

ティッシュエンジニアリング用マテリアルの製品化条件と国際標準化

Manufacturing of the biomaterial as the scaffold for tissue engineering and the international standardization in the field of tissue engineered medical products

Keywords

品質評価 製品化
国際標準化 安全性
有効性

土屋 利江

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

Summary

Biodegradable polymers are often used as the scaffolds for the tissue engineering, and these polymers are classified in class IV under the revised Pharmaceutical Affairs Law.

A certain biodegradable polymer for tissue engineering did not show the toxicity in cartilage, but showed the severe toxicity in the other organs. If the constituted ingredients showed organ toxicity in design phase, we should avoid to use such constituents since the beginning. I introduce problems and the activities of the international standardization in the field of the tissue engineered medical products.

はじめに

ティッシュエンジニアリング用マテリアルは、すでに医療材料、医療機器として使用されているものが多い。たとえば、生分解性高分子材料や、通常細胞のよい基質となるコラーゲンに代表される天然材料がある。

ティッシュエンジニアリング用マテリアルとしての安全性は、医療材料としての前臨床評価試験と、さらにティッシュエンジニアリング用マテリアルとして臨床使用を考慮した評価が必要となる。

たとえば、神経再生用のティッシュエンジニアリング用マテリアルであれば、マテリアルを細胞・組織の足場として評価したとき、神経が目的とする正常な機能などを保っていることを確認しなければならない。また、その状態を維持できることも示す必要があると考える。

Tsuchiya, Toshie

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

E-mail : tsuchiya@nihs.go.jp

骨の分化に及ぼす影響を調べた結果、P(LA-CL) 25 10000では軟骨分化は抑制され、コントロールの90%程度の分化に留まった。ラット胎仔軟骨前駆細胞では、顕著な分化促進作用を認めたことより、細胞の採取組織部位や種の違いによりオリゴマーに対する反応は異なることが明らかになった。一方、P(LA-CL) 50 18000を試験した結果では、ヒト軟骨細胞はコントロールと同程度の分化レベルであった。しかし、細胞の増殖に及ぼす影響は、P(LA-CL) 25 10000とP(LA-CL) 50 18000は、ヒト軟骨細胞に対して、7~5%程度の増殖抑制が観察されたが、ラット胎仔軟骨前駆細胞ではP(LA-CL) 25 10000でコントロールの25%阻害、P(LA-CL) 50 18000では、コントロールの40%減少し、強く阻害した。

したがって、同じ濃度レベルの共重合体オリゴマーについて比較した結果、ラットおよびヒト細胞間では、細胞分化や増殖能に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。

組織工学利用医療用具の評価を行う上で、動物モデルからヒト臨床使用するとき、分化・増殖機能が両種間で異なる可能性を考慮する必要がある。

一般的に、治療効果の高い動物モデルを使った論文や学会発表が多い。高齢の対象患者で治療効果があることを示す必要がある。海外で使用されているものの中には、有用性のあり・なしが論争になっているものもある。

国際標準化

現在、再生医療製品の国際標準化の動きがある団体として3団体があげられる。一番初めに活動を開始し、最も活発な作業を行っているのが、American Society for Testing and Materials (ASTM)のF04のセクションの中にあるTissue Engineered Medical Products (TEMPS)のグループである。最近では、ASTMはInternational standardであると、米国のメインパーソンがInternational Organization for Standardization (ISO)の会議でも主張している。しかし、欧州のISOメンバーはその主張に異議を唱えている状況にある。このような状況下、2004年の2月26~27日の二日間にわたり、スイス・ジュネーブにあるWorld Trade Organization (WHO)本部で「The high-level workshop on International Standards for Medical Technologies」が開催された。ISO, International Electrotechnical Commission (IEC)とInternational Telecommunication Union's Telecommunication Standardization (ITU-T)が主催したWorld Standard Cooperation (WSC)の第一回会議が開かれた。共催団体は、WHO, GHTEF, Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), the European Confederation of Medical Device Association (EUCOMED), the Japan Federation of Medical Devices

Associations(JFMDA)の5つであった。日本からは、JFMDAの三浦氏(GE横河メディカルシステム株式会社)と筆者が招待講演者として招かれた。参加者は約70名で、各TC(technical committee)の議長が参加していた。5つのセッション(1. Vision, 2. Links between regulators and standards developers, 3. Standard development practice, 4. New Technologies and standards[emerging technology], 5. Development dimension)が開かれ、三浦氏はsession 2で、筆者はsession 3で講演した。筆者は、standard practice developmentのセッションの目的・内容を考慮して、standard reference materialとわが国の医療機器・細胞組織医療機器分野の健全な発展のための規制環境の整備について紹介した。本セッションの他の講演者は、各TCで標準化された多くのタイトルの紹介に終始して時間切れの状態であった。一方、TC194(医療用具の生物学的評価)でのわが国の活動過程の報告は、standard practice developmentの過程を実際に示した講演内容であると議長からコメントされた。今後もこのような横断的な標準化の会議が開かれるであろう。わが国では、現在さまざまな医療機器の標準化作業が行われているが、世界の人々に優れた医療機器を提供するためにも、有用な基準を提案し、国際的に理解され認知される標準化活動をする必要があると考える。

組織工学関連のISOでの標準化は、TC150が先行し、WG11では、「General

requirements for safety, marking and for information to be provided by the manufacturer」の文書作業が開始されている。

TC194では、新たにmedical devices utilizing tissuesに関するsub committeeを作り、その中に3つのワーキンググループ(WG1~3)が作られた。

「Animal tissue and their derivatives utilized in the manufacture of medical devices [Part1: Analysis and management of risk (WG1), Part2: Controls on sourcing, collection and handling (WG2), Part3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses

and transmissible agents (WG3)]」の文書化作業が開始され、2004年6月28日~7月2日にNorwayのTromsoで初めての会議が開催される。現在は、ENの文書が転用されているが、文書化後、時間も経過し、引用されている内容も古いことから、全面的に加筆修正が行われると考えられる。

再生医療製品の製品化までには、多くの知識・技術が必要である。医療機器同様、臨床家・研究者・企業人が連携し、お互いに補足しあう形で技術や材料を提供し、製品化に向けて努力すれば、世界の国々の患者さんに先端的医療製品を発信できる可能性がある。

民間の調査レポートによれば、ある再生医療関連の米国企業は、5億ドルの開発研究費をかけながら、製品化後の売り上げは0.2~0.3億ドルで、借金返済のめどがたたず倒産に追い込まれたと報告している。合理的なコストダウンと国際市場で治療効果があり、優良と認められる製品でないかぎり、企業ベースでの持続的な製品化はなかなか困難な状況であると思われる。したがって、材料開発研究者、臨床家、企業人などがばらばらに研究を進めるのではなく、相互により連携をとり、力を合わせて着実に製品化に向けた努力をすべきであると考えられる。

