

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  $\epsilon$ -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  $\epsilon$ -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らず倒産にお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、販売価格相当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](mailto: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 医薬食品局 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 医薬食品局 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 エンドトキシン汚染, 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](mailto: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

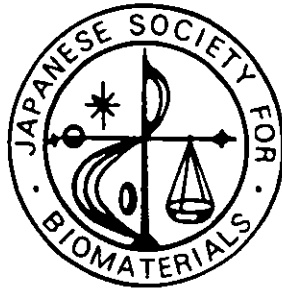
(土屋 利江: 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長)

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

---

JJISB

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の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・酵解、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 cm<sup>2</sup>/ml

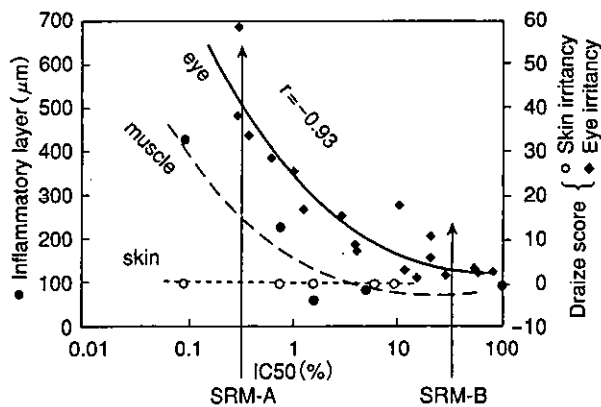


図1 筋肉内埋植，眼粘膜接触，健全皮膚接触した医療材料による組織反応とコロニー法による細胞毒性強度との関係  
SRM-A：標準材料A. SRM-B：標準材料B  
(Tsuchiya T et al., 1993)<sup>4)</sup>

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 cm<sup>2</sup>/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量的評価法

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

6cm<sup>2</sup>/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，血清不含有，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，血清不含有，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、血清含有培地にくらべて 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おり、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 <sub>2</sub> 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 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,<sup>a,b,\*</sup> Toshie Tsuchiya,<sup>b</sup> Tatsuya Ishiguro,<sup>a</sup> Naoki Matsuda,<sup>c</sup> Yukio Nakatsuchi,<sup>d</sup> Akira Teramoto,<sup>a</sup> Akira Hachimori,<sup>c</sup> and Koji Abe<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

<sup>b</sup> Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 158-8501, Japan

<sup>c</sup> Radioisotope Center, Nagasaki University, Nagasaki 852-8526, Japan

<sup>d</sup> Department of Orthopaedic Surgery, National Nagano Hospital, Ueda 386-8610, Japan

<sup>e</sup> 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  $\mu$ 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  $\beta$ 1 (Int $\beta$ 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  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 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](mailto:nagahata@nihs.go.jp) (M. Nagahata).

## Materials and methods

**Sulfated hyaluronan.** On the sulfation of the polysaccharide, various methods are reported [7–10]. However, the sugar chain is easily cut off under reaction and the molecular weight lowers. Therefore, a method using sulfur trioxide ( $\text{SO}_3$ ) complex was developed to prevent the lowering of the molecular weight [11–13]. The molecular weight simply lowers on Hya by acid and heating. Then, the synthesis was carried out using dimethylformamide (DMF)- $\text{SO}_3$  complex and trimethylamine (TMA)- $\text{SO}_3$  complex. Hya derivatives with different sulfation degrees can be obtained by changing the amount of DMF- $\text{SO}_3$  complex and TMA- $\text{SO}_3$  complex.

**Dimethylformamide- $\text{SO}_3$  complex.** Ten percent Hya150 (molecular weight,  $1.5 \times 10^6$ ) solution in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (WAKO Pure Chemical Industries) was mixed with DMF- $\text{SO}_3$  complex [14] and stirred for 14 h at  $0^\circ\text{C}$ . The reaction mixture was then diluted, neutralized, and precipitated by adding to a large quantity of acetone. The precipitate was dissolved in distilled water again and dialyzed against distilled water.

**Trimethylamine- $\text{SO}_3$  complex.** Ten percent Hya150 solution in DMF was mixed with TMA- $\text{SO}_3$  complex (Aldrich Chemical) and stirred for 48 h at  $60^\circ\text{C}$ . SHya was obtained after the reaction by the method equal to the above-mentioned DMF- $\text{SO}_3$  complex method.

The degree of substitution (DS) of SHya was 1.2, 2.1, and 3.4 as determined by the chelate titration method [15]. Moreover, the effectiveness of sulfation was also demonstrated by FT-IR analysis. The IR spectrum of SHya exhibited two absorption bands at 1240 and  $820\text{ cm}^{-1}$  due to the S=O and  $\text{SO}_3^-$  stretching, respectively. Characteristics of SHya are summarized in Table 1 and chemical structures are illustrated in Fig. 1. The number, which is at the end of the compound's name, indicates MW [ $\times 10^4$ ] and the subscript shows the DS.

