

図1 国内ガイドライン手法で評価した生体吸収性高分子止血剤の細胞毒性。細胞にはChinese Hamster由来の繊維芽細胞を用いた結果を示す。(文献5より改変)

するために行った事例である³⁾。細胞コロニーの染色像から明らかなように、100%抽出液では細胞のコロニーがほとんど認められないが、抽出液の希釈に従いコロニー数が増加した。陰性対照に対する試料の細胞コロニー形成率と試験に使用した抽出液濃度をそれぞれ縦軸および横軸にとってグラフ化した結果、例で示した試料の細胞増殖50%阻害濃度(IC50)が抽出液濃度80%程度であることが明らかとなった。その他の検体から調製した24時間抽出液のIC50を同様に評価した結果、各検体のIC50はそれぞれ72.5%、31.5%、26.5%、14.5%であった。これらの結果から、少なくとも最も低いIC50を示した検体での不具合には、その細胞毒性が関与していることが推察された。また、材料の細胞毒性は、材料と生体との接触により生じる組織反応と相関することが報告されていることから^{4),5)}、材料の安全性評価において細胞毒性試験は非常に重要な位置を占める。

げっ歯類を用いた研究で、体内に長期間埋植された異物の周囲域には炎症反応に加えて腫瘍形成が観察されることが報告されている^{6),7)}。この腫瘍形成は作用機序に従って化学発がんとも異物発がんとも大別できる。化学発がんでは、一般的に埋植材料から溶出する化学物質の遺伝毒性によりDNAに変異が生じ、その結果として腫瘍形成が起こる。化学発がんを引き起こす化学物質は、すでにその危険性に応じてIARC(International Agency for Research on Cancer)により分類されている⁸⁾。遺伝毒性と動物や人体における発がんとの相関性については数多く研究されており⁹⁾、人体に対する発がん物質は高い頻度で遺伝毒性を示すことも報告されている¹⁰⁾。

一方、遺伝毒性試験で陰性を示すにもかかわらず、げっ歯類への埋植実験において腫瘍形成が観察される高分子材料も存在する。このように、遺伝毒性との関連性が見られない材料によって誘導される腫瘍形成現象は異物発がんと呼ばれ、埋植材料による摩擦や力学

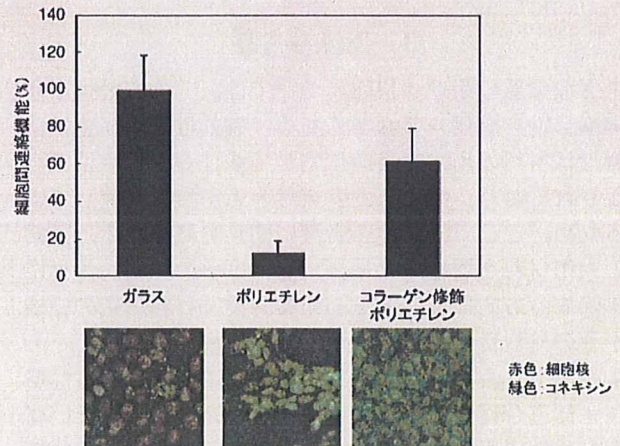


図2 培養用ガラス、ポリエチレン、コラーゲン修飾ポリエチレンの上で培養した繊維芽細胞の細胞間連絡機能変化を示す(平均値±標準誤差)。免疫染色でチャンネルを形成するタンパク質コネクシンの細胞内分布状態を確認すると(下)、コラーゲン修飾でその局在回復が見られた。(文献13より改変)

的負荷などの生体に対する物理的刺激がその腫瘍形成の原因と考えられている。異物発がんには、材料の大きさ、固さ、形状などが大きく影響することが知られている¹¹⁾。たとえば、フィルム状ポリウレタンはラット皮下埋植実験で腫瘍を形成するが、その腫瘍形成率は同材料をスポンジ状に成形することで低下することが明らかとなっている¹²⁾。また、ポリエチレンはラット埋植後の腫瘍形成が報告されているが、その腫瘍形成がポリエチレン表面へのコラーゲン修飾により抑制されることが報告されている¹³⁾。このように、物理的あるいは物理化学的刺激が異物発がんを誘導する材料の場合には、遺伝毒性以外の視点から安全性を考察する必要がある。筆者らは、材料と接触した細胞では、その材料の特性に応じて細胞の恒常性を司る機能に変化が生じることを見いだした。そこで、腫瘍形成が見られたポリエチレンおよびその形成を抑制したコラーゲン修飾ポリエチレン上で細胞を培養し、細胞の恒常性維持において重要な役割を果たしている細胞間連絡機能と同機能を担っているコネクシンタンパク質の発現変化を検討した¹⁴⁾。その結果、ポリエチレン上で培養した細胞では細胞間連絡機能が顕著に阻害されること、また、その機能阻害がコラーゲン修飾により回復することが明らかとなり、材料の異物発がん性と細胞間連絡機能とが相関することが示唆された(図2)。コラーゲン修飾により、ポリエチレン上の細胞は通常の状態と同様の形態で接着していたため、本実験で観察された細胞間連絡機能の回復は細胞の形態変化と関連する可能性もある。しかしながら、がん細胞の多くで細胞間連絡機能やコネクシン発現が阻害されていることから¹⁵⁾、材料上での細胞間連絡機能変化は材料の安全性を評価する指標として利用できる可能性があり、新しい試験法として今後の展開が期待される。

3. 生体適合性

医療機器に用いる材料については、その有効性や生体適合性を評価する必要もある。有効性および生体適合性は材料の用途や目的に応じて多種多様な手法で評価されており、前述した安全性とも密接に関連しているため、ここでは生体適合性に関して概説する。通常の人工材料を埋植した場合、生体はその材料を体外に排除する方向に反応する。その結果、材料周辺の組織やその材料自体に期待された機能が損なわれる。そのような不具合を回避するために材料に要求される性質が生体適合性である。生体適合性が充足していない材料を生体に用いた場合、短期間使用の場合には薬物の併用などで不具合を回避することができるが、長期的使用では何らかの不具合を生じることになり、結果として適用患者の治療に問題が生じる。前者の例としては、人工腎臓などのように血液や生体組織に比較的短時間接触するものが挙げられる。この場合は、接触による血栓形成を避けるために抗凝固剤を併用することで、適合性を充足していない材料であっても特定の条件のもと医療に使用されている。後者の例としては、人工関節に用いられている超高分子量ポリエチレンが挙げられる。このポリエチレンは力学的特性に優れ、生体に対して不具合の原因となる生体反応を引き起こし難いが、長期使用後には人工関節のステム挿入部にゆるみが生じて再置換手術が必要となることが多い。この不具合は、長期使用で生じたポリエチレンの摩耗粉が免疫細胞を活性化して起こる骨吸収が原因であることが報告されている¹⁶⁾。また、筆者らは微粒子状物質が接触した細胞の機能に影響を与えることを明らかにしており¹⁷⁾、長期間使用した人工関節に生じるゆるみは接触した細胞の機能変化にも起因することが示唆されている。

これらの不具合原因は毒性ではなく、材料との接触により細胞や周囲組織が引き起こす生体反応である。すなわち、材料の表面特性やバルク特性、材料・細胞間の相互作用を詳細に解析することにより、実際に材料を生体に適用した際に生じ得る問題点を解明し、今後の材料開発および改質に繋げることが可能となる。材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体タンパク質や血球の吸着が起こる。細胞は材料表面上の吸着タンパク質を介して材料に接着することで、最終的な生体反応を誘導する。したがって、材料界面におけるタンパク質、あるいは細胞との相互作用に関する研究が材料の生体適合性解明のためには重要となる。材料表面における初期の細胞接着は、材料の表面自由エネルギーに左右されることが報告されている¹⁸⁾。また、分子生物学の進歩にともない、材料と相互作用した細胞に生じる変化を遺伝子レベルで容易に解析できるようになったため、表面自由エネルギーの異なる材料表面上で培養

した細胞内の遺伝子発現変化を解析し、表面自由エネルギーと遺伝子発現パターンとの関連を検討した研究も報告されている^{19),20)}。これらの研究から、材料の物理化学的特性が相互作用した細胞の応答性に影響を及ぼすことが示唆されている。しかしながら、材料上の細胞挙動を支配する因子は多岐にわたるとともに複雑に関連しているため、実際の材料・細胞間相互作用を単純化することは難しい。たとえば、材料上に吸着したタンパク質により、材料表面特性は元々の化学構造から予想されるものと大きく異なってしまふ。また、タンパク質吸着は動的な反応で、厳密な意味では時間経過とともに吸着タンパク質の種類や比率が変化する。場合によっては、吸着にともない、タンパク質の三次元構造変化が生じ、細胞や組織が正常にそのタンパク質を認識できなくなることも考えられる。現在、材料表面特性と生体適合性に関する研究のほか、材料上における吸着タンパク質の構造変化、生体適合性改質を目的としたタンパク質、ペプチドあるいは糖鎖などの機能分子を修飾した材料と生体との相互作用解析が行われている。今後、これらの研究から得られる材料・細胞間相互作用に関する新しい知見を材料の評価に応用することが期待される。