バイオマテリアルの安全性について 組織工学用材料を中心として

Safety evaluation of biomaterials for tissue engineering

国立医薬品食品衛生研究所 療品部

土屋 利江

Toshie TSUCHIYA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

はじめに

医療用具(平成17年度4月から医療機器に名称変更)に使用されるバイオマテリアルには、金属、セラミックス、高分子、天然材料などがある。それぞれ医療用具として使用される目的、部位により、それらの単体あるいは複合材料が使用されている。近年は、ナノテクノロジー技術を応用した医療材料・医療機器開発が活発に行われており、米国の最近のニュースでは、がん治療分野で、大型の予算がついたとの報道がなされている。

医療材料・医療機器は、従来の承認された既存材料の組み合わせのみでは、限界があり、今後は、生物の仕組みを制御する機能を組み合わせた医療機器開発が盛んになるものと考えられる。薬と医療機器の組合されたステント、さらに、最近では、細胞・組織と医療機器がくみあわされたバイオ皮膚・バイオ軟骨・バイオ骨などがあげられる。細

胞組織医療機器と日本語で表記されるものは、通常 tissue engineered medical products (TEPS)として海外では、標準化すべき課題として取り上げられ、米国規格協会(ASTM)では、すでにいくつかの関連文書ができています。一方、tissue engineering といわれる技術については、近年、複数の学会が立ち上げられ、社会的にも大きな関心事となった。しかし、事業としては、海外を含めて成功しているようにはおもえない。また、いくつかの問題点と課題も浮き彫りにされてきた。

ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルは、既に、医療材料、医療機器として使用されているものが多い。例えば、生分解性材料や、通常、細胞の良い基質となるコラーゲンに代表される天然材料がある。

ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルとしての安全性は、医療材料としての前

臨床評価試験と, 更に, ティッシュエンジニアリング用マテリアルとして使用実態を考慮した評価が必要となる。

例えば, 神経再生用のティッシュエンジニアリング用マテリアルであれば, マテリアルを細胞・組織の足場として評価した時, 神経が目的とする正常な機能等を保っていることを確認しなければならない。また, その状態を維持できることも示す必要があると考える。

ある種のティッシュエンジニアリング用マテリアルが, 軟骨では毒性を示さないが, 神経では毒性を示すことは既に知られている。設計段階で, 神経毒性を示す構成成分が原材料として使用されていれば, 推測可能であり, はじめから, そのような合成方法はさけるべきである。使用範囲や製品としての価値を低くする設計をさけることがポイントとなる。当然のことだが意外とおそろかにされている感がする。

分解性材料は, やがては, 生体内で分解・吸収・代謝・排泄される。通常は, 生体内に残存し続ける医療用具の方が安全性上, リスクが高いと考えやすいが, 薬事法改正による新クラス分類では, 生分解性材料は, 4つのクラスの中でリスクが最も高いクラス IV に分類されている。このクラス分類の考え方は, わが国だけでなく, Global Harmonization Task Force (GHTF) で示された国際レベルでのクラス分類とも整合している。医療材料は, その性質, 使用方法により, ヒトへの安全性の確保について慎重に考

慮すべきであると考え。

現在, 考えられる問題点やこの分野の国際標準化の動向について紹介する。

1. ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアル製品化のための課題

製品化の上で重要だと考えられるポイントについて以下に私見を列挙する。

- (a) バイオマテリアルの選別が重要である。材料が承認されているからといって, ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルとして適切であるかどうかは, 保証されていない。使用する組織・使用方法により, バイオマテリアルの細胞・組織との反応性が異なるからである。
- (b) 天然材料では; エンドトキシン汚染があると考え, エンドトキシン汚染がないことを事前に確認して使用することが重要である。高分子でもエンドトキシン汚染に留意すべきである。
- (c) 天然材料中に混在するエンドトキシンは, 材料の特性に応じて吸着しやすく, 材料から, 通常の方法に従って溶液を調製し, 測定しても正確な測定値を示しているとは限らない。エンドトキシン汚染濃度は, 回収率を考慮して測定することが重要である。従来の試験溶液調製方法では, 汚染されているエンドトキシンの1%程度以下しか検出されていない例も多い。
- (d) ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルの原材料, 製造工程などを明確にし,

安全性上問題はないか, 検討した後に使用すること. たまたま, 入手したものを出発物質として細胞を接着させ, 培養しても, その結果に対する解釈はあやふやなものとなり, 科学的な説明が困難となる. 同名の材料でも, 細胞の反応は, 阻害・亢進と対照的に著しく異なることに留意すべきである. 製造メーカーの異なる同名の材料を並べて試験した場合, 細胞との反応性は異なる. 学会でも材料の製造工程は, 不明のまま使用されている例が多い.

(e) モノマーやポリマーの種類, 触媒, 添加物などは, 安全性, 有効性に影響を与える因子となる. 設計の段階で, 十分考慮すべきである. 研究計画と同様, 製品化の上で十分な事前評価が重要である.

(f) 優れた医療機器開発と低コスト化をねらった精密な事前計画を練るキーパーソンがヒットメーカーでは活躍している. 材料のみでなく, 人材が活躍できる環境作りも重要と考える.

(g) 医療材料でありながら, 化学発ガン物質もある. 従って, 発ガン性を懸念する場合には, 最低限, 対象材料や対象物質の溶液での形質転換試験等によりチェックしておく必要がある. ガイドラインで記載されている遺伝毒性試験の中で, Ames Test や染色体異常試験では, 陽性とはならないが, 動物実験では発ガン性を示す材料が少なからずある.

(h) バイオ製品では, これから標準化すべき

課題としては, バイオ製品の力学強度の評価指標と評価方法がある. 組織工学製品の標準化を進めている米国 (ASTM F04) は, バイオ軟骨において, いくつかの力学指標を盛り込んだ文書(案)を作成しており, 今年の8月第1回目の投票が行われた. 11月のASTM 会議で投票結果と反対コメントなどが明らかになり, 今後の方針が決定される予定である.

(i) 国際的に掲げられているバイオ製品の課題は, 欠損部位など治療目的とする部位へのバイオ製品の固定, バイオ製品の生体内での機能維持, 目的外細胞・組織形成の否定, 非侵襲的臨床評価による有効性評価指標など, 若年者のみでなく, 対象患者である高齢者での治療効果の提示, バイオ製品の評価のための動物モデル(治療効果に種差がある. 軟骨の動物モデルに関する文書(案)が ASTM でまとめられている.) 感染因子の否定などである.

(j) 今までに報告されているリスク因子としては, 天然由来材料: 未知の感染因子, アレルギー反応, エンドトキシン等の吸着, 生分解性材料: 炎症反応, ゲッシ類動物での高頻度腫瘍化, 最近の研究から, 腫瘍化の程度に系統差があること, 腫瘍化した細胞は, 軟寒天コロニー試験でコロニー形成能陰性であったが, ヌードマウス移植試験で早期に大きな腫瘍を形成した.

