細胞毒性実験による圧電材料の生体適合性評価[†]

上 辻 靖 智* 上 田 剛 大** 黄 輝 心***
平 野 義 明**** 槌 谷 和 義***** 仲 町 英 治*****

Biocompatibility Evaluation of Piezoelectric Materials through Cytotoxicity Test

by

Yasutomo UETSUJI*, Takahiro UEDA**, Hwishim HWANG***,
Yoshiaki HIRANO****, Kazuyoshi TSUCHIYA***** and Eiji NAKAMACHI*****

Biocompatible piezoelectric materials are becoming increasingly important for actuators and sensors in medical devices. In this paper, we highlighted on some perovskite-type oxides MgSiO_3 , CaSiO_3 and CaTiO_3 of biocompatible piezoelectric materials discovered by first-principles calculation in our previous studies. In order to verify their biocompatibility, the cytotoxicity of similar oxides with the same components was examined as comparing with typical perovskite-type oxides $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ and BaTiO_3 . The fibroblast (L929) cells were cultured during 7 days and the effect of materials was evaluated by relative proliferation ratio and doubling time. As a result, it was recognized that MgSiO_3 and CaTiO_3 has the higher biocompatibility. On the other hand, CaSiO_3 and $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ shows the strong toxicity and they can't be applied to medical devices.

Key words : Biomaterial, Piezoelectric Material, Perovskite-type Oxides, Cytotoxicity, Biocompatibility

1 緒 言

高齢化社会を支える新しい医療技術としてヘルスマニタリングシステム (HMS : Health Monitoring System) やドラッグデリバリーシステム (DDS : Drug Delivery System) が注目されている。例えば、血液を分析し血糖値などの健康指標をモニタリングできる医用デバイスの開発が盛んである。¹⁾ 著者らもこれまでに、糖尿病患者を対象として自動採血および血糖値分析が可能な医用電子機械の開発を行ってきた。²⁾ これらの医用電子機械において、機械的・電気的機能を備えた上で生体適合性を満足する材料が要求され、特に種々のアクチュエータに利用可能な圧電材料の開発が強く求められている。

優れた圧電性を発現するペロブスカイト型酸化物 $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ (PZT : チタン酸ジルコン酸鉛) は、圧電アクチュエータとして多用されるが、PZT 系圧電セラミックスは有害な鉛を含むことから医療機器への応用に問題がある。また、環境問題の観点から欧州の廃電気・電子機器 (WEEE) 指令³⁾ および有害物質使用規制 (RoHS) 指令⁴⁾ により、鉛を含めた有害物質の使用規制が強化された。このため、代替材料として非鉛圧電材料の開発が活発化している。⁵⁾ しかし、現状の材料開発では、元素置

換による非鉛化や他元素微量添加による既存無鉛材料の高性能化が最優先課題であり、医療機器への適用を前提として生体適合性を満足する圧電材料の開発はなお課題を残していると考える。そこで本研究では、医用電子機械へ適用可能な生体適合圧電材料を新規に創製することを目的として、これまでに密度汎関数法に基づく第一原理計算により体系的な新規材料探索を実施した。^{6), 7)} すなわち、ルイスの酸・塩基反応論に基づいた HSAB (Hard Soft Acids and Bases) 則^{8), 9)} により生体内分子との相互作用性を評価することで、生体に無害な生体適合元素を特定した。また、ペロブスカイト型酸化物 ABO_3 に対して、A および B 元素に生体適合元素を採用し、構造安定性の高い元素組合せを探索した結果、既存材料を含む酸化物 26 種の候補材料を得た。今後は、第一原理計算により圧電特性を評価してこれらの候補材料を厳選し、スパッタリング法による圧電薄膜創製技術の開発を目指している。¹⁰⁾ しかしながら、生体適合元素の特定において、単独元素の反応性しか考慮しておらず触媒作用による他元素との相乗効果による未知なる毒性発現などの危険があり、第一原理計算により得た候補材料の実験的な検証が必要である。特に、最適な薄膜創製条件を見いだすには

[†] 原稿受理 平成 20 年 1 月 15 日 Received Jan. 15, 2008 ©2008 The Society of Materials Science, Japan

