

医療機器の生物学的安全性評価に関する動物実験代替法の開発

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

宮島 敦子，加藤 玲子，中岡 竜介，野村 祐介，配島 由二

近年、動物福祉に係る 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) を推進するため、動物実験代替法の開発が提唱されている。既に欧州においては、化粧品の安全性評価を対象とした動物実験の実施が禁止された。現在、化学物質、医薬品、農薬分野等において世界的に *in vitro* 試験系への代替が進められており、医療機器の生物学的安全性評価においても、刺激性試験動物実験代替法が ISO/FDIS 10993-23 に導入された。本稿では、我々が開発を進めている新規試験法を含めて、医療機器分野の動物実験代替法に係る最近の動向について紹介する。

1 はじめに

生体と接触する医療機器の承認申請等には、生物学的安全性評価が要求されている。医療機器の生物学的安全性評価に関する国際標準である ISO 10993 シリーズは、医療機器の国内規制とも密接に関連している。医療機器の生物学的安全性評価に関する基本的考え方を取りまとめた ISO 10993-1¹⁾ およびその他の各試験法等に関する ISO 文書の改訂動向に対応した最新の国内規制としては、令和 2 年 1 月 6 日付け薬生機審発 0106 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について」が発出されている。

生物学的安全性評価においては、可能な限り動物試験を削減し、適切な評価を行うことが原則となる。文献データや既承認品との同等性等に関する情報を最大限に利用し、試験の実施を省略する妥当性について十分考察した上で、動物試験を実施せざるを得ない場合にも、*in vitro* 試験による代替法を積極的に選択することが推奨されている。欧州で既に導入されている *in vitro* 発熱性物質試験である Human-Cell based Pyrogen Test (HCPT) については、国内においても性能検証が完了し、上記通知の別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」の第 7 部「発熱性物質試験」に参考情報として記載されている。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験、HCPT、エンドトキシン試験は、それぞれ測定原理および検出できる発熱性物質の範囲が異なる。ISO/PDTR 21582「Pyrogenicity」では、

試験目的に応じて適切な試験法を選択することと規定しているため、少なくとも国内におけるウサギを用いた発熱性物質試験の HCPT への完全移行は今後の課題となる。一方、再構築ヒト表皮 (Reconstructed human Epidermis : RhE) モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法は、関連する ISO 文書の発行に先駆けて、「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」の第 5 部「刺激性試験」に収載された。当該 *in vitro* 試験は医療機器の刺激性試験を行うにあたり、第一選択肢とすることが推奨されている。

医療機器の感作性試験、家兎眼装用試験は、現時点で動物実験代替法が整備されていない。がん原性、全身毒性、生殖発生毒性については、毒性学的懸念の閾値 (Threshold of toxicological concern : TTC) に基づいた化学分析を用いて評価する手法が考案されているが、その実用化にあたっては課題が山積している。医療機器の生物学的安全性評価手法として動物実験代替法を導入する際は、医療機器の特性および化学物質等との適用方法の相違を十分理解した上で、*in vitro* 試験系を開発又は改良する必要がある。本稿では、医療機器の生物学的安全性評価に関する動物実験代替法の最新情報について概説する。

2 皮膚刺激性試験動物実験代替法

医療機器の刺激性は、医療機器の単回、反復あるいは連続使用による局所的な非特異的炎症反応を引き起こす性質である。従来、医療機器の刺激性は動物を用いた皮膚一次刺激性試験、皮内反応試験および眼刺激性試験等の *in vivo* 試験に

より評価されている。ISO/TC 194/WG 8 では、2016 年に EpiDerm™ EPI-200 RhE および SkinEthic™ RHE の 2 種類の RhE モデルを用いた国際ラウンドロビンスタディ (RRS) を実施した²⁾。現在、当該 *in vitro* 試験法を含む医療機器の刺激性試験に係る国際標準である ISO10993-23「Tests for irritation」は Final Draft International Standard (FDIS) ステージまで進んでおり、2021 年初頭に発行される予定である。

RhE モデルを使用した *in vitro* 皮膚刺激性試験法は、化学物質を対象とした動物実験代替法として OECD TG 439 に採用されている。RhE モデルでは、ヒト表皮の基本構造が再構築されており、水溶性の試験サンプルのほか脂溶性サンプルも重層できる利点がある。また、医療機器の場合は、試験に供する溶媒抽出液中に存在する刺激性物質の濃度が低いことから試験法が改良された。

RhE モデルを用いた *in vitro* 刺激性試験は、皮膚一次刺激性試験と比較して感度が高い³⁾。そのため、当該 *in vitro* 試験で非刺激性と判定された試験試料については、新たに *in vivo* 試験を実施する必要がないと考えられる。現時点の RhE モデルを用いた *in vitro* 刺激性試験法は、MTT アッセイによる細胞生存率を指標として刺激性の有無のみを判定している。一方、皮膚一次刺激性試験では、刺激性強度を定量的に判定できる。当該 *in vitro* 試験法は、刺激性を反映する炎症性サイトカインやケモカイン等の二次マーカーを

