

〈企画委員会シンポジウム〉

化学分析を利用した生体適合性評価法の開発 － 薬事を目指した分析戦略 －

○野村祐介¹, 福井千恵¹, 高原健太郎², 宮脇俊文³, 小野田 資⁴, 三輪怜史⁵,
内原有紀⁶, 薮島由二¹

国立医薬品食品衛生研究所¹, Thermo Fisher Scientific², 日本
Waters³, 東レリサーチセンター⁴,
一般財団法人化学物質評価研究機構⁵, 住化分析センター⁶

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



野村 祐介
nomura@nihs.go.jp

日本動物実験代替法学会第34回大会

〈企画委員会シンポジウム〉

化学分析を利用した生体適合性評価法の開発
－ 薬事を目指した分析戦略 －

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名: 野村祐介

演題発表に関連し、
開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

講演内容

- ①TTC, DSTを用いた安全性評価の概念
- ②現行のE&L分析の諸問題
- ③戦略的分析パッケージ

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

野村 祐介
nomura@nihs.go.jp

講演内容

- ①TTC, DSTを用いた安全性評価の概念
- ②現行のE&L分析の諸問題
- ③戦略的分析パッケージ

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

野村 祐介
nomura@nihs.go.jp

化学分析を併用した生安性評価手法は国際標準になりつつある

- ISO 10993-1, 17, 18, TS 21736 の改訂動向
- 動物実験の削減
- 試験コストの削減(医療機器分野の場合, 化学分析は non-GLP)

分析対象が決まっている場合

- 定性・定量が容易
- プロトコルが決まれば, 自動測定可能
- 対象化学物質の毒性データが存在すれば, 実使用条件を模した溶出試験結果から曝露量評価が可能

分析対象が不明な場合

- 原材料メーカーは全情報を開示しない
 - 不純物も含めた全組成が不明な場合, 網羅的な定性・定量分析は科学的に実施不可能
- ➔ 毒性学的懸念の閾値 (TTC)に基づく評価

TTCとは？

毒性学的懸念の閾値

TTC (Threshold of Toxicological Concern)

- TTCとは、あらゆる化学物質についてそれ以下の曝露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト曝露の閾値として設定される。
- 数多くの化学物質群あるいは毒性情報が不明の化学物質の安全性評価を包括的に行う方法を開発するため、過去の毒性試験データの統計学的解析により発展してきた。
- この手法は、香料や食品包装材料物質のような多くの物質で毒性学的情報は極めて限られているが、曝露量が通常極めて低く、多くの機能的に同類の物質を含む化学物質群を包括的に評価するのに有用であると考えられている。
- 現時点におけるTTCのエンドポイントとしては、保守的にがん原性、全身性、生殖発生毒性の評価を対象としている。その他の細胞毒性、刺激性、感作性等の主に局所性の評価にTTCアプローチを用いることについては、未だ業界的にはコンセンサスが得られていない。

ICH-M7が提唱するTTCレベル

個々の不純物に対する許容摂取量 (ISO/TS 21726も同様)

投与期間	≤1カ月	>1~12カ月	>1~10年	>10年(生涯)
1日摂取量 ($\mu\text{g}/\text{day}$)	120	20	10	1.5

除外成分

Kroes R, et. al, Food and Chemical Toxicology, 42:65-83 (2004)

構造アラートにより強力な発がん物質等であってTTCアプローチが不適切な化合物群

- Aflatoxin-like compounds
- Azoxy compounds
- Heavy metal
- N-Nitroso compounds
- Steroids
- Polyhalogenated dibenzodioxins, dibenzofrans, biphenyls

ISO/TS 21726 Section 5.3

Cohort of concern constituents

TI値がTTC未満の化学物質を含む化合物群として、上記の除外成分6群に併せて、右記の化合物群が例示されている。

- Azo compounds
- Polycyclic amines
- Strained heteronuclear rings
- Alpha-nitro furyl compounds
- Organophosphorous compounds
- Hydrazines/triazenes/azides/azoxy compounds