* 正 会 員 大阪工業大学工学部機械工学科 〒535-8585 大阪市旭区大宮, Dept. of Mech. Eng., Osaka Inst. of Tech., Asahi-ku, Osaka, 535-8585
** 大阪工業大学工学部機械工学科 (現在 大王製紙(株)) 〒535-8585 大阪市旭区大宮, Dept. of Mech. Eng., Osaka Inst. of Tech., Asahi-ku, Osaka, 535-8585

*** 大阪工業大学大学院工学研究科 (現在 同志社大学大学院生命医科学研究科生命医科学専攻) 〒535-8585 大阪市旭区大宮, Graduate School of Eng., Osaka Inst. of Tech., Asahi-ku, Osaka, 535-8585

**** 大阪工業大学工学部応用化学学科 (現在 関西大学化学生命工学部化学・物質工学科) 〒535-8585 大阪市旭区大宮, Dept. of Appl. Chem., Osaka Inst. of Tech., Asahi-ku, Osaka, 535-8585

***** 東海大学工学部精密工学科 〒259-1292 平塚市北金目, Dept. of Precision Eng., Tokai Univ., Kitakinme, Hiratuka, 259-1292

***** 正 会 員 同志社大学生命医科学部医工学科 〒610-0394 京田辺市多々羅, Dept. of Biomedical Eng., Doshisha Univ., Tatara, Kyotanabe, 610-0394

膨大な労力を要することから、予め候補材料の生体適合性を実験的に検証し、開発リスクを軽減することが必要である。また、既存の圧電材料に対しても生体適合性は不明であり、医用電子機械の開発における材料選択に対して有効な指針がないのが現状である。

そこで本報では、既存の圧電材料と第一原理計算により得た候補材料に対して細胞毒性実験を実施し、生体適合性を実験的に検証した。実験にはマウス皮下結合組織由来の線維芽細胞株 L929 を採用し、細胞増殖率および倍加時間を評価した。また、既存の圧電材料として PZT および BaTiO₃ (チタン酸バリウム)、新規候補材料として MgSiO₃ (シリコン酸マグネシウム)、CaTiO₃ (チタン酸カルシウム) および CaSiO₃ (シリコン酸カルシウム) を採用した。なお、新規候補材料が優れた圧電性を発現するためにはペロブスカイト型構造の正方晶として創製する必要があるが未開発であることから、同じ化学組成を有する実在の材料で代用した。

2 生体適合圧電材料の探索

生体適合無鉛圧電材料の探索は、Fig. 1 に示すペロブスカイト型酸化物 ABO₃ を対象として、最初に A および B 元素に適用する生体適合非鉛元素を特定した。つぎに、結晶構造の幾何学的安定性評価に基づいて 3 元素の組合せを探索した。

2・1 生体適合元素の特定方法

ペロブスカイト型酸化物 ABO₃ が体内埋込み型デバイスに使用された場合、構成元素である A および B 元素が溶解し、体内のタンパク質や DNA と結合することによって生体機能を破壊する危険がある。そこで、ルイスの酸・塩基反応論に基づく HSAB 則^{8), 9)}により生体内分子との相互作用性を評価し、生体に無害な生体適合元素を特定した。生体内分子との相互作用性を評価するため、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸、アミノ酸の残基である配位基とそのアニオン、水素で終端化した配位基、DNA 内の最も破壊されやすい塩基グアニンを選択し、汎用量子化学計算プログラム (Gaussian 社製 Gaussian 98) を採用して最高占有軌道 (HOMO) および最低空軌道 (LUMO) の軌道エネルギーを計算した。一方、構成元素には鉛を含む既知の有害元素を除外した上で陽イオンとなり得るすべての金属元素に対して、生体内分子と同様に

HOMO および LUMO の軌道エネルギーを計算し、生体内分子との相互作用エネルギーを HSAB 則により算出した。

2・2 3 元素組合せの探索方法

ペロブスカイト型酸化物 ABO₃ の結晶構造は、A および B 陽イオンがいずれも O 陰イオンに最近接する場合に安定となることから、次式に示す幾何学的許容因子 t (Tolerance factor) により構造安定性を評価できる。

$$t = \frac{r_A + r_O}{\sqrt{2}(r_B + r_O)} \quad (1)$$

ここで、 r_A , r_B および r_O は、それぞれ A, B および O 元素のイオン半径を意味する。上式の幾何学的許容因子が $0.75 \leq t \leq 1.10$ を満足する場合、ペロブスカイト型結晶構造における安定性が高い。そこで、A および B 元素に生体適合元素を適用して、構造安定性の高い 3 元素 A, B および O 元素の組合せを探索した。すなわち、A および B 陽イオンと O 陰イオンの電気的中性条件を満足した上で、ペロブスカイト型化合物の幾何学的構造安定条件を満足する組合せを探索した。なお、構造安定条件式には、ポーリングのイオン半径を採用した。