**Cell culture.** The rOB cells were isolated and cultured using the method described by Hamano et al [16]. rOB cells were cultured in a sterile tissue culture dish (NUNC) with the use of Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM, Nissui-seiyaku) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco). Cultures were maintained in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere at  $37^\circ\text{C}$ . The cells were plated in 24-well tissue culture plates (NUNC) or 100 mm  $\phi$  tissue culture dish (NUNC) at an initial density of  $5 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  for study of the effects of Hya and SHya on cell function. The cells were subconfluent after 2–3 days of culture and confluent after 3–4 days.

**Western blotting analysis.** Immunoblots of N-cadherin (N-cad), Integrin  $\beta 1$  (Int $\beta 1$ ), and Connexin43 (Cx43) were performed according to the method of Matsuda et al. [17]. rOB cells were plated in 100 mm  $\phi$  dishes. The cells were incubated with SHya for different time intervals as indicated in the results, washed with phosphate-buffered saline (PBS (-)), and lysed for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  with RIPA buffer. After sonicating the lysates for 30 s using a sonicator, their protein concentrations were determined using DC protein assay (Bio-Rad Laboratories). The lysate was mixed with equal volumes of Laemmli sample buffer, and proteins were separated on 7.5% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (OSMONICS). After blocking with 3% nonfat dried milk in Tris-buffered saline with Tween 20 buffer, the membranes were incubated successively with a primary antibody, followed by incubation with antimouse antibodies conjugated with ALP, and detection with ALP detection reagent (Gibco). Primary antibodies used include those recognizing N-cad, Int $\beta 1$ , and Cx43. All antibodies were monoclonal mouse antibodies and were obtained from BD Transduction Laboratories.

**Preparation of cell lysate for assay.** Cell lysates were prepared according to the method of Hamano et al. [16]. After removal of the culture medium from the dishes, cells were washed three times with PBS (-). One milliliter of PBS (-) containing 0.04% Nonidet P-40 (Nacalai tesque) was poured into the dishes and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. The suspension was homogenized with an ultrasonic disrupter (BH-200P, TOMY SEIKO) and centrifuged at 1000 rpm for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . These cell lysates were used as sample solutions for the measurements of protein content and ALPase activity.

**Protein content.** Total protein content of cell lysate was measured by the BIO-RAD protein assay method (Protein assay, Bio-Rad Laboratories) and absorbance at 595 nm was measured using an ELISA reader (Bio-Rad Laboratories), using bovine serum albumin (WAKO Pure Chemical Industries) as reference standard.

**Alkaline phosphatase activity.** Alkaline phosphatase (ALPase) activity was determined by the modification of the methods of Hamano et al. [16] and Lowry et al. [18]. The reaction mixture consisted of 0.1 ml cell lysate and 0.4 ml of 16 mM *p*-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate (WAKO Pure Chemical Industries). The solution was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.5 ml of 0.5 N NaOH and absorbance at 410 nm of *p*-nitrophenol liberate was measured. The enzyme activity was expressed in units/mg of protein, where 1 U corresponded to 1 nmol of *p*-nitrophenol liberate per 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . For determination of the localization of the ALPase activity, cells were rinsed with PBS (-) and fixed with 10% formalin (pH 7.4) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . These fixed dishes were rinsed three times with distilled water and Azo staining solution (5 mg naphthol AS-BI phosphoric acid sodium salt (FLUKA) in 10 ml of 0.05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (WAKO Pure Chemical Industries) buffer (pH 9.8)) for 5 min at room temperature. Finally, they were washed three times with distilled water.

**Culture conditions for estimating the interaction of serum and SHya.** Four kinds of dishes were prepared as follows: (A) DMEM only, (B) DMEM with 10% FBS, (C) 2.1SHya in DMEM with 10% FBS, and (D) 2.1SHya only in DMEM into 35-mm tissue culture dish (NUNC), and incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ , respectively. After the incubation, these dishes were washed up with PBS (-) three times. rOB cells were suspended in DMEM without serum, the cell suspensions were added into these dishes, and cell adhesion and morphological change were examined after 24 h-incubation.

