の付着が見られなかった。その他、目立つ傷は見られなかった。

FTIR 測定の結果は、ガンマ線照射あり (40kGy)、結晶化度 77%、最大酸化度 6.9 であり、空气中でガンマ線照射滅菌が行われ、酸化劣化が進行したものと思われた。

インプラントの分析から、以下のように推定された。空气中におけるガンマ線照射滅菌のため酸化劣化が進行していた。摺動面では摩耗がある程度進行していた。C 型リングの表面であるリム部には、全周にわたってインピンジの痕跡が見られ、アウターカップの回旋が正常に機能していたことが示唆された。しかし、デラミネーションの発生には至っていなかった。従って、インプラントの問題として考えられるのは、摺動面の摩耗による摩耗粉の発生であったが、OUH006 や OUH007 といった、リムのデラミネーションまで進行した症例に比べると、その影響は少ないものと考えられた。このことは、再置換理由が骨折によるものであったこととも合致した (表 4)。

6. 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

埋め込み手術後の体重変化及び実験終了後の脳の観察所見、膜の吸収

曝露期間を通じて、ラットの体重について、群間で有意性はなく、実験終了時の各群の体重の平均値 ± 標準誤差は control 群 517.9 ± 16.6 g、モデル品 PLGC 膜埋め込み群 518.5 ± 9.4 g、高濃度 OT 含有膜埋め込み群 513.3 ± 11.0 g、高濃度 DBT 含有膜埋め込み群 514.9 ± 11.6 g であった。

回収した膜から計算した膜の吸収重量の平均値 ± 標準誤差は、モデル品 PLGC 膜 6.28 ± 0.56 mg、高濃度 OT 含有 PLGC 膜は 9.75 ± 0.86 mg、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜は 5.94 ± 0.39 mg であった。

脳表面の観察所見については、多くのラットで、大脳表面に骨の切り出しの円形に相当した痕が見いだされ、表面が壊死している個体、大脳皮質の損傷が深く海馬に及んでいる個体もあった。壊死や損傷

が海馬に及んでいるものを損傷が著しい個体と判断し、脳表面の損傷が著しい control 群 1 匹、モデル品 PLGC 膜埋め込み群 3 匹、高濃度 OT 含有 PLGC 膜埋め込み群 3 匹、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜埋め込み群 2 匹は解析から除いた。その結果、control 10 匹、モデル品 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 OT 含有 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜埋め込み群 8 匹の解析となった。

2) 神経伝達物質

大脳における神経伝達物質及びその代謝産物の濃度について、高濃度 DBT 曝露群では、NE、5-HT、5-HIAA 濃度が control 群に比べて有意に高かった。また post hoc test では有意水準に達しないが、分散分析では DA について有意であり、また DOPAC についても $p=0.075$ であった。

NE について線条体において高濃度 OT 群が control に比べて NE の平均値が有意に高かった。DA 及び D A 代謝産物の濃度を示した。いずれの部位についても、群間で有意性を示さなかった。DOPAC/DA、HVA/DA についても群間で有意な差はなかった。

線条体、視床下部、海馬における 5-HT、5-HIAA 濃度について、線条体については、モデル品 PLGC 膜挿入群、高濃度 OT 群、高濃度 DBT 群全てで 5-HT の平均値が control より有意に高かった。視床下部については、高濃度 OT 群の 5-HIAA の平均値が control 群に比べ有意に高かった。海馬については、5-HIAA について分散分析で $p=0.063$ であった。その他の部位の 5-HT、5-HIAA 濃度を示したが、群間で有意性はなかった。5-HIAA/5-HT の平均値について、線条体、視床下部、海馬について示したが、視床下部、海馬において、5-HIAA/5-HT の平均値は、モデル品 PLGC 膜挿入群、高濃度 OT 群、高濃度 DBT 群全てで control 群より有意に高かった。

7. コンピューター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

屈曲解析の最終の状態、得られた屈曲角度は 135 度であった。これまでに構築した 2 種類の解析モデル (簡易モデルと膝関節モデル) は、強制的に大腿骨コンポーネントを回転させることで屈曲動作を再現していたが、今回開発したバーチャル・シミュレータは自然な屈曲に近い動作状態が再現することに成功した。

屈曲角度 45 度と 135 度での脛骨インサート表面でのミーゼス相当応力分布では、45 度では応力集中は condyle 面のみで生じており、post 部にはまだ応力は作用していない。90 度になると大腿骨コンポーネント cam と post が接触し post 表面に応力集中が発生している。condyle 面にも応力が集中しているが、

45 度の状態と比較するとより後方に移動していることがわかる。最大応力値は 45 度に比べると若干増加している。屈曲角度が 135 度になると post 表面において応力集中は大幅に増大する。condyle 面でも応力集中は増大しているが、外側に偏って分布しており、特にインサートのエッジの部分に応力が集中している。これは屈曲動作に伴い脛骨部が外旋するため、最終的には 15 度の外旋が生じていた。また、最大応力は 40MPa 程度にまで増大していた。

最大相当応力値の変化を示す。condyle 面では 120 度付近までは最大応力は屈曲と共に次第に増加した後、135 度までの間に急激に増大する。これは脛骨の外旋の影響により脛骨インサートのエッジの部分で大腿骨コンポーネントと接触するためである。また、post 表面では 70 度付近から急激に応力は増加し、最終的には 40MPa 程度にまで増加する。このような応力レベルは UHMWPE の降伏応力を大幅に超えており、深屈曲状態では容易に塑性変形が生じることが示唆される

8. 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

ストラットの位置によって、流速の下がり方に差があることがわかる。特に、血流を流入部や流出部で制御(減少)させようとしている場合には、ステントストラットの減少効果は非常に限定的であることに注目したい。このことは、血流を制御するために流入部や流出部を抑えるようなステントは必然的にマテリアルの量が多くなってしまふ。その結果、マテリアルと血流(血液)とが接触する頻度や度合いが高まり、結果的に血栓化のおそれがある。

9. 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

光学式 3D デジタイザによる摩耗量測定の可能性の検証

摩耗モデル(図 1 8)での摩耗体積の変化(図 2 2)は、(a)は $r = 11 \text{ mm}$ のとき、(b)は $r = 14 \text{ mm}$ のときである。それぞれの場合において、図 2 2 右側のグラフに示すように、最大摩耗深さ d に対して摩耗体積 V_{wear} が直線的に増加する結果が得られた。

形状測定装置を用いた UHMWPE カップの摩耗量測定
非摩耗球推定法の検証のために作成したテスト

データと、そのデータに対する評価関数値の分布図を図 2 3 に示す。

ピークでの t の値を用いて非摩耗球の中心位置を算出し、半径 r の値と併せて非摩耗球とした。これらの値を利用して摩耗量を算出し、 $50 \mu \text{ mm}^3$ の値を得た。これは、算出された非摩耗球中心位置と摺動面ポリゴンの節点位置との距離から、非摩耗球半径を差し引いた値の度数分布である。このヒストグラムから分かるように、最大摩耗深さが 2 mm 程度だった(図 2 4)。

10. 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

ステレオカメラによる計測

3 種類のファントム、a) 平板、b) 半球のステレオカメラのカラー画像と 3 次元位置計測結果を示す。カラー画像は近距離用(A-D)と遠距離用(B-C)の 2 つのペアを上段、下段にそれぞれ示す。ステレオカメラによるカラー画像について、平板の結果を図 3 1、半球の結果を図 3 2 に示す。ここで、半球のステレオカメラによる距離画像を図 3 3 に示す。距離画像は奥行きに深さに合わせて白から黒までの濃淡で示される。次にステレオカメラによる計測結果を点で三次元座標系に描画した図について、平板を図 3 4、半球を図 3 5 に示す。また、半球の計測結果に理論上の球形状をフィッティングした図を図 3 6 に示す。平板については、平面上にデータが分布していたが、角部では反りがみられ、奥行き方向のデータのずれが生じていた。半球については、結果として $\phi 250$ のみを示しているが、 $\phi 200$ 、 $\phi 300$ ともに同様の傾向であった。球形状の一部を再現できており、フィッティングした結果をみても、ほぼ同一球面にデータが分布していた。しかし、カメラの中心から離れるにしたがって球形状から外れていた。

計測による挿入状況の再現

人体模型を対象とし、ダイレータを挿入する時のステレオカメラによるカラー画像を図 3 7 に示す。このときのステレオカメラによる計測結果を点で三次元座標系に描画した図 3 9 を示す。また、点群を三角形で連結しポリゴン化した結果を図 3 8 に示す。さらに、表面にスムージングをかけて滑らかにした結果を図 4 0 に示す。

点群の表示では三次元的な形状を認識しづらいが、面を構成することで立体的な構造が把握しやすくなっている。人体模型上に置かれた三本の指の形状と

手の甲が示された。しかし、ダイレータは左手で部分的に隠れており、形状の十分な再現性が得られていない。

11. 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

h-CLAT

a) 濃度設定試験

濃度設定試験を行うにあたり、V79 コロニーアッセイにおいて、塩化トリブチルスズの IC50 が 10- 50 ng/ml の範囲であったので、濃度設定試験の最高濃度を 1 μ g/ml とし、その濃度から公比 2 で 8 濃度希釈系列で試験を行った。その結果、生存率 75%の前後の生存率を占める 2 濃度が 250ng/ml (生存率 82%) と 500ng/ml (生存率 35%) であったことから、CV75 を求める計算式に代入し、CV75 が 277.5ng/ml であることが算出された。そこで本試験では 277.5ng/ml を基準に、高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度公比 1.2 で試験濃度を設定することにした。

b) 本試験

濃度設定試験で設定した濃度で本試験を行った (図 4 1, 図 4 2)。細胞の生存率はコントロールで 90%以上かつ陽性対照である DNCB が 60%以上を満たし、さらに DNCB が CD86 及び CD54 が共に陽性基準を超えて陽性であったことからこの試験が成立していることが確認された。そこで試験物質である塩化トリブチルスズでの細胞生存率をみたところ、濃度依存的に低下していたが、最高濃度 (333 ng/ml) でも 50%以上ではあったので、試験濃度のすべてのデータを採用できた。一方、CD86 と CD54 の発現においては、試験したすべての濃度で CD86 の RFI が 30 前後であったのに対して、CD54 は最低濃度 (93ng/ml) から陽性基準である RFI=200 を超えており、さらに CV75 である 277.5ng/ml まで、濃度依存的に増強していた。