通常の医療材料としての前臨床試験は, 使用部位, 使用期間により, 確認すべき試

験項目は異なる。

一次評価の試験として, 細胞毒性試験, 感作性試験, 刺激性・皮内反応試験, 急性全身毒性試験, 亜急性毒性試験, 遺伝毒性試験, 発熱性試験, 埋植試験, 血液適合性試験がある。補足的な二次評価の試験として, 慢性毒性試験, 発ガン性試験, 生殖・発生毒性試験, 発ガン性試験, 生分解性試験がある。そのほか, 個別の医療機器・医療材料の特性に応じた試験もあり, 各医療機器・医療材料の規格に記載されている。

組織工学用医療材料では, 通常の試験以外にいくつかの試験が付加される。

特に, 分化影響・腫瘍化などは, 考慮すべき項目である。分化指標が確立しているものでは, Key molecule の定量的評価が製品化の上で重要となる。学会発表で多く見られる免疫染色像や電気泳動によるバンド像のみでは定性的であり, 論文には受理されても, 製品化のためには不十分である。各企業は, 個別の製品について, Key molecule を少量のサンプルで迅速に定量的に評価する方法を確立することが, 製品の出荷判定において必要なポイントとなる。はじめにその戦略を立てておかないと, 繰り返し実験が多くなり, 時間・労力・過剰なコストを失いかねない(開発費削減のポイントの一つ)。

腫瘍化の試験として, 材料で腫瘍化した細胞組織での研究から, 軟寒天コロニー形成試験のみでなく, ヌードマウス移植試験を実施する必要があると考える。

また, ある種のモデル生分解性材料を動物に埋植すると, 早期から中期に炎症が起き, 炎症が持続している動物には, 腫瘍発生頻度が高い, また, その埋植量が多いほど腫瘍発生頻度も高い。

医療材料の使用目的, 使用する部位, 使用方法などを考慮し, 慎重に安全な材料を設計すべきである(安全かつ有用な医療材料の選択と開発が, 長期使用後の不具合をなくし有効性の高い製品を上市化する上で重要となる)。

次に細胞・材料の相互作用に関する研究を紹介する。

2. 採取組織や種の異なる細胞の分化機能等に及ぼす生分解性材料等の影響

組織工学材料として, 様々なタイプの生分解性ポリマーが使用され, 研究されているが, 代表的な生分解性ポリマーの分解産物である低分子量の ϵ -カプロラクトンとL-乳酸共重合体等を用いて, 軟骨前駆細胞や神経前駆細胞の高密度培養での分化および増殖に及ぼす作用を調べることを目的とした。

2-1. ラットの胎児肢芽細胞や中脳細胞の細胞分化および増殖に及ぼす影響

組織工学材料として, 様々な生分解性ポリマーが使用されていることから, その代表的な生分解性ポリマーの分解産物である ϵ -カプロラクトンとL-乳酸共重合体

P(LA-CL)25 10000)のラット胎児細胞由来軟骨前駆細胞および神経前駆細胞の初代細胞の分化能への影響を, マイクロマスカルチャー(高密度培養)条件下で調べた. その結果, P(LA-CL)25 10000は, 軟骨細胞の分化を促進するが, 神経前駆細胞への増殖・分化を阻害することが明らかになった. 更に3種の生分解性オリゴマーについて, 神経前駆細胞の増殖・分化に及ぼす影響を調べた結果, 類似の化学構造からなるオリゴマーでも, 重合時の配合比や, 置換基が異なる場合では, 阻害強度が異なることも明らかになった. 従って, 組織再生過程で分解され生成する低分子量ポリマーを迅速に評価することが, 組織が再生していく過程に及ぼす影響因子の解析を正確に評価する上で有用である.

2-2. ヒトおよびマウス由来細胞の増殖および骨分化に及ぼす影響

細胞・組織加工医療用具の前臨床評価試験として, 細胞を組み込んだ生分解性ポリマーからなる足場について, 動物をモデルとして評価が行われる. ヒトと動物では, 解剖学的組織の構造の違いから, 細胞・組織加工医療用具のヒト臨床成績は, 動物モデルでの結果と異なる可能性がある. ヒト正常骨芽細胞と研究で良く使用されるマウス骨芽細胞様細胞株を用いて生分解性材料の骨分化に及ぼす影響について, 両細胞間で比較した. すなわち, 同じ濃度レベルのポリ乳酸

オリゴマーを培地中に添加して比較した. その結果, 良く使用されるマウス細胞株および正常ヒト細胞では, 細胞分化に及ぼす影響が, 前者では促進, 後者では阻害と全く逆の異なる結果を得た. 組織工学利用医療用具の評価を行う上で, *in vitro*動物モデルからヒト臨床使用するとき, 分化・増殖機能が両検出系で異なる可能性を考慮する必要がある.

3. 国際標準化など

現在, 再生医療製品の国際標準化の動きがある団体として3団体があげられる. 一番はじめに活動を開始し, 最も活発な作業をおこなっているのが, American Society for Testing and Materials の F04 のセクションのなかにある Tissue Engineered Medical Products:TEMPS のグループである. 最近では, ASTM は International standard であると主張している. しかし, 欧州の ISO メンバーは, その主張に異議を唱えている状況にある. このような状況下, 2004年の2月26-27日の二日間にわたり, スイス・ジュネーブにある WHO 本部で「The high-level workshop on International Standards for Medical Technologies.」が開催された. ISO, IEC, ITU-T (International Telecommunication union's Telecommunication Standardization) が主催した WSC (World Standard Cooperation)の第一回会議が開かれた. 共催団体は, WHO, GHTF, AAMI, Eucomed,

JFMDA の5つであった。参加者には、各団体議長(高柳 IEC 議長ら)および個別の TC (Technical committee) 議長が参加し、5つのセッションが開かれた(1.Vision, 2.Links between regulators and standards developers, 3.Standard development practice, 4.New Technologies and standards [emerging technology], 5.Development dimension.)。日本からは、JFMDA(日本医療機器団体協議会)の三浦氏(横河)と土屋(国立衛研)が講演した。今後もこのような横断的な標準化に関する世界会議が開かれるであろう。我が国は、現在、様々な医療機器の標準化作業が行われているが、世界の人々に優れた医療機器を提供するためにも、有用な基準を提案し、国際的に理解され認知される標準化活動をする必要があると考える。

組織工学関連の ISO での標準化は、TC150(外科用インプラント)が先行し、WG11 では、[General requirements for safety, marking and for information to be provided by the manufacturer]の文書作業が開始されている。

TC194(医療機器・医療材料の生物学的評価)では、新たに Medical Devices utilizing tissues に関する Sub Committee(SC)を設置した。New SC では、三つのワーキンググループ(WG1,2,3)が作られ、文書化作業を開始した。

[Animal tissue and their derivatives utilized in the manufacture of medical devices]

Part 1: Analysis and management of risk. (WG1)

Part 2. Controls on sourcing, collection and handling. (WG2)