4. 安全性評価ガイドライン

医療機器は、医薬品、医薬部外品、化粧品とともに薬事法によって規制されている。薬事法は、規制対象であるそれらの品質、有効性、安全性を確保し保健衛生の向上を図ることを目的とする法律である。その薬事法で、医療機器とは1) 人若しくは動物の疾病の診断、治療または予防に使用されるもので、2) 人若しくは動物の身体の構造若しくは機能に影響を及ぼすことが目的とされているものと定義されている。実際には、医療機器として扱われる製品は厚生労働省告示²¹⁾により指定されており、メス、鉗子、手術台のような簡易な機器から、人体に埋め込む人工心臓に至るまで多種多様である。表1に示すように、現在、医療機器は、使用目的、方法、体に与える影響に応じて、一般医療機器、管理医療機器、高度管理医療機器に大別されており、それぞれに応じた規制がなされている。一般に、人体に対するリスクが高くなるに従って、当該機器の安全性評価に必要な項目は増加する。

表2に示したように、医療機器およびその材料の生物学的安全性を評価するために必要な試験項目は、人体に対する接触部位とその期間に応じて規定されている。細胞毒性試験、感作性試験は人体と接触するすべての機器に要求される。感作性試験は、材料や最終製品の接触感作性を評価する試験であり、製品から溶出する化学物質に由来する遅延型アレルギーのリスクを検討することを目的としている。その他の試験は、当該医療機器の人体接触部位と接触期間とに応じて行うことが求められており、いずれも医療機器の安全性を判断するため

表1 日本国内における医療機器分類と国際分類との比較

	国内品目数	定義	リスク	機器例	国際分類	
					クラス	
一般医療機器	1195品目	副作用又は機能の障害が生じた場合においても、人の生命及び健康に影響を与える恐れがほとんどないもの	極めて低い	・X線フィルム ・水銀体温計 ・打診器 ・握力計 ・汎用手術台	I	不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが極めて低いと考えられるもの
管理医療機器	1786品目	副作用又は機能の障害が生じた場合において、人の生命及び健康に影響を与える恐れがあるもの	低い	・診断用X線装置 ・MR装置 ・電子体温計 ・心電計	II	不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが比較的低いと考えられるもの
高度管理医療機器	1069品目	副作用又は機能の障害が生じた場合において、人の生命及び健康に重大な影響を与える恐れがあるもの	中・高	・中心静脈用カテーテル ・縫合糸 ・吸収性創傷被覆・保護材 ・機械式人工心臓弁 ・ペースメーカー ・人工股関節	III	不具合が生じた場合、人体へのリスクが比較的高いと考慮されるもの
					IV	患者への侵襲性が高く、不具合が生じた場合、生命の危険に直結する恐れがあるもの

(平成21年1月現在、業事法及び文献21を参考に作成)

表2 医療機器安全性評価のためのガイドライン (○: 検討すべき試験)

医療機器の分類	接触期間	生物学的試験 (第一次評価)		生物学的評価 (補足的評価)		
		細胞毒性 感作性	刺激性 / 皮内反応 急性全身毒性 亜急性毒性 遺伝毒性 血液適合性	慢性毒性 発がん性	生分解性 発がん性	
接触部位	A: 一時的接触 (24時間以内) B: 短・中期的接触 (1~30日) C: 長期的接触 (30日を超えるもの)					
非接触機器						
表面接触機器	皮膚	A	○ ○ ○			
		B	○ ○ ○			
		C	○ ○ ○			
	粘膜	A	○ ○ ○			
		B	○ ○ ○			
		C	○ ○ ○ ○ ○			
損傷表面	A	○ ○ ○ ○				
	B	○ ○ ○ ○				
	C	○ ○ ○ ○ ○ ○				
体内と体外を連結する機器	血液流路間接的	A	○ ○ ○ ○ ○		○	
		B	○ ○ ○ ○ ○		○	
		C	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○ ○	
	組織/骨/歯質	A	○ ○ ○ ○			
		B	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○			
		C	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○ ○	
		循環血液	A	○ ○ ○ ○ ○		○
			B	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○
			C	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○ ○
体内埋込み機器	組織/骨	A	○ ○ ○ ○			
		B	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○			
		C	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○ ○	
	血液	A	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○			
		B	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○			
		C	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		○ ○	

評価プログラムを作成するための枠組みであり、チェックリストではない

(JIS T 0993-1:2005「医療機器の生物学的評価-第1部: 評価及び試験」表1、2を引用 ((財)日本規格協会発行))

に重要である。各試験法の詳細については、国内ガイドラインとその参考資料^{1),2)}を参照していただきたい。

5. 終わりに

現在、国内外を問わず新規性の高い医療機器の開発や改良に関する研究が活発に行われているが、当該機

器の早期承認や輸出入における貿易障壁を排除するため、医療機器およびその材料の安全性評価手法を可能な限り標準化する必要がある。表2に示した各種生物学的試験法については、国際標準化機構 (ISO) /技術委員会 (TC) 194において、安全性評価に関する考え方やアプローチ等の国際標準化を目指した作業が行われている。上述した医療機器の生物学的安全性に関する国内ガイドラインの内容は、TC194で作成された国際標準化文書 (ISO 10993シリーズ) の規定と整合性が保たれている。医療機器に関する国際調和作業は、ほかのISO/TC, GHTF (Global Harmonization Task Force) やHBD (Harmonization by Doing) においても進行している。

前述したように、医用材料の生物学的安全性は溶出する化学物質の毒性に大きな影響を受けることから、生体への適用を前提とした高分子材料を開発する場合には、可能な限り無毒性の原材料や添加剤を使用することが望ましいことは明らかである。医療機器に要求される特性を充足するために生体活性物質を使用する必要がある場合には、同物質の除去、最終製品からの溶出量と毒性強度からのリスク解析、架橋処理などによる活性物質の不活化や不溶出化などの対策を行い、医療機器に由来する毒性の発現を避ける必要がある。その上で、当該医療機器を使用することによって患者が被るリスクと患者が得られるベネフィットとのバランスから、医療機器の有用性を判断することになる。したがって、医療機器から生じるリスクを回避、低減させることには大きな意義がある。今後の医療機器開発発展のためにも、医療用高分子材料の開発にあたっては、国内ガイドラインを参照して、必ず安全性を視野に入れた上で研究を進めていただきたい。

文 献

- 1) 平成15年2月13日医薬審発第0213001号審査管理課長通知
- 2) 平成15年3月19日事務連絡医療機器審査No.36
- 3) *J. Artif. Organs*, 11, 204 (2008)
- 4) *J. Biomater. Appl.*, 9, 138 (1994)
- 5) *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 75, 115 (2005)
- 6) *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 631 (1992)
- 7) *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 17 (1994)
- 8) IARC Monographs Database on Carcinogenic Risks to Humans (<http://monographs.iarc.fr/>)
- 9) *Mutat. Res.*, 488, 151 (2001)
- 10) *Mutat. Res.*, 389, 3 (1997)
- 11) *Surgical Implants and Other Foreign Bodies*, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 74 (1999)
- 12) *J. Long-Term Effects Med. Implants*, 5, 263 (1995)
- 13) *Biomaterials*, 14, 546 (1993)
- 14) *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 567 (2001)
- 15) *Biochim. Biophys. Acta*, 1719, 125 (2005)
- 16) *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 81 (1994)
- 17) *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 279 (2001)
- 18) *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 783 (1994)
- 19) *Biomaterials*, 17, 1301 (1996)
- 20) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 18, 609 (2007)
- 21) 平成16年7月20日厚生労働省告示298号 (平成20年7月11日厚生労働省告示381号 一部改正)

医療機器の製造販売承認について

土屋 利江* 国立医薬品食品衛生研究所 名誉所員
Toshie TSUCHIYA

Abstract

医療機器の薬事法の大幅な改正が平成 17 年度行われた。それから数年経過しているが、平成 17 年度の改正内容が、基本となっている。まず、医療用具、医用材料と従来分類された製品は、すべて、医療機器という名称に変更された。たとえば、コラーゲンからなる創傷被覆材として使用される製品は、現行の薬事法では、医療機器として分類される。

平成 17 年度、薬事法改正のおもな内容は、(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等が行われた。

また、承認制度は、大きく改正された。薬事法改正前は、FDA と同様で、政府系機関による大臣承認により、医療機器の承認が行われていた。しかし、薬事法改正後は、リスクが低いクラス 2 の医療機器について、欧州の制度と類似の第三者機関による認証制度が、新たに導入された。第三者認証機関は、当初、約 10 機関程度が認定されている。各認証機関は、クラス 2 に分類される医療機器すべてを認証するものではなく、各認証機関毎に、認証可能な医療機器が、一定のルールに基づき決められている。

また、これらの認証機関が扱うことができる医療機器としては、クラス 2 に分類され、かつ、各医療機器の認証に必要な規格・基準等が作成されていることが必須である。それらの文書作りは、厚生労働省と医薬品医療機器総合機構 (PMDA) で、活発に進められている。

1 医療機器の特性に応じた安全対策の見直し

医療機器は、メス、ピンセットから、画像診断装置、ペースメーカーに至るまで、その種類により、リスクが大きく異なる。したがって、薬事法上の安全対策について、見直しを図る必要があった。

医療機器は、疾病の治療等に用いられるものであり、医薬品と同様、保険衛生上の観点からの対策が必要である。また、医療機器は、技術・素材・使用形態・リスクにおいて、医薬品以上の多様性を有すること等を考慮し、見直しが行われた。

また、製品開発のために必要な臨床試験等を行うためのルール、例えば、GLP、GCP、治験等が、改正された。

さらに、医療機器特有の対策として、リスクに応じた医療機器のクラス分類、および、低リスクの医療機器にかかる第三者認証制度を取り入れている。

2 医療機器の分類

Global Harmonization Task Force (GHTF) で議論されているクラス分類ルールに従って、医療機器を分類する。一般的名称は、ISO TC210 で、議論されている Global Medical Device Nomenclature (GMDN) に定められる名称に準拠している。