LLNA

陽性対照の DNCB が h-CLAT の約 1000 倍の濃度であることから、試験に用いる塩化トリブチルスズの濃度を h-CLAT で陽性判定だった最低濃度の 100ng/ml の 1000 倍を基準にして高濃度側に 2 濃度、低濃度側に 2 濃度公比 10 で設定した。その結果、高濃度側で濃度依存的にリンパ球の活性化が上がっていることが分かった (図 4 3)。In vivo LLNA-BrdU 法の場合、陰性対照群に対する試験物質投与群の平均値の比を Stimulation index (SI) で表し、SI \geq 3 を感作性陽性と判断するが、最高濃度の 10 mg/ml で SI = 7 (307092 vs 43378) あった。

1 2. 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

昨年度は、種々のモル比で混合したメチル基と水酸基を含む溶液で調製した表面上で培養した NH0sts の分化程度を評価して、接触角が NH0sts の分化に与える影響を検討した。今年度は、昨年度のデータを利用して、70° 前後の接触角をもつメチル基と他の官能基から構成されるモデル表面を調製し、その上での NH0st の分化程度を評価した。調製時の各試薬混合比と調製した表面の接触角を以下に示す。

- 1) 水酸基 1 : メチル基 1 (接触角 69.2°)
- 2) カルボキシル基 2 : メチル基 1 (接触角 68.9°)
- 3) アミノ基 1 : メチル基 4 (接触角 75.7°)
- 4) リン酸基 1 : メチル基 4 (接触角 73°)

これらの他、培養用ディッシュ、未処理の金 (接触角 64.7°) 表面及びメチル基単独表面 (接触角 99.5°) を比較対象として使用した。まず、所定時間培養後に Tetracolor One を用いて評価した各モデル表面細胞数を吸光度で表した (図 4 4)。骨分化誘導因子の有無に関わらず、メチル基単独表面において細胞の初期接着及び増殖が抑制されていること、水酸基において細胞増殖が抑制されていることが示唆される。図 4 5 には、図 4 4 と同条件下での一定細胞数あたりに換算した ALP 活性比を示す。骨分化誘導因子の添加によりいずれの条件下でも ALP 活性は上昇すること、メチル基表面上での ALP 活性は他の表面上のものに比べて低いことが分かる。しかしながら、この骨分化の指標となる ALP 活性からは、メチル基以外のいずれの表面上でも骨分化に対する影響は認められなかった (図 4 5)。

一方、単一官能基からなるモデル表面を上で代謝協同阻害試験を行い、官能基が細胞間連絡機能に与える影響を検討した結果を、同時に行ったコロニー法による細胞毒性結果と比較した (図 4 6)。昨年度の NH0st を用いた検討と同様、メチル基表面でのコロニー形成率がコントロールに対して低下していることが明らかとなった。しかしながら、NH0st を用いて得られた結果よりもその毒性の程度は低いものであった。また、NH0st 培養では毒性や細胞増殖抑制が認められなかったリン酸基表面でのコロニー形成率も低下傾向にあることが示された。代謝協同に関しては、メチル基及び水酸基表面で阻害が認められた。

代謝協同阻害試験は、V79 とその変異体との間で細胞間連絡機能が発揮できるように両者がある程度の確率で接触できることが必要である。よって、この試験で材料上での阻害活性を評価する場合、化学物質の評価とは異なり、材料上に細胞が接着した後のその占有面積が結果を左右する因子となる。そこで、培養 1 日後の各種モデル表面上における細胞占有面積を SEM 写真及び光学顕微鏡写真からコンピュータソフト (ImageJ 1.42q, NIH) を用いて算出し、その

面積と接触角、細胞毒性及び代謝協同阻害の関連性を検討した。その結果、細胞の占有面積は、接触角が 65° 程度で極大を示すことが認められた (図 4 7)。また、代謝協同阻害と接触角との間に相関があることが示唆された (図 4 8)。

D. 考察

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

NHOst の分化進行に関与すると思われる機能性蛋白質の絞り込みを行った。また、スルホン化プレート上で培養した同細胞の蛋白質発現状況から、培養初期における細胞挙動を検討した。

スルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動解析では、NHOst の分化進行に影響を及ぼすと考えられる TETN、IBP2、C01A1 及び C01A2 が有意に濃縮されていることが確認されたが、機能性蛋白質の検索に関しては LC-MS/MS を利用したショットガン解析が有益であった。また、ショットガン解析に利用する MS 装置を Paladigm MG4/QTRAP4000 から DiNa/LTQ-Orbitrap に変更することにより、蛋白質の同定数と Mascot 検索における同定精度が共に向上した。

IGF や TGF- β などの成長因子は NHOst の増殖と分化に深く関与していることが報告されており、スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析において、IGF 関連蛋白質 (IGF2 及び各種 IBP) と TGF- β 関連蛋白質 (TGBR3) が検出されたことは興味ある知見である。

骨代謝には様々な蛋白質が関与している。TETN は NHOst の分化初期に重要な役割を果たしている蛋白質であり、PLMN と親和性を持つことが報告されている。Thiol protease inhibitor としてシステインファミリーに分類される SPP24 は非コラーゲン性の骨蛋白質であり、骨代謝の調節機能を持つことが知られている。また、VTDB は骨成長や骨リモデリングに関与する蛋白質である。

スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析では、上記の成長因子関連蛋白質、骨代謝関連蛋白質のほか、細胞外マトリクス関連蛋白質も検出されている。

スルホン化プレートは NHOst の分化進行を顕著に促進する機能を持つが、スルホン基自体が同細胞に直接的な影響を及ぼしているとは考え難い。現在までに、硫酸化多糖類は BMPs、FGFs、antithrombin III や GM-CSF などと相互作用することにより細胞機能を増進させることが示唆されていると共に、本研究においても、スルホン化プレートには NHOst の分化進行に深く関与すると思われる種々の蛋白質が吸着することが明らかになった。

スルホン化プレート上で培養した NHOst の培養初期における細胞挙動を検討するため、細胞内の蛋白質及び遺伝子発現解析を行った結果、骨形成、アポ

トーシス、転写因子を含む細胞サイクル等に関与する幾つかの蛋白質・遺伝子が発現していることが確認された。ANXA2 はアパタイト形成時、Bone matrix vecicle 内に発現する蛋白質であり、同 vecicle への Ca²⁺ の取り込みと Endocytosis に関与している。AT2B4 は細胞内 Ca²⁺ ホメオスタシスを制御する蛋白質である。CAD11 は NHOst の分化過程において発現が増強される蛋白質であり、Ca 依存的細胞接着、骨形成、骨メンテナンスに関与している。CAD11 は蛋白質レベルでは大きく変動していなかったが、遺伝子レベルでは培養開始後 1 日目において、有意に発現量が上昇していた。これらの蛋白質及び遺伝子群が細胞内で機能することにより、NHOst の分化進行が促進されているものと思われる。

アポトーシス誘導性蛋白質である AIFM2 の発現量は遺伝子レベルで低下していた。アポトーシスと正負の関係にある ATG2A 遺伝子は培養開始後 8 時間目で増加する傾向が認められた。アポトーシス抑制蛋白質である GELS 及び STAT6 と相関して抗アポトーシス機能を司る BCL2L1/BCL-X(L) 遺伝子の発現を誘導する IRF6 は共に発現量が上昇していた。スルホン化プレート上で培養した NHOst は、その培養初期においてアポトーシスが抑制されていることが判明した。

スルホン化プレート上で培養した NHOst は分化進行が促進されるため、増殖率自体は低下するが、培養開始後 7 日目までは経時的に増殖する。研究結果 (2) 及び (3) 項に記載したように、増殖抑制や分化を誘導する PA2G4、増殖抑制効果を示す IQGA1、RAB5A、RAB7A、CIP2A、2A5D 及び PPP2R5C 等の発現量は蛋白質又は遺伝子レベルで低下している反面、Mitosis、細胞増殖、分化、転写調節等の細胞サイクルに関与する MAPK8、NEK10、SEPT9、GRP75、PTPRD 等の因子の発現量は上昇しており、初年度に実施した NHOst の培養実験と相関する結果が得られた。

初年度に実施した遺伝子発現解析において、スルホン化プレート上で培養した NHOst では、EGF、IGF、BMP 及び TGF- β スーパーファミリーの蛋白質をコードする遺伝子群の発現が早期に誘導されることが明らかになっており、本年度に実施したスルホン化プレート吸着蛋白質及び NHOst 細胞内蛋白質の発現解析結果と相関性が認められた。また、スルホン化プレート吸着蛋白質では、抗アポトーシス作用を示すことが知られている PEDF が有意に濃縮されていたと共に、NHOst 細胞内蛋白質の発現解析においてもアポトーシスを抑制する一連の蛋白質が発現していることが判明した。初年度に実施した遺伝子発現解析においても、培養初期において BCL-2 蛋白質群をコードする BCL2L11 遺伝子の発現量が上昇していたことから、蛋白質及び遺伝子発現解析間に良好な相関性が認められた。

