

III 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著書名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
土屋利江	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	日本再生歯科医学会誌	2	1-8	2004
土屋利江	細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン,環境整備について	高分子	53	144-146	2004
石黒(長幡)操、寺本彰、阿部康次、中岡竜介、土屋利江	ラット頭蓋冠由来骨芽細胞のALPase 活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果	繊維学会(報文)	61	98-102	2005
Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets	Key Engineering Materials	288-289	409-412	2005
Toshie Tsuchiya	A Useful Marker for Evaluating the Safety and Efficacy of Tissue Engineered Products	Tissue Engineered Medical Products	ASTM STP 1452	254-261	2004
Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya	Novel mechanism of tumorigenesis: increased transforming growth factor-beta 1 suppresses the expression of connexin 43 in BALB/cJ mice after implantation of poly-L-lactic acid.	J Biomed Mater Res	70	335-340.	2004
Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya	Gene expression changes in BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films	J Biomed Mater Res	68	376-382	2004
Yuji Haishima, Rieko Matsuda, Yuzuru Hayashi,	Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood	Int J Pharm	274	119-129	2004

Chie Hasegawa, Takeshi Yagami and Toshie Tsuchiya	circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy				
Misao Nagahataa, Ryusuke Nakaokaa, Akira Teramotob, Koji Abeb and Toshie Tsuchiyaa	The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes	Biomaterials.	26(25)	5138-5144	2004
Atsuko Matsuoka Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extract of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests	J Biomed Mater Res	In press		
Wakitani S, et al.	Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints.	Cell Transplant	13	331-6	2004
Wakitani S, et al.	Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports.	Cell Transplant	13	595-600	2004
Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K.	Fibroblast growth factor-2 promotes repair of partial thickness defects of immature rabbits but not in mature rabbits.	Osteoarthritis Cart	12	636-641	2004
Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y,	Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal	Rheumatology	43	390-395	2004

Matsushita I, Gejo R, Kimura T.	cells derived from bone marrow.				
Takagi M, Fukui Y, Wakitani S, Yoshida T.	Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes.	J Biosci Bioeng	98	477-481	2004
脇谷滋之	関節軟骨再生現状と展望.	分子リウマチ	2	119-124	2004
服部高子、脇谷滋之.	骨髄間葉系細胞移植	関節外科	23	688-691	2004
天正恵治、中谷宏幸、岡部高弘、脇谷滋之.	変形性関節症の軟骨再生の現状と将来.	Journal of Clinical Rehabilitation	13	436-442	2004
岡部高弘、中谷宏幸、天正恵治、脇谷滋之.	種々細胞利用による関節軟骨修復法の現状.	Clinical Calcium	14	1116-1121	2004
天正恵治、岡部高弘、中谷宏幸、脇谷滋之	関節軟骨修復と運動	運動・物理療法	15	289-294	2004

IV 研究成果の刊行物・別刷り

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ろそ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. ガイドラインに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)

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, 定員になり次第〆切.)

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

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

細胞組織医療機器等の製品化のための ガイドライン、環境整備について

医療機器・細胞組織医療機器関連の薬事法の改正が昨年度からスタートしている。その内容は、(1)多様性に富んだ医療機器のリスクに応じた新クラス分類とその承認制度の見直し、(2)細胞組織医療機器が含まれる生物由来製品の感染リスクに応じた安全対策の充実、(3)市販後安全対策の抜本的見直しが一歩進められている。また、第三者認証制度の導入において必要な規格・基準の整備も行われている。本稿では、細胞組織医療機器や新たな制度である生物由来製品の薬事法の改正内容について記載した。

土 屋 利 江

1. 細胞組織医療機器等の薬事法改正について

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等の品質及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、別添1「細胞組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」と別添2「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」の2つの文書が示された。

別添1の基本的考え方は、ヒトや動物の細胞・組織から構成される医薬品および医療機器(平成17年度から医療用具は、医療機器に名称変更される予定)について、品質および安全性の確保ならびに細胞・組織の取扱いに関する科学的および倫理的妥当性を確保するための方策をまとめている。