特定し、細胞生存率と併用することにより、試験の確度や精度を向上できると考えられる。我々は用量反応性を示すサイトカインとして、IL-1 α のほかに、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF) が優れた二次マーカーとして利用できることを見出した⁴⁾。現在、MIF 産生誘導能を指標とした刺激性強度の定量化を目指し、複数の刺激性物質を用いて皮膚一次刺激性試験との相関性を検証している。

3 感作性試験動物実験代替法

医療機器の感作性試験は、医療機器又は原材料にばく露されることで引き起こされる遅延型アレルギー反応を探知する手法である。現時点で公定法として利用可能な試験としては、モルモットを用いる最大化試験 (GPMT)、アジュバント&パッチ法 (A&P)、マウスを用いる局所リンパ節試験 (LLNA) の 3 つの *in vivo* 試験がある。一方、ISO/TC 194/WG 8 では、医療機器の感作性試験に関する国際標準である ISO 10993-10 に様々な動物実験代替法を参考情報として収載する方向で改訂作業が進められている。

OECD が提唱する感作性応答の有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway : AOP) における主要イベント (Key Event : KE) は、下図に示したとおりに定義されている⁵⁾。KE を検出する *in vivo* および *in vitro* 試験法は、OECD TG 442 シリーズに収載されている。

LLNA は KE4 を対象とした試験法である。化学物質を

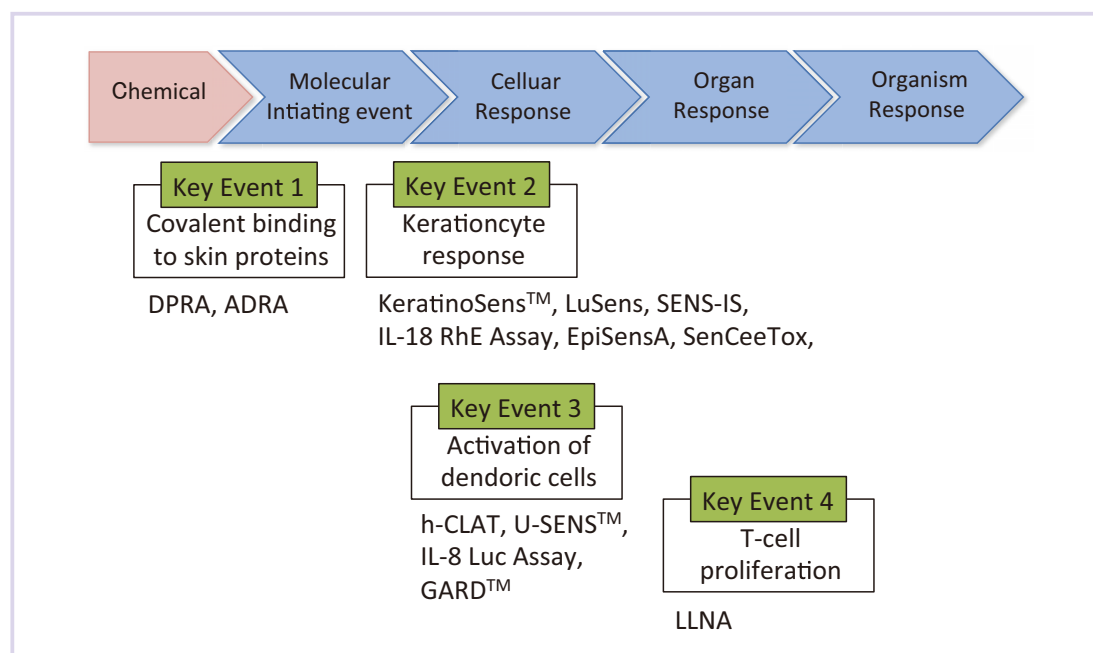


図 感作性応答の有害性発現経路における主要イベント (KE) と *in vitro* 試験法

対象とした感作性試験では、KE4を除く3つのKEに基づいた *in vitro* 試験法を組合せて評価する手法が提案されているが⁶⁾、具体的な試験パッケージは確立されていない。医療機器又は原材料の感作性試験としても、同様の組合せが有用であると考えられるが、化学物質と異なり、非極性溶媒抽出物を用いた試験を行う必要があると共に、抽出液中に存在する感作性物質の濃度が低いことに留意して試験系を構築する必要がある。OECD TG 442C に記載されている Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) は、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) と比較して感度が高く、有機溶媒も適用できることから、KE1 を評価する *in vitro* 試験法として利用できる可能性が高い。KE2 を対象とした試験中、非極性溶媒も適用可能な手法としては、RhE モデルを用いた SENS-IS、IL-18 RhE Assay、EpiSensA、SenCeeTox 等が挙げられる。