以上、スルホン化プレートが示すNH0stの分化促進機能には、同プレートに吸着する成長因子や細胞外マトリクスが深く関与していることが示唆された。また、培養初期における増殖、分化、アポトーシス等の細胞挙動変化に関する分子レベルの情報も得ることができた。今後、本研究において同定された興味ある蛋白質の絶対定量解析を行うと共に、各候補蛋白質の機能解析を行う予定である。また、分子モデリングツールを利用して、スルホン基/蛋白質間相互作用の有無についても検討する予定である。

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

カーボン系の4種のナノマテリアルの試験を実施したが、同じカーボンナノマテリアルでも、細胞毒性に違いがあり、もっとも細胞毒性の強かったのは、CNT-2であった。カーボンナノホーンでは、4種の中でもっとも細胞毒性が弱かった。

染色体の数的異常を誘発したのは、CNT-1 およびCNT-2であったが、細胞毒性との相関は認められなかった。むしろ、材料の形状との相関が認められた。

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

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大きな特徴がある。また、Ti-Zr-Nb 合金を構成する元素であるZr及びNbは、合金の表面に形成される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、耐腐食性の向上に寄与する。さらに、我々は、Ti-Zr-Nb 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、ラットを用いた動物実験で、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。したがって、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。実際、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。

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。さらに、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、ナトリウムイオンがカルシウムイオンと置換してチタン酸水素カルシウムに変化し、アパタイト形成能がより高くなる。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、NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、NaOH + CaCl₂ 処理に比べて、材料表面へカルシウムを多く導入することができ、カルシウム導入量が多いチタン合金は高いアパタイト形成能を示した。

未処理の試験材料において、従来の試験結果と同様に、Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示し、その他の試料に比べて骨芽細胞の増殖が低かった。これは、Ti-6Al-4V を構成する元素のひとつであるバナジウムに強い細胞毒性があることに起因する。しかし、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及びNaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したTi-6Al-4V は、細胞毒性が弱くなり、骨芽細胞の増殖も増加した。Ti-6Al-4V において、バナジウムの細胞増殖への影響がNaOH 処理によって抑制されたものと考えられる。

NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及びNaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したTi-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及びTiは、未処理のそれらと比べて、骨芽細胞のALP活性を増加させた。さらに、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、カルシウム導入量が高い試料は、その上で培養した骨芽細胞の分化レベルを促進させる傾向が認められた。昨年度の研究で、表面処理によりカルシウム導入量が高い試料は、高いアパタイト形成能を示すことが確認されている。また、生分解性材料のひとつであるポリ乳酸にガンマ線を照射すると、照射線量の増加とともに、アパタイト形成能が増加し、さらに、その上で培養した骨芽細胞の分化は促進した^{20,21)}。チタン合金においても、細胞毒性が無く、アパタイト形成能が高い材料は、骨芽細胞の分化を促進させることが示された。これらのことから、材料のアパタイト形成能は、骨芽細胞の分化に関与すると考えられる。したがって、材料のアパタイト形成能を定量的に評価することは、骨結合性を有する材料の開発に必須であるとともに、骨系医用材料のリスクアセスメントに有用である。

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プ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、パルプ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、血栓形成やパルプ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った。人工心臓弁の機能不全が認められる患者 15 名（全例パルプによる機能不全と考えられる。うち 2 例は血栓も併発。）および人工弁の不具合が今のところ認められない患者 11 名と、対照として日本人の健常人（100 名）について検討したところ、血液凝固因子第 10 (F10) の SNP : rs3211736 で、人工心臓弁の機能不全の有無間での有意なアレル頻度の差が認められた。F10 はビタミン K 依存性凝固因子の一つであり、肝臓で生成される際にビタミン K を必要とする。抗血液凝固薬であるワーファリンの作用はビタミン K の働きを抑える事で発揮されるため、F10 はワーファリンの薬効に関連する遺伝子と考えられる。今回検討した人工心臓弁の機能不全が認められる患者は全てその原因がパルプ形成によるものであると考えられるため、この結果から、F10 の SNP : rs3211736 (INTRON, c. 231+64C>T) がパルプ形成の有無に関与する可能性が示唆された。ただし、現段階では患者の検体数が合計 26 と少ないため、今後さらに検体数を増やしていく事でより正確な遺伝子

多型の検討が出来るものとする。

人工心臓弁の機能不全の有無や原因(血栓形成によるものかパルプ形成によるものか等)によってアレルの頻度に有意な差が出てくる SNP が今後さらに特定できれば、血栓形成やパルプ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

今年度分析を行った 5 例は、いずれもバイポーラ型人工骨頭であった。うち 2 例では、中心性移動による疼痛が要因で再置換に至っていたが、これらの症例ではいずれも、ガンマ線照射滅菌、UHMWPE の酸化劣化、リム部のデラミネーションが関係していた。

1 例では、骨頭を保持するためのつめが破断しており、これが再置換の直接の原因となった。これもガンマ線照射滅菌による UHMWPE の酸化劣化が遠因となったものと思われたが、摺動面における摩耗の進行、リム部でのインピンジの発生とデラミネーションの発生、アウターカップの回旋の停止、骨頭保持機構による力学的弱点といった、バイポーラ型人工骨頭で考えられるほとんど全ての問題が指摘された。このインプラントは 28 年という長期にわたり機能していたものであり、上記のような問題点が単独で不具合につながらず、全てが複合化して初めて不具合に至ったことが長期の成績につながったものと思われた。

残る 2 例では、インプラントからは不具合を断定できる要因が見られなかったが、診療情報からもインプラント以外に起因する再置換の原因が報告され、抜去インプラント解析の結果と合致した。

ほとんどの症例でリム部の全周にわたりインピンジの痕跡が見られることから、アウターカップは体内で回旋していることがわかった。回旋が止まっていたと思われる症例でも、途中までは回旋が許容されており、摩耗が進行したある時期から回旋が停止したものと思われた。しかし、アウターカップの摺動面に摺動痕などは見られず、アウターカップ側の摺動面がどの程度機能していたかを示す痕跡は確認できなかった。しかし、どのインプラントでもリム部でのインピンジが広範に見られたことから、骨頭側の摺動面がおもに機能していたのではないかと考えられた。また、どちらの摺動面にも傷などはほとんど見られず、摺動面に異物が混入し金属側摺動面に傷をつける third body wear の痕跡は見られなかった。このことは、多くの UHMWPE 側の摺動面に光沢

があり、滑らかであったことと一致しており、ほとんどの摩耗が凝着摩耗により生じていたものと思われる。

今回、一部の試料について形状測定を行い、摩耗量の推定を行った。抜去インプラント解析では摩耗前の形状を入手することが困難であるため、測定した形状データから非摩耗面を抽出し、基の形状を推定することで摩耗量を計算した。この方法では、以下の2つの理由により、摩耗量を過小評価してしまうことが考えられた。第一に、全周にわたって摩耗が進行してしまっている場合は、摩耗した面を非摩耗面として認識してしまう可能性があり、摩耗量を過小評価してしまうことが考えられた。特にバイポーラ型人工骨頭では、アウターカップが回旋するため、その可能性が高いものと考えられた。インピンジの痕跡から、ほとんどのバイポーラ型人工骨頭で回旋が生じており、今回の試料の中でも例えばOUH007など、目視で摩耗の進行が認められる場合でも摩耗量がなしと計算されてしまっていた。第二に、この方法ではリム部のデラミネーションに伴う摩耗粉の放出が考慮されない。特にバイポーラ型人工骨頭では設計上インピンジが生じることになるため、今回の分析でも多くの症例でリム部のデラミネーションが認められた。しかし、今回の摩耗量の計算の方法では、この部分の体積の減少は考慮に入れない。

本研究から、バイポーラ型人工骨頭のインプラントに起因する不具合の要因につながる要素が抽出できたものと思われる。

第一の要因としては、UHMWPEの酸化劣化が挙げられる。これは、一般に空気中におけるガンマ線照射滅菌に起因する。UHMWPEの酸化劣化により、リムにおけるインピンジによる摩耗およびデラミネーションの発生、力学特性低下による破断につながる。これに対する対策として、ガス滅菌やガスプラズマ滅菌など他の滅菌方法の採用、不活性中でのガンマ線照射および保管などが取り入れられている。

第二の要因として、摺動部でのUHMWPEの摩耗が挙げられる。摩耗粉の発生は骨溶解に至る生体反応を引き起こし、インプラントのゆるみにつながる事が知られている。また、UHMWPEライナーの菲薄化により、破断の遠因となる。これに対する対策として、耐摩耗性の高い高度架橋ポリエチレンの採用などが挙げられる。高度架橋ポリエチレンの耐摩耗性については、実験室での結果に比べ臨床上の摩耗量削減効果は小さいものの、現在までのところ人工股関節全置換術(THA)で良好な中期成績が報告されている。しかしながら、バイポーラ型人工骨頭のようなインピンジが起こる状況では、高度架橋による疲労特性

の低下による破損の危惧もあり、人工膝関節全置換術(TKA)のUHMWPEコンポーネントと同様にあまり採用されていない。

第三の要因として、リム部でのインピンジによるデラミネーションの発生が挙げられる。酸化劣化の防止によりデラミネーション発生を抑制することが可能である。バイポーラ型人工骨頭では、設計上インピンジを起こさないようにすることはできないが、可動域がおおきくなるように設計を改善し、接触部で応力集中しないようにすることが考えられる。

最後に、骨頭保持機構部分の力学的脆弱性が挙げられる。破断やき裂が観察されたインプラントでは、いずれもこの部分に関与していた。特に、比較的細いUHMWPE製リング(OUH006、OUH007)や切欠き(OUH008)が問題と思われた。これに対し、OUH009やOUH010のように、太く、厚いリングを採用した場合、不具合につながりにくい可能性が考えられた。例えばOUH010はOUH006に比べ埋植期間が長く、最大酸化度も高かったが、デラミネーションはほとんど発生しておらず、C型リングの設計による影響が考えられた。