別添2の指針は、「基本的考え方」に基づき、ヒトの細胞・組織に培養処理等の加工を施して製造される医薬品および医療機器について、品質および安全性の確保のために必要な基本的技術要件を定めており、治験前に厚生労働省に提出する品質および安全性の確認申請時に、必要な添付資料の内容を示している。

平成13年3月28日付けで「薬事法施行規則の一部を改正する省令等の施工について(細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する取扱いについて)」(医

薬発第266号)省令および告示が公布され、平成13年4月1日より施行されている。

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。

2. 細胞組織医療機器等の適用範囲

ヒトまたは動物の細胞または組織より構成される医療機器および医薬品であり、動物由来の組織を利用して承認を取得している生体弁や心のう膜も含んでいる。

3. 改正概要

承認申請書の記載方法の変更(詳細は、最新の薬事法で確認のこと)や、GMP*関係省令についても一部改正された。その概要は、細胞組織医療機器などを製造または輸入するにあたり、細胞もしくは組織由来または製造工程中の感染症などの伝播による危険性を排除し、不適切な製造や取扱いによる品質および安全性上の問題の発生を防止するために、製造管理と品質管理に必要な要求事項を定めた。

具体的には、

- (1) 細胞組織医療機器等の製造所の構造設備の基準への適合、原料の受入れ、加工処理、製品の保管等を行う区域について、他区域からの区分、必要な構造及び設備の要求。

* GMP: 製造許可の要件として製造所の構造設備から製造工程全般にわたる製造管理及び品質管理について製造業者が遵守すべき基準

TSUCHIYA, Toshie 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部 (158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)・薬品部長、農学博士、1971年九州大学薬学部卒業。専門は生化学、薬物代謝、腸内細菌学、発生学、安全性評価、医療材料・医療機器の生体適合性、細胞組織医療機器の安全性・有効性など。

Reform of Biological Products Regulation and Guidelines
for Manufacturing Tissue Engineered Medical Products

- (2) 加工処理の「加工」とは疾病の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞または組織の人為的増殖、細胞または組織の活性化を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、遺伝子工学的改変、非細胞または非組織成分とのハイブリッド化、カプセル化等を施すこと。
- (3) 細胞組織医療機器等は、生物学的製剤等と同様に原料として使用する人、動物、植物または微生物から得られたものに係る事項や使用動物の規格に関する事項について、製品標準書を作成。
- (4) 細胞組織医療機器等の製造、保管及び出納ならびに衛生管理に関する記録については、遅発性感染症の危険性を否定し得ないことから、安全性の確保上必要な情報を得るために、少なくとも所定の期間記録を保存することとなっている。即ち、特定生物由来製品の場合、医療機関での患者使用記録の保管期間は20年間とし、製造業者等での提供者・製造記録の保管期間は30年間と規定。生物由来製品では、製造業者等での提供者・製造記録の保管が求められ、人血液成分以外の成分に関する記録は、10年間、人血液成分を含む場合の人血液成分に関する記録は、30年間保管となっている。(生物由来製品の特性に応じて保管期間は異なる。最新版の業務公報に目を通し、現時点での正確な情報を入手し、確認すること。)
- (5) 細胞又は組織の取り違いや細菌、真菌、ウイルス等の伝播の危険性を避けるために、製造工程において複数のドナーからの細胞又は、組織を同一室内で同時期に取扱ったり、交叉汚染を引き起こすような保管方法をとらないこと。更に、ドナー又はドナー動物ごとに細胞や組織、中間製品及び製品を管理する必要がある。
- (6) 原料となる細胞又は組織について、後述した内容において、適格なものであることを確認し、その結果に関する記録を作成すること。
- (i) 当該細胞又は組織を採取した施設
- (ii) 当該細胞又は組織を採取した年月日
- (iii) 当該細胞又は組織が人に係るものである場合には、ドナースクリーニング（ドナーについて、問診、検査等による診断を行い、細胞組織医薬品の原料となる細胞又は組織を提供する適格性を有するかどうかを判定することをいう）のためのドナーの問診、検査等による診断の状況。
- (iv) 当該細胞又は組織が動物に係るものである場合には、ドナー動物の受入の状況並びにドナースクリーニング（ドナー動物について、試験検査及び飼育管理を行い、細胞組織医薬品の原料となる細胞又は組織を提供する適格性を有するかどうかを判定することをいう）のためのドナー動物の試験検査及び飼育管理の状況
- (v) 当該細胞又は組織を採取する作業の経過（採取する