KE3 に関する評価としては、感作性応答に関連する 200 種類の遺伝子の変動を機械学習で解析する Genomic Allergen Rapid Detection Assay (GARD™)⁷⁾ が注目されており、OECD TG への収載を目指した検証試験が進められている。骨髄由来樹状様細胞を用いる GARD™ は、非極性溶媒も適用できることから、医療機器の感作性試験動物実験代替法としても応用できる可能性が高い。

我々は、医療機器の感作性評価に適用できる動物実験代替法試験法パッケージの開発を目指し、現在、ADRA および IL-18 RhE Assay 等の性能検証を行っている。当該試験パッケージの構築にあたっては、適用範囲、予測精度、感度等、多くの課題があり、解決に向けて試験法の改良等、科学的根拠に基づいた検討が必要となる。

4 家兎眼装用試験動物実験代替法の開発

眼に適用する代表的な医療機器の一つとしてコンタクトレンズ(CL)が挙げられる。CL は、眼粘膜に接触すると共に、累積使用時間が長期に渡るため、多くの生物学的安全性評価が求められる。CL は瞬きする毎に眼瞼又は角膜と摩擦し、その程度によっては物理的影響により上皮障害を起こし得ることが知られている。また、溶出物による影響も確認する必要があるため、安全性評価の一環として、家兎眼装用試験の実施が求められている。物理的影響については、何らかの方法で瞬き時に生じる CL と眼瞼又は角膜との摩擦係数を指標として、CL を使用した際に生じ得る眼障害の発生リスクを見積もることができると考えられる。

我々は、CL の摩擦特性とその使用に由来する眼障害発生の相関性を評価する一環として、振子式摩擦測定装置を使用した試験系の開発を進めている。振子式摩擦測定装置は一般的な摩擦測定装置と異なり、CL 全体の摩擦係数を測定可能なため、臨床使用に近い条件下で評価できる利点を有する⁸⁾。CL の使用に伴う眼障害の発生は、おしやれ用カラー CL で数多く報告されているため、現在、色素局在部位が判明している市販カラー CL の摩擦係数を当該装置により解析し、色素局在部位がレンズの摩擦特性に与える影響を評価している。

現在までの知見として、振子式摩擦測定装置により算出されたカラー CL における眼瞼側の摩擦係数は、対照に用いた透明 CL と比較して高値を示すと共に、色素局在部位と摩擦係数との間に一定の相関性があることを見出している。現行装置に使用している治具は生体と全く異なった材料から作製されているため、現在、CL 接着部材を眼球の弾性率に近い値を示す硬質ゴムに変更すると共に、摩擦面に脂質二重膜を模倣した高分子をコーティングする等の工夫を講じ、生体を模した実験系への改良も進めている。

今後、家兎眼装用試験も行い、摩擦特性と眼障害発生との因果関係の解明を目指す。溶出物の影響については、再構築ヒト角膜モデルを利用した *in vitro* 眼刺激性試験と家兎眼装用試験との相関性評価を開始する。最終的には、摩擦試験と *in vitro* 眼刺激性試験を組み合わせた家兎眼装用試験動物実験代替法を新たに構築することを目指している。

5 化学分析を用いた医療機器の生物学的安全性評価

近年、ISO 10993-1「Evaluation and testing within a risk management process」、並びに 10993-18「Chemical characterization of medical device materials within a risk management process」の改訂に伴い、あらゆる化学物質について、それ以下のばく露量では明らかに有害影響を受けない TTC を考慮した化学分析による生物学的安全性評価の選択肢が追加された^{1) 9) 10)}。TTC 同様、感作性物質についても LLNA における EC3 に基づいて設定された皮膚感作性の閾値 (Dermal sensitization threshold : DST) が報告されている^{11) ~ 15)}。遺伝毒性および感作性試験については、将来的に TTC および DST の概念に基づいた化学分析による評価が主な手法となり得るが、分析対象、測定装置および分析条件等は多岐にわたる。また、現行の抽出物・溶出物分析は、これらの概念を適用