2・3 探索結果

生体内分子との相互作用エネルギーが -0.3eV 以上であることを生体適合元素の判定基準とし、これを満足する 6 種類の元素 (Li, Ba, K, Au, Rb, In) を特定した。また、生体必須元素 (Ca, Fe, Ge, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Sn, Zn) および生体適用実績のある元素 (Si, Ca, Ta, Ti, Zr) も生体適合元素に加えた。これらを A および B 元素に適用した場合、ペロブスカイト型酸化物 ABO₃ の元素組合せ探索結果を Table 1 に示す。シリコン酸化物 5 種、ゲルマニウム酸化物 6 種、モリブデン酸化物 6 種、チタン酸化物 6 種、ジルコン酸化物 4 種が構造安定条件式を満足した。表中のチタン酸バリウム BaTiO₃ は最初に強誘電性が発見されたペロブスカイト型構造の正方晶をもつ既存材料である。無鉛圧電材料として注目され、性能改善のための他元素添加や混晶化が積極的に研究されている。また、CaGeO₃, BaMoO₃, CaMoO₃, BaZrO₃, CaZrO₃, CaTiO₃ は、ペロブスカイト型構造の立方晶または斜方晶をもつ酸化物として知られているが、圧電材料としての使用実績はない。BaGeO₃, FeGeO₃, ZnGeO₃, MgGeO₃, MnTiO₃, FeTiO₃, ZnTiO₃, MgTiO₃, MnSiO₃, ZnSiO₃ は非ペロブスカイト型構造をもつ鉱物、MnGeO₃, CaSiO₃, FeSiO₃,

Fig. 1 Perovskite-type crystal structure.

Table 1 Combinations of biocompatible elements satisfying the geometric stable condition of perovskite-type oxides.

Si	Ge	Mo	Ti	Zr
MgSiO₃	MgGeO ₃	MgMoO ₃	MgTiO ₃	MnZrO ₃
MnSiO ₃	MnGeO ₃	MnMoO ₃	MnTiO ₃	FeZrO ₃
FeSiO ₃	FeGeO ₃	FeMoO ₃	FeTiO ₃	CaZrO ₃
ZnSiO ₃	ZnGeO ₃	ZnMoO ₃	ZnTiO ₃	BaZrO ₃
CaSiO₃	CaGeO ₃	CaMoO ₃	CaTiO₃	
	BaGeO ₃	BaMoO ₃	BaTiO ₃	

MgSiO₃は高温・高压（地球マントル内）においてペロプスカイト型構造として存在する鉱物であり、圧電性を示す正方晶として人工創製できれば新しい生体適合圧電材料になり得ると考える。MnMoO₃, FeMoO₃, ZnMoO₃, MgMoO₃, MnZrO₃, FeZrO₃は、鉱物や工業材料としての報告例はなく新規材料である。

2・4 候補材料の選定と結晶構造解析

前節 Table 1 に示した候補材料に対して、細胞毒性実験の対象として MgSiO₃, CaTiO₃ および CaSiO₃ に着目した。MgSiO₃ は、密度汎関数法に基づいたフォノン振動モード解析より正方晶への構造相転移の可能性が高く、生体適合圧電材料の最有力候補である。¹¹⁾ CaTiO₃ に対してはペロプスカイト型構造の斜方晶が実在し、これまでに開発された創製技術の応用が可能である。CaSiO₃ は両者を混合した組成をもち、細胞毒性の比較対照として採用した。さらに、既存無鉛圧電材料であり Table 1 にも含まれる BaTiO₃ に加えて、圧電アクチュエータに多用される PZT も評価対象として選択した。