Dermal Sensitization Threshold (DST)

DST vs TTC

Safford RJ, Reg. Toxicol. Pharm., 51:195-200 (2008)
Safford RJ, et al. Reg. Toxicol. Pharm., 60:218-224 (2011)

Item	DST	TTC
Endpoint	Sensitization	Carcinogenicity
Chemicals with hazard	20%	20%
Bioassay	Mouse LLNA	Rat/mouse long-term bioassays
Hazard metric	EC3	TD50
Exposure units	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$
Data set	271 sensitizers	343 carcinogens
Extrapolation to man	Apply correlation formula and SAF	Linear extrapolation
Risk metric	Acceptable exposure level (AEL)	Virtual safe dose
Probably of acceptable risk	95%	95%

- 反応性化学物質: $\text{DST} = 64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
- 非反応性化学物質: $\text{DST} = 900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
- DST除外化合物: 非常に感作性の高い物質群(HPCs)
 - ・クライテリアに従い、化合物の構造に基づいて決定
 - ・金属には適用できない

本日の講演内容

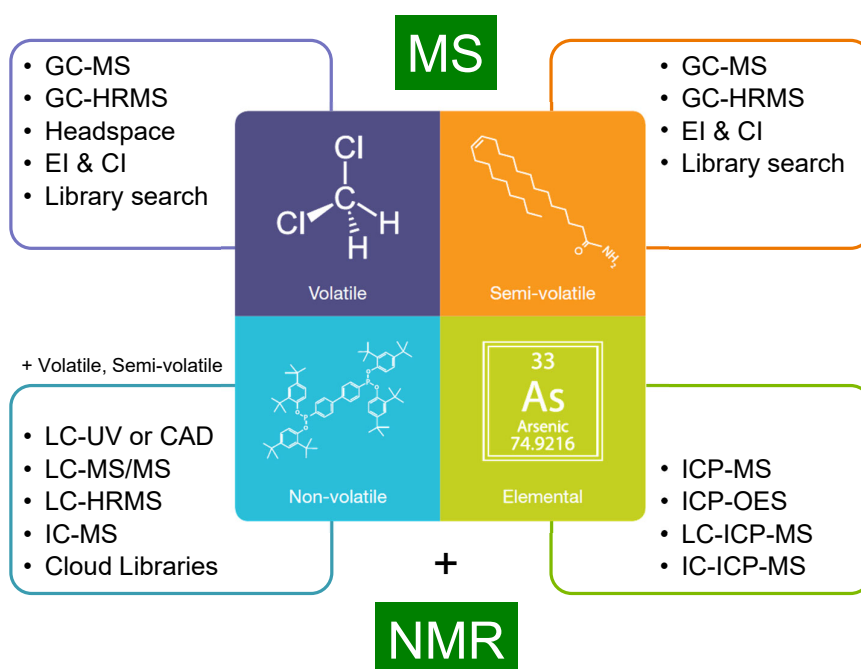
- ① TTC, DSTを用いた安全性評価の概念
- ② 現行のE&L分析の諸問題
- ③ 戦略的分析パッケージ