作業経過に関する記録と採取作業において微生物等に汚染されていない旨が確認できるものであること。

- (vi) (i) から (v) までに掲げるもののほか、細胞組織医療機器等の品質の確保に関し必要な事項（製造に使用する試薬に関する試験検査結果を指す）。
- (7) 「施設」は組織を採取した医療施設もしくは動物の細胞又は組織を採取した施設を指す。
- (8) 「適格性を有する」とは、「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」の

以下のいずれにも該当し、原料となる条件を満たしているもの。

細胞組織医療機器について、薬事第42条の規定に基づき、品質及び安全性確保の観点から、原料又は材料となる細胞又は組織に関する基準を定めている（平成13年3月厚生労働省告示第101号関係）。この基準を満たさない細胞又は組織は、品質及び安全性についての情報が十分でないことから、製造業者は、これら細胞又は組織を原料又は材料として医薬品又は医療機器として製造すべきでない。

「基準の概要」

医薬品又は医療機器の原料又は材料となる細胞又は組織については、

必要な衛生管理と人員を持つ施設で採取されていること。
ドナースクリーニングが適切に行われていることが確認できること。
採取作業が適切に行われていることが確認できること。
必要な記録を確認できること。

が必要である。

ドナースクリーニングの項目等具体的な内容については、個別の製品ごとに異なることから、具体的事項については承認申請書に記録する。

4. 生物由来製品に関する制度の概要

(1) 生物由来製品に関する制度の創設について

人又は動物の細胞、組織等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等について、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

(a) 生物由来製品及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。

平成 15 年厚生労働省告示 209 号「厚生労働大臣が指定する生物由来製品及び特定生物由来製品を定める件」

(b) 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等の原材料について、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。

平成 15 年度厚生労働大臣告示 210 号「生物由来原料基準を定める件」及び平成 15 年 5 月 20 日医薬発第 0520001 号「生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について」

(c) 血液製剤等の使用記録等の保管期間（前述した。）

(d) 表示

特定生物由来製品、生物由来製品それぞれの容器・包装に識別表示を行う。血液成分を含む特定生物由来製品については、採血国、献血、非献血の別を記載。

(e) 添付文書記載要領

平成 15 年 5 月 15 日付け医薬発第 0515005 号医薬局長通知「生物由来製品の添付文書に記載すべき事項について」及び平成 15 年 5 月 20 日付け医薬安発第 0520004 号医薬局安全対策課長通知「生物由来製品の添付文書の記載要領」において、生物由来製品に係る添付文書の具体的な記載要領等を定めている。

(e) 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、生物由来製品に係る感染症定期報告の具体的な報告方法等について記載している。

(f) 使用対象者への説明並びに記録及び保存

医療関係者にたいし、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。また、特定生物由来製品の選及調査等を可能とするために、使用の対象者の氏名等の記録及びその保存を義務付けた。

製造業者に対しては、生物由来製品の選及調査等を可能とするため、販売等を行った生物由来製品に関する記録及びその保存を義務付けている。

(g) 製造業者等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等は、生物製品製造管理者を設置しなければならない。その承認の対象者は、以下のよう

(i) 医師、医学の学位を持つ者

(ii) 歯科医師であって細菌学を専攻した者

(iii) 細菌学を専攻し、修士課程を修めた者

(iv) 大学等で微生物学の講義及び実習を受講し、修得した後、3年以上の生物由来製品もしくはそれと同等の保険衛生上の注意を要する医薬品、医療用具等の製造等（治療薬として製造する場合も含む）に関する経験を有する者

5. 医療機関からの副作用等報告制度：医師・薬剤師等の医薬関係者から直接厚生労働省に報告される副作用・不具合又は感染症報告の報告事項を規定

平成 15 年 5 月 15 日付け医薬発第 0515014 号医薬局長通知「医療機関等からの医薬品または医療用具についての副作用、感染症及び不具合報告の法制化に伴う実施要領の制定について」により、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。