**Interaction of serum components and SHya.** The cells were plated in serum free DMEM supplemented with fibronectin (FN), basic FGF

Table 1  
Characteristics of polysaccharides

Polysaccharides	Number of sulfate groups per two saccharide rings	MW ( $\times 10^4$ )
Hya	0	30
1.2 SHya	1.2	55
2.1 SHya	2.1	20
3.4 SHya	3.4	5

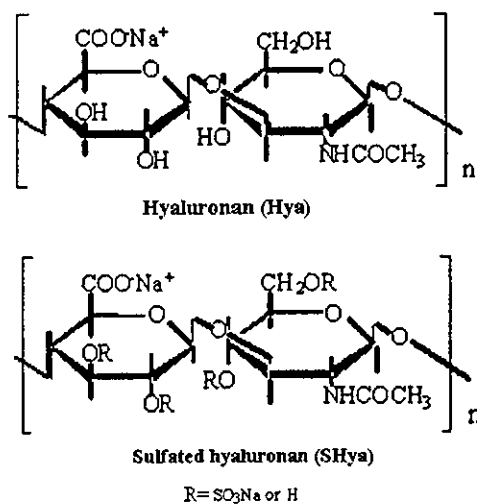


Fig. 1. Structure of hyaluronan and sulfated hyaluronan.

(bFGF), and SHya. Cells in culture were incubated at 37 °C for 24 h with 5% CO<sub>2</sub>.

## Results

Fig. 2 shows the morphologies of the attachment of rOB cells cultured with four different concentrations of 2.1SHya after 24 h. rOB cells treated with high concentrations (0.25 and 0.5 mg/ml) of 2.1SHya formed large aggregations. Western blotting was used to examine the effect of 2.1SHya on adhesion protein expression in rOB cells. The cultures were washed with cold PBS (–) and protein samples were collected by the addition of a lysis buffer. As shown in Fig. 3A, the control time-dependently increased protein levels of N-cad, Intβ1 after incubation with rOB cells for 24 h. The time-dependence of 2.1SHya stimulation of N-cad is shown in Fig. 3B. This response was considerably earlier than that observed for the control, peaking 2–6 h after 2.1SHya addition (Fig. 3C). Expression of Intβ1 was not observed in great difference for the 2.1SHya addition and control. Cx43 expression level in the 2.1SHya addition reached a peak at 2–4 h, and increase in some expression levels of protein was observed in comparison with the control (Fig. 3C). N-cadherin in Fig. 4 shows the morphologies of the attachment of rOB cells treated with different DS

SHya and Hya after 24 h. Cell aggregations were formed in the case of high DS SHya (2.1SHya, 3.4SHya). In the meantime, with low DS 1.2SHya or nonsulfated Hya, aggregations were not formed. However, when 1.2SHya was added in high density, rOB formed aggregations. Fig. 5 shows rOB cell proliferation in the presence of SHya and Hya. In the presence of 2.1SHya, cell proliferation was suppressed after seeding 48 h. However, rOB cells treated with 2.1SHya gradually proliferated afterwards and it reached confluence after 120 h. Hya showed similar trends in the control (TCD). Fig. 6 shows photographs of the Azo staining used for the determination of ALPase activity localization on rOB cell monolayers and aggregates cultured for 24 h. The staining also immaturely dyed the central part of the aggregation observed in the 2.1SHya. The rOB cells in TCD and Hya did not stain with Azo staining. The ALPase activity was only expressed in the aggregates. Compared with the control and Hya, 2.1SHya also time-dependently enhanced the ALPase activity of rOB cells when examined at a concentration of 0.5 mg/ml (Fig. 7). The effect of the existence of serum component and 2.1SHya on the formation of aggregation of rOB cells was examined (Fig. 8). rOB cells did not form aggregations without 2.1SHya in the case of the serum-free medium (Fig. 8D). The adherent cell number increased when it