医療機器の分類は、GHTF において、クラス I から IV の 4 つのクラスに分類されており、我が国では、クラス I を一般医療機器、クラス II を管理医療機器、クラス III および IV を高度管理医療機器として、指定する。

以下に、クラス分類および医療機器の分類について、厚生労働省の公開資料に基づいて、記載した。

クラス I : 不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが極めて低いと考えられるもの

クラス II : 不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが比較的低いと考えられるもの

クラス III : 不具合が生じた場合、人体へのリスクが比較的高いと考えられるもの

*〒 158-0094 世田谷区玉川 3-29-21
E-mail/tsutoshi2005@yahoo.co.jp

◎特集

クラスⅣ：患者への侵襲性が高く、不具合が生じた場合、生命の危険に直結する恐れがあるもの

一般医療機器：高度管理医療機器および管理医療機器以外の医療機器であって、副作用又は機能の障害が生じた場合においても、人の生命及び健康に影響を与えるおそれがほとんどないものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するもの

管理医療機器：高度管理医療機器以外の医療機器であって、副作用又は、機能の障害が生じた場合において人の生命及び健康に影響を与えるおそれがあることから、その適切な管理が必要なものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するもの

高度管理医療機器：医療機器であって、副作用又は機能の障害が生じた場合（適正な使用目的に従い適正に使用された場合に限る。）において人の生命及び健康に重大な影響を与えるおそれがあることから、その適切な管理が必要なものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するもの

特定保守管理医療機器

一般管理医療機器、管理医療機器、高度管理医療機器のうち、保守点検、修理その他の管理に専門的な知識および技術を必要とすることから、その適正な管理を行わなければ、疾病の診断、治療又は予防に重大な影響を与えるおそれがあるものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定する。

設置管理医療機器

設置に当たって、組立てが必要な特定保守管理医療機器であって、保険衛生上の危害の発生を防止するために当該組立に係る管理が必要なものとして厚生労働大臣が指定する。

2.1 医療機器の製造販売承認・認証・販売業について

医療機器の分類は、国際分類を踏まえて分類され、最終的にどこに分類されるかは、薬事・食品衛生審

議会の意見を聴いて、厚生労働大臣が定めることとなっている。

一般管理医療機器：製造販売承認は不要、販売業は届出不要

管理医療機器：登録機関による認証（厚生労働大臣が基準を定めて指定する管理医療機器に限る。）、販売業は届出制

高度管理医療機器：製造販売に係る大臣承認、販売業は、許可制

特定保守管理医療機器：一般管理医療機器、管理医療機器に分類されるものであっても、販売業は、許可制とする。

医療機器には、賃貸業があるが、薬事法上の規制は、販売業と同様となっている。

2.2 医療機器のクラス分類ルール

例をあげる。これらは、ルールの一部を示したものである。

クラスⅢ/Ⅳ

1. 分離して使用すれば、医薬品と考えられる物質を不可欠な成分として含有し、その物質が機器の働きを補助する目的で人体に作用を及ぼす場合
2. 活性または不活性を問わず、動物またはヒトの細胞/組織/その由来物から製造されまたはこれを含有する場合

例外：不活化した動物組織もしくはその由来物から製造または含有し、正常な皮膚のみに接触する場合（クラスⅠ）

クラスⅡ

1. 特に医療機器を消毒または滅菌するために使用するように意図したすべての機器（消毒剤を除く）

3 医療機器の承認書記載整備の基本的考え方

旧法では、製造（輸入）承認であったが、改正法では、従来の製造のみでなく、製造から販売までを責任をもつことが重要であることから、改正法では、製造販売承認とした。

製造販売承認にともなう承認書の記載方法の改正も行われた。以下の項目について記載することとなっている。

類別、名称、形状、構造及び原理、原材料または構成部品、使用目的、効能又は効果、品目仕様、操作方法又は使用方法、製造方法、品目・原材料の製造所、貯蔵方法及び有効期間

医療機器の名称の取扱いについて（承認記載整備）

(1) 一般的名称の取扱い

記載整備届け出において、製造販売業者自らが特定した一般的名称を記載する。記載整備届け出において、一般的名称への妥当性説明を行う。

(2) 販売名の取扱い

複数販売名を削除のみ行い1つの販売名とする場合、記載整備届け出により行う。複数販売名の分割のみを目的とする新規承認申請については、当該品目にかかる製造業の許可更新までに行う。

4 医療機器 GCP 省令の法制化

(1) 治験計画の30日前届出

治験計画の届出から30日を経過した後でなければ、治験の依頼をしてはならない。（治験計画に関する保険衛生上の危害の発生を防止するための必要な調査を行う。）

(2) 治験中の有害事象報告

不具合の発生等により治験を中止する等、試験機器の有効性、安全性に関する保健衛生上重要な知見を届け出る制度

(3) 治験の実施に関する基準（GCP）

法制化に伴い、各種要件等の追加、GCP 適合についての報告、聴取、立入検査を導入

(4) 治験依頼者の守秘義務

治験依頼者は、治験に関し、その職務上知り得た人の秘密を漏らしてはならない。

治験を実施する場合、治験の届出を要する医療機器

1. すでに製造販売の承認又は認証を与えられている医療機器と構造及び原理が異なる機械器具等。
2. すでに製造販売の承認又は認証を与えられている医療機器と構造及び原理が同一の機械器具等であって使用形態が異なるもの
3. すでに製造販売の承認又は認証を与えられている医療機器と構造及び原理が同一の機械器具等

であってその使用目的、効能、効果もしくは操作方法又は使用方法が異なるもの

4. すでに製造販売の承認又は認証を与えられている医療機器と構造及び原理が異なる医療機器として製造販売の承認を与えられた医療機器であって、その製造販売の承認のあった日後、法に規定されている調査期間を経過していないものと構造及び原理が同一の機械器具等（2号に掲げるものを除く）
5. 生物由来製品となることが見込まれる機械器具等（前号に掲げるものを除く）
6. 遺伝子組換え技術を応用して製造される機械器具等（前号に掲げるものを除く）

なお、GCP は、医療機器の治験実施が困難とならないように、現在、規制上の工夫がなされている。最新の通知等を参考にすること。

5 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。

◎特集

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
省略

(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、採血回、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。

(f) 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。

(g) 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づけている。また、特定生物由来製品の遡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、生物由来製品の遡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。

(h) 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、以下のように規定されている。

(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

6 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。

7 おわりに

紙面の都合上、全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を読み、正確な情報

厚生労働省ホームページ：薬事法

<http://www.mhlw.go.jp/topics/2003/06/tp0630-1.html>

審査管理課関連通知

<http://www.nihs.go.jp/mhlw/touchi/index.html>

を入手することが重要である。

[参考文献]

- 1) 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課医療機器審査管理室 改正薬事法ポイント承認・認証制度および販売規制
- 2) 土屋利江 細胞組織医療機器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、2004、53 巻、3 月号、144-146。

Enhancing action by sulfated hyaluronan on connexin-26, -32, and -43 gene expressions during the culture of normal human astrocytes

Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Misao Nagahata-Ishiguro, Rumi Sawada, Nasreen Banu, Tsutomu Nagira
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-Ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 21 January 2007; revised 27 September 2007; accepted 11 December 2007

Published online 20 June 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32018

Abstract: Astrocyte proliferation is strictly controlled during development and in the adult nervous system. In this study, we examined the role of sulfated hyaluronan (SHya) in the proliferation and differentiation of normal human astrocytes (NHAs). Cells were cultured with different concentrations of SHya for 7 days, and the number of viable cells and the presence of neural cell-specific genes were determined to assess their proliferation and development, respectively. With SHya, cell proliferation increased non-significantly. Furthermore, remarkable enhancing action by SHya on connexin-26, -32, and -43 gene expressions were observed during the culture of NHAs. It has been suggested that a fraction of NHAs have neural precursor activity that

gives rise to astrocytes themselves, oligodendrocytes, and neurons. Our results clearly demonstrated that the expression of specific genes for neural precursor cells, astrocytes, neurons, and oligodendrocytes was significantly increased to 50 µg/mL in SHya-treated cultures when compared with that of the control culture. These findings suggest that SHya plays an important role in the proliferation and differentiation of NHAs and in the production of a novel material for tissue engineering. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res 90A*: 713–719, 2009

Key words: astrocyte; sulfated hyaluronan; cell proliferation; real-time PCR; gene expression

INTRODUCTION

Telencephalic neuroepithelial cells contain neural precursors that give rise to the neuronal lineage and the glial lineage, which includes astrocytes and oligodendrocytes.^{1,2} Astrocyte proliferation is strictly controlled during development and in the adult nervous system. In all regions of the central nervous system (CNS), astrocytes are comprehensively coupled by gap junctions.³ Gap-junctional intercellular communication (GJIC) occurs through clusters of intercellular channels that directly connect the cytoplasm of adjacent cells, allowing selective passage of ions and small molecules between coupled cells.^{4,5} GJIC involves two hemichannels or

connexons,⁶ and each connexon is composed of six basic protein subunits named connexin (Cx) that allow the cell-cell transfer of small molecules. Approximately 20 connexins are known, and they are expressed in a cell- and development-specific manner.^{7,8} Among them, Cx26, Cx30, and Cx43 are expressed in astrocytes, and Cx32 and Cx47 are expressed in oligodendrocytes.⁹

Because of its important biological activities, hyaluronan (Hya) has been widely used in medical practice. Hya is a negatively charged glycosaminoglycan (GAG) that facilitates cell migration, adhesion, proliferation, and tissue repair. By interacting with other matrix molecules, Hya contributes stability and elasticity to the extra-cellular matrix (ECM). It also plays the main structural role in the formation of the brain ECM.¹⁰ Recently, hyaluronan synthesized with varying degrees of sulfation was reported to affect cell aggregation, proliferation, and differentiation of rat calvarial osteoblasts.¹¹ In this study, we investigated the effect of sulfated hyaluronan (SHya) on the cell function of normal human astrocytes (NHAs).