医療機器の3大材料

分析法: ISO/FDIS 10993-18 Table 3, 4 参照

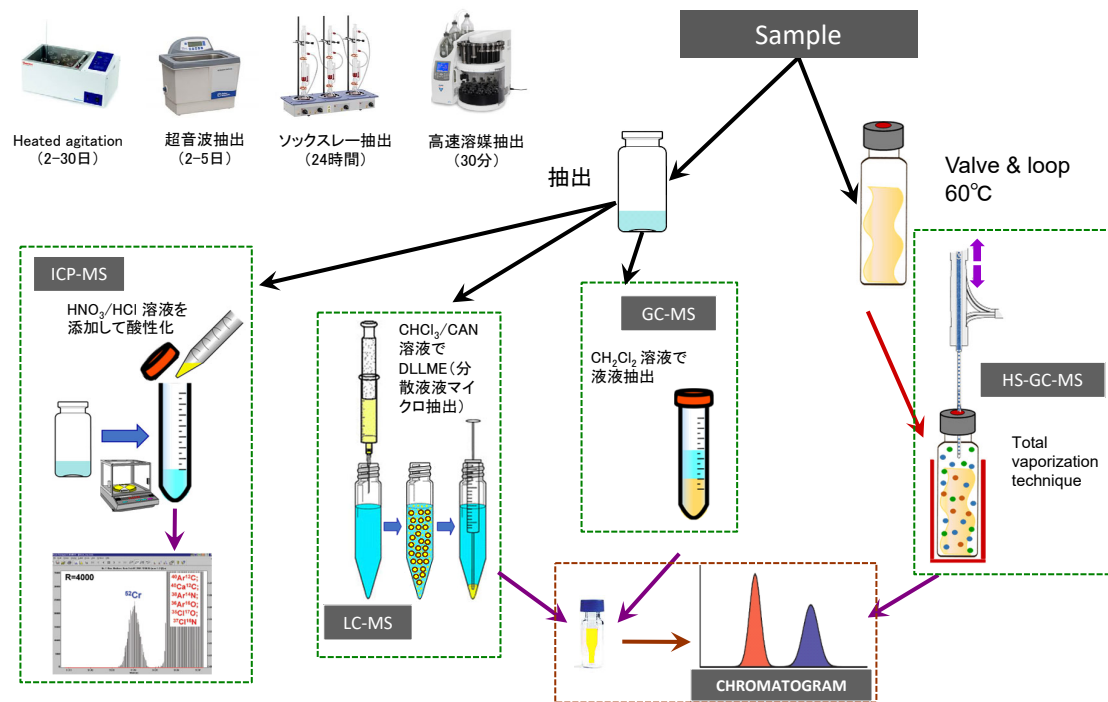
- 金属 } → 分析手法, 得られる結果ともに明確
- セラミックス } → 構成成分が多様なため, 質量分析計を利用した分析については, 方法論の選択と得られる結果の解釈が難しい。
- 合成高分子