6. 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

頭蓋内で吸収される吸収性人工硬膜の毒性学評価(特に触媒として使用されるDBT、OTの脳への影響への評価)について、今回使用した動物モデル、つまり頭蓋骨くり抜き直径を8mmと確定し、手術後の観察期間を2ヵ月とし、術後の消毒と抗生物質投与を行った動物モデルは、実験に使用したラットの体重が、順調に増加し、明らかな臨床的な所見は見られず、2ヵ月の観察期間で膜の吸収も明らかで、実際の臨床適用に近づいたモデルであり、脳表面の損傷の改善がなお必要とされるものの、抗生物質の投与の効果も見られたと判断可能なモデルであった。しかし評価に行動学試験を使用した場合にはDBT高濃度含有膜を挿入してもcontrolとの有意差は検出できなかったモデルでもあり、リスクアセスメント手法としては、特に高濃度のDBTを含んだ膜を挿入した群に、何らかの異常を検出できるような感度の高い方法が求められていた。そこで、今回は脳各部位の神経伝達物質及びそれらの代謝産物の濃度で評価を行った。

今回の研究では、大脳において、NE、5-HT、5-HIAAで高濃度DBT含有膜挿入群がcontrol群に比べ、有意に高かった。DAについてもpost hoc testで有意差はなかったものの、分散分析では有意で、かつ高濃度DBT含有膜挿入群の平均値は高く、DOPAC(分散分析で $p < 0.1$)、HVAでも高濃度DBT膜挿入群の平均値は高かった。挿入した膜に接している大脳で、神経伝達

物質及び代謝産物の増加が起きたことは、高濃度DBTを含む膜による影響の可能性があり、この膜の挿入が神経伝達物質を指標とする場合には、毒性影響を起こす陽性対照として使える可能性があることを示唆する。但し神経伝達物質の濃度の変化は単純に毒性を示すものと解釈するのは難しいので、DBTの濃度などに更なる検討を行い、行動学試験とあわせての評価を今後も行うべきであろう。

本研究では他に高濃度OT含有膜挿入群での線条体でのNEの上昇、視床下部での5-HIAAの上昇、全ての膜挿入群で線条体における5-HT濃度の上昇、視床下部、海馬における5-HT代謝の変化が示された。これらが毒性学的評価に使えるかどうかは、今後実験を積み重ね判断する必要があり、また機序についても検討する必要がある。

モデル実験には、まだ課題があり、脳損傷を減ずるためには、抗生物質の術前投与は感染防止を更に有効にするために必要かもしれない。他に麻酔薬の選択、使用ラットの週令（より若い週令）についても検討の余地がある。

埋植した膜が組織と癒着した動物が観察された。合成高分子からなる共重合体の一部では、感作性が知られており、炎症等による癒着発生とそれらの影響については、今後、検討を要すると考える。

7. コンピューター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、これまでに得られた簡易モデルや膝関節モデルの結果と類似しており、本バーチャル・シミュレータモデルの妥当性を示す結果となった。しかし、本モデルでは筋肉として大腿四頭筋のみを考慮しており、ハムストリングスは考慮していない。そのため、脛骨の外旋が生じたことが考えられる。実際の生体膝関節あるいは人工関節で置換した膝関節では、ほとんどの場合、脛骨は内旋を生じることが知られている。したがって、より自然な屈曲動作を成り立たせるためにはハムストリングスモデルの導入が必要不可欠である。ハムストリングスモデルについては、現在検討中である。

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たモデルであり、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。次に開発した生体膝関節モデルは、骨と軟組織の力学的相互作用をある程度考慮しており、より生体に近づいたモデルであった。しかし、自然な屈曲動作を再現しているとは言い難い。今回開発したバーチャル・シミュレータは、機械構造部分を有す

るものの、屈曲動作自体はより自然な状態を再現することができた。これらの異なる3種類のシミュレーション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。

8. 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

本結果より、ステントストラットには血流の方向を変化させる可能性があることが分かる。これは、今後の脳動脈瘤ステント（頭蓋内ステントも含む）のレギュレーションにおいて、血流に関してのコメントがあった場合、血管とストラットに関して留意する必要があることを示唆している。さらに、ファイナメッシュである場合においても、血流が完全に遮断されることはないことをこの結果では示している。これは、今後のレギュレーションにおいて、血流の遮断能力に関して留意することが必要であることを示唆している。なお、本ファイナメッシュを従来の離散化手法で解析までできたのは、本邦では初めてである。

9. 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

光学式3Dデジタイザによる摩耗量測定の可能性の検証

おおよそ1 mm程度以上の摩耗深さがあるサンプルであれば、測定誤差の影響は相対誤差において0.1（10%）未満に抑えられるのではないかと予想ができる。抜去ライナーにこの程度の摩耗が見られることもあるため、そのような摩耗が進んだライナーであれば、光学式3Dデジタイザによる摩耗量測定値にも一定の信頼性があることが見込まれる。

本研究では、いくつかの仮定において、摩耗モデルおよび測定誤差モデルを考えた。その仮定では、摩耗が一方向的に進むとしていることや、非摩耗球面の中心位置が始めから明らかである点など、実際の摩耗状態や測定データの状態よりも緩やかな条件設定がなされている面がある。そのため、実際よりも測定誤差の影響を過小評価してしまう可能性も考えられる。

その一方で、ワーストケースとして条件設定している仮定もある。

摩耗モデル「摩耗前の摺動面半径と摩耗によって生じた摺動面の半径は同じとする」とした仮定は、ライナーとステム骨頭とのクリアランスを無視して考えており、その分だけ摩耗によって生じる摺動面がより広く生じることになる。このことによって摩

耗体積の値は測定誤差の影響を受けやすくなると考えられる。

また、測定誤差モデルにおける測定誤差 σ の与え方についても、非常に極端なケースを考えており、実際よりも誤差の影響を過大に見積もっている可能性がある。本研究の測定誤差モデルでは、測定誤差 σ の値として測定装置であるVIVID 9iの測定精度の値を使用した。VIVID 9iの測定精度は、測定座標のばらつきをガウス分布としたときに、その標準偏差を3倍した値として定義されており、本研究の測定誤差モデルのように、摺動面の広い範囲に測定精度程度の誤差が生じることは極めて稀であるはずである。

形状測定装置を用いたUHMWPEカップの摩耗量測定

本研究では、光学式3Dデジタイザを用いてUHMWPEライナーの形状を測定し、その結果から摩耗体積の算出を試みた。光学式3Dデジタイザは、多数の測定点が容易に得られることから、摩耗体積の算出に当たって多くの測定点を利用することができる。それにより、測定点の少なさに起因する誤差は生じにくいことが期待できる。その一方、使用した装置では測定精度が ± 0.05 mmとなっており、微小な摩耗体積を測定するには十分でない。考察したように、モデル計算の結果からは、ライナーに1 mm程度以上の摩耗深さがなければ、相対誤差を0.1未満に抑えることができない可能性がある。したがって、ある程度大きな摩耗が存在するライナーのみが測定可能対象となる。

また、本研究では、形状測定データに対して演算を行うことにより、可能な限り主観に頼らずに非摩耗形状を推定する計算手法について提案を行った。実際のサンプルにおいては、前提条件が満たされるかの判断がまず必要になる。前提条件を満たしうるサンプルであっても理想的に満たすことはないため、前提条件からのずれがピークの出現位置にどの程度影響するかについてさらなる検討が必要である。

本研究の非摩耗球推定法では、測定対象とするUHMWPEライナーに、ほとんど摩耗していない部分が残されている必要がある。したがって、この要件を満たさないと考えられるライナーは適用対象とすることができない。しかし、この制限は、多くの従来研究において同様に存在するものであり、本研究の非摩耗球推定法に特有の欠点ではない。

また、本研究の非摩耗球推定法では、ライナーの外形から中心軸を算出し、その軸上に非摩耗球の中心が存在すると仮定している。したがって、そのよ

うな設計がなされていなければこの推定法は適用できず、また、加工精度が十分でなければ非摩耗部分の推定を誤る恐れがある。本研究で使用した評価関数は、一般的に計測誤差がガウス分布状に分布することを考慮し、ポリゴン三角形の面積にガウス分布関数をかけて総和した値を返す関数として定義した。今回提案した非摩耗球の推定方法は、接触式座標測定装置やマイクロCTなど比較的広範囲の3次元形状を測定できる測定装置であればそれらの測定データにも応用可能であると考えられる。特に、精度面では接触座標測定装置、測定範囲面ではマイクロCTの方が光学式3Dデジタイザよりも優れている場合が多い。これらの測定装置の測定データに対しても本研究の非摩耗球推定法を適用してみることでこの推定法の妥当性を検証できればと考えている。

10. 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

平板、半球どちらにおいても、カメラ中心から外れるにしたがってデータの精度が落ちていた。これには以下の3つの要因が考えられる。1) レンズの歪み、2) 低輝度、3) 計測対象の形状特性である。まず、レンズの歪みはカメラの中心から外れて端になるほど、大きくなる。カメラ全体に映し出せるように対象を配置しているため、その影響を受けたと考えられるが、レンズ歪みの補正についてはソフトウェア上で自動的に行なっているため、全体における影響は小さいと考えられる。次に輝度であるが、プロジェクタでグリッドパターンを投影することで、計測対象の表面にコントラストをつけたが、プロジェクタの中心から離れるにしたがって光量が落ちており、十分なコントラストが得られなかったことによる影響があったと考えられる。そして、形状特性であるが、平板の場合は平板を設置した台自体も平面であり、計測対象とした平板とともにグリッドパターンが投影されていたため、境界が曖昧となったと考えられる。また、半球については球の外側はカメラの視野から外れる領域となりやすく、計測できなかったと考えられる。したがって、計測対象はなるべくカメラ中心になるような設置が求められる。