Correspondence to: T. Tsuchiya; e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

Contract grant sponsors: Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, The Japan Health Sciences Foundation

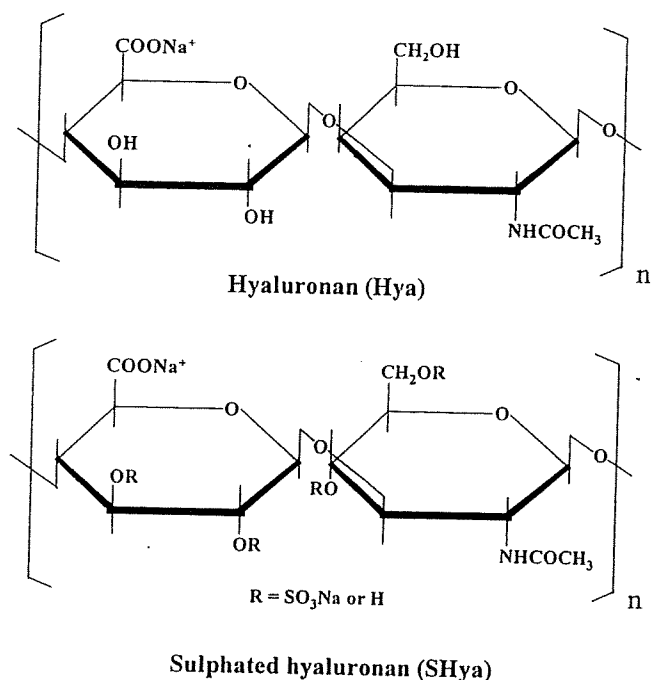


Figure 1. Structure of Hya and SHya. SHya is composed of Hya and a sulfate group. The molecular weight of SHya is 2.0×10^4 , and the degree of substitution of SHya is 0.6.

MATERIALS AND METHODS

SHya preparation

SHya was synthesized by the method reported earlier (Fig. 1).¹¹ The molecular weight of SHya was 2.0×10^4 , and the degree of substitution (D.S.) of SHya was 0.6, as determined by the chelate titration method.¹² Briefly, 2% Hya120 (molecular weight, 1.2×10^6) solution in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) was mixed with trimethylamine (TMA)-SO₃ complex (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) and stirred at 60°C for 24 h. The reaction mixture was then diluted, neutralized, and precipitated by adding acetone (Wako Pure Chemical Industries). The precipitate was dissolved in distilled water and dialyzed against distilled water. 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 cm⁻¹ due to S=O and SO₃⁻ stretching, respectively. Stock solutions of SHya were made directly in ABM medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) supplemented with 5% FCS and recombinant human epidermal growth factor.

Astrocyte cell culture

NHA (Cambrex Bio Science) was maintained in ABM medium supplemented with 5% FCS and recombinant human epidermal growth factor, and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ under 95% air at 37°C.

Giemsa staining

When the cells reached confluence in tissue culture dishes, cells were fixed and stained with Giemsa solution. Cell morphology was determined under an inverted light microscope.

MTT assay for cell proliferation

NHAs were seeded into 24-well plates for MTT assay at a density of 1×10^4 /well in ABM medium supplemented with 5% FCS, recombinant human epidermal growth factor, and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ under 95% air at 37°C. After 1-week culture with different concentrations of SHya (10 or 50 µg/mL), the viability of NHA cells was determined by MTT assay. TetraColor ONE (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) was used to measure changes in cell numbers. This assay measures the activity of the enzyme in mitochondria for counting living cells. The medium was replaced with 300 µL of fresh medium containing 6 µL TetraColor ONE reagents. After 2 h, samples were measured in a microplate reader.

Scrape loading and dye transfer assay

The scrape loading and dye transfer (SLDT) technique was performed by the method of El-Fouly et al.¹³ Confluent monolayer cells in 35-mm culture dishes were rinsed with Ca²⁺, Mg²⁺ phosphate-buffered saline [PBS(+)], and the cell dishes were loaded with 0.1% Lucifer Yellow (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS(+) solution and immediately scraped with a sharp blade. After incubation for 5 min at 37°C, cells were washed four times with PBS(+), and the extent of dye transfer was monitored using a fluorescence microscope equipped with a type UFX-DXII CCD camera and a super high-pressure mercury lamp power supply (Nikon, Tokyo, Japan).

Expression of gap junctional and neural cell marker genes

For quantitative RT-PCR, NHAs were seeded into 12-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in ABM medium (Cambrex Bio Science) supplemented with 5% FCS and recombinant human epidermal growth factor, and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ under 95% air at 37°C. After 1-week cell culture with 10 or 50 µg/mL SHya, single-stranded cDNA was prepared from 1 µg of total RNA by reverse transcription (RT) using a commercially available First-Strand cDNA Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Aliquots of the cDNA (1/20) were used as templates for PCR analysis using a Lightcycler System (Roche, Mannheim, Germany). PCR amplification was performed in a total volume of 20 µL mixture including 1 µL of RT reaction mixture, 2 µL LightCycler-Fast Start Reaction Mix SYBR Green 1 (Roche), 0.5 µM each primer, and 3 mM MgCl₂. The PCR program consisted of 40 cycles of 8 s at 94°C, 5 s at 65°C, and 10 s at 72°C. Primer sequences for amplification were

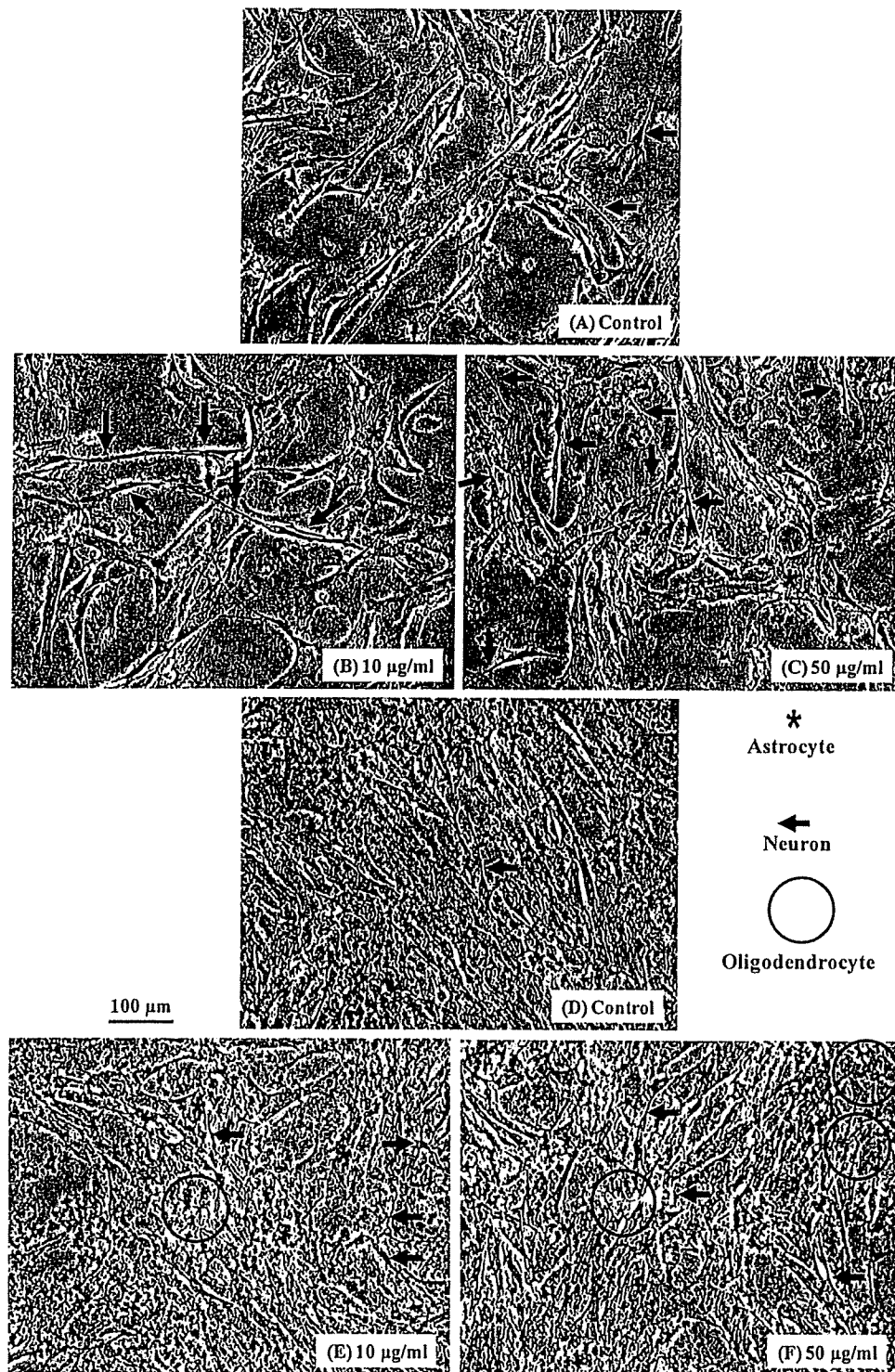


Figure 2. NHA cell morphology. Cultures were cultured with SHya in different concentrations. Cells were observed by inverted light microscopy observation and Giemsa staining. After 3 days of culture, some cells looked like branches or spikes extending out from the cell body (neuron) in control (A) and 10 µg/mL (B) of SHya-treated cultures, and the neurons were elongated and increased in number in 50 µg/mL (C) of SHya-treated cultures. After 1 week, in addition to neurons, some cells appeared like the sparse branches of a tree (oligodendrocyte) with 10 µg/mL (E) and 50 µg/mL (F) of SHya. The number of oligodendrocytes was increased at 50 µg/mL of SHya-treated cultures, compared with the control (D) culture.