化学分析法の適用分類



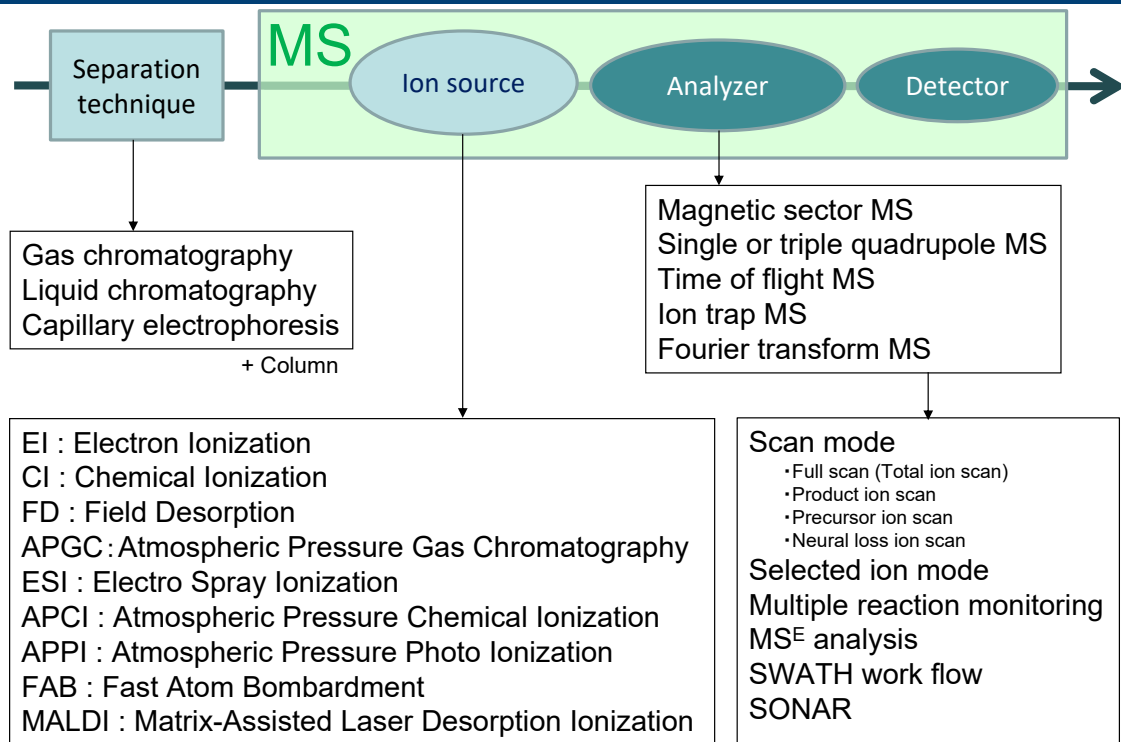
〈資料提供〉 ThermoFisher Scientific

サンプル前処理例



<資料提供> ThermoFisher Scientific

質量分析計を利用した分離分析

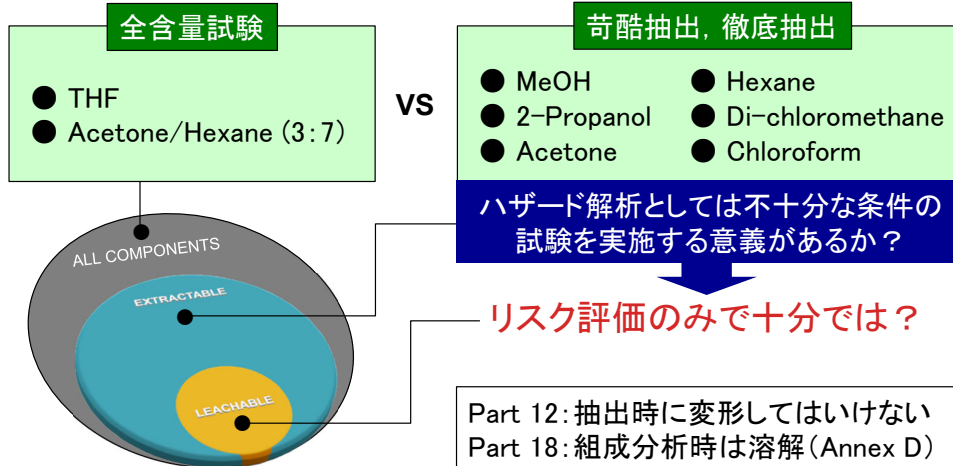


本来あるべきハザード解析の概念

ハザード解析 = 全含量試験

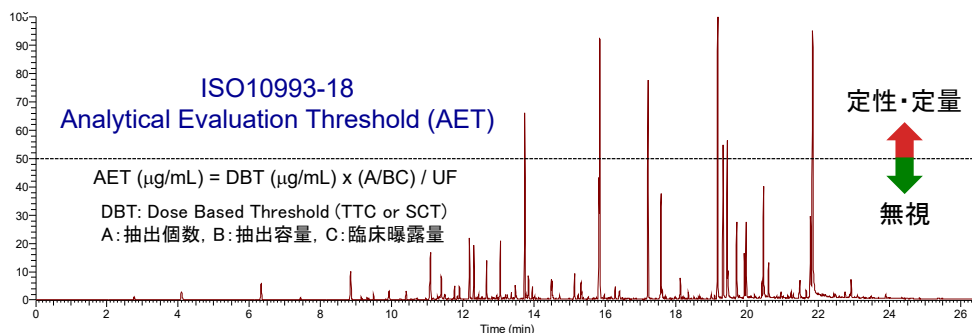
人の健康に不利益な影響を及ぼす原因となり得る遺伝毒性, 感作性, 慢性全身毒性等の要素(化学物質)を確実に検出すること