Part 3. Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible agents. (WG3)

2004年6月28日—7月2日 Norway の Tromso で第1回目の会議を開催した。草案となった EN 文書が、内容も古いことから、全面的に加筆修正が行われつつある。

再生医療製品の製品化までには、多くの知識・技術が必要である。民間の調査レポートによれば、ある再生医療関連の米国企業は、5億ドルの開発研究費をかけながら、製品化後の売り上げは、0.2—0.3億ドルで、借金返済のめどがたたず倒産においこまれたと報告している。学会発表のみならず、国際市場で治療効果があり、販売価格相等に優良とみとめられる製品でない限り、持続的に売れる製品の事業化は困難であると思われる。そのためには、キーポイントとなる設計段階でのアイデアと合理的なコストダウンが必須となる。

また、今後、開発される必要性があるものとして、安全で機能的にも優れた生分解性材料があげられる。更に、抜いた歯を元どおりにする歯科再生治療が早期に実現することを期待しています。

4. 医療機器フォーラム設立について

医療機器・医療材料の開発には, 医学, 薬学, 工学等, 異種分野の知識, 技術等を必要とします. 異種分野の専門化の横断的な交流による「安全で有用な医療機器開発」を目指し, 医療機器フォーラムを昨年度設立しました(2003年10月). 本年, 10月, 第2回医療機器フォーラムシンポジウムを開催しますので, 関係者への連絡をお願いいたします.

第二回医療機器フォーラム プログラム(案)

主催 医療機器フォーラム
共催 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会
協賛 日本バイオマテリアル学会, 日本人工臓器学会, 日本組織工学会, 日本再生歯科医学会
(学会依頼中)

日時: 平成16年10月23日(土)
10:00~17:00

場所: 日本科学未来館7階みらい CAN ホール
(東京都江東区青海2丁目41番地)

URL: <http://www.miraikan.jst.go.jp/>

参加費: 6000円・学生2000円

事前登録・支払方法等: 参加希望者は, 氏名, 連絡先等を電子メール(iryokiki@nihs.go.jp)

あるいは FAX03-3700-9196 で事前登録後, 振り込み口座をお知らせします.

定員: 200名 (先着順登録, 定員になり次第×切.)

10:00~10:05(5分)

1. 開会の辞 長尾 拓

国立医薬品食品衛生研究所 所長

2. 規制関連

(座長 大和 雅之: 東京女子医科大学 先端生命医学研究所 助教授)

(座長 増田 茂樹: 株式会社 カネカ)

10:05~10:25(20分)

① 医療機器審査全般(山本 弘史: 厚生労働

省 医薬品局 医療機器審査管理室長)

10:25~10:45(20分)

② 医療機器規制(安田 尚之: 厚生労働省

医薬品局 医療機器審査管理室長補佐)

10:45~11:05(20分)

③ 「より有効で」「より安全な」医療機器を「より早く」患者の皆様へお届けするために

(木下 勝美: 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 医療機器審査部長)

3. 不具合対策講座

(座長 浜田 良機: 山梨医科大学 整形外科学 教授)

(座長 片倉 健男: テルモ株式会社)

11:05~11:25(20分)

① 医療用セラミックスの摩耗試験とその標準化

(池内 健: 京都大学 再生医科学研究所 教授)

11:25~11:45(20分)

② エンドキシン汚染, 測定のポイントなど

(配島 由二: 国立医薬品食品衛生研究所 療部室長)

4. コンピューターシミュレーションによる先進的医療技術への貢献と課題

(座長 堤 定美: 京都大学 再生医学研究所 教授)

(座長 小林 郁夫: 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

11:45~12:05(20分)

① セメントレス人工股関節開発へのコンピューターシミュレーション

(浜田 良機: 山梨医科大学 整形外科学 教授)

12:05~12:25(20分)

② 人工関節の固定法の最適化

(馬淵 清資: 北里大学 医療衛生学部 教授)

12:25~12:45(20分)

③ インプラント系の Risk Simulation

(堤 定美: 京都大学 再生医学研究所 教授)

12:45~13:45 昼食

5. 前臨床試験としての動物モデル(特徴と限界)

(座長 岡野 光夫: 東京女子医科大学 先端生命医学研究所 教授)

(座長 袴塚 康治: オリンパス光学工業株式会社)

13:45~13:55(10分)

- ① 総論 (土屋 利江: 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長)

ホームページ: <http://dmd.nihs.go.jp/iryokiki/>

電子メール: iryokiki@nihs.go.jp

13:55~14:15(20分)

- ② 動物実験の GLP と動物愛護について
(宮脇 宏彰: 新日本科学)

14:15~14:35(20分)

- ③ 大型動物(羊)による脊椎固定デバイス
(プレート・スクリュー)の評価
(伊東 学: 北海道大学 整形外科 講師)

14:35~14:55(20分)

- ③ 脊椎疾患の動物モデルでの評価
(四宮 謙一: 東京医科歯科大学 整形外科 教授)

14:55~15:15(20分)

- ④ 人工骨の動物モデルの特徴と限界: 評価方法の開発
(中村 孝志: 京都大学 整形外科 教授)

15:15~15:35(20分)

- ⑤ 軟骨評価の課題と将来展望
(脇谷 滋之: 信州大学 整形外科 講師)

15:35~16:00 休憩

6. 新規材料

(座長 赤池 敏宏: 東京工業大学 生命理工学 教授)

(座長 小川 哲朗: ペンタックス株式会社) 16:00~16:20(20分)

- ① 海からのコラーゲン
(伊藤 博: 株式会社 高研)

16:20~16:40(20分)

- ② 接着分子を利用したナノマテリアルの開発
(赤池 敏宏: 東京工業大学 生命理工学 教授)

16:40~16:50(10分)

7. ISOTC194 活動報告

(土屋 利江: 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長)

16:50~16:55(5分)

問い合わせ及び申込み先
医療機器フォーラム事務局

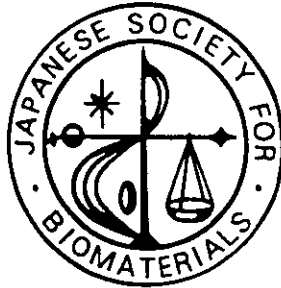
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所 療品部内

Tel & FAX 03-3700-9196

バイオマテリアル -生体材料-

Journal of Japanese Society for Biomaterials



Vol.22
2004. JULY No.