5'-GGGCTAATTACAGTGCAG-3' and 5'-CATGTCCAG CAGCTAGTT-3' for Cx43, 5'-ATAGACAGCATGAGAGG GAT-3' and 5'-AGACAGGCATAGAATTAGGC-3' for

Cx26, 5'-CTTCCTTCCCTGGCTACTTC-3' and 5'-CATCCC ATCTCTTGTAACCA-3' for Cx32, 5'-GAGATCAGAGCCC AGGATGCT-3' and 5'-CTGAGGGGTGGTGCCAAGGAG-3'

for nestin, 5'-TCCGCTGCTCGCCGCTCTAC-3' and 5'-TCATCTTGCCCGCTCACTGG-3' for glial fibrillary acidic protein (GFAP), 5'-CACTTCCTCCTCCTCCACGAC-3' and 5'-GTCCATGGCCAGGTTTCAGGTC-3' for oligodendrocyte transcription factor 1 (OLIG1), 5'-CTAAGGAGGAGATTG GACAGG-3' and 5'-AGTGGTGGCAGTGATTTTCAGT-3' for Nurr-1, and 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' for GAPDH. The RNA preparation and RT-PCR in this study were performed in triplicate.

Statistical analysis

Student's *t*-test was used to assess whether differences observed between the SHya-supplemented and control samples were statically significant. For comparison of groups of means, one-way analysis of variance was carried out. When significant differences were found, Tukey's pairwise comparison was used to investigate the nature of the difference. The confidence level was set at 95% for all tests. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Values were presented as mean \pm SD.

RESULTS AND DISCUSSION

NHAs were cultured with different concentrations (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of SHya. After 3-day and 1-week culture, cells were observed by inverted light microscopy observation and Giemsa staining. After 3-day culture, some cells looked like branches or spikes extending out from the cell body (neuron) in control and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHya-treated cultures, and the neurons were elongated and increased in number in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHya-treated cultures [Fig. 2(A–C)]. After 1 week, in addition to neuron, some cells appeared like the sparse branches of a tree (oligodendrocyte) with 10 μg and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHya. The number of oligodendrocytes was increased at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHya-treated cultures, compared with the control culture [Fig. 2(D–F)]. Cell proliferation was nonsignificantly increased about 1.2-fold with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya compared with control (Fig. 3), but was almost similar to control when treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHya.

Astrocytes are coupled to a cellular network via gap junction channels predominantly composed of Cx43. Astrocytes are believed to play an important role in neuroprotection by providing energy substrates to neurons and by regulating the concentrations of K^+ and neurotransmitters via gap junctions. Therefore, we measured the GJIC function by SLDT assay. GJIC was significantly increased in cells cultured with SHya [Fig. 4(A,B)].

The expression of the Cx43 gene was also significantly increased in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya-treated cultures [Fig. 5(A)]. It was reported that Cx26, Cx30, and Cx43 are expressed in astrocytes,⁹ and Cx47 and

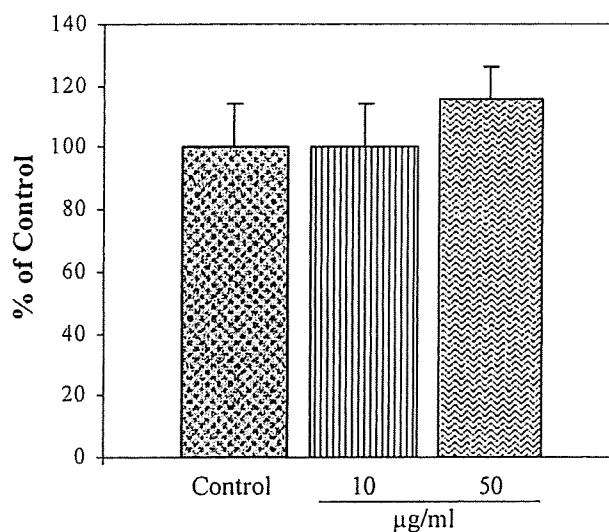


Figure 3. MTT assay for cell proliferation. Cell proliferation was nonsignificantly increased about 1.2-fold with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya-treated cultures compared with control.

Cx32 are expressed in oligodendrocytes; Cx32 is also expressed by neurons in mice.^{9,14} Astrocyte Cx26 is associated mainly with oligodendrocyte Cx32, whereas astrocytes Cx43 and Cx30 are associated with oligodendrocyte Cx47.¹⁵ To evaluate their presence, we further estimated the expression levels of these specific genes. Expression of Cx26 and Cx32 genes was increased in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya-treated cultures about 4- and 3.5-fold, respectively, compared with the control culture [Fig. 5(B,C)]. In contrast, no expression of Cx30 and Cx47 genes was detected (data not shown). As mentioned earlier, mouse astrocytes and oligodendrocytes were capable of expressing Cx30 and Cx47 gene, respectively. But, in our experiment, we used human cells that failed to express these genes. We postulated that the difference in the species may play a vital role in the expression of these genes. Our data suggest that SHya promotes a strong association of astrocyte Cx26 with oligodendrocyte Cx32 and neuron Cx32.

The majority of cells in the CNS are generated during the embryonic and early postnatal period. Brain tissue has long been regarded as incapable of regeneration. Therefore, discovery of new neurons in certain regions of adult mammalian brain has generated intense interest. Neural stem cells were reported to have the capability for expansion and differentiation into astrocytes, oligodendrocytes, and neurons *in vitro*.^{16,17} It was suggested that a fraction of NHAs have neural precursor activity that gives rise to astrocytes themselves, oligodendrocytes, and neurons that express their original specific markers (Fig. 6).¹⁸ Neural precursor cells express nestin, a class IV intermediate filament protein. Astrocytes express glial filamentous acidic protein (GFAP). Oligodendrocytes express OLIG1, and differentiated

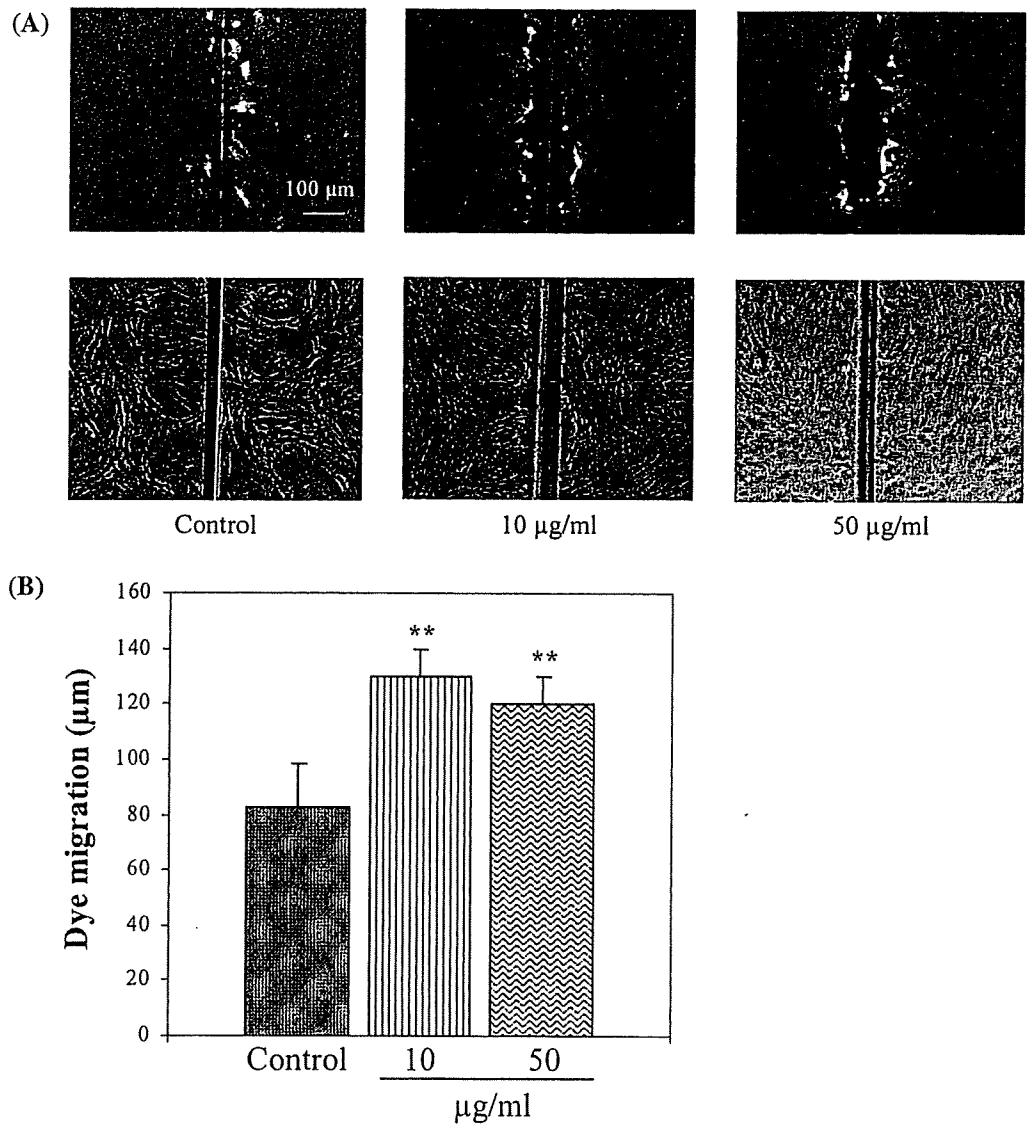


Figure 4. Statistical analysis of SLDT assay. (A) and (B), GJIC was significantly increased in cells treated with 10 and 50 µg/mL of SHya. ** $p < 0.01$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