軟質ポリ塩化ビニルに含有される可塑剤の抽出法



【小括】 現行のE&L分析の課題

- ハザード解析の概念の科学的妥当性は?
- ハザード解析, リスク評価のどちらか, 若しくは両方必要か?
- 除外規定となる危険な化学物質を確実に検出できるか?
⇒ Full Scan Modeで測定するため, 感度が低い
- 確実に同定できるか?
- 適用する分析法の充足性は?
- AETを設定する標準物質の科学的妥当性は?
- 複合材料, 修飾体, 分解物のリスクも検出できるか?
- 分析データから薬事的に何が言えるか?



講演内容

- ①TTC, DSTを用いた安全性評価の概念
- ②現行のE&L分析の諸問題
- ③戦略的分析パッケージ

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

野村 祐介
nomura@nihs.go.jp

戦略的分析パッケージの提案(高分子材料)

除外規定となる危険な化学物質等の存在の有無を確実に検出する

考慮すべきポイント

- 射出成形過程において、酸化、脱水、脱炭酸等の修飾を受ける可能性がある
- 複合材料も存在する
- ハザードを確実に検出するためには、高感度分析が必要となる

解決法の基本戦略

- 分析対象: 感作性物質, 遺伝毒性物質
- SIM, MRM, 骨格サーチ, MS^E分析等を利用した差分解析(Neutral loss)
 - ⇒ 高分解能SIM, MRM解析によるターゲット分析(微量定量)
 - ⇒ 除外規定となる危険な化合物群は共通骨格を有するものが多い
 - ⇒ 除外規定となる危険な化合物群は共通の官能基脱離を起こすものが多い
 - ⇒ 抽出物の他、揮発性物質も分析対象とする(Pyrolysis GC-MS/MS)
- 既存試験法と組み合わせた評価
 - ⇒ in chemico Peptide Binding Assay(感作性物質)
 - ⇒ DNAアダクトーム解析(発がん性物質)
- ハザード解析(抽出物分析/全含量試験)として実施
- 抽出条件は材料毎に個別設定
- 必要に応じて、リスク評価(溶出物分析)を併用する

骨格サーチと差分解析の原理

汎用測定モード Scan mode ⇒ 全ての質量数のイオンを検出する手法(主に定性用)
MRM・SIM ⇒ 特定の質量数のイオンを高感度に検出する手法(定量用)

骨格サーチ 共通骨格(アラート構造)を検出する手法

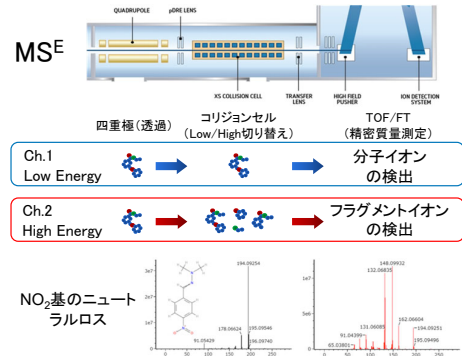
LBSA Alert ID	LBSA Alert Name	LBSA Pattern	LBSA Alert ID	LBSA Alert Name	LBSA Pattern
001	N-Hydroxyaryls		006	N-Methylols	
002	N-Acylated aminoaryls		007	N-Nireosamines	
003	Aza-aryl N-oxides		008	Nitro Compounds	
004	Aminoaryl and alkylated aminoaryls		009	Carbamates	
005	Aldehydes		010	Epoxides	

- 酸化体, 脱水体, 脱炭酸体, 複合材料のアラート構造も探知可能
- フラグメントイオンを追跡する(分子イオンの検出不要)
- EI mode GC-MSが有用(GC-MS/MS or HRMS)
- LC-MS及びAPGC-MSのようなソフトイオン化法では, MS^E又はSWATH/SONAR解析でMS/MSスペクトルを取得