する上で除外すべき化合物を確実に検出・同定していない等、ハザード解析としての科学的妥当性に劣ると共に、その他の多くの課題を抱えている。

我々は、これらの課題を解決するために、高分子材料を対象とした遺伝毒性および感作性物質の戦略的分析パッケージの開発、検証を進めている。同分析パッケージは、除外規定化合物の存在有無を確実に検出すると共に、分析データを補完する *in chemico* 試験を併用することで、成形過程等において、酸化、脱水、脱炭酸等の修飾を受けた物質も検出できる利点を有する。遺伝毒性物質の除外規定化合物は、5つの化合物群に含まれるすべての物質が該当するため、化合物群の共通骨格又は官能基をそれぞれ検出する骨格サーチ、差分解析による高感度分析を採用している。一方、感作性物質においては、除外規定化合物を EC3 が $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の化合物と定義し、Multiple reaction monitoring 又は高分解能 Selected ion monitoring モードにより、すべての除外規定化合物を高感度且つ網羅的に検出する手法を採用している。これらのハザード解析は、全含量試験として実施する共に、揮発性物質を対象とした測定も行う。また、リスク評価として材料毎に条件を設定した溶出物分析を必要に応じて併用する。本スキームは医療機器の遺伝毒性および感作性評価に有用であると共に、現行の生物学的安全性試験を代替する手法となり得ると考えられる。今後、戦略的分析パッケージの実用化に向けた性能検証を進めていくと共に、国際的なコンセンサス形成を目指す。

6 おわりに

本稿では、医療機器の皮膚刺激性試験、感作性試験および家兎眼装用試験の動物実験代替法、並びに化学分析を用いた安全性評価法の現状と今後の課題等について紹介した。RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法は、「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」に既に収載されており、国内において利用可能である。皮膚刺激性強度の定量化や皮内反応試験への適応拡大等、当該 *in vitro* 試験法の高度化は今後の課題である。現在開発を進めているその他の新規試験法を含めて、将来的には、*in vivo* 試験との相関性および RRS により再現性・頑健性を評価した上で、標準化することを目指している。

文 献

- 1) ISO 10993-1: "Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process", (2018).
- 2) W. H. De Jong, S. Hoffmann, M. Lee, H. Kandárová, C. Pellevoisin, Y. Haishima, *et al.*: *Toxicology in Vitro*, **50**, 439, (2018).
- 3) H. Kandárová, H. Bendova, S. Letasiova, K. P. Coleman, W. H. De Jong, D. Jirova: *Toxicology in Vitro*, **50**, 433, (2018).
- 4) R. Kato, A. Miyajima, K. Komoriya, Y. Haishima: *Toxicology in Vitro*, **68**, 104919, (2020).
- 5) OECD: "The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins", Part 1, No.168, (2012), available from <<https://www.oecd.org/env/the-adverse-outcome-pathway-for-skin-sensitisation-initiated-by-covalent-binding-to-proteins-9789264221444-en.htm>>, (accessed 2020-11-06).
- 6) OECD: "Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation", No. 256, (2016), available from <<https://www.oecd.org/publications/guidance-document-on-the-reporting-of-defined-approaches-and-individual-information-sources-to-be-used-within-integrated-9789264279285-en.htm>>, (accessed 2020-11-06).
- 7) H. Johansson, A. S. Albrekt, C. A. K. Borrebaeck, M. Lindstedt, *Toxicology in Vitro*, **27**, 1163, (2013).
- 8) K. Mabuchi, H. Iwashita, R. Sakai, M. Ujihara, Y. Hori: *Biosurface and Biotribology*, under submission.
- 9) ISO 10993-18: "Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process", (2020).
- 10) R. Kroes, A. G. Renwick, M. Cheeseman, J. Kleiner, I. Mangelsdorf, A. Piersma, *et al.*, *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 65, (2004).
- 11) R. J. Safford, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **51**, 195, (2008).
- 12) R. J. Safford, A. O. Aptula, N. Gilmour, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **60**, 218, (2011).
- 13) R. J. Safford, A. M. Api, D. W. Roberts, J. F. Lalko, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **72**, 694, (2015).
- 14) D. W. Roberts, A. Marie Api, R. J. Safford, J. F. Lalko, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **72**, 683, (2015).
- 15) T. Nishijo, A. M. Api, G. F. Gerberick, M. Miyazawa, D. W. Roberts, R. J. Safford, H. Sakaguchi, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **117**, 104732, (2020).

著者紹介

【宮島敦子】国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第二室長
[専門] 細胞毒性学, 分子生物学, 医療機器レギュラトリーサイエンス (医療機器および医用材料の安全性・有効性評価)

【加藤玲子】国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
[専門] 分子生物学, 細胞毒性学, 免疫学, 医療機器レギュラトリーサイエンス (医療機器および医用材料の安全性・有効性評価)

【中岡竜介】国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 埋植医療機器評価室長
[専門] 高分子化学, 医療機器レギュラトリーサイエンス (医療機器および医用材料の安全性・有効性評価)

【野村祐介】国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第一室長
[専門] 分析化学, RNA工学, 構造生物学, 分子生物学, 医療機器レギュラトリーサイエンス (医療機器および医用材料の安全性・有効性評価)

【配島由二】国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長
[専門] 化学全般, 細菌学, 分子生物学, 医療機器レギュラトリーサイエンス (医療機器および医用材料の安全性・有効性評価)