4

Offprint

Title

Name

Department

Institution

Address

Postal Code

City

Country

Phone

Fax

JJSIB

日本バイオマテリアル学会

**Journal of Japanese Society
for Biomaterials**



バイオマテリアルの許認可と留意点

土屋利江*

JJSB

Certification and a notice point for the products of biomaterials

バイオマテリアルから作製された医療機器には、多種多様な製品がある。今回の医療機器関連の薬事法改正で、① リスクに応じたクラス分類制度の導入、② 低リスクの医療機器には、第三者認証制度の導入、③ 医療機器の販売業・賃貸業においては、安全対策の強化、④ 医療機器の治験制度などの充実、⑤ プタ心臓弁など生物由来製品は、原材料の採取・製造から市販後まで、一貫した安全確保体制、などが導入された。これらの見直された規制内容を紹介する。

さらに、医療機器の細胞毒性試験に関する留意点について述べる。

Toshie Tsuchiya*

Key words : biomaterial, medical devices classification, certification system, Pharmaceutical Affairs Law, biologics

バイオテクノロジーなどの科学技術の進歩、国際的な規制にハーモナイゼーション、企業の活動の多様化など、社会的な情勢の変化を受けて、2005年4月には、医療機器に関する安全対策の抜本的見直しなどの措置が施行される予定であり、見直された規制内容を紹介する。

リスクに応じたクラス分類制度の導入

人体に与えるリスクを考慮した安全対策として、三つの医療機器に分類し、国際分類などについても考慮した分類となっている。

- ① 高度管理医療機器：副作用・機能障害が生じた場合、人の生命・健康に重大な影響を与えるおそれがある医療機器(例：透析器、ペースメーカー、放射線治療装置など)
- ② 管理医療機器：副作用・機能障害が生じた

場合、人の生命・健康に影響を与えるおそれがある医療機器(例：MRI、電子式血圧計、消化器用カテーテルなど)

- ③ 一般医療機器：副作用・機能障害が生じた場合でも、人の生命・健康に影響を与えるおそれがほとんどない医療機器(例：メス、ピンセット、X線フィルムなど)

各医療機器の具体的な品目は、薬事食品衛生審議会の意見をきき、厚生労働大臣が指定し、すでに公表されている。

低リスクの医療機器には、第三者認証制度の導入

低リスク医療機器(先の分類では② 管理医療機器)のなかで、厚生労働大臣が適合性認証基準を定めて指定した品目については、現行の、厚生労働大臣による承認制度から、第三者認証機関による基準適合性認証を受けることになった。大きな変更点である。

- ① 第三者認証機関の認定は、基準適合性認証業務申請に基づき、厚生労働大臣が行う。
- ② 第三者認証機関の認定は、更新性である。
- ③ 第三者認証機関における基準適合性認証業務の実施義務・守秘義務・業務規定などや、第三者認証機関に対する厚生労働大臣

* Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所療品部
【略歴】 1971年九州大学薬学部卒業。1986年 国立衛生試験所医化学部主任研究官。1988年 国立衛生試験所療品部室長。1989年 スイス・ベルン大学留学, visiting scientist(1年間)。2000年 国立医薬品食品衛生研究所療品部部長。専門：化学物質などの吸収、分布、代謝、排泄(ADME)、腸内細菌による代謝・酵素、遺伝毒性、細胞毒性、催奇形性(発生毒性)、発がん性、免疫系評価。細胞組織医療機器、医療機器や医療材料の安全性・生体適合性に関連した分野。趣味：旅行、読書、球技

の指導監督規定など、第三者認証制度の実施に際して必要な事項を定めることとなっている。

主な認定要件は、下記である。詳細は省略した。

- ① 基準適合性認証業務を実施する一定の条件に適合する知識経験者が、厚生労働省令で定める人数以上であること
- ② 基準適合性認証業務の適正かつ誠実な実施のための設備、実施方法、実施計画および経理的基礎を有すること
- ③ 基準適合性認証業務が不公正になるおそれがないよう、一定の基準に適合すること

医療機器の販売業・賃貸業の安全対策強化

高度管理医療機器および特定保守管理医療機器*の販売業・賃貸業については、現行の届出制から、都道府県知事の許可を必要とすることになった。

高度管理医療機器などの販売業・賃貸業の許可要件として、一定の構造設備の具備を定め、営業所の管理者の設置を求める。

医療機器の販売・賃貸全般についての安全対策を充実させるため、高度管理医療機器以外の医療機器の販売業・賃貸業も含め、医療機器の販売業・賃貸業全般に共通する遵守要件を強化し、新たに、納品先記録の作成、保管、一般消費者への適正使用のための情報提供、中古品販売時における元売業者からの指示事項の遵守などを定めることとなっている。

医療機器の治験制度などの充実

治験計画の30日前届出、治験の実施にかかる有害事象の報告など、現行の医薬品での治験の例と同様に、医療機器の治験の取り扱いに関する制度の充実を図ることとなった。

1. 医療機器GCP省令

医療機器の有効性と安全性を評価する臨床試験(治

* 特定保守管理医療機器とは、保守点検、修理その他の管理に専門的な知識・技能を必要とする医療機器である(レントゲン装置、CT装置、人工呼吸器など)

験)を実施する際の新しい基準として、医薬品 GCP (平成9年厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」と整合をとった基準を設定すべきとの観点から、医薬品GCP省令を基盤として原案を作成し、医療機器の特性に配慮しつつ、特に以下の点に留意しながら、個別条文ごとに検討を行っている。

- ① 文書による説明と同意取得の義務化
- ② 治験総括医師制度の廃止
- ③ 治験依頼者(医療機器企業)の責務の強化
- ④ 治験審査委員会の機能の充実
- ⑤ 治験責任医師の責任と義務の明確化と、治験支援体制の充実
- ⑥ GCP 対象の臨床試験の範囲

2. 医師主導のGCP

医師みずからが行う治験が導入されたことにより、上記の検討と並行し、医師主導の治験の際のGCPについて二つの基本原則に基づき、検討が行われた。

- ① 原則として、現行 GCP(医薬品 GCP 省令)の意図する水準と同様のものが維持され、現行GCPの内容が網羅されたものとし、国際的な標準である ICH-GCP との整合性に配慮すること
- ② 医師主導の治験においても、原則として、“みずから治験を実施しようとする者”または“みずから治験を実施する者”(医師、医療機関)が、“治験依頼者”と同等の責務を負うものとする。

医療機器の特性を考慮して、GCP省令に反映すべき点などについて追加・修正などが行われたのち、すでに公表されている(詳細は省略)。

GLPの改正概要

安全性に関する非臨床試験(毒性試験)の資料の信頼性を確保するための試験実施施設、試験実施者などの基準を通知し、平成15年10月より施行している。その概要について列記した。

- ① 試験操作などを標準化するため、標準操作手順書を作成すること

- ② 試験計画の立案，実施について試験計画書を作成すること
- ③ 試験の適正な実施，信頼性確保のための内部監査の実施(信頼性保証部門の設置)
- ④ 動物の飼育管理施設，試験に用いるサンプルの取り扱い区域，試験操作区域を設けること
- ⑤ 試験に用いるサンプルの特性を確認し，試験に使用すること
- ⑥ 試験の報告(最終報告書の作成)および生データ，標本および記録の保存に関する規定