一方で、ダイレータの挿入状況の計測については、人体模型や操作者の指の形状を三次元的に再現した。今後、三次元データを立体的に表示する技術が盛んになってきているため、臨場感ある手技の再現も可能になると考えられる。しかし、操作対象であるダイレータの形状を再現するには十分でなかった。ダイレータの直径は4mm程度であり、ガイドワイヤーの直径が2mm程度であるのに比べれば大きい。被写体としては小さいため、十分に検出できなかった。

解像度の高いカメラを使うことや計測の方向を変えることでダイレータの写り方を改善することはできると考えられるが、径が小さく、長さのある対象については、ステレオカメラの計測結果だけでなく、他の計測方法も検討すべきである。また、手術室での応用を考えると、無影灯などによる光量、ステレオカメラの配置場所なども今後の検討課題として残されているが、実験室環境での訓練などの記録を残すには使い易い手法である。

11. 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

今年度は医用材料として使用されている生分解性ポリマーの合成時に触媒として使用されるジブチルスズの不純物として含有される可能性があり、かつTリンパ球での解析からアレルギー性を有するとの報告もあるトリブチルスズのアレルギー性の評価をh-CLATで行うことが可能であるかを検討した。その結果、設定した試験濃度の最低濃度である(93ng/ml)からCD54のRFIが陽性基準の200を超えていた。一方、CD86のRFIは低濃度から高濃度まで30前後と変化がみられなかった。この結果は昨年度までに報告したポリマー自身のh-CLATの結果と酷似している。しかしながら、ポリマーでの結果が混在トリブチルスズの影響であるのか、もしくは全く別の原因に由来するのか、現在のところは不明である。またこれまでの報告にもCD54のみ陽性基準を超える物質があるが、そのメカニズムが共通しているのか検討の余地がある。それには実験だけでなく、今まで蓄積されたデータを整理し、CD54もしくはCD86のいずれかのみ陽性基準をクリアしているもの、両方が基準を満たしているもの、またそれぞれの動物実験での感作性の強弱との関係がどうであるかを照らし合わせる作業も重要であると考えられる。

一方、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が、LLNAでのトリブチルスズの報告がなされおらず、LLNAでの解析も行った。その結果、10mg/mlでSIが7となり陽性と判定され、h-CLATとの結果と相関がみられた。しかしながら、今年度LLNAは一度しか試験しておらず、再現性を確認する必要はある。

12. 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

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。よって、材料・細胞間相互作用解析は、埋植型医療機器を生体内で使用する際に生じる生体反応全般、特に不具合を予想・解析する上で非常に重要である。

生体が異物を排除するための機能、すなわち免疫機能を有するため、医療機器の埋植は少なくともその周辺部位には炎症反応が引き起こし、その後材料の特性に応じた反応を誘導すると考えられる。初期に生じる炎症反応程度は、その手術手技や機器の大きさ以外に、生体と接触するその材料の化学構造や表面特性が関連していることは古くから予想されており、事実、数多くの研究がこれまでに行われている。一方、自己組織化膜を利用した表面の構築とそれを用いた応用研究は、この10年強の間に飛躍的に発展してきており、化学構造を制御したモデル表面を調製する手段としては非常に有用である。本研究では、自己組織化膜を利用して調製したモデル表面特性とその表面と接触した細胞の挙動変化との関連性を検討し、埋植後の炎症反応を予測することが可能な新規in vitro手法が開発可能かどうかを考察した。今年度は、炎症を引き起こすメディエータを細胞集団間で伝達する一つの手段にもなりうる、細胞集団の恒常性維持を担う重要な細胞間連絡機能に対する材料特性の影響を中心に検討を行った。

今年度も、昨年度同様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種類の官能基をもつ表面を調製した。今回は、可能な限り接触角による細胞挙動への影響を排除して官能基のみの影響を検討することを試み、接触角を同程度とした表面を4種類調製した。調製時の条件は昨年度の研究結果から設定し、おおよそ70°前後の表面を調製することができた。これらの表面上で培養した骨芽細胞の分化挙動変化を観察すれば、官能基が細胞分化に与える影響を正確に評価できると考えたにも関わらず、4種類の表面上における細胞の接着、増殖及び分化程度には有意な差は認められなかった。ここから、いくつかの仮説を立てることができる。

- 1) 今回調製したような表面上の官能基は、細胞機能へ何ら影響を与えず、接触角で評価できるような全体としての表面特性が細胞挙動に影響を与える
- 2) 官能基は細胞挙動に影響を与えうるが、表面上

に存在するメチル基がその影響を打ち消す

3) 自己組織化膜を利用した官能基表面ではその官能基の運動性に乏しいため、特定の分子との相互作用を妨げ、結果として細胞への影響を発揮できない

そこで、これらの仮説についての検討を行う目的で、単一官能基表面上で別の細胞機能変化を検討した。今年度は、細胞集団の恒常性維持においてその機能の一部を担う細胞間連絡機能に着目した検討を行った。図4-6には各種官能基上での代謝協同阻害試験の結果を細胞毒性試験結果と共に示しているが、メチル基及び水酸基上においてはその機能阻害が生じることが示唆される結果を得た。

これらの表面上における細胞の形態を観察したところ、阻害がみられた官能基表面上においては接着した V79 は丸い形態をとって他と比べて占有面積が小さくなっていることが観察され、その伸展阻害を受けていることが示唆された。前述したように、代謝協同阻害試験においては、接着した細胞の占有面積が大きく結果を左右する。よって、その占有面積による効果と、官能基による効果とを区別しなければならない。占有面積と阻害との間に相関性が示唆されたことから、今回の阻害は細胞間連絡機能の本質的な阻害ではなく、細胞の伸展阻害に伴ったものである可能性が大きい。このことを確認する目的で、昨年度の検討で使用した種々の接触角をもつメチル基：水酸基混合表面を用いて代謝協同阻害試験を行った結果を、細胞の占有面積と代謝協同阻害との相関は認められなかった(図4-9)。これらのことは、V79 の細胞間連絡機能が何らかの形で直接材料表面より影響を受けうることを示唆している。細胞間連絡機能と表面特性との関連性に関する検討は、今後、遺伝子及びタンパク質レベルでの検討を続けていく予定である。

なお、昨年度の検討では、骨芽細胞初期接着の接触角依存傾向が、骨分化誘導因子を培地中に添加した場合のみではあるが認められていた。今回、繊維芽細胞の培養1日後の占有面積を測定したところ、表面接触角が70°前後で占有面積が極大を示すことが認められた。すなわち、細胞の初期接着機構、あるいは細胞の伸展機構は基本的に材料表面の自由エネルギーに影響を受けることが示唆された。この点については、様々な細胞を用いて同様の検討を行い、細胞接着及び伸展を制御する機構を明らかにしていきたい。

今後、複数の官能基を用いた2官能基混合表面を用いて同様の検討を進めていくことで接触角、あるいは官能基が特定の細胞機能に影響を与えることが明らかになる可能性は大きい。これまでの検討は、材料表面における複数の化学的及び物理化学的特性

が複雑に絡み合っただけで細胞挙動に影響を及ぼすことを示唆している。よって、検討に用いる細胞が異なれば材料表面から受ける影響も異なることが充分予想される。今後の検討においては、その点を十分に考慮して実験を進め、材料表面における細胞挙動変化、すなわち細胞に生じる反応と表面特性との関連を明らかにしていく。

今年度の報告には特に記していないが、モデル炎症系細胞の選択と実験系の構築の試みは継続して行っている。しかしながら、未だ適切な細胞及び実験系は構築できていない。今後は、株化細胞ではなく正常ヒト単球細胞などを用いての検討を行う必要があるだろう。

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 NH0st 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。また、同プレート上で培養した NH0st の細胞挙動に関する情報も得られたことから、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された。

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

ナノマテリアルの安全性を簡便にスクリーニングできる評価系を目標としていた。生物試験系とナノマテリアル分散液調製法の両者について、提案する予定であった。細胞毒性と染色体異常試験に限定した検討であるが、一次スクリーニングとしては、対応可能である。分散液の調製は、ナノマテリアルの多様性のため、一般的な方法を提案できなかった。

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

NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施し、カルシウムを導入したチタン合金等の生物学的安全性を評価した。その結果、未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示すが、NaOH 処理によって細胞毒性は認められなくなった。また、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に、骨芽細胞の分化レベルを促進させた。NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与するとともに、骨芽細胞の分化を促進させることが

明らかになった。材料のアパタイト形成能は、骨芽細胞の分化に関与するため、アパタイト形成能を定量的に評価することは、骨系医用材料のリスクアセスメントに有用である。

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した。その結果、血液凝固因子第 10 (F10) の SNP: rs3211736 で、人工心臓弁の機能不全の有無間での有意なアレル頻度の差が認められた。

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、診療情報も入手し、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。その結果、インプラントに起因すると思われる症例はインプラントの分析から推測することが可能であることが示唆された。これらの全ての症例でガンマ線照射滅菌に伴う UHMWPE コンポーネントの酸化劣化が不具合の遠因として考えられた。現在はこれに関して対策が施されているため、近年および今後埋植されるインプラントではこれを直接原因とする不具合は生じにくくなることが期待され、今後の検証が待たれる。これ以外の要素について考察すると、インピンジによるリム部破損と骨頭保持機構部分の力学的脆弱性が考えられた。この結果を、開発や審査にフィードバックすることにより、バイポーラ型人工骨頭の長寿命化が図られることが期待される。一方で、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. 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

本年度研究では高濃度 DBT 含有膜埋め込み群において、対照群と比べ、神経伝達物質及びその代謝産物の有意な高値が示され、人工硬膜の安全性評価のモデル実験系において、陽性対照として使用できる可能性が示された。

7. コンピューター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

実験的に用いられている膝関節シミュレータを基にバーチャル・シミュレータを開発した。バーチャル・シミュレータは、機械構造部、生体膝関節、人工関節から構成されている。筋肉としては大腿四頭筋のみを考慮した。構築したモデルを用いて屈曲動作を模擬した解析を行った結果、しゃがみ込み状態での自然な屈曲動作を再現することができた。今後、ハムストリングスモデルを導入することで、より生体に近い屈曲動作が再現できることが期待される。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。