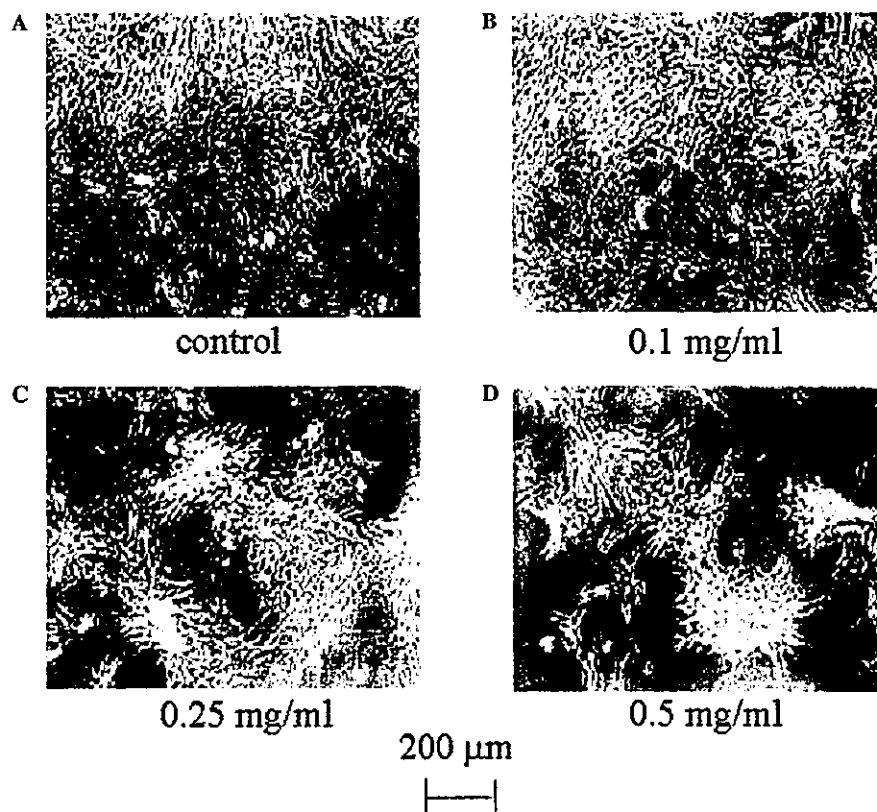


Fig. 2. Relationship between 2.1SHya concentration and rOB cell adhesion after 24 h. rOB cells were treated with various concentrations of 2.1SHya. (A) Control. (B) 0.1 mg/ml of 2.1SHya. (C) 0.25 mg/ml of 2.1SHya. (D) 0.5 mg/ml of 2.1SHya. Phase contrast micrographs. Scale bar 200 μm.



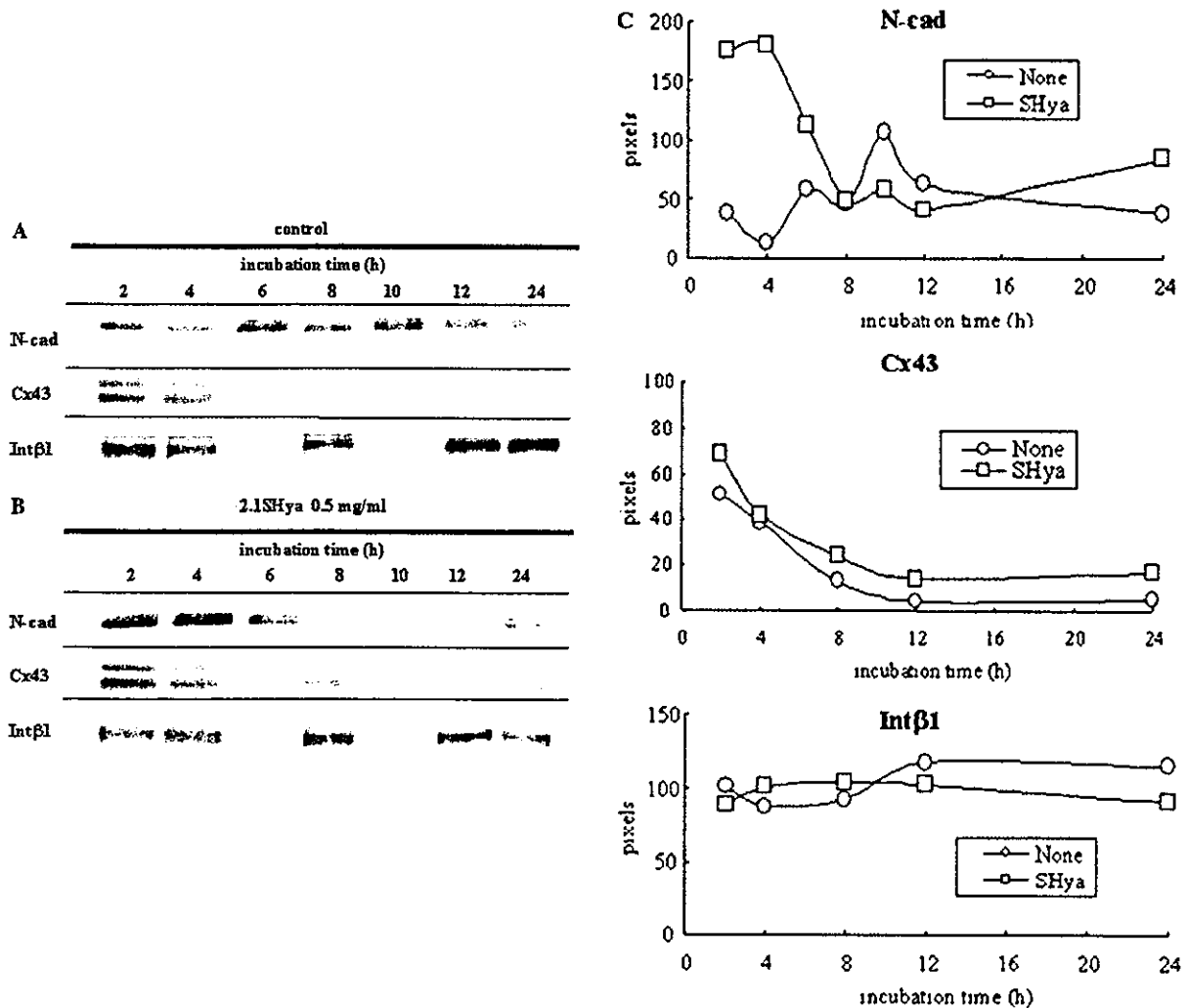


Fig. 3. Effect of SHya on adhesion protein expression in rOB cells. rOB cells were incubated with 2.1SHya for the times shown. Cells were lysed and proteins were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. (A) Without 2.1SHya (B) with 2.1SHya (C) quantification of band intensities was measured by NIH images.