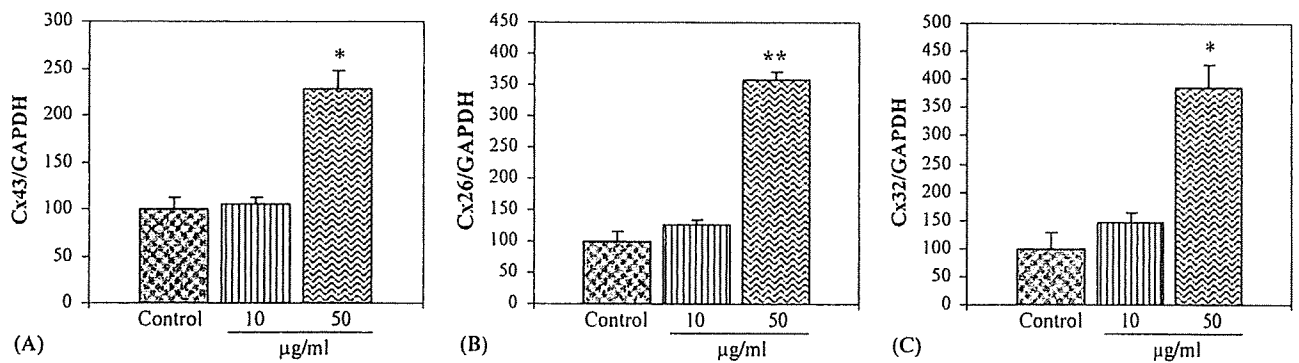


Figure 5. mRNA expression of Cx43, Cx26, and Cx32 by real-time PCR analysis. Expression of all gap junctional genes was significantly increased in 50 µg/mL SHya-treated cultures compared with control. (A) Expression of Cx43 was increased about 2.2-fold, (B) expression of Cx26 was increased about 4-fold, and (C) expression of Cx32 gene was increased about 3.5-fold. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

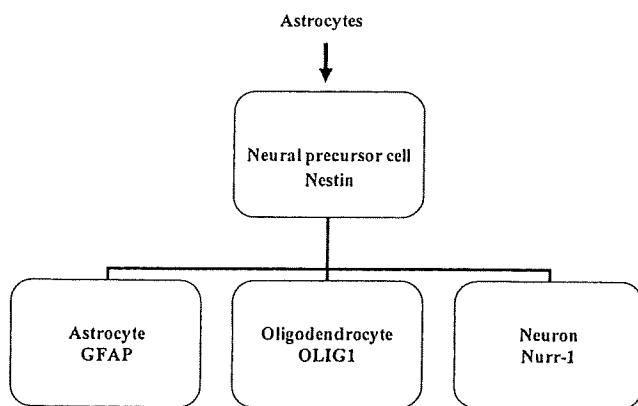


Figure 6. Schematic representation of astrocyte differentiation *in vitro*.

neurons express Nurr-1, a transcription factor. In this study, we also determined the role of SHya in differentiation and expression of specific neural genes. When NHA was cultured with SHya, the expression of nestin, GFAP, OLIG1, and Nurr-1 was significantly increased in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya-treated cultures [Fig. 7(A–D)]. In all cases, the increases (about 2-, 3-, 1.8-, and 1.7-fold, respectively) were statistically significant at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SHya compared to the control. From this finding, it was suggested that astrocytes may be differentiated into neurons and/or oligodendrocytes with SHya-treated cultures.

Sulfated polysaccharides, such as heparan sulfate and heparin, are reported to mediate the activity of basic fibroblast growth factor in the ECM.¹⁹ SHya, a semisynthetic material, composed of Hya and a sulfate group,¹¹ was synthesized by using Hya extracted from microorganisms; therefore, it has a lower infectivity and a lower risk of containing virus-induced carcinogens. Interaction of SHya with cells was already reported in several studies,²⁰ but the effect of SHya on cell proliferation, differentiation, and intercellular signaling was not clear. As reported earlier, SHya affected the osteoblasts responding to serum components supplied by FBS in the culture medium.¹¹ In our experiment, FBS was also added to the culture medium, suggesting that SHya may affect cell function by interacting with the serum components. Moreover, Abatangelo et al.²¹ reported SHya as a better nutrient for cells than Hya. Also, the SHya do not stimulate damage to the erythrocyte membrane. Therefore, we hypothesized a positive role of SHya on NHA.

CONCLUSION

In this study, we identified several distinct roles for SHya in NHA: increasing cell proliferation and facilitating GJIC function in a dose-dependent manner. Expressions of the specific markers of certain

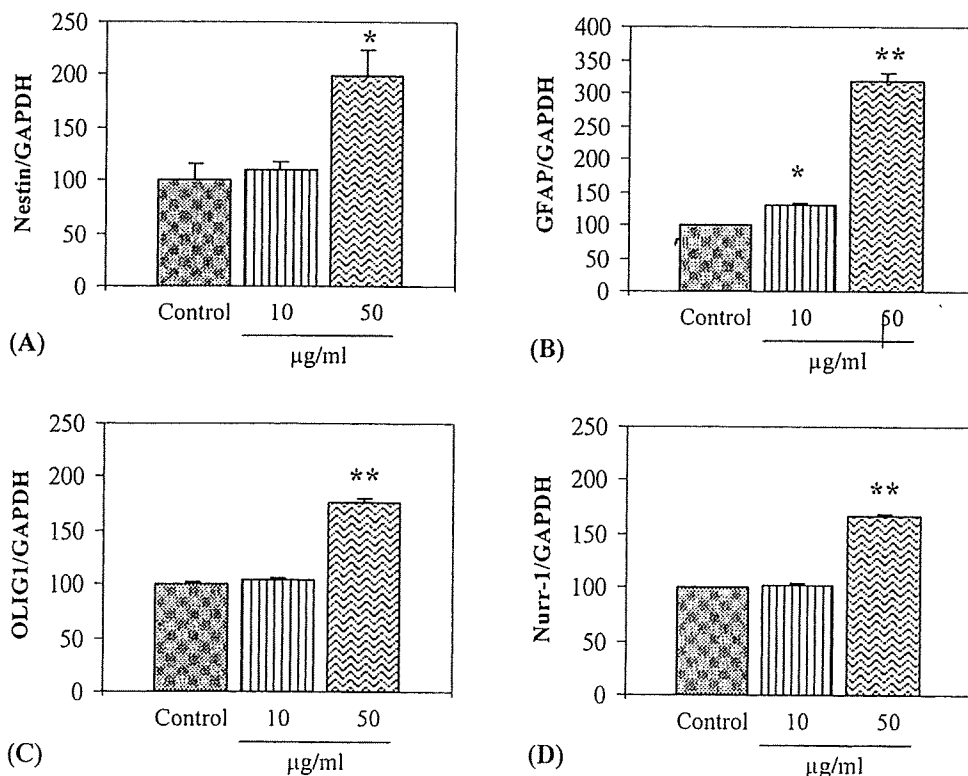


Figure 7. mRNA expression of neural cell marker genes by real-time PCR. The expression of (A) Nestin, (B) GFAP, (C) OLIG1, and (D) Nurr-1 was increased. In all cases, at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the increase was significant (about 2-, 3-, 1.8-, and 1.7-fold, respectively), compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

genes were also enhanced with SHya treatment. Therefore, we postulate that SHya can bind with NHA and facilitate cell migration, adhesion, proliferation, and differentiation. Thus, SHya seems to play an important role in NHA and thus could help provide a novel material for the advancement of the field of tissue engineering.