6. おわりに

紙面の都合上、すべての改正内容について記載はできない。薬務関連の公報最新版

厚生労働省ホームページ：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>

を読み、正確な情報を入手することが重要である。

2003 年 10 月 25 日医療機器フォーラム (<http://dmd.nihs.go.jp/iryokiki/>) 設立記念シンポジウムを開催し、「Tissue Engineering—開発と評価」に関する講演会を開いた。全国から多くの方々に参加された。医療機器フォーラムは、Tissue Engineering（平成 17 年度から細胞組織医療機器と名称される）を含む医療機器の健全な発展を図るために、医療機器の開発、製造および品質管理にかかわる問題について、産官学の情報交換の場をつくることを目的として設立した。医療機器フォーラムは、毎年 1 回は定期的で開催（10 月予定）する予定である。安全かつ優れた医療機器の開発支援に本フォーラムが有効に活用されることを願っている（医療機器フォーラムのホームページ：<http://dmd.nihs.go.jp/iryokiki/>）。

高分子学会は、生物由来の感染因子による汚染の可能性が少ない材料を合成できる研究者で構成されている。生分解性高分子を主たる細胞の足場とする細胞組織医療機器を進展させるためには、有効性、安全性の高い材料を開発していただくことが重要なポイントとなる。製品の上市化に有望な新規材料を開発された場合には、是非、医療機器フォーラムに参加・発表していただき、有効で安全な医療機器の開発を促進できれば、と願っている。

ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性を促進する 硫酸化ヒアルロン酸の効果

信州大学繊維学部 石黒 (長幡) 操・寺本 彰・阿部康次
国立医薬品食品衛生研究所療品部 中岡竜介・土屋利江

Enhancement action of sulfated hyaluronan on the ALPase activity of rat calvarial osteoblasts

Misao Nagahata-Ishiguro^{*1,2}, Ryusuke Nakaoka^{*2}, Toshie Tsuchiya^{*2},
Akira Teramoto^{*1} and Koji Abe^{*1}

^{*1} Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology,
Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan

^{*2} Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

Abstract : The purpose of this study was to clarify the effect of hyaluronan (Hya) and sulfated hyaluronan (SHya) on rat calvarial osteoblast (rOB) cells proliferation and differentiation *in vitro*. rOB cells were cultured in the presence of Hya with different molecular weights (0.2, 2, 30, 90, 120 × 10⁴) for 10 days. Hya did not affect the proliferation of rOB cells. However, SHya suppressed the proliferation of rOB cells. The alkaline phosphatase (ALPase) activity of rOB cells cultured with SHya for 10 days was significantly enhanced in comparison with control (in the absence of polysaccharides) and with Hya. Hya suppressed the ALPase activity of rOB cells. As a result, SHya can control rOB cells proliferation and differentiation. SHya suppressed the rOB cells proliferation in a few culture days and promoted the differentiation. It was suggested that these effects were based on the sulfate groups of SHya. Therefore, it is considered that SHya is useful for the biomedical material, which promotes the differentiation of rOB cells.

(Received 16 June, 2004; Accepted 20 December, 2004)

1. 緒言

硫酸化多糖であるヘパリン (Heparin; Hep) やヘパラン硫酸 (Heparan sulfate; HS) は heparin-binding growth factors (HBGFs) と複合体を形成し、組織が損傷を受けた場合、速やかに HBGFs を放出して、周辺の組織を活性化することが明らかとなっている [1-3]。HBGFs は、骨の修復にも重要な役割を果たしていることが知られ、骨芽細胞の増殖や分化の過程でオートクライン、パラクライン的に骨の形成や吸収を制御する [4-6]。病気やケガなどで骨組織が損傷した場合、修復するために人工骨や人工関節などの人工材料が用いられている。しかし、これらの人工材料は様々な問題があり、近年組織工学的手法を用いた骨再生が期待されている。この手法を用いて骨組織の再生に利用される細胞は、骨組織を形成する骨芽細胞で