was incubated in the culture medium including the serum (Fig. 8B) in comparison with the serum-free system. However, when SHya coexisted with the serum, rOB cells formed aggregations (Fig. 8C). rOB cells were seeded onto the plates in the presence or absence of FN and bFGF of added SHya for the study of effects of serum protein and SHya on cell aggregation (Fig. 9). bFGF was shown to form aggregation in rOB cells but not in the case of FN addition. Furthermore, when SHya was added with the bFGF, the cell aggregation was increased by the addition of SHya under the presence of bFGF.

## Discussion

The aim of this study was to elucidate the mechanism of the enhancement of ALPase activity induced by the

high molecular weight of sulfated polysaccharides. Hep, HS, and Hya are common components of the ECM in most tissues [19]. It is reported that sulfated polysaccharides like Hep/HS are the major FGF, TGF- $\beta$ , and bone morphogenetic protein (BMP)-binding molecules in the ECM [20]. However, the molecular weights of Hep/HS and chondroitin sulfate (Chs) are lower than Hya [21]. Therefore, we synthesized SHya with varying DS and high molecular weight in order to obtain a high molecular weight of sulfated polysaccharides. Hya is easily decomposed in heat and acid [19]. Therefore, by the change of type and quantity of the  $\text{SO}_3$  complex, SHya of varying DS and high molecular weight was synthesized. In this study, we examined the effect of SHya on the initial differentiation marker of the osteoblast. As a result of examining the effect of SHya in rOB cells on cell morphology, the following fact became clear: rOB cells formed aggregations in over 3 mg/ml

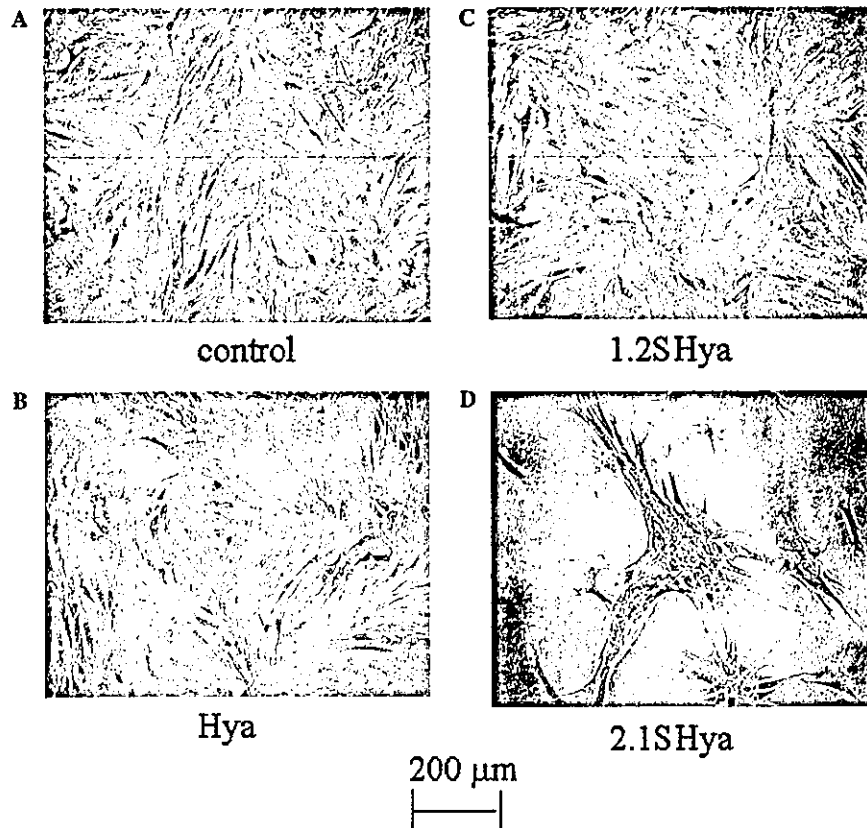


Fig. 4. Cell morphologies of rOB cells in the presence of 0.5 mg/ml Hya and SHya after 24 h. rOB cells were treated with Hya and varying DS of SHya. (A) Control, (B) Hya, (C) 1.2SHya, and (D) 3.4SHya.