後述の細胞毒性実験に用いた MgSiO₃, CaTiO₃, CaSiO₃, BaTiO₃ および PZT に対して、X 線回折による結晶構造解析結果を Table 2 に示す。試料には、いずれも純度 0.9999 である粉体（MgSiO₃, CaTiO₃ : Good fellow 製, CaSiO₃, BaTiO₃, PZT : フルウチ化学製）を使用し、MgSiO₃, CaTiO₃ および CaSiO₃ に対しては同じ化学組成を有する実在の材料で代用した。X 線解析の結果、MgSiO₃ は高温・高压下ではペロプスカイト型構造の斜方晶であることがわかった。CaTiO₃ はペロプスカイト型構造の斜方晶、CaSiO₃ はパラ珪灰石構造の単斜晶であり、既存圧電材料である BaTiO₃ はペロプスカイト型構造の正方晶、PZT は三方晶であることを確認した。

3 細胞毒性実験

3・1 細胞培養方法

細胞毒性実験には、多数の実績により検出感度および精度が保証されているマウスの皮下結合組織由来の線維芽細胞株 CCL1(NCTC clone929)（以下では、L929 細胞と記す）を用いた。¹²⁾ 培養液には、10% 牛胎児血清（CELLect 製 FBS）含有の Eagle's MEM（日本製薬製）を用い、温度 37℃、濃度 5% の CO₂ インキュベータ内で静置させて L929 細胞を培養した。細胞の継代は、以下の手順で実施した。最初に、対数増殖期末期の細胞が入った 25cm² フラスコ内の培養液を抜き取り PBS (-) 溶液 5ml を加え洗浄した。つぎに、PBS (-) 溶液を除去し、トリプシン溶液 5ml を加えて CO₂ インキュベータ内に 5 分間静置した。さらに、培養液を 5ml 加えてフラスコ内の液体をピペッティングし、1000rpm/min で 3 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄み液を抜き取り、培養液を新たに 5ml 加えてピペッティングした。最後に Burkert-Turk 血球計算盤を用いて細胞数を測定して 6×10^4 cell/ml に調整したものを新しく培養液を 5ml 加えた 25cm² フラスコに入れ、L929 細胞を継代した。また、培養液の交換はつぎの手順で実施した。対数増殖期途中の細胞が入った 25cm² フラスコ内の培養液を抜き取り、PBS (-) 溶液 5ml を加え洗浄した。その後、新しい培養液 5ml をフラスコ内に加えて培養液を交換した。継代および培養液の交換は、3～4 日程度毎に実施した。

3・2 評価方法

試料には、前章 Table 2 に示した酸化物 5 種に加えて、培養した L929 細胞の感度および精度を確認するために検定済みの標準物質として 2 種類の陽性対照材料 A および B（秦野研究所製）を使用した。¹²⁾ 陽性対照材料 A（以下では、Ref.A と表記）は、中程度の毒性を示す 0.1%

Table 2 Crystal structure of candidate materials measured by X-ray diffraction.

Crystal unit cell						
Structure type	Protoenstatite	Perovskite	Parawollastonite	Perovskite	Perovskite	
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic	Monoclinic	Tetragonal	Trigonal	
Space group	P21/a	Pcmn	P21cn	P4mm	R3m	
lattice parameters	<i>a</i> (Å)	8.74	5.442	7.320	3.994	5.738
	<i>b</i> (Å)	9.25	5.381	7.066	3.994	5.738
	<i>c</i> (Å)	5.32	7.642	15.43	4.038	7.092
	α (deg)	90.0	90.0	90.0	90.0	90.0
	β (deg)	90.0	90.0	95.4	90.0	90.0
	γ (deg)	90.0	90.0	90.0	90.0	120.0
Z-value	4	4	12	1	3	

ZDEC (Zinc DiEthyldithioCarbamate) 含有ポリウレタンフィルムである。一方、陽性対照材料 B (Ref.B) は、弱い毒性を示す 0.25% ZDBC (Zinc DiButyldithio Carbamate) 含有ポリウレタンフィルムである。生体適合材料には、毒性が Ref.B よりも低いことが要求される。本細胞毒性実験は、上記の酸化物 5 種および対照材料 2 種に対して以下の手順で抽出液を作成し、L929 細胞に及ぼす影響を調査した。まず、試料 1g をスクリー管に入れ、121℃ に熱したオートクレーブ内で 15 分間乾熱滅菌した。つぎに、培養液を 10ml ずつスクリー管に入れ CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した後、液体のみを抜き取り 1000rpm/min で 3 分間遠心分離し、液体をろ過滅菌したものを抽出液とした。