生物由来製品における一貫した安全確保体制

1. 生物由来製品に関する制度の創設

ヒトまたは動物の細胞，組織などに由来する原材料を用いて製造される生物由来製品は，その特性として，原材料の汚染に由来する感染リスクなどについて，注意を払う必要がある。生物由来という，この共通特性に着目し，原材料採取・製造から市販後に至る，一貫した安全性確保体制を導入し，製品の安全性を図るために創設された。

2. 生物由来製品に関する制度の主な内容

(1) 生物由来製品および特定生物由来製品の指定
製品の感染症リスクを考慮した科学的評価に基づき，指定を行い，生物由来製品は約700製品，特定生物由来製品は約280製品について指定し，公表した。

(2) 生物由来原料基準

生物由来原材料を用いるすべての医薬品などの原材料について，品質・安全性の確保のために，適格性の基準を制定している。

(3) 血液製剤などの使用記録などの保管期間

(4) 表示

(5) 添付文書記載要領

(6) 感染症定期報告

平成15年5月15日付け医薬発第0515008号医薬局長通知“生物由来製品に関する感染症定期報告制度について”において，生物由来製品に関わる感染

症定期報告の具体的な報告方法などについて，以下のように記載している。

当該生物(ヒトを含む)由来成分，または由来臓器を介したヒトへの感染に関する論文などに限らず，当該生物の感染症に関する論文など全般のうち，以下を報告対象としている。報告対象範囲には，当該事実が“明確に示された”論文などだけでなく，“示唆された”論文なども含む。

- ① ヒトに感染することが新たに判明した当該生物の感染症に関する論文など(新規感染)
- ② 当該生物の人獣共通感染症(生物自身の感染，臓器などの使用によるヒトへの感染を含む)の感染頻度増加に関する論文など(頻度増加)
- ③ 当該生物の人獣共通感染症の既知感染経路とは別の感染経路に関する論文など(新規感染経路)

(7) 使用対象者への説明ならびに記録，および保存

医療関係者に対し，特定生物由来製品の適正な使用のための必要な事項についての使用対象者への説明を義務付けている。

すなわち，特定生物由来製品を取り扱う医師その他の医療関係者は，特定生物由来製品の有効性および安全性，その他特定生物由来製品の適正な使用のために必要な事項について，当該特定生物由来製品の使用の対象者(動物への使用に当たっては，その所有者または管理者)に対し適切な説明を行い，その理解を得るよう努めなければならない(第68条の7参照)。

また，特定生物由来製品の遡及調査などを可能とするために，使用の対象者の氏名などの記録，およびその保存を義務付けた。

製造業者に対しては，生物由来製品の遡及調査などを可能とするため，販売などを行った生物由来製品に関する記録，およびその保存を義務付けている。

(8) 製造業者らの生物由来製品製造管理者の設置要件の規定

生物由来製品の製造業者らは，生物製品製造管理者を設置しなければならない。

細胞組織医療機器などの薬事法改正

平成 12 年 12 月 26 日付けで、ヒトまたは動物由来成分を原料として製造される医薬品などの、品質および安全性確保についての医薬安全局長通知(医薬発第1314号)において、“細胞組織利用医薬品などの取り扱いおよび使用に関する基本的考え方”と“ヒト由来細胞・組織加工医薬品などの品質および安全性の確保に関する指針”の二つの文書が示された。

ヒトまたは動物の細胞または組織より構成された、医療機器および医薬品に関して、科学技術の進歩に伴う感染症への対策が急務となり、ドナースクリーニング、感染因子の不活化など、ドナーに由来する感染症への対策、培養などの処理により、細胞または組織が有害な性質のものとならないことの確認など、品質および安全性を確保するために特別の対策が必要とされ、改正された。

市販後の安全対策の充実と承認、許可制度の見直し

医療機関からの副作用などの報告制度として、医師・薬剤師などの医薬関係者から、直接、厚生労働省に報告される副作用、不具合、または感染症報告の報告事項を規定した。製造業者のみならず、医療機関からの報告事項について規定された。

医療関係者は、副作用や不具合などを知った場合、保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するため、必要があると認めるときは、その旨を厚生労働大臣に報告しなければならない。

その他

薬事法上、従来“医療用具”としていた法制上の名称を“医療機器”に変更する。

医療機器全般について求められる本体または直接の容器・被包への表示事項については、現行の元売業者名、使用期限などのほか、新たに、医療機器の名称、製造番号、製造記号などを表示しなければならない。

特定保守管理医療機器(人工呼吸器など、保守点検、修理、その他管理に専門的な知識・技能を必要

とする医療機器)については、中古品の流通実態などを踏まえ、本体に直接表示すべき事項を新たに定め、具体的には、元売業者名、医療機器の名称、製造番号・製造記号などの直接表示を行わなければならない。

「医療機器修理業の重要性に鑑み、従来、製造業の一類型として政令で位置づけられてきた医療機器修理業について、位置づけの法的明確化をはかる。医療機器の修理に際しての安全対策を強化する一環として、医療機器の修理業者は、中古品修理に際して元売業者からの指示を受けなければならないこと等、修理業者の遵守要件を強化すること。」

日本のすべての改正内容について述べることはできない。薬務関連の公報最新版を読み、正確な最新情報を入手することが重要である。

薬事法：<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/html/hourei/contents.html>

審査管理課関連通知：<http://www.nihs.go.jp/mhlw/tuuchi/index.html>

現在も改正が進められており、毎月、通知などの追加が行われている。

医療機器の細胞毒性試験

医療材料および医療用具の細胞毒性試験は、USP Elution test methodでは、培地や、蒸留水を抽出溶液としてISOに記載されている各種温度、時間で抽出し、semi-confluentの状態の細胞に抽出液を加えて、細胞の傷害の程度に応じた5段階 grade(0～4)で判定する。コロニー法では、血清含有培地で37℃、24時間抽出した液を段階希釈して試験する。両試験法で得られた細胞毒性評価の違いを明らかにするために、細胞毒性試験用標準材料を用いて比較試験を行った。

細胞毒性試験では、ISO10993で採用されている標準材料A(SRM-A：中程度の細胞毒性を示す材料)および標準材料B(SRM-B：弱い細胞毒性を示す材料)、陰性対照材料を使用した。

Elution testでは、MEM培地のみ、あるいは、5%血清、10%血清含有MEM培地による抽出を行い、ISOでの標準的な材料の抽出方法に従って、6 cm²/ml

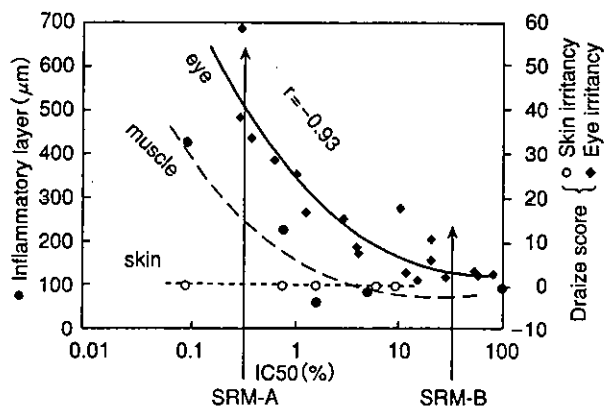


図1 筋肉内埋植，眼粘膜接触，健全皮膚接触した医療材料による組織反応とコロニー法による細胞毒性強度との関係
SRM-A：標準材料A. SRM-B：標準材料B
(Tsuchiya T et al., 1993)⁴⁾