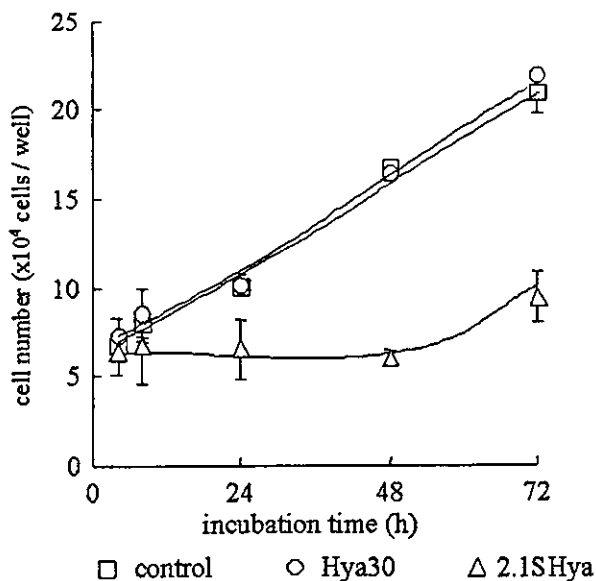


Fig. 5. Effect of 0.5 mg/ml Hya and SHya on the proliferation of rOB cells. rOB cells were treated with Hya and 2.1SHya for 72 h. The proliferation of rOB cells treated with Hya and 2.1SHya was determined. Values are means  $\pm$  SD for four dishes.

concentration in the case of SHya of low DS (1.2SHya) and in over 0.25 mg/ml concentration in the case of SHya of high DS (2.1SHya, 3.4SHya). However, rOB cells cultured with Hya without the sulfate group did not form aggregations (data not shown). Also, aggregations were not formed when Hep and Chs were added. After the SHya addition, rOB cells began to form aggregations after 4 h and large aggregations were formed after 24 h. Therefore, by introducing a sulfate group into the hyaluronan, rOB cells formed aggregations.

Cell-cell contacts and communication between bone cells are essential for coordinated bone development and remodeling. Cell-cell adhesion mediated by the cadherin superfamily plays an important role in osteogenesis. Cadherins play essential roles in the regulation of several physiological processes such as cell migration, proliferation, and differentiation [22]. Tsutsumimoto et al. [23] reported that the expression of N-cad is involved in the aggregate formation of MC3T3-E1. Also, integrins are the principle mediators of the molecular dialogue between a cell and its ECM environment such as collagen and fibronectin [24,25]. Osteoblasts express several integrin subunits and their presence may be important in

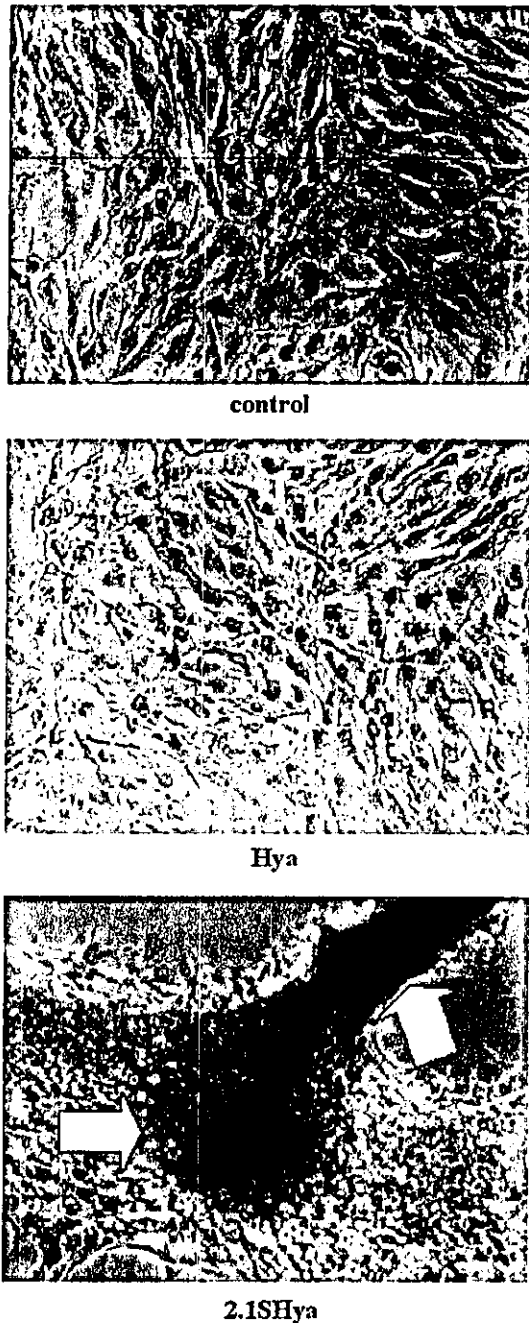


Fig. 6. Appearance of Azo-stained cultures of rOB cells in the presence of 0.5 mg/ml Hya and SHya after 24 h. rOB cells were treated with Hya and 2.1SHya for 24 h. rOB cells were stained by the Azo stain method.