細胞毒性実験は、以下の手順に従って各抽出液に対して 3 回実施した。まず、12well のマイクロプレートに初期細胞数を 2×10^3 cell/well で播種し、培養液 1ml を加え 24 時間インキュベータ内で静置した。24 時間経過した後、培養液を抜き取り抽出液をそれぞれ 2ml 加えた。なお、比較のため、抽出液を用いず培養液のみを加えたものを Control とした。培養液を抽出液に交換した日を 0 日目とし、7 日間培養した。細胞数の測定には Burker-Turk 血球計算盤を用いて、1 日目から 2 日間毎に L929 細胞の状態を観察した。すなわち、Fig. 2 に示すように細胞数の時間変化を計測し、相対細胞増殖率および倍加時間により細胞毒性を評価した。相対細胞増殖率 P は次式により算出される。

$$P = \frac{N_i}{N_i^{Control}} \quad (2)$$

ここで、 N_i は一定時間経過後の細胞数であり、 $N_i^{Control}$ は Control の同時間経過後の細胞数を意味する。一方、倍加時間 T は

$$T = \frac{(t_i - t_0) \log 2}{\log N_i - \log N_0} \quad (3)$$

Fig. 2 Schematic diagram of the relation between number of cells and time.

のように算出される。ここで、 t_i は細胞数 N_i を測定した時間を意味する。

3・3 実験結果および考察

細胞毒性実験の観察結果を Fig. 3 に示す。抽出液ではなく培養液のみを加えた Control の場合、時間の経過に伴って点在する L929 細胞が増殖しコロニーを形成する様子が確認できる。また、陽性対照材料の抽出液を加えた場合、生体適合性の基準となる Ref.B では Control と同様に L929 細胞が増殖し類似のコロニーを形成するのに対して、強い毒性がある Ref.A では L929 細胞がほとんど増殖しないことが確認できる。つぎに、5 種類の酸化物の場合、MgSiO₃、CaTiO₃ および BaTiO₃ では Control および Ref.B と大差はなく、良好な細胞増殖が確認できる。一方、CaSiO₃ および PZT では、Ref.A と同様にコロニーが形成されず L929 細胞の増殖が阻害されることがわかる。

Fig. 4 に細胞増殖曲線の比較を示す。Control と比較すると細胞数の減少が認められるが、Ref.B、MgSiO₃、CaTiO₃ および BaTiO₃ では時間経過に伴って細胞数が増加し、定性的には同様の傾向を確認できる。なお、図中

Fig. 3 Observation of L929 cells during the cytotoxicity test of perovskite-type oxides.

Fig. 4 Experimental result for the relation between number of cells and time.

には明記していないが、Ref.A, CaSiO₃ および PZT は毒性が強く、1日目以降の細胞数はほぼ零であった。

細胞毒性を定量的に比較するため、Controlの細胞数を100%とした相対細胞増殖率をFig. 5 (a), 倍加時間をFig. 5 (b)に示す。いずれの評価値も式(2)および(3)中の N_i には7日目の細胞数を用いて算出した。相対細胞増殖率に着目すると、CaTiO₃が最も高く約61%であり、MgSiO₃はRef.Bと同程度で約37%である。また、BaTiO₃は比較的低く約19%である。一方、CaSiO₃およびPZTは毒性が強く、Ref.Aと同じくほぼ0%である。つぎに、倍加時

(a) Relative proliferation ratio

(b) Doubling time

Fig. 5 Comparison of experimental results obtained by the cytotoxicity test for perovskite-type oxides.

間に着目すると、CaTiO₃は最も短く約21.0時間であり、MgSiO₃はRef.Bと同程度で約23.1時間である。また、BaTiO₃は少し増加し約26.6時間である。一方、CaSiO₃およびPZTは細胞数が少なく、Ref.Aと同様に倍加時間の算出が不可能である。なお、L929細胞の場合Controlに対する標準的な倍加時間が約20時間、Ref.Bが約24時間であることが確認されている。これに対して本実験ではControlが19.3時間、Ref.Bが22.8時間であり、いずれも標準値にほぼ一致することから細胞毒性実験が正しく実施できたと考える。