8. 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

脳動脈瘤ステント（頭蓋内ステントに瘤内血流制御能力を付与したステント）のレギュレーション構築のために、血流解析において数値流体解析技術の開発とステント効力を示し、シミュレーションが有効であることを示した。

9. 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

光学式 3D デジタイザを用いて人工股関節や人工骨骨頭の UHMWPE ライナーの摩耗量測定を行う上での課題について研究を行った。

まず、測定装置の精度的に摩耗量の測定が可能であるかどうかの検討をモデル計算で行った結果、おおよそ 1 mm 程度の摩耗深さがあるライナーであれば、相対誤差を 10% 以内にする事ができるのではないかとこの予測が得られた。

また、測定された形状データから摩耗量を算出する際に問題になる、非摩耗形状が不明である点について、抜去ライナーの形状測定データから非摩耗形状を推定する計算手法について提案を行った。

10. 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

カテーテル手技中の問題点を抽出するために、手技を予め計測、記録できるシステムの開発を行った。ステレオカメラを用いた三次元形状計測により、作業領域の立体的な情報を取得できた。手軽に使えるカメラで手術作業を記録できれば、リスク管理において役立つだろう。今回の実験ではカテーテルのような小さな機器の動きを取得するには十分ではなかったが、他の計測器との併用により、動き情報を取

得していく。さらに、三次元ディスプレイ等の技術と組み合わせれば、情報の直感的な理解を得られると期待される。

11. 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

トリブチルスズ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 *in vivo* の系である LLNA の結果の間で比較・検討した。その結果、両者とも陽性判定基準をクリアしていたことから、トリブチルスズが両解析法でもアレルギー性を有すると評価されることが示唆された。

12. 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

いくつもの材料表面特性による細胞挙動への影響を別々に考慮するために、2種類の官能基からなるモデル表面を自己組織化膜により調製し、その上で骨芽細胞及び繊維芽細胞の機能変化を観察した。表面自由エネルギーの指標となる接触角が同程度で、構成する官能基が異なる表面上で骨芽細胞の分化を検討したが、官能基の違いによる分化挙動への影響は見られなかった。また、繊維芽細胞の細胞間連絡機能変化を検討したところ、その阻害程度と接触角、あるいは官能基との関連性は見いだせなかった。一方、細胞の初期接着挙動と接触角との間にはその相関が示唆されたことから、表面特性を表面自由エネルギーと化学構造とに分けて考えると、着目した細胞挙動に応じてその2つの特性が与える影響の度合いは異なり、それらの影響のバランスが重要であることが考えられた。もちろん、この2つ以外の要因も考慮する必要があるが、少なくとも表面特性の影響程度を化学的及び物理化学的特性に分けて詳細に検討することが、材料と相互作用した生体に引き起こされる様々な反応の機構を解明する上で重要であり、その検討手段として自己組織化膜を利用したモデル表面は非常に有用であることが本研究において示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. R. Nakaoka, Y. Yamakoshi, K. Isama, T. Tsuchiya: Effects of surface chemistry prepared by self-assembled monolayers on osteoblast behavior, *Journal of Biomedical Materials*

Research: Part A, in press

2. Matsuoka, A., A. Onfel, Y. Matsuda, R. Nakaoka, Y. Haishima, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya, Development of an *in vitro* screening method for safety evaluation of nanomaterials. *Bio-Med. Mater. Engineering*, 19, 19-27, 2009.
3. 大嶋智子、尾崎麻子、中島晴信、伊佐間和郎、土屋利江：ポリ乳酸プラスチック中の有機スズ化合物の分析、大阪市立環境科学研究所報告、71、21-26 (2009)
4. Ahmed S., Tsuchiya T., Nagahata-Ishiguro M., Sawada R., Banu N., and Nagira T. : Enhancing action by sulfated hyaluronan on connexin-26, -32, and -43 gene expressions during the culture of normal human astrocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 90A, 713-719 (2009).
5. 迫田秀行、石川格、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高密度架橋ポリエチレンの疲労特性評価 臨床バイオメカニクス, 30, 263-268 (2009)
6. 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 第二報 人工股関節 臨床バイオメカニクス, 30, 319-323 (2009)
7. M. Tsuji, Y. Inoue, C. Sugaya, M. Tsunoda, T. Sugaya, M. Takahashi, T. Yuba, T. Tsuchiya, Y. Aizawa, Higher toxicity of dibutyltin and poly-L-lactide with a large amount of tin but lower toxicity of poly-L-lactide of synthetic artificial dura mater exhibited on murine astrocyte cell line. *YAKUGAKU ZASSHI* 130, 847-855, 2010.
8. 東藤 貢, 長嶺隆二, 高橋祐二, 医療用画像に基づく3次元膝関節モデルの構築と人工膝関節の応力解析への応用, *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, Vol. 30, 2009, 339-346.
9. L. Augsburger, P. Reymond, E. Fonck, Z. Kulcsar, M. Farhat, M. Ohta, N. Stergiopoulos, D. A. Rüfenacht, Methodologies to assess blood flow in cerebral aneurysms: Current state of research and perspectives, *Journal of Neuroradiology*, 2009 (accepted)
10. Makoto Suto, Hiroyuki Kosukegawa, Kaoru Maruta, Makoto Ohta, Kazuyuki Tohji, Balachandran Jeyadevan, Heat diffusion characteristics of magnetic nanoparticles dispersed hydro-gel in alternating magnetic

- field, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* June 27th, 2009, pp. 3483-3487
11. Yuang-Seng Tsuei, Yasushi Matsumoto, Makoto Ohta, Toshio Nakayama, Masayuki Ezura, Akira Takahashi, Vertebrobasilar junction fenestration with dumbbell-shaped aneurysms formation: computational fluid dynamics analysis, *Surgical Neurology*, 2009 (accepted)
 12. Lei Liu, Hiroyuki Kosukegawa, Makoto Ohta, Toshiyuki Hayase, An isotropic in vitro Vessel Model Using (Vinyl Alcohol) Hydro Gel and Mesh Material, *Journal of Applied Polymer Science*, 2009 (accepted)
 13. ChangHo Yu, Hiroyuki Kosukegawa, Keisuke Mamada, Kanju Kuroki, Kazuto Takashima, Kiyoshi Yoshinaka, makoto Ohta, Study on Catheter Movement with Poly (vinyl alcohol) Hydrogel for the Development of an In Vitro Tracking System, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2009 (accepted)
 14. Takashi Yamada, Ryusuke Nakaoka, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya. Effects of intracerebral microinjection of hydroxylated-[60] fullerene on brain monoamine concentrations and locomotor behavior in rats. *J. Nanoscience Nanotechnol.*, 2010, 10, 604-611.
 15. 土屋利江、医療用ナノ材料の国際標準化動向「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」 pp. 279-287. 2010 フロンティア出版、東京
 16. 土屋利江、フラーレンの毒性評価「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」 pp. 121-127, 2010. フロンティア出版、東京
 17. 土屋利江、医療機器の製造販売承認について、特集「コラーゲン・テクノロジーの新展開」*Materials Integration* 23, 67-70, 2010.

2) 学会発表

1. Toshie Tsuchiya Insight ISO 10993-3 with special focus on the mechanism of tumorigenesis induced by medical materials. Seminar Biological evaluation of medical devices based on ISO 10993 series. Jinan, China 18 April 2009.
2. Toshie Tsuchiya The requirements regarding biological evaluation of medical devices in Japan. Seminar Biological evaluation of medical devices based on ISO 10993 series. Jinan, China 18 April 2009.
3. 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, 東大 山上会館 2009. 7. 28
4. Toshie Tsuchiya, A general overview of safety control and the developed evaluation criteria on biomaterials and medical devices in Japan. Beijin 2009. 9. 28-29.
5. 土屋利江、再生医療品の製品化 第6回 Advanced Anti-Aging 研究会 2009. 10. 30.
6. 土屋利江、石川烈、石川格、松山晃文、澤芳樹, TR 実践のための戦略的高機能拠点整備事業生分解性材料の安全性試験(1):オリゴマーのモルモット遅延型アレルギー誘発能, 第47回日本人工臓器学会, 2009年11月12-14日
7. 石川烈、石川格、中岡竜介、齋藤充弘、松山晃文、澤芳樹、土屋利江, TR 実践のための戦略的高機能拠点整備事業医用材料の安全性試験(1):カーボンナノチューブの細胞毒性と形質転換活性, 第47回日本人工臓器学会, 2009年11月12-14日
8. 土屋利江、笠本佐和子、石川烈、石川格、松山晃文、澤芳樹, TR 実践のための戦略的高機能拠点整備事業生分解性材料の安全性試験(3):生分解性材料の染色体異常試験, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16-17日
9. 石川烈、石川格、中岡竜介、齋藤充弘、松山晃文、澤芳樹、土屋利江, TR 実践のための戦略的高機能拠点整備事業 医用材料の安全性試験(2):カーボンナノチューブとその誘導体の細胞毒性と形質転換活性, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16-17日
10. 土屋利江、石川烈、澤田留美、白畑実隆、松山晃文、名井陽、澤芳樹、町田一彦、浦野浩司、川井健司, 腫瘍細胞の高感度検出法開発:NOGマウスにおける各種条件下での1及び10個腫瘍細胞増殖能, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月18-19日
11. 石川 烈、土屋利江、齋藤充弘、澤芳樹, 腫瘍細胞の検出方法:迅速簡便な軟寒天コロニー形成試験法の検討, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月18-19日
12. 藪島由二、伊佐間和郎、長谷川千恵、松岡厚子、土屋利江. スルホン化材料が持つ骨芽細胞分化促進機能と材料吸着蛋白質の相関性. 第31回日本バイオマテリアル学会大会 (2009年11月・京都).
13. Matsuoka, A, Y. Matsuda, K. Isama, H. Sakoda, T. Tsuchiya, Polyploidy induction by five size-different polystyrene particles in a Chinese hamster cell line CHL, 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月 イタリア・フィレンツェ)
14. K. Isama, T. Tsuchiya: Osteoblast compatibility of Ti-Zr-Nb alloys, *Biomaterials Asia* 2009 (2009. 4, Hong Kong)