regulating the response of these cells to the ECM, suggesting that integrin participates in the differentiation. By Western blotting, the expression of N-cad and Int $\beta$ 1 proteins in osteoblasts was confirmed. In the presence of 2.1SHya, rOB cells increased protein levels of N-cad at early stages, but protein levels of Int $\beta$ 1 were not observed in great difference between the 2.1SHya addition and control group. To clarify the roles of N-cad in

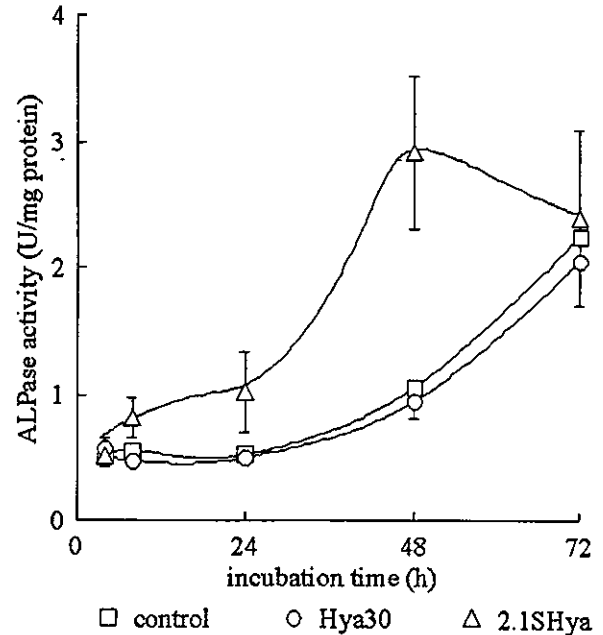


Fig. 7. Effect of 0.5 mg/ml Hya and SHya on the ALPase activity of rOB cells. rOB cells were treated with Hya and 2.1SHya for 72 h. The ALPase activity of rOB cells treated with Hya and 2.1SHya was determined. Values are means  $\pm$  SD for four dishes.

SHya-induced cell aggregation, the effects of N-cad function-perturbing agents such as blocking antibodies were tested. This N-cad antibody was shown to inhibit cell–cell aggregation in rOB cells. These results confirm a direct involvement of N-cad in aggregation process (data not shown). Gap and adherens junctions are observed in osteoblast cell–cell contact [26,27]. Gap junctional intercellular communication (GJIC) is the key function by which cells exchange small molecules including signal molecules directly from the inside of a cell to neighboring cells. Gap junctions that are mediated by Cx have been well studied in osteoblasts. Among the Cx family, Cx43 is a major protein in osteoblasts [28]. By Western blotting, the expression of the Cx43 protein in these cells was confirmed. Cx43 expression level in the 2.1SHya addition reached a peak at 2–4 h, and the increase in expression level of protein was observed in comparison with the control. Some reports have proposed that cadherin is also involved in the regulation of the GJIC. This suggests that cadherin-mediated cell–cell adhesion is essential for GJIC and cadherin may also regulate GJIC in osteoblasts. Chiba et al. [29] demonstrated that Cx43 expression parallels ALPase activity and osteocalcin secretion in differentiating human osteoblastic cells. These data suggest that Cx43 expression contributes to osteoblastic differentiation.

Proliferation of rOB cells after aggregation formation was inhibited with the SHya addition more than with