ある。骨芽細胞は間葉系由来の細胞で、未分化な間葉系の細胞から骨原性細胞を経て次第に成熟した骨芽細胞へと分化する。骨が大きく欠損した場合、細胞が増殖、分化するための足場が失われるため、仮の足場が必要となる。しかし、足場が優れていても細胞の数が少ないと十分な組織の再生は望めない。そこで、生体材料と増殖因子の組み合わせによる組織再生の方法が、近年多く報告されている [7, 8]。しかし、これらの増殖因子はたんぱく質であり、生体内での寿命が短く、不安定であるため、増殖因子を保持する担体が必要である。グリコサミノグリカンの構成成分であるヒアルロン酸 (Hya) は、眼球、関節をはじめとする多くの結合組織に存在し、細胞外マトリックスの構成成分として、組織の創傷治癒や形態発生に重要な働きをしていることが報告されている [9-11]。近

年, Hya のレセプターとして CD44 が発見されて以来, Hya を介した生物学的機能の研究が盛んに行われている [12-14]. Pilloni らは, 骨芽細胞の前駆細胞である間葉系細胞を用いて, 分子量の異なる Hya の影響を検討しており [15], Hya は骨芽細胞の石灰化を促進すると報告している. しかし, 細胞の増殖性, 分化マーカーについての詳細な検討は行っていない. そこで本研究では, 骨再生用材料の開発を目的として, 生体適合性の高い多糖類を用いて骨組織の再生を試みた. 本研究では, ヒアルロン酸と硫酸化多糖の機能を併せ持つ高分子量の硫酸化多糖を作製し, ラット頭蓋冠由来骨芽細胞 [rat calvarial osteoblast (rOB cells)] の初期骨分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALPase) に対する影響について検討を行った.

2. 実験方法

2.1 材料

SHya は以前に報告した方法にて合成した [16]. 使用した硫酸化多糖の硫酸化度 (D.S.; 2 糖残基当たり硫酸基の量) を Table 1 に示した. HyaX (X は分子量を示す) の分子量は 0.2, 2, 30, 90, 120 $\times 10^4$ のものを使用した. Hya, SHya, コンドロイチン硫酸 typeC (Chs-C), Hep は 0.5 mg/l の濃度になるように培地に溶解し, 0.22 μm の孔径を有する

Table 1 Characteristics of polysaccharides

Polysaccharides	Number of sulfate groups per two saccharide rings	MW ($\times 10^4$)
Hya	0	0.2-120
1.2SHya	1.2	55
2.1SHya	2.1	20
3.4SHya	3.4	5
Chs-C	1	0.5
Hep	2.5	1

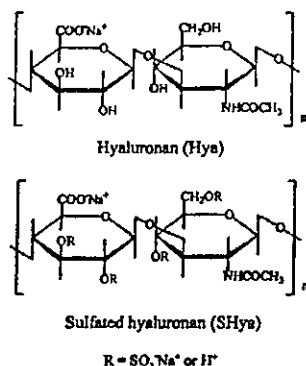


Fig.1 Structure of hyaluronan and sulfated hyaluronan

filter で滅菌をおこなった. Hya および SHya の構造式を Fig.1 に示した.

2.2 細胞培養

生後 48 時間以内のウィスター系ラット (Charles River) の頭蓋冠から, 酵素消化法により rOB cells を分離した [17]. その後, 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nissui-seiyaku) を用いて, 初代培養を行った. 3 日毎に培地を交換しながら通常の継代培養を行い, 継代数 4-6 の rOB cells を実験に使用した.