差分解析 特定のニュートラルロスを検出する手法

◀スライド提供> 日本Waters

溶出するすべての化合物について、分子イオンの検出とフラグメントイオンの検出を同時に、網羅的に行なう分析手法



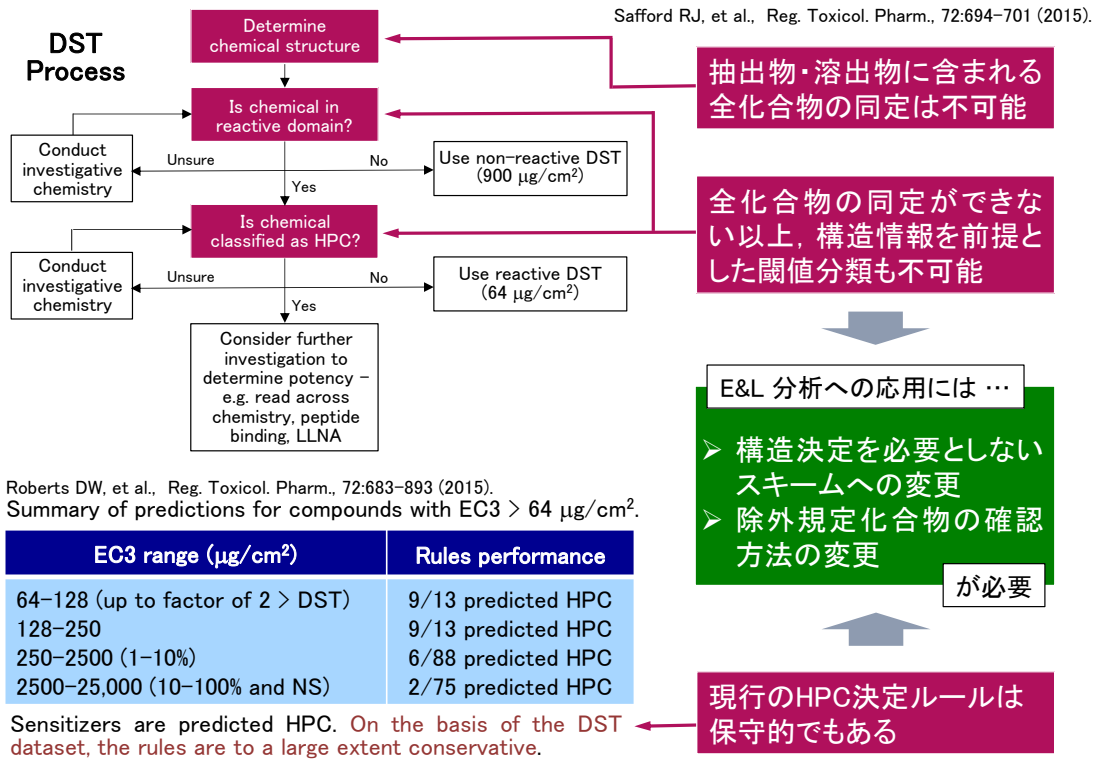
- 分子イオンとフラグメントイオンを同時に検出する
- GC-MS, LC-MSともにMS^E解析が有用(GC/LC-HRMS)
- ソフトウェアにより, 目的の差分を持つピークを特定
- SWATH/SONAR解析も利用できる可能性有り

戦略的分析パッケージ

感作性物質を対象とした分析パッケージ

- 新規DSTアプローチの提案
- 除外規定化合物の高感度分析
- In chemico Peptide Binding Assayによる化学分析の補填

DSTをE&L分析に応用する上での課題



E&L分析用DSTアプローチの提案

ハザード解析(除外規定化合物)

リスク評価(E&L分析)

Reactive DST 値(64 µg/cm²)以下の用量で感作性を発揮する全ての既知化合物の存在有無を確認

該当する化合物が検出されなければ、DST 値 = 64 µg/cm²から求めたAETを利用したリスク評価を実施

In chemico Peptide Binding Assayも併用し、化学分析による評価を補完する

新規DSTアプローチの特徴

- 明快な理論
- 除外規定化合物は随時更新が必要
- 評価対象化合物の構造情報不要
- DST 値 = 900 µg/cm²は採用しない
- 除外すべき化合物のみが除外規定