References

1. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66-71.
2. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-1438.
3. Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7573-7578.
4. Yeager M, Nicholson BJ. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:183-192.
5. Yeager M, Nicholson BJ. Structure and biochemistry of gap junctions. *Adv Mol Cell Biol* 2000;30:31-98.
6. Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 2000;79:564-574.
7. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: Structure and function (review). *Mol Membr Biol* 2002;19:121-136.
8. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996;238:1-27.
9. Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knock-out mice. *Glia* 2003;44:205-218.
10. Bignami A, Hosley M, Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)* 1993;188:419-433.
11. Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, Hachimori A, Abe K. A novel function of N-cadherin and Connexin43: Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:603-611.
12. Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenbach G. Metallindikatoren VII. Ein auf Erdalkaliionen ansprechendes Phatalein und sein analytische Verwendung. *Helv Chim Acta* 1954;37:113-120.
13. El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 1987;168:422-430.
14. Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE. Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* 2003;464:356-370.
15. Altevogt BM, Paul DL. Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J Neurosci* 2004;24:4313-4323.
16. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96:25-34.
17. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-1710.
18. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996;175:1-13.
19. Walker A, Turnbull JE, Gallagher JT. Specific heparan sulfate saccharides mediate the activity of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:931-935.
20. Hollander D, Stein M, Bernd A, Windolf J, Wagner R, Pannike A. Autologous keratinocyte culture on hyaluronic acid ester membrane: an alternative in complicated wound management? *Unfallchirurgie* 1996;22:268-272.
21. Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 1997;18:1411-1415.

Development of an *in vitro* screening method for safety evaluation of nanomaterials

Atsuko Matsuoka^{a,*}, Agneta Önfelt^b, Yoshie Matsuda^a, Ryusuke Nakaoka^a, Yuji Haishima^a, Masako Yudasaka^{c,d}, Sumio Iijima^{d,e} and Toshie Tsuchiya^a

^a *Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan*

^b *Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Stockholm, Sweden*

^c *Nanotube Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST, Tsukuba, Japan*

^d *NEC Corporation, Ibaraki, Japan*

^e *Department of Materials Science and Engineering, Meijo University, Nagoya, Japan*

Received 29 July 2008

Accepted 10 October 2008

Abstract. To evaluate the role of particle size in cytotoxicity tests of nanomaterials (NMs), we exposed Chinese hamster cells to polystyrene (PS) spheres with defined diameters ranging from 0.1 to 9.2 μm . We found that the 4.45- μm PS particles were most cytotoxic while sizes 0.1 and 0.2 μm showed no cytotoxicity up to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the chromosome aberration test, the 4.45- μm PS particles induced polyploidy in a mass concentration-dependent manner in 24- and 48-h treatments. The 5.26- μm PS particles induced polyploidy only at 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h. Next, we performed the cytotoxicity test with as-grown single walled carbon nanohorns (NHAs). These were suspended in DMSO and then transferred into the culture medium followed by sonication. Six suspensions differently sonicated showed the same apparent toxicity, although the total particle size distributions differed. However, the sizes of NHAs particles predicted to be most toxic from the experiments with PS particles, i.e. 1.01–4.47 μm constituted 40–60% of all particles in all six suspensions. The results suggest that the cytotoxicity of NMs in suspension depends on specific sizes of aggregates and therefore suspensions should be checked with regard to particle size distributions in assays of toxic effects. The uptake of particles into cells was confirmed by confocal microscopy.

Keywords: Polystyrene particles, single-walled carbon nanohorns, cytotoxicity, polyploidy

1. Introduction

Development in the field of nanotechnologies has brought nanomaterials (NMs) closer to us day by day and at the same time toxicological concerns of NMs have been growing. NMs are expected for a variety of applications not only in industry, but also in the field of medicine such as drug delivery system, as gene transfer vectors, and as scaffold for cell culture in the regenerative medicine. The NMs are new materials with unknown characteristics and we need to consider the safety of their use.

Recently, in the *in vitro* studies to evaluate toxicity of NMs, macrophages, a human alveolar epithelium cell line, a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), and so on have been used with NM

* Address for correspondence: A. Matsuoka, Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamigoya, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 9268; Fax: +81 3 3707 6950; E-mail: matsuoka@nihs.go.jp.

suspensions prepared with a variety of methods by using dispersion agents and ultrasonication [1–5]. A standard method has not yet been established for evaluation of toxicity of NMs. The aim of our study is to contribute to the establishment of an *in vitro* safety evaluation system for the first screening of NMs.

Relationships between particle size and its cytotoxicity have been investigated before. Koshi et al. reported that the 1.5–3.0 μm quartz particles are most cytotoxic to the cultured rat intraperitoneal monocytes among tested particles ranging from <0.5 to 15.0 μm [6]. Yin et al. reported that for the 10- and 150-nm nickel ferrite particles, cytotoxicity is independent of particle size at mass concentrations of 2–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a mouse neuroblastoma cell line [7]. Obviously both physical and chemical characteristics have to be considered.

In the present study, first we investigated cytotoxicity with a series of eleven sizes of polystyrene particles. A Chinese hamster cell line, CHL, was used. This cell line has been used for a long time in safety evaluation of pharmaceuticals and chemicals in Japan and there is now a large database. Next, we tested as-grown single-walled carbon nanohorns, which has been suggested as carriers in drug delivery [8,9]. Based on our results, we make a technical proposal and show the necessity of physical characterization of NM suspensions tested for precise safety evaluation of NMs.

2. Materials and methods

2.1. Cells

The Chinese hamster lung derived cell line, CHL [10,11], was maintained in Eagle's minimum essential medium (GIBCO 11095-080) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Intergen Company, NY, USA) in 5% CO_2 in air at 37°C with saturated humidity. The doubling time was around 13 h and the modal chromosome number was 25.

2.2. Nanomaterials (NMs)

Polystyrene (PS) particles were purchased from Spherotec Inc. (IL, USA). Their sizes were 0.10 ± 0.0024 , 0.20 ± 0.005 , 0.51 ± 0.012 , 0.92 ± 0.023 , 1.09 ± 0.027 , 2.07 ± 0.05 , 3.17, 4.45, 5.26, 6.8 and 9.2 μm in mean diameter \pm SD, respectively. They were suspended in deionized water containing 0.02% sodium azide and appropriate aliquots were suspended in the culture medium for use.

The as-grown single-walled carbon nanohorns (NHAs) were prepared by CO_2 laser ablation of a pure graphite target containing no metal catalyst in an Ar atmosphere (760 Torr) at room temperature [12]. NHAs composed of thousands of graphitic tubules having diameters of 2–5 nm exist in dahlia-type aggregates with a diameter of 50–100 nm.

To visualize the uptake of particles into cells, red fluorescent PS microspheres (2.0 μm -diameter FluoSpheres[®]) were obtained from Molecular Probes, Inc. (OR, USA).

2.3. Preparation of the NHAs suspension and a measurement of particle size distribution

After NHAs was suspended in DMSO (1% of suspension vehicle), the suspension was transferred into the culture medium. The final suspension was ultra-sonicated for 20 s in an ultrasonic (US) bath (a model HONDA W-113 MKII, output 110 W), or for 15 s to 5 min with probe type US processors (a model Sonics and materials VC50T, 50 W, CT, USA and a model TOMY SEIKO UR-200P, 200 W, Tokyo, Japan) in iced water. Size distribution analysis of the six suspensions was performed by the laser diffraction/scattering method with a model Horiba LA-950 (Tokyo, Japan).

2.4. Cytotoxicity test (the colony formation assay)

The colony formation assay was performed as reported previously [13]. Briefly, CHL cells were seeded at 50/well in 24-well plates. After 24-h incubation, a suspension of NMs was added to the culture and incubated for further six days. The final concentration of DMSO for NMs treatment was 0.5%. The colonies formed were fixed with methanol and stained with Giemsa solution. The number of colonies on each well was counted, and the survival (%) was calculated as the ratio of the number of colonies in the test group to that in control. Experiments were performed at least twice and the representative data are shown.

2.5. Chromosome aberration (CA) test

Cells were seeded at 1.0×10^5 /plate (60 mm in diameter) and incubated for 17 h. They were then treated with a suspension of NMs for 24 h or 48 h and colcemid ($0.2 \mu\text{g/ml}$) was added for the final 2 h. Chromosome preparations were made as reported previously [14]. All slides were coded, and the number of cells with structural CAs among 100 well-spread metaphases was counted. The number of polyploid cells among 100 metaphases was counted. In our historical database, the frequency of CHL cells with structural CAs or polyploidy in both untreated and solvent-treated negative controls did not exceed 4%. The experimental groups were judged as negative if the total CA frequency was less than 5.0%, inconclusive if it was 5.0 to up to 10.0%, and positive if it was 10.0% or more. Solvent-treated cells served as the negative control. Experiments were repeated at least twice and representative data are shown.

2.6. Confocal microscopy

The uptake of NMs by CHL cells was observed by confocal laser microscopy (Olympus FLUOVIEW FV1000, Tokyo, Japan). Cells were seeded at 2×10^4 /well of a glass bottom microwell dish (MatTek Corp. MA, USA) and incubated for 24 h. They were then treated with NMs at $100 \mu\text{g/ml}$ for 20 h. After treatment, cells were fixed with 10% formalin, stained with FITC to visualize cytoplasm, and then mounted in an antifade/glycerol solution containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain chromosomes and nuclei.

3. Results

3.1. Cytotoxicity of PS particles

Cytotoxicity of eleven PS particles different in size was tested in CHL cells (Fig. 1). Treatment with the $4.45\text{-}\mu\text{m}$ particles was most toxic followed by treatment with the 2.07- and $3.17\text{-}\mu\text{m}$ particles. To understand the cytotoxicity of the PS particles more precisely, we separately performed the test at different concentrations of 100 and $1000 \mu\text{g/ml}$ from those in Fig. 1. The smallest particles with mean diameters of 0.1 and $0.2 \mu\text{m}$ did not show any cytotoxicity even at $1000 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 2, left). The eight larger particles were tested at $100 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 2, right); again the size $4.45 \mu\text{m}$ was most cytotoxic. The $5.26\text{-}\mu\text{m}$ particles were much less cytotoxic, although they precipitated and covered cells to the same extent as the $4.45\text{-}\mu\text{m}$ particles.