2.3 細胞増殖

多糖類と 10% FBS を含む DMEM を用いて調製した rOB cells (1×10^4 cells/well, 24 multiwell plate) を播種し, 5% CO_2 下, 37°C で培養した. 所定時間培養後の細胞数を, 下記のタンパク質濃度測定によって計測した. 上澄みを除去し, well を phosphate-buffered salines (PBS; pH7.6) で 3 回洗浄した. 0.04% nonidet P-40 (NP-40, Nacal tesque) を含む 1ml PBS を各 well に添加し, 37°C で 10 分間インキュベートした. 懸濁液を超音波破砕機を用いてホモジナイズした後, 1000rpm, 4°C, 5 分間遠心を行った. この上澄液を細胞溶液として, Bio-Rad protein assay (protein assay, Bio-Rad Lab.) 法により, 595nm の吸光度を EIA READER を使って総タンパク質濃度を測定した. 細胞数とタンパク質濃度の検量線を作成し, 検量線により総タンパク質濃度から細胞数を算出した. 検量線の作成法を以下に示す. 0, 1, 5, 10, 30 $\times 10^3$ cells/ml に調製した細胞懸濁液を各試験管に入れ, 1000rpm, 4°C, 5 分間遠心を行った. 上澄みを除去し, 0.04% NP-40 を含む 1ml PBS を各試験管に入れ, 総タンパク質濃度を求め, 細胞数と総タンパク質濃度の検量線を作成した.

2.4 Alkaline phosphatase (ALPase) 活性

ALPase 活性の測定は以下のようにして行った. 細胞増殖の測定時に得られた細胞溶解液 0.1ml と基質水溶液 0.4ml (16mM p-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate) を混合して, 30 分間, 37°C でインキュベートした. その後, 反応を停止するため, 混合液に 0.2N NaOH 水溶液を 0.5ml 添加し, 410nm の吸光度を EIA READER を用いて測定した. 総タンパク質濃度は Bio-Rad protein assay によって測定し, Albumin (Bovine Albumin Fraction V) の検量線から算出した.

全ての実験において, 実験数 $n=6$ として測定を行い, その平均値を求めた.

3. 結果

分子量の異なる Hya を添加した rOB cells の増殖曲線を, Fig.2 に示した. 培養 7 日目までは, Hya の分子量に関係なく rOB cells は増殖し, コンフルエントに達した. しかし, 培養 10 日目になると, 高分子量の Hya を添加した rOB cells において, わずかに細胞数の増加が示され

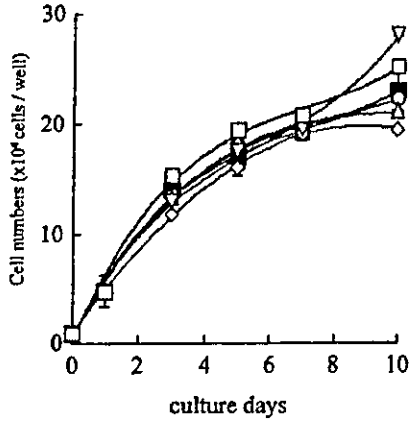


Fig.2 Effect of 0.5mg/ml hyaluronan on the proliferation of rOB cells

■ none ○ Hya0.2 △ Hya2 ◇ Hya30 ▽ Hya90 □ Hya120

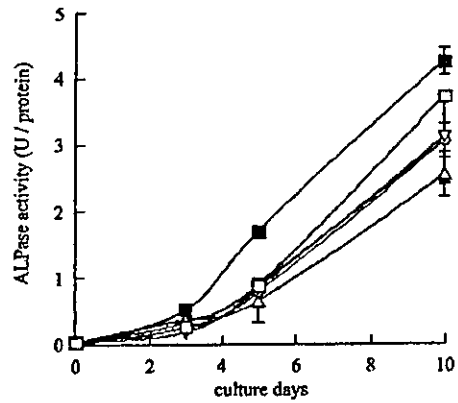


Fig.4 Effect of 0.5mg/ml hyaluronan on the ALPase activity of rOB cells

■ none ○ Hya0.2 △ Hya2 ◇ Hya30 ▽ Hya90 □ Hya120

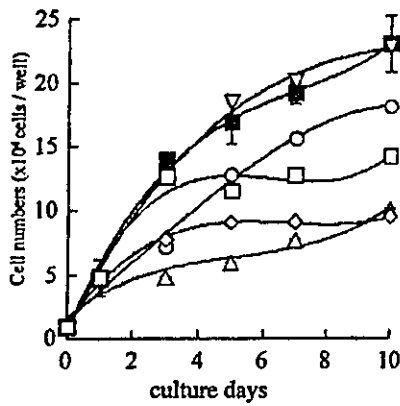


Fig.3 Effect of 0.5mg/ml sulfated polysaccharides on the proliferation of rOB cells