15. 大嶋智子、中島晴信、伊佐間和郎、土屋利江：高分子材料中に不純物として含まれる有機スズ化合物の分析、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会（2009 年 11 月、盛岡）
16. 伊佐間和郎、河上強志、土屋利江、松岡厚子：アルカリ処理・カルシウム導入による Ti-Zr-Nb 合金へのアパタイト形成能の付与、第 31 回日本バイオマテリアル学会大会（2009 年 11 月、京都）
17. 伊佐間和郎：金属材料の骨組織適合性評価—Ti-Zr-Nb 合金の例—、日本金属学会 2010 年春期講演大会（2010 年 3 月、つくば）
18. 澤田留美、松山晃文、大倉華雪、土屋利江、松岡厚子「細胞組織加工医療機器に用いられる幹細胞の *in vitro* 培養時における品質及び安全性評価に関する研究」第 9 回日本再生医療学会（2010. 3）
19. 迫田秀行、土屋利江：ガンマ線照射と熱処理が UHMWPE の疲労特性に与える影響 日本機械学会 2009 年度年次大会, J0401-1-1（2009 年 9 月、盛岡市）
20. 迫田秀行、石川格、脇谷滋之、天正恵治、佐藤道夫、松岡厚子：人工関節用超高分子量ポリエチレンのフラクトグラフィに関する基礎的研究 第 36 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 36, T4-1（2009 年 10 月、松山市）
21. 石川格、迫田秀行、菅野伸彦、松岡厚子：光学式 3D デジタイザによる抜去人工股関節 UHMWPE ライナーの摩耗測定 第 36 回 日本臨床バイオメカニクス学会, 36, 0-115（2009 年 10 月、松山市）
22. 迫田秀行、松岡厚子：超高分子量ポリエチレンの疲労特性に及ぼす脂質の影響 第 31 回 日本バイオマテリアル学会, 31, 1P15（2009 年 11 月、京都市）
23. 迫田秀行、石川格、松岡厚子、西井孝、菅野伸彦：破損したバイポーラ型人工骨頭の不具合要因分析 第 40 回 日本人工関節学会, 40, P2-048（2010 年 2 月、沖縄県宜野湾市）
24. 辻雅善、井上葉子、菅谷ちえ美、角田正史、菅谷津貴子、高橋正身、柚場俊康、土屋利江、相澤好治（2009）人工硬膜の主成分であるポリ乳酸ラクチド及び合成時の触媒であるジブチルスズ、オクチル酸スズのアストロサイト系細胞に対する毒性評価. 日本衛生学雑誌, 64, 463.
25. 角田正史、菅谷ちえ美、井上葉子、工藤雄一朗、佐藤敏彦、片桐裕史、秋田久直、佐治眞理、土屋利江、相澤好治（2009）人工硬膜の安全性評価に関する研究（第 3 報）：人工硬膜（直径 8mm）埋め込みラットに対する行動学試験. 日本衛生学雑誌, 64, 464.
26. 角田正史、峽戸孝也、細川まゆ子、工藤雄一朗、土屋利江、相澤好治（2009）合成吸収性人工硬膜の安全性評価に関する研究：動物モデルの 2 ヶ月観察後の行動学試験. Biomedical Research on Trace Elements, 20(2), 170.
25. 東藤貢、大野充孝、日垣秀彦、三浦裕正、長嶺隆二、バーチャルシミュレータによる人工膝関節の応力解析, 第 36 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2009, 230.
26. 大野充孝、東藤貢、日垣秀彦、三浦裕正、バーチャルシミュレータによる人工関節置換膝の応力解析, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 2010, 356.
27. M. Todo, Yuji Takahashi, Ryuji Nagamine, Shunji Hirokawa, Contact stress analysis for artificial knee joints during gait and flexional motions, World Tribology Congress 2009, 2009, 889.
28. M. Todo, L. Qian, R. Nagamine, W. J. Chen, T. Hara and Y. Sugioka, Comparison of Posterior Stabilized and Cruciate Retaining Type Knee Prostheses under Flexional Motion, The 22nd Annual Congress of International Society for Technology in Arthroplasty, 2009, A843.
29. Mamada, Kanju Kuroki, Lei Liu, Kosuke Inoue, Toshiyuki Hayase, Makoto Ohta, Study on the Development of Blood Vessel Biomodeling with Realistic Mechanical Properties Using Poly(vinyl alcohol) Hydrogel, 4th Asian Pacific Conference on Biomechanics, University of Canterbury, Christchurch, Apr. 14-17, 2009, pp. 126-127
30. Chang-Ho Yu, Hiroyuki Kosukegawa, Keisuke Mamada, Kanju Kuroki, Kazuto Takashima, Kiyoshi Yoshikawa, Makoto Ohta, Study on a Catheter Movement with Poly (vinyl alcohol) Hydrogel for the Development of an In-Vitro Tracking System, 4th Asian Pacific Conference on Biomechanics, University of Canterbury, Christchurch, Apr. 14-17, 2009, pp. 301-302
31. Zijing Zeng, Akira Takahashi, Hiroaki Shimizu, Makoto Ohta, Teiji Tominaga, Anne M. Robertson, A parametric model for side wall and bifurcation cerebral aneurysms, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P. 61
32. K. Takashima, M. Ohta, K. yoshioka, T. Murai, S. Oota, Computational simulation for catheter

- and guidewire motion in blood vessels, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.75
33. S. Shida, H. Kosukegawa, K. Kuroki, M. Ohta, Optical properties measurement of Poly (vinyl alcohol) hydrogel biomodel for applying Particle Image Velocimetry, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.82
34. H. Kosukegawa, K. Mamada, K. Kuroki, L. Liu, K. Inoue, T. Hayase, M. Ohta, Evaluation of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel Biomodeling by Using Ultrasound, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.83
35. C.H. Yu, H. Kosukegawa, K. Mamada, K. Kuroki, K. Takashima, K. Yoshinaka, M. Ohta, Experimental Study on a Catheter Movement for evaluating Catheter Designs, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.83
36. M. Ohta, T. Nakayama, H. Anzai, J. Cebal, L. Augsburger 10. 3rd Virtual Intracranial Stenting Challenge(VICS09), International Intracranial Stent Meeting 2009: Virtual Intracranial Stent Challenge 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.84
37. K. Tokunaga, H. Hyase, T. Nakayama, K. Sugiu, A. Nishida, S. Arimitsu, T. Hishikawa, S. Ono, M. Ohta, I. Date, Computational Fluid Dynamics of Carotid Arteries after Carotid Endarterectomy or Carotid Artery Stenting based on Postoperative Patient-specific Data, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.87
38. Y. Umeda, K. Hamada, K. Fukazawa, Y. Miura, F. Ishida, S. Matsushima, S. Shimosawa, W. Taki, M. Ohta, Improvement of Dynamic Four-dimensional CT Angiography (DFA) and apply to the Computational Fluid Dynamics, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.93
39. H. Anzai, Y. Takeshima, T. Nakayama, M. Ohta, 3D Visualization of numerical simulation of blood flow on intracranial stent, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.93
40. K. Matsumoto, S. Noda, K. Fukasaku, R. Himeno, Makoto Ohta, Measurement of Flow Speed of In Vitro Aneurysm Models with Coils Using Particle Image Velocimetry (PIV), International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.97, Poster Presentation
41. M. Hirabayashi, M. Ohta, H. Kojima, K. Oiwa, D. A. Rufenacht, B. Chopard, Numerical Analysis on Characteristic Effects of Stent in Cerebral Vessels, International Intracranial Stent Meeting 2009, Sendai, Japan, Aug. 5-7, 2009, P.100
42. Hitomi Anzai, Toshio Nakayama, Yuriko Takeshima, Makoto Ohta, 3D Visualization of Numerical Simulation of Blood Flow on Intracranial Stent, Third Switzerland-Japan workshop on Biomechanics 2009(SLB 2009), Institute for Biomechanics, ETH Zurich, Engelberg, Switzerland, Sep. 1-4, 2009, P. 72
43. Hiroyuki Kosukegawa, Yoko Hashida, Toshiyuki Hayase, Makoto Ohta 18. Poly(vinyl alcohol) Hydrogel with Controlled Wall Thickness for Blood Vessel Biomodeling, Third Switzerland-Japan workshop on Biomechanics 2009(SLB 2009), Institute for Biomechanics, WTH Zurich, Engelberg, Switzerland, Sep. 1-4, 2009, P. 75
44. Shuya Shida, Hiroyuki Kosukegawa, Kanju Kuroki, Makoto Ohta, Development of Particle Image Velocimetry System for intra-aneurysmal flow in arterial biomodel made of Poly (vinyl alcohol) hydrogel, Third Switzerland-Japan workshop on Biomechanics 2009(SLB 2009), Institute for Biomechanics, ETH Zurich, Engelberg, Switzerland, Sep. 1-4, 2009, P. 76
45. Keisuke Mamada, Hiroyuki Kosukegawa, Vincent Fridrici, Philippe Kapsa, Makoto Ohta, Friction properties of PVA-H / steel ball contact, Proceedings of World Tribology Congress 2009, Kyoto International Conference Center, Sep.6-11, 2009, p787
46. K. Ozawa, K. Yamaguchi, N. Oikawa, Y. Katakura, Y. Shibata, K. Kuroki, M. Ohta, Analysis of