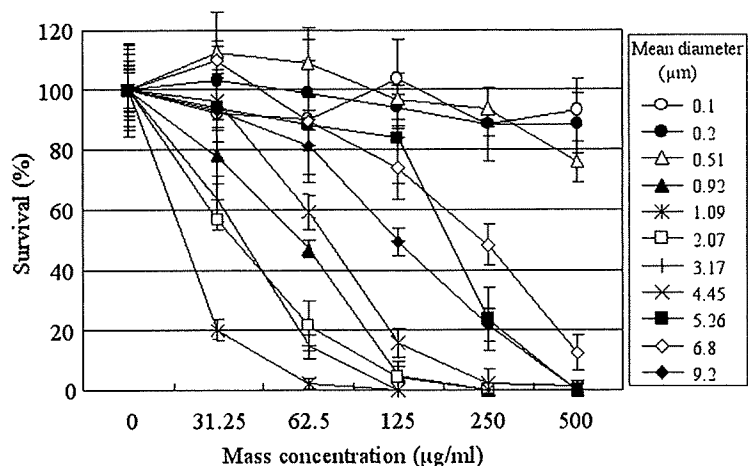


Fig. 1. Cytotoxicity of 11 size-different polystyrene particles in CHL cells. Cells were treated with the particles for six days. Values are expressed as means \pm SD for four wells.

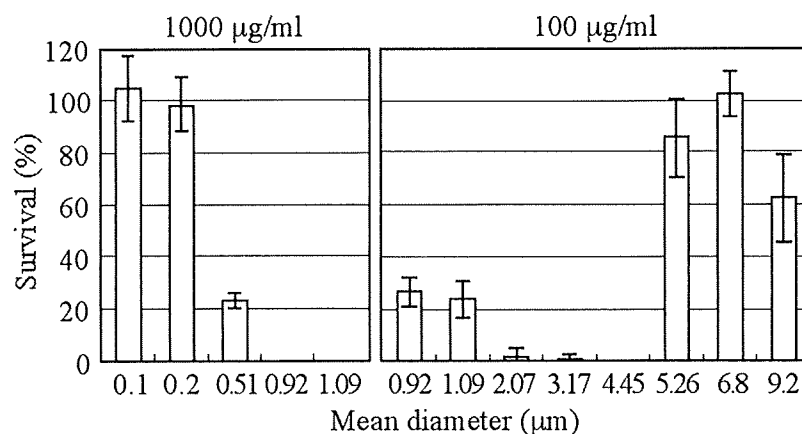


Fig. 2. Cytotoxicity of five smallest PS particles treated at a mass concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$ (left) and of eight larger PS particles treated at 100 $\mu\text{g/ml}$ (right). Cells were treated with the particles for six days. Values are expressed as means \pm SD for four wells.

3.2. Cytotoxicity of NHAs

Six kinds of suspensions of NHAs were subjected to the cytotoxicity test (Fig. 3). We observed precipitation of NHAs at all the concentrations. With all six suspensions, 50% growth inhibition was observed at mass concentrations of around 135 $\mu\text{g/ml}$. Although the size distribution of particles was different in all suspensions (Fig. 4) ranging from 2.05 to 5.10 μm in median, the frequencies of the sizes that were most toxic in the experiments with PS particles were similar comparing all six of the NHAs suspensions (Fig. 5). The ranges of sizes 2.27–4.47 μm and 1.01–1.98 μm corresponded roughly to those of the three most cytotoxic PS particles.

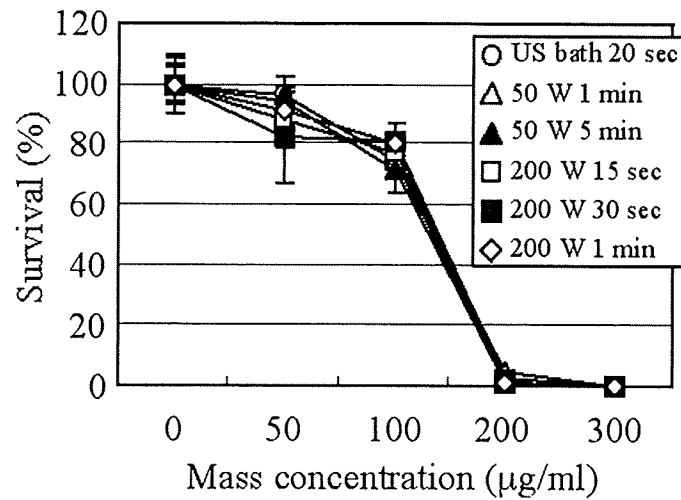


Fig. 3. Cytotoxicity of NHAs dispersed under six US conditions in CHL cells. Cells were treated with NHAs for six days. Values are expressed as means \pm SD for four wells.

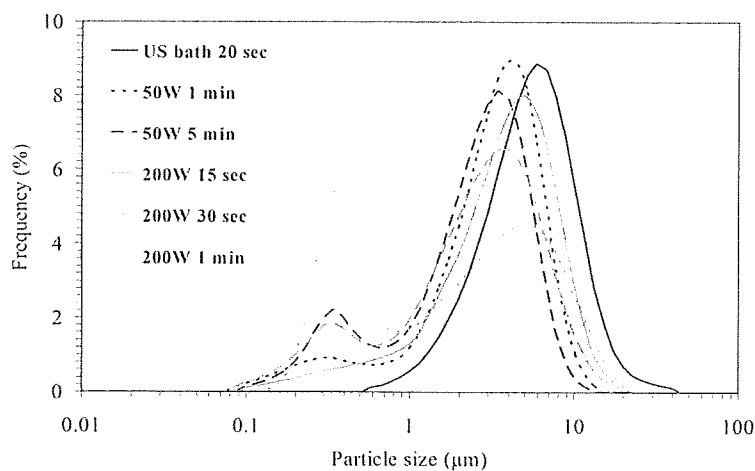


Fig. 4. Size distribution of NHAs dispersed under six US conditions.

3.3. Numerical changes of chromosomes induced by PS particles not by NHAs

The 4.45- and 5.26- μm PS particles were subjected to the CA test. The 4.45- μm PS particles induced a high frequency of polyploidy in a concentration-dependent manner (Fig. 6). The 5.26- μm PS particles also induced 13% polyploidy but only at the highest concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$. In contrast, NHAs did not induce polyploidy at concentrations up to 500 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h or 200 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h (data not shown). Neither PS particles nor NHAs caused any increase of CAs due to chromatid/chromosome breaks.

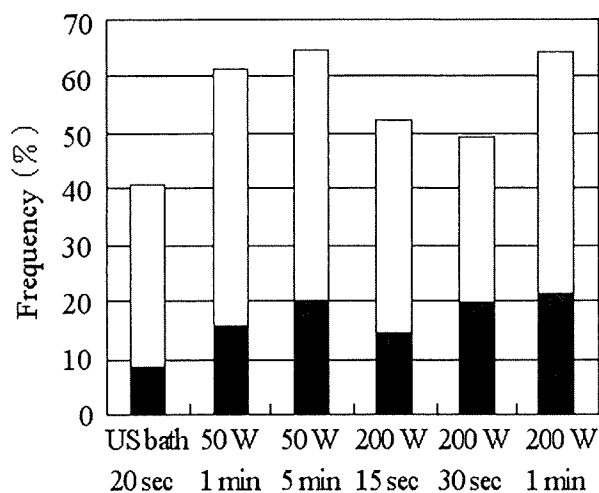


Fig. 5. Frequency of particles with specific sizes of 1.01–1.98 μm (■) and 2.27–4.47 μm (□) in NHAs suspensions prepared under six US conditions.

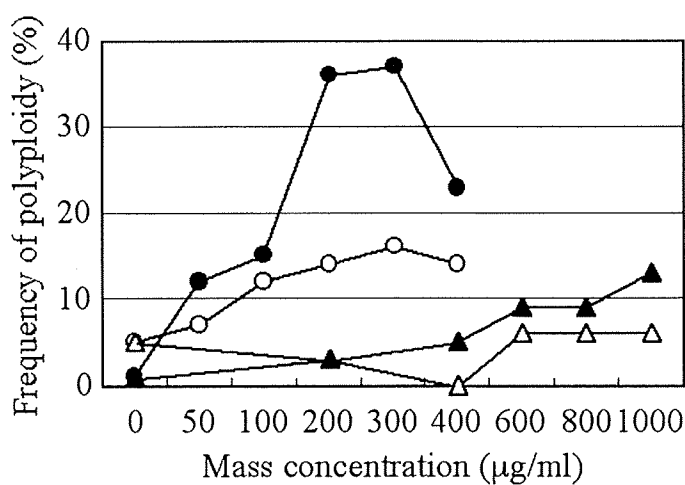


Fig. 6. Frequency of polyploidy induced by the 4.45- (○ 24 h, ● 48 h) and 5.26- μm (△ 24 h, ▲ 48 h) PS particles. Frequency equal to or higher than 10% was judged as positive.

3.4. Uptake of NMs by CHL cells

Uptake of NMs by CHL cells was observed by confocal laser microscopy. Figure 7 shows a mitotic cell with at least one bead (2.0- μm FluoSpheres[®]) inside and several more beads close to it but outside. Figure 8 shows a mitotic cell with an NHAs aggregate ($\sim 1 \mu\text{m}$) inside. The NHAs was not labeled with any fluorescent molecule but observed by differential interference contrast microscopy (particles appear black).