■ none ○ 1.2SHya △ 2.1SHya ◇ 3.4SHya ▽ Chs-C □ Hep

Fig. 3に、硫酸化度の異なるSHyaを添加したrOB cellsの増殖曲線を示した。Hyaを添加した場合と異なり、SHyaを添加したrOB cellsは、培養3日目から非添加系に比べて増殖が抑制された。さらに、SHyaの硫酸基の導入率が高くなるほど、rOB cellsの増殖は抑制された。これに対し、同じ硫酸基を有する多糖類であってもChs-Cではほとんど影響は見られず、Hepでも抑制効果は小さかった。

Fig. 4に、Hyaを添加したrOB cellsのアルカリフォスファターゼ(ALPase)活性の経時変化を示した。Hyaは分子量に関係無く、骨芽細胞の初期分化マーカーであるALPaseの活性は非添加系に比べて低い値を示した。Fig. 5に、硫酸化度の異なるSHyaを添加したrOB cellsのALPase活性を示した。Hyaとは異なり、SHyaを添加したrOB cellsのALPase活性は非添加系に比べて上昇が認められた。特に、高硫酸化度になるほど、ALPase活性の

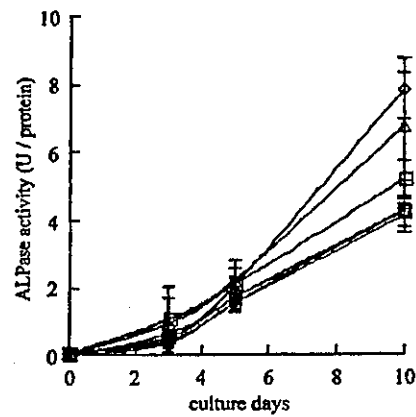


Fig.5 Effect of 0.5mg/ml sulfated polysaccharides on the ALPase activity of rOB cells

■ none ○ 1.2SHya △ 2.1SHya ◇ 3.4SHya ▽ Chs-C □ Hep

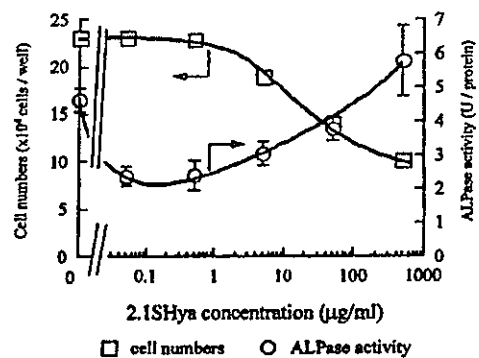


Fig.6 Dose-dependence of 2.1SHya on the proliferation and ALPase activity of rOB cells after 10days

上昇率は高かった。そこで、rOB cells の増殖と ALPase 活性に対する 2.1SHya の添加濃度の影響を検討した (Fig. 6)。高濃度の SHya は rOB cells の増殖を抑制し、ALPase 活性を促進させたのに対し、低濃度の SHya は増殖を促進し、ALPase 活性を抑制させることが認められた。