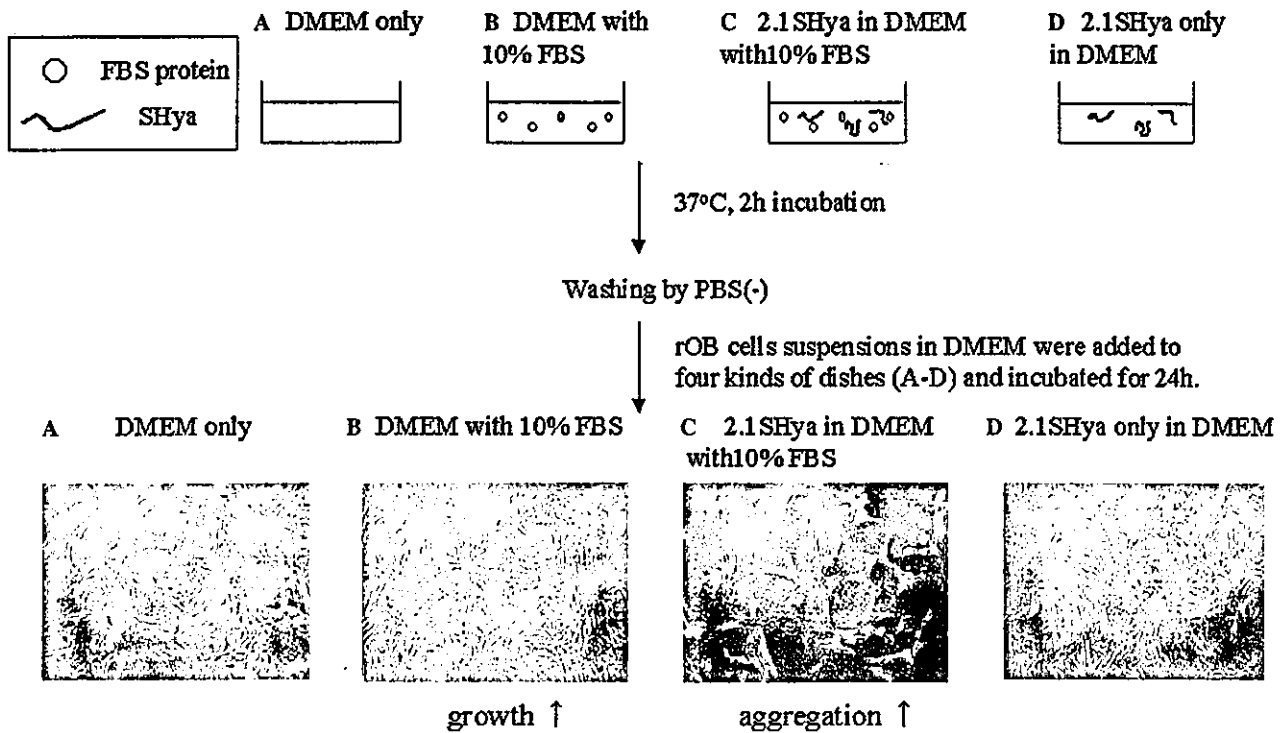


Fig. 8. Effect of FBS and 2.1SHya on cellular adhesion after 24 h. Four kinds of dishes were prepared as follows: (A) DMEM only, (B) DMEM with 10% FBS, (C) 2.1SHya in DMEM with 10% FBS, and (D) 2.1SHya only in DMEM into 35-mm tissue culture dish (NUNCLON) were incubated at 37°C for 2 h under the 5% CO<sub>2</sub>–95% air conditions, respectively, and washed with PBS (–) three times. Then, rOB cell suspensions in DMEM were added to four kinds of dishes (A–D) and incubated for 24 h. After 24 h-incubation, the cell appearances were observed as shown in (A–D). Magnification 100×.

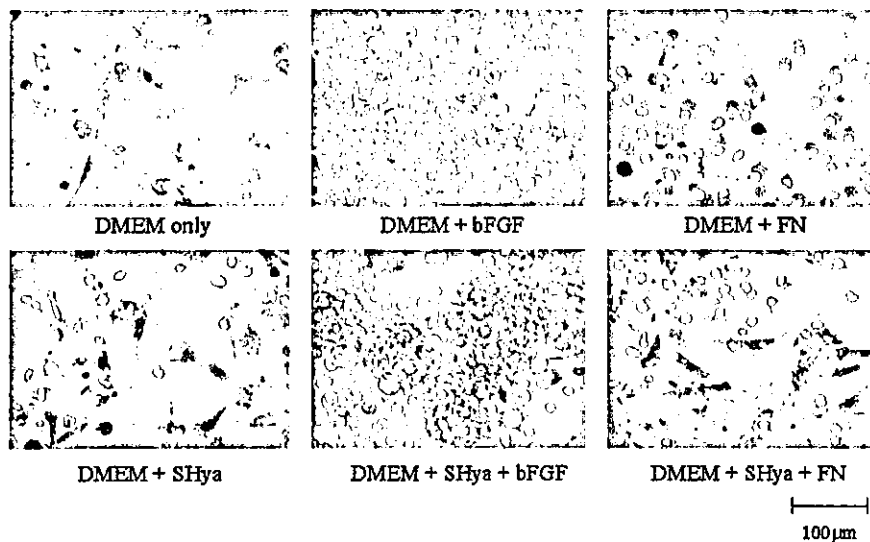


Fig. 9. Effect of serum component and 2.1SHya on cellular adhesion after 24 h. The cells were plated in serum free DMEM supplemented with FN, bFGF, and SHya, and incubated for 24 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

the control or Hya addition. It is known that the osteoblast shifts to differentiation after it stops proliferation [30]. Recently, C-terminal Cx protein was found to suppress cell proliferation [31]. Then, we evaluated

the effect of SHya on the ALPase activity of the initial differentiation marker for the osteoblast. The ALPase activity of rOB cells cultured with SHya was only expressed in the aggregation, when localization of the