- 除外規定化合物の分析法の確立(MRM, 高分解能SIM)
- E&L分析と併用するin chemico Peptide Binding Assayの性能検証(ADRA)

感作性物質ハザード解析ステップ ①

MRM又は高分解能SIM分析により除外規定化合物の存在有無を確実に評価
DST算出に利用されたデータベース中の除外規定化合物(30種)のMS分析用パラメータ

Confidential

感作性物質ハザード解析ステップ ②

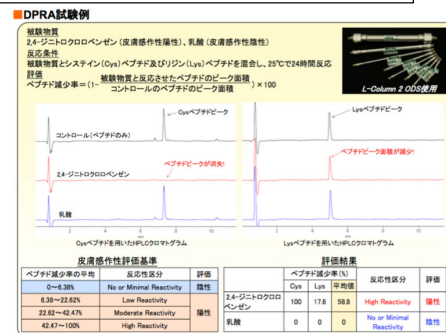
DPRA in chemico 皮膚感作性試験(OECD TG442C) (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA)

- 感作成立の初期反応である化学物質とタンパク質の結合に着目した皮膚感作性試験
- 被験物質と反応させ、ペプチドの減少率をHPLCを用いて評価

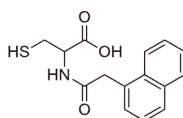
問題点

- ① 脂溶性物質の評価が困難
- ② 感度が低い

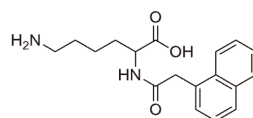
<出典> 化学物質評価研究機構HP



Amino acid derivative reactivity assay (ADRA) 感度、脂溶性問題を解決できる



NAC



NAL

- OECD TG442C
- UV : 280 nm
- 蛍光 : Ex 284 nm, Em 334 nm
⇒ 高感度化可能

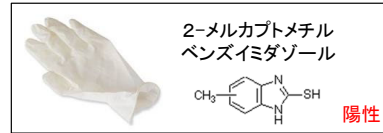
ADRAを用いたin chemico解析

DSTデータベース中の除外規定30化合物 Roberts DW, et al., Reg. Toxicol. Pharm., 72:683-893 (2015).	反応機構	ADRA評価結果
4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazoline-5-one	MA	陽性
Diphenylcyclopropenone	MA	陽性
p-Benzoquinone	MA	陽性
Bandrowski's base	MA	陽性
4-Nitro-benzene-1,2-diamine	MA(pro/pre)	陽性
4-((2-Hydroxyethyl)amino)-3-nitrophenol	MA(pro/pre)	陽性
2',3',4'-Trihydroxy chalcone	MA	陽性
1,4-Dihydroquinone	MA(pro/pre)	陽性
2,5-Diamino-toluene	MA(pro/pre)	陽性
4-Amino-3-nitrophenol	MA(pro/pre)	陽性
p-Phenylenediamine	MA(pro/pre)	陽性
4'-Hydroxychalcone	MA	陽性
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	MA	陽性
Glutaraldehyde	SB	陽性
Benzo[a]pyrene	S _N 2(pro/pre)	陽性
1-Chloromethylpyrene	S _N 2	陽性
7,12-Dimethylbenz[a]anthracene	S _N 2(pro/pre)	陽性
4-Nitrobenzyl bromide	S _N 2	陽性
N-Methyl-N-nitrosourea	S _N 2(pro/pre)	陽性
Dimethyl sulphate	S _N 2	陽性
Benzyl bromide	S _N 2	陽性
β-Propiolactone	S _N 2	陽性
1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine	S _N 2(pro/pre)	陽性
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	S _N Ar	陽性
Chlorothalonil	S _N