- Drilling bone Biodeling, International Bone-Tissue-Engineering Congress, Hannover, Germany, Oct. 8-11, 2009, p54
47. T. Nakayama, K. Srinivas, M. Ohta, Development of stent for Cerebral Aneurysm, Proceedings of the Ninth International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary fluid Integration(ATI/TFI 2009), Nov. 4-5, 2009, pp. 68-69
48. C. H. Yu, H. Kosukegawa, K. Mamada, K. Kuroki, K. Takashima, K. Yoshinaka, M. Ohta, Experimental Study on a Catheter Movement for Evaluating Catheter Designs Using an In-Vitro Tracking System, Sixth International Conference on Flow Dynamics(ICFD), Global COE Program, Nov. 4-6, 2009, pp. 352-353
49. Keisuke Shinohara, Kotoe Mizuki, Kazunari Katagiri, Hidemasa Tanaka, Makoto Ohta, Hideya Nishiyama, Dynamic response and Functionalization of Magneto-Rheological fluid flow in a biological tube, 第 28 回昆相流シンポジウム 昆相流学会年会講演会 The Japanese Society for Multiphase Flow (JSMF), 2009 年 8 月 7 日, pp. 116-117
50. Shuya Shida, Hiroyuki Kosukegawa, Kanju Kuroki, Makoto Ohta, Development of working fluid for Particle image velocimetry measurements of intra-aneurysmal flow in biomodel made of Poly(Vinyl alcohol) hydrogel, 計測自動制御学会東北支部 45 周年記念学術講演会, 2009 年 9 月 7-8 日, pp. 27-28
51. Kaoru Matsumoto, Shigeo Noda, Kazuaki Fukasaku, Ryutaro Himeno, Makoto Ohta, Hemodynamic studies of coiling in cerebral aneurysm model, Mechanical Engineering Congress, 2009 Japan, Nihon Kikai Gakkai, Iwate University, Sep. 13-16, 2009, vol. 6, pp. 171-172
52. Hitomi Anzai, Yuriko Takeshima, Toshio Nakayama, Makoto Ohta, 3D visualization of numerical simulation of blood flow on intracranial stent, Mechanical Engineering Congress, 2009 Japan, Nihon Kikai Gakkai, Iwate University, Sep. 13-16, 2009, vol. 6, pp. 177-178
53. 松本薫、野田茂穂、深作和明、姫野隆太郎、太田信, コイルを留置させた脳動脈瘤モデルでの血流の定量的測定法の開発, Journal of Neuroendovascular Therapy, Vol 3. No. 4, The 25th Annual Meeting of the Japanese society for Neuroendovascular Therapy (第 25 回日本脳神経血管内治療学総会), 2009 年 11 月 19-21 日, p. 257
54. 深作和明、根来真、野田茂穂、松本薫、太田信、奈良一成、高木周、姫野龍太郎, 脳動脈瘤コイル塞栓後の血流変化の計算機流体力学による評価, Journal of Neuroendovascular Therapy, Vol 3. No. 4, The 25th Annual Meeting of the Japanese society for Neuroendovascular Therapy (第 25 回日本脳神経血管内治療学総会), 2009 年 11 月 19-21 日, p. 263
55. 石川格, 迫田 秀行, 菅野 信彦, 松岡 厚子. 光学式 3D デジタイザによる抜去人工股関節 UHMWPE ライナーの摩耗測定. 日本臨床バイオメカニクス学会, 0-115 (2010 年 10 月, 松山)
56. 中岡竜介、松岡厚子「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 (2) : 細胞機能への影響を中心に」、第 31 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009 年 11 月 16、17 日
57. 土屋利江、日本の医療機器の研究開発と制度の動向、第 59 回高分子年次大会特別セッション「高分子・今・未来」2010 年 5 月 26-28 日、横浜

表 1

スルホン化プレート上で培養したNH0stの遺伝子発現と細胞内蛋白質発現の相関性

Gene symbol	Control vs Sample (S/C ratio)				Protein name
	2 hr	4 hr	8 hr	1 day	
AIFM2		1.123	0.500	1.075	Apoptosis-inducing factor 2
ALPL	1.142	1.082	1.692	2.106	Alkaline phosphatase
ARID2	0.657	0.823	1.242	2.029	AT-rich interactive domain-containing protein 2
ATG2A	1.161	1.352	2.060	1.005	Autophagy-related protein 2 homolog A
BMP1	1.020	1.119	1.453	2.197	Bone morphogenetic protein 1
	1.100	1.134	1.683	2.202	
CALD1	3.942	1.160		0.598	Caldesmon
	1.765	0.884	2.117	1.523	
	1.572	1.673	2.253	1.990	
	1.171	1.467	2.999	2.561	
	2.771	1.368	2.713	1.300	
	1.027	1.162	2.477	2.121	
CDH11	1.114	1.252	1.444	2.592	Cadherin-11
	1.237	1.141	1.258	2.318	
	1.171	1.092	1.274	2.070	
CSE1L	0.975	1.165	1.029	0.427	Exportin-2
	1.032	1.126	1.095	0.458	
	1.000	1.082	1.048	0.357	
EHD2	1.116	1.263	1.645	2.183	EH domain-containing protein 2
FN1	1.468	1.763	2.358	0.809	Fibronectin
FNDC3B	0.674	0.956	2.213	1.551	Fibronectin type III domain-containing protein 3B
FSTL1	0.435				Follistatin-related protein 1
GBP2	1.263	0.895		4.285	Interferon-induced guanylate-binding protein 2
		1.407	3.342	6.239	
GSG2	0.935	1.461	0.845	0.299	Serine/threonine-protein kinase haspin
HSP90AA1	1.059	1.021	0.972	0.429	Heat shock protein HSP 90-alpha
HSP90B1		2.108	0.898		Heat shock protein HSP 90-beta
HSPA4L	0.864	1.300	2.283	1.458	Heat shock 70 kDa protein 4L
IRF6				3.583	Interferon regulatory factor 6
ITPR3	1.153	1.259	0.805	2.111	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
KIAA1524	0.961	0.767	1.327	0.420	Protein CIP2A
	1.102	1.127	1.156	0.259	
MAPK8	1.124	0.731	2.310	0.909	Mitogen-activated protein kinase 8
NEK11	0.842	1.250	3.499	1.344	Serine/threonine-protein kinase Nek11
NRD1	0.974	2.140	1.601	1.173	Nardilysin
OPTN	1.050	1.275	1.380	2.408	Optineurin
PA2G4	1.064	1.198	1.208	0.445	Proliferation-associated protein 2G4
PDCD6	0.893	1.272	1.064	0.395	Programmed cell death protein 6
	1.212	1.421	2.809		
PHB	1.028	1.056	0.873	0.496	Prohibitin
PPP2R5C			2.399	1.086	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform
PRG4	0.978	1.046	2.100	1.879	Proteoglycan 4
PTPRD	0.813	1.138	2.091	1.313	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta
RAB11B				2.173	Ras-related protein Rab-11B
RAB15	0.705	1.014	1.099	3.240	Ras-related protein Rab-15
RAB7A	0.845	1.090	0.417	0.702	Ras-related protein Rab-7a
SEPT2	1.369	1.512	3.062	2.112	Septin-2
SEPT9	0.992	1.804	2.011	1.133	Septin-9
SNX1	1.005	1.346	2.205	1.546	Sorting nexin-1
STIP1	1.026	1.097	1.030	0.471	Stress-induced-phosphoprotein 1
TLK1	1.385	1.450	2.470	0.877	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1

表 2 ターゲットとしたSNP

Gene	JSNP	dbSNP(rs)	Location
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005633	rs11178	3'UTR c.1570C>T
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST058119	rs6092	CDS (Ala/Thr) c.43G>A
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST058120	rs6090	CDS (Ile/Val) c.49G>A
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005631	rs2070682	INTRON c.700+1921C>T
SERPINE 1 (PAI-1)	IMS-JST005632	rs2070683	INTRON c.1087+859T>A
CYP2C9	IMS-JST052819	rs2298037	INTRON c.1149+147C>T
CYP2C9 *3		rs1057910	CDS (Ile/Leu) c.1075A>C
CYP2C9 *13			CDS (Leu/Pro) c.269T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005890	rs2070850	INTRON c.240+83T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005891	rs2070851	INTRON c.316+2125C>T
F2 (prothrombin)	IMS-JST005892	rs2070852	INTRON c.422+90G>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST005893	rs5896	CDS (Met/Thr) c.494T>C
F2 (prothrombin)	IMS-JST031911	rs2282686	INTRON c.1472+251C>T
F2 (prothrombin)	IMS-JST031912	rs2282687	INTRON c.1654+290C>T
F7	IMS-JST017150	rs6042	CDS-synonymous c.525C>T
F9	IMS-JST178462	rs3817939	INTRON c.88+75A>G
F10	IMS-JST069694	rs5960	CDS-synonymous c.792T>C
F10	IMS-JST103451	rs3211719	INTRON c.70+270A>G
F10	IMS-JST117973	rs2026160	INTRON c.256+98A>C
F10	IMS-JST119689	rs3211736	INTRON c.231+64C>T
F10	IMS-JST152051	rs3838839	INTRON c.502+2115~2116
F10	IMS-JST190984	rs3829391	INTRON c.502+2531A>G
GGCX	IMS-JST006491	rs2028898	INTRON c.2084+408C>T
VAMP8	IMS-JST041766	rs12888	CDS-synonymous c.201A>G
VAMP8	IMS-JST085287	rs3731828	CDS-synonymous c.138C>T
TGF β1	IMS-JST096736	rs1800470	CDS-synonymous c.29C>T
TGF βRI		rs7861780	CDS-synonymous c.1125A>C
TGF βRII		rs1050833	CDS(Glu/Val) c.946A>T
TGF βRII		rs3209742	CDS(Ala/Val) c.1606T>C