の割合で37℃で24時間抽出して使用した。また，水を用いた材料からの抽出溶液は，10%血清含有培地で倍希釈し，細胞毒性試験に用いた。細胞毒性試験は，L929細胞を用いたElution test(USP)と，V79細胞を用いたコロニー法を用いて試験した。

わが国およびISOで細胞毒性試験に採用されている細胞毒性試験用標準材料AおよびBのIC50(%)と眼粘膜刺激性，筋肉組織刺激性，健全皮膚刺激性の関係を図1に示した。SRM-Aよりも強い細胞毒性を示す材料は，眼粘膜刺激性，筋肉組織刺激性を示す材料である。SRM-Bよりも強い細胞毒性を示すがSRM-Aよりも弱い細胞毒性を示す材料は，眼粘膜には刺激性を示すが，筋肉組織への刺激性は低い材料であると判断できる。眼粘膜刺激性を示さない材料の選択は，SRM-Bよりも弱い細胞毒性を示す材料のなかから選択可能となる。

日本のガイドラインで採用されているコロニー法で試験したときのSRM-AおよびBのIC50(%)値は，おのおの0.48%と54.1%であり，両材料間で100倍程度の開きがあった(表1)。

つぎに，USPのElution test methodでSRM-Aについて試験した細胞をギムザ染色した。Elution testにおける細胞毒性の評価方法を表2に示す。SRM-AおよびSRM-Bの2種の標準材料を5% fcs-MEMで，材料面積6 cm²/mlの割合で，37℃で24時間抽出した溶液について試験した。抽出溶液を2倍(50%)，4倍(25%)希釈した試験溶液では，細胞はほとんど観察

表1 血清含有培地抽出液を用いたコロニー法による標準材料の細胞毒性評価

Colony assay	(V79 cells)	
	SRM-A	SRM-B
IC50(%)	0.48	54.1

0.1g/ml(MO5:5%fcs-MEM) 37℃, 24h-extraction

表2 Elution testにおける細胞毒性の判定的評価法

Grade	reactivity	Conditions of all cultures
0	None	Discrete intracytoplasmic granules : no cell lysis
1	Slight	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached, and without intracytoplasmic granules : occasional lysed cells are present
2	Mild	Not more than 50% of the cells are round, and devoid of intracytoplasmic granules : no extensive cell lysis and empty areas between cells
3	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed
4	Severe	Nearly complete destruction of the cell layers

表3 血清含有培地抽出液を用いたElution testによる標準材料の細胞毒性評価

MEM Elution test	(L929 cells)	
	Grade	
Extraction conc.(%)	SRM-A	SRM-B
100	4	4
50	4	4
25	4	0
12.5	0	0

6cm²/ml(5%fcs-MEM) 37℃, 24h-extraction

されず，細胞傷害のgradeは最高の4を示した。SRM-Bについても同様に試験し，ギムザ染色した。2倍希釈した溶液でのみ，細胞傷害が観察され，gradeは4であった。USPのElution testでの評価基準(表2)に従って，SRM-AおよびSRM-Bについて評価した結果を表3に示した。SRM-AとSRM-Bでは，おのおの25%と50%抽出液濃度以上でgrade4を示し，細胞毒性を示す最小抽出液濃度は，両材料間で2倍程度のみの違いであった(表3)。

つぎに，SRM-Aについて，血清不含，血清5%および10%含有MEM培地で同様に抽出した溶液についてUSP Elution testで試験した。その結果，血清含有培地を用いて抽出したときのほうが細胞の傷害の程度が強いことが明らかになった(表4)。

陰性対照について同様に試験した結果，この場合には，血清不含，血清5%，および10%含有培地で

抽出した溶液について試験しても、抽出液を加えないコントロール培地での結果と同様、細胞に傷害性が検出されないことを確認した(表4)。

つぎに、蒸留水で37℃で抽出し、USPのElution testで試験した結果では、*in vivo*で傷害性を示すSRM-AおよびSRM-Bともに、その細胞毒性を検出できないことが明らかになった(grade 0)。また、血清不含の培地では、血清含有培地に比べてgradeが低く、USPで2以下のgradeを示す材料は合格させていることから、同じ材料が培地の違いにより、判定結果が異なることが明らかになった(表4)。

つぎに、蒸留水を抽出溶液にしたときの抽出温度と時間について、ISOで記載されている方法で試験した。その結果、50℃/72時間、70℃/24時間、121℃/1時間抽出しても、細胞毒性のあるSRM-Aの蒸留水抽出液は、抽出液を加えないコントロール培地での結果と同様な細胞形態を示し、USP Elution testではgrade 0で、細胞毒性を検出できないことが明らかになった(表5)。

USP Elution testとコロニー法での感度の違いについて、SRM-Aの種々の希釈倍率で調製した溶液を用いて比較した結果、SRM-Aの12.5~2.5%溶液では、Elution testではgrade 0で、細胞傷害性がないと判定されるが、コロニー法では、コロニー形成率が0%であり、明らかに細胞毒性がある溶液である。両法では、播種する細胞数の違いが最も感度の違いとなってあらわれているものと考えられるが、材料の100%抽出溶液でコロニー形成が認められない材料(IC50($\%$)< 100%)では、弱い眼粘膜刺激性(draize score 2~4)を示すことから、Elution testは、眼刺激性のような、細胞毒性に鋭敏な組織に使用するコンタクトレンズなどの評価には、感度が低い可能性が示唆される。

USPで採用されている寒天重層法とコロニー法を比較した結果を示す。コンタクトレンズ材料を、ウサギ眼装用試験を行ったとき、いずれもdraize scoreが2~4程度を示した。この材料を寒天重層法で試験すると陰性になるが、コロニー法では、明らかにIC50($\%$)が100%以下であり、細胞毒性を検出することが可能であった。細胞接着活性、溶出液のコロニー法、材料直接接触によるコロニー法および材料

表4 各種抽出液を用いたElution testによる標準材料の細胞毒性評価

Ext. med.	Grade					
	SRM-A		SRM-B		Negative-SRM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
d-H ₂ O	0	0	0	0	0	0
0% fcs-MEM	3	3	1	2	0	0
5% fcs-MEM	4	4	4	4	0	0
10% fcs-MEM	4	4	4	4	0	0

37℃, 24h-extraction (L929 Cells)

表5 各種温度・時間で蒸留水で抽出した液を用いたElution testでの標準材料などの細胞毒性評価

Ext. cond.	Grade					
	SRM-A		SRM-B		Negative-SRM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
37℃, 24h	0	0	0	0	0	0
50℃, 72h	0	0	0	0	0	0
70℃, 24h	0	0	0	0	0	0
121℃, 1h	0	0	0	0	0	0