以上の実験結果を総括すると、MgSiO₃およびCaTiO₃はRef.Bと同程度またはそれ以下の細胞毒性であり、生体適合材料としての使用が可能であると示唆される。一方、CaSiO₃およびPZTはRef.Aと同様に毒性が強く、医用デバイスにおいて直接的な使用は困難であると考えられる。PZTは有害なPbを含むため毒性が強く、CaSiO₃は生体適合元素であるCaおよびTiで構成されるが両元素の相乗効果または溶解度が高いなどの原因により強い毒性が発現したものと推察する。また、既存無鉛圧電材料であるBaTiO₃はRef.Bよりもやや強い毒性をもち、生体適合材料としての使用には危険があると考えられる。

4 結 言

新規生体適合圧電材料の創製を目指して、第一原理計算により得た候補材料MgSiO₃、CaTiO₃およびCaSiO₃と既存圧電材料BaTiO₃およびPZTに対して、L929細胞を用いて細胞毒性実験を実施した。その結果、以下の知見を得た。

(1) MgSiO₃の倍加時間は23.1時間、CaTiO₃は21.0時間であり、生体適合材料として使用可能であることを示唆できた。

(2) CaSiO₃は毒性が強く、医用機器への直接的な使用は困難である。

(3) 高性能圧電材料として多用されるPZTは毒性が強い。また、既存の無鉛圧電材料であるBaTiO₃の倍加時間は26.6時間であり生体適合材料としての使用は危険である。

なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金基盤研究(B) [No.17760095]の助成を得て遂行した。

参 考 文 献

- 1) Y. Horiike, A. Oki, H. Ogawa, M. Takai, S. Momose, A. Yokokawa and Y. Takamura, "Advent of the Aging Society and Creation of Healthcare Chip -Development of Dry Etching Technologies-", Transactions of the Surface Finishing Society of Japan, Vol.55, pp.385-390 (2004).
- 2) K. Tsuchiya, N. Nakanishi, T. Kometa, Y. Uetsuji, K. Mori and E. Nakamachi, "Department of blood extraction system for bio-mem", Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. C, Vol.71, pp.603-609 (2005).
- 3) "On Waste Electrical and Electronic Equipment", Official Journal of the European Union, L37, pp.24-38 (2003).
- 4) "On The Restriction of The Use of Certain Hazardous

- Substances in Electrical and Electronic Equipment”, Official Journal of the European Union, L37, pp.19-23 (2003).
- 5) Y. Saito, H. Takao, T. Tani, T. Nonoyama, K. Takatori, T. Homma, T. Nagaya and M. Nakamura, “Lead-Free Piezoelectrics”, *Nature*, Vol.432, pp.84-87 (2004).
  - 6) Y. Uetsuji, K. Imoto, S. Kumazawa, K. Tsuchiya, S. Ueda and E. Nakamachi, “A Study on Bio-Compatible Piezoelectric Materials by First Principles Calculation”, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. A*, Vol.71, pp.944-951 (2005).
  - 7) Y. Uetsuji, S. Kumazawa, T. Ohnishi, K. Tsuchiya and E. Nakamachi, “Structure Evaluation of Bio-Compatible Lead-Free Piezoelectric Materials by Crystal System Distinction and First Principles Calculations”, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. A*, Vol.72, pp.1472-1478 (2006).
  - 8) R. G. Parr and G. Pearson, “Absolute Hardness : Companion Parameter to Absolute Electronegativity”, *Journal of American Chemical Society*, Vol.105, pp.7512-7516 (1983).
  - 9) A. Baeten, M. Tafazoli, M. Kirsch-Volders and P. Geerlings, “Use of the HSAB Principle in Quantitative Structure – Activity Relationships in Toxicological Research : Application to the Genotoxicity of Chlorinated Hydrocarbons”, *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol.74, pp.351-355 (1999).
  - 10) E. Nakamachi, Y. Okuda, S. Kumazawa, Y. Uetsuji, K. Tsuchiya and H. Nakayasu, “Development of Fabrication Technique of Bio-Compatible Piezoelectric Material MgSiO_3 by Using Helicon Wave Plasma Sputter”, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. A*, Vol.72, pp.353-358 (2006).
  - 11) Y. Uetsuji, F. Hwang, K. Tsuchiya and E. Nakamachi, “Characterization of New Biocompatible Piezoelectric Materials by First-Principles Calculation”, *Proc. Mechanical Engineering Congress 2007*, Vol.6, pp.289-290 (2007).
  - 12) The Japanese Tissue Culture Association, “In Vitro Toxicology Testing Method”, pp.66-68 (1991) Asakura Publishing Co., Ltd.