4. 考察

本実験で我々は、分子量の異なる Hya を骨芽細胞に添加し、骨芽細胞の増殖と ALPase 活性について検討を行った。分子量 2000 から 120 万の Hya を rOB cells に添加したところ非添加系とほとんど変わりなく増殖し、Hya 添加やその分子量の違いによる影響は見られなかった (Fig. 2)。しかし、ALPase の活性は分子量に関係なく非添加系に比べてすべて低いため (Fig. 4)、Hya は rOB cells の分化を抑制することが示唆された。Hep, HS は細胞外あるいは細胞表面に広く存在し、多くの種類のタンパク質と特異的な相互作用を示すことが知られている [18]。特に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、細胞と ECM の相互作用や細胞同士の相互作用を介して、接着、凝集、シグナル伝達などに関与している。このように、多岐にわたる HSPG の機能の中で、増殖因子との相互作用については多くの報告があり、注目されている [1-3]。FGF, transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic protein (BMP) などの細胞増殖因子は、Hep や HS などの硫酸化多糖と相互作用し、細胞の増殖を制御することが報告されている [1, 4]。Hep, HS, Chs の分子量は、Hya に比べて非常に小さい。そこで本研究では、高分子量である SHya の骨再生用材料への応用を目的として、SHya 単独での rOB cells に対する影響を検討した。SHya の硫酸化度が高くなるにつれ、細胞の増殖は抑制され、Hep もある程度の抑制効果を示した (Fig. 3)。ALPase 活性に対しては、硫酸化度が高くなるにつれて活性が上昇した (Fig. 5)。これより、硫酸化多糖は細胞の増殖を抑制し、分化を促進させることが示された。次に、影響が最も大きく現れた 2.1SHya を用いて、濃度依存性について検討を行った。Fig. 6 より、2.1SHya は低濃度では細胞の増殖を促進し、高濃度になるにつれ増殖を抑制した。これに対して ALPase 活性は低濃度では活性が低く、高濃度になるにつれ上昇した。これより、2.1SHya は濃度を変化させることで、rOB cells の機能を制御することが可能であることが示された。Hep, HS と増殖因子との協同的な作用の細胞の増殖に対する影響も、濃度によって大きく異なることが報告されている。Blanquaert らは、Hep 及び硫酸化多糖の RGTA (Heparin-like polymers derived from dextran) と増殖因子との協同作用による、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 MC3T3-E1 への影響を報告している [1]。RGTA は増殖因子と共に用いることで、増殖に対しては抑制的に働き、ALPase の活性が上昇することを明らかにした。

この作用は RGTA のみでも影響が現れるが、増殖因子が存在することにより、さらに顕著に影響が現れた。今回、我々は SHya 単独の影響を検討したが、彼らの結果と一致する結果が得られた。以上の結果から、Hya に硫酸基を導入することにより、SHya は骨芽細胞の増殖や分化機能を制御することが可能であると示された。

5. 結論

rOB cells に Hya を添加すると、rOB cells の増殖は促進され、分化は抑制された。しかし、SHya を添加すると、rOB cells の増殖は抑制され、分化の促進が示された。SHya の効果は SHya の硫酸化度、濃度に大きく依存した。従って、SHya は骨芽細胞の機能を制御することが明かとなった。骨形成促進作用を持っている BMP, FGF2, TGF- β などの増殖因子を臨床応用に用いる場合、これらの増殖因子に適した担体の開発が必要である。SHya は分子量が高く、粘性があるため、増殖因子を保持する能力は Hep, HS などの他の硫酸化多糖に比べて高いことが考えられる。今後、SHya と増殖因子との相互作用について検討を行うことにより、SHya の分化促進作用の機序を明らかにできると同時に、SHya の骨再生用材料への応用が期待される。

6. 謝辞

本研究の一部は、21 世紀 COE プログラム、科学研究費補助金基盤研究(B)(14950495)、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究、医薬品・医療機器等レギュラトリサイエンス総合研究事業)の助成金により行われた。

文献

1. F. Blanquaert, D. Barritault and J. P. Caruelle, J. Biomed. Mater. Res., **44**, 63 (1999)
2. E. Ruoslahti and D. Yamaguchi, Cell, **64**, 867 (1991)
3. O. Saksela, D. Moscatelli, A. Sommer and D.B. Rifkin, J. Cell Biol., **107**, 743 (1988)
4. D. J. Baylink, R. D. Finkelman and S. E. Mohan, J. Bone Miner. Res., **8**, S565 (1993)
5. W. T. Bourque, M. Gross and B. K. Hall, Int. J. Dev. Biol., **37**, 573 (1993)
6. M. E. Joyce, S. Jingushi, S. P. Scully and M. E. Bolander, Preg. Clin. Biol. Res., **365**, 391 (1991)
7. H. Ueda, L. Hong, M. Yamamoto, K. Shigeno, M. Inoue, T. Toba, M. Yoshitani, T. Nakamura, Y. Tabata and Y. Shimizu, Biomaterials, **23**, 1003