抽出液：蒸留水 (L929 Cells)
SRM-A：標準材料A. SRM-B：標準材料B
Negative-SRM：陰性材料

からコンタクトレンズを作製し、ウサギ眼装用試験を行ったときの試験結果を比較した。Draize scoreで2~4を示す材料は、血清含有培地での抽出液をコロニー法で試験すると、IC50($\%$)値は70~90%を示し、眼粘膜刺激性物質を検出することが可能であった。直接接触法では、コロニー形成はほとんど0%に近く、鋭敏に細胞毒性を検出できた。細胞接着活性は、*in vivo*での眼粘膜刺激性や、*in vitro*細胞毒性試験の結果と相関しない。

医療材料および医療用具の細胞毒性試験は、USPでは、培地や蒸留水を抽出液としてISOに記載されている各種温度、時間で抽出し、semi-confluentの状態の細胞に抽出液を加えて48時間後に、細胞の傷害の程度に応じたgradeで判定するElution test法を採用している。コロニー法では、血清含有培地で37℃、24時間抽出した液を段階希釈して試験することとなっている。

両試験法で得られた細胞毒性評価の違いを明らかにするために、細胞毒性試験用標準材料を用いて比較した。その結果、コロニー法の方がSRM-AおよびSRM-BのIC50($\%$)値に100倍以上の抽出液濃度

の違いが認められた。USP Elution testでは細胞毒性を示す最小抽出液濃度は、両材料間で2倍程度の違いであった。

したがって、コロニー法のほうが材料評価の判別精度の点ですぐれている。USP Elution test法では、SRM-Bを血清不含培地で抽出し、試験するとgrade 2以下を示し、試験適合(USP評価基準)となるが、血清含有培地では、severely reactive (grade 4)となって、不適合となり、同一材料の判定結果が異なるという問題点も明らかになった。

以上のことから、抽出溶液としては、血清含有培地が適切であり、コロニー法は、USP Elution test法にくらべて、精度が高く、定量的に細胞毒性強度を評価できる点においてすぐれている。

文 献

- 1) 日本組織培養学会・編：細胞トキシコロジー試験法。東京、朝倉書店、1991。
- 2) Ikarashi Y et al. : Comparative studies by cell culture and *in vivo* implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J Biomed Mater Res* 1992, 26 : 339-356.
- 3) Tsuchiya T et al. : Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J Applied Biomaterials* 1993, 4 : 153-156.
- 4) Tsuchiya T et al. : Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities : *In vivo/in vitro* correlation study using standard reference materials. *J Biomed Mater Res* 1993, 27 : 885-893.
- 5) Tsuchiya T et al. : *In vivo* toxic tissue/biomaterials responses : Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment. *Clinical Materials* 1994, 16 : 1-8.
- 6) Tsuchiya T et al. : A modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. *J Applied Biomaterials* 1994, 5 : 361-367.
- 7) Tsuchiya T et al. : Toxicological evaluation for biomaterials : Examinations of radiation vulcanized natural rubber latex. *Radiat Phys Chem* 1992, 39 : 541-545.
- 8) Tsuchiya T : Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J Biomaterials Applications* 1994, 9 : 138-157.
- 9) Isama K et al. : Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy : Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater Trans* 2002, 43 : 3155-3159.
- 10) Sumide T, Tsuchiya T : Effects of Multipurpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional Intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J Biomed Mater Res PartB : Appl. Biomater* 2003, 64B : 57-64.
- 11) 陰性対照材料、陽性対照材料 A および B の入手先 : (財)食品薬品安全センター薬野研究所事務部標準材料担当。TEL0463-82-4751, FAX0463-82-9627, E-mail : RM.Office@fdsc.or.jp



A novel function of N-cadherin and Connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan

Misao Nagahata,^{a,b,*} Toshie Tsuchiya,^b Tatsuya Ishiguro,^a Naoki Matsuda,^c Yukio Nakatsuchi,^d Akira Teramoto,^a Akira Hachimori,^e and Koji Abe^a

^a Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

^b Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 158-8501, Japan

^c Radioisotope Center, Nagasaki University, Nagasaki 852-8526, Japan

^d Department of Orthopaedic Surgery, National Nagano Hospital, Ueda 386-8610, Japan

^e Institute of High Polymer Research, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

Received 6 January 2004

Abstract

In this study, we examined the interaction of the osteoblast which forms bone and sulfated hyaluronan (SHya). For the purpose of the creation of a new functional polysaccharide, we introduced a sulfate group in hyaluronan (Hya) of high molecular weight, and SHya of high molecular weight could be obtained for the first time. When rat calvarial osteoblast (rOB) cells were cultured with a high concentration of SHya, they formed aggregated spheroids after 4 h and the spheroids grew to about 200 μ m after 24 h. We examined the expression of cell adhesion molecules in order to clarify the mechanism of aggregate formation. The N-cadherin (N-cad) and Connexin43 (Cx43) expression level of rOB cells cultured with SHya remarkably increased after 2 h. A difference in the expression of Integrin β 1 (Int β 1) could not be observed between the SHya addition and control group. The alkaline phosphatase (ALPase) activity of rOB cells cultured with SHya after 8 h was significantly enhanced in comparison with control. Therefore, the sulfate group of SHya seems to enhance expression of cell adhesion protein such as N-cad and Cx43, resulting in aggregate formation and further remarkable induction of the ALPase activity of rOB cells.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Sulfated hyaluronan; Osteoblast; Aggregation; N-cadherin; Connexin; ALPase activity

It is reported that the extracellular matrix (ECM) provides positional and environmental information essential for tissue function [1]. ECMs are complex, consisting of several different classes of molecules that may regulate modeling and remodeling [2]. Sulfated polysaccharides, such as heparan sulfate (HS) or heparin (Hep), stabilize fibroblast growth factor (FGF) and transforming growth factor β (TGF- β) in an active conformation, protect them against pH, thermal, and proteolytic degradations, and strongly potentiate their mitogenic activity in many cell types. Growth factors

play a key role in the process of bone repair [3,4]. However, when the size of the defect is large, growth factor alone is not enough for bone repair. One promising way of promoting bone repair is to use cell scaffold, such as collagen [5]. However, there are problems, such as the antigenicity on the proteins. Therefore, we tried the regeneration of the bone using biocompatibility polysaccharides. Hyaluronan (Hya) has by far the highest molecular weight of the glycosaminoglycans (GAGs) and is thought to facilitate cell migration, adhesion, proliferation, and tissue repair [6].

Then, we synthesized sulfated hyaluronan (SHya) with different degrees of sulfation. We examined the effect of SHya on the cell function of rOB cells.

* Corresponding author. Fax: +81-3-3700-9196.

E-mail address: nagahata@nihs.go.jp (M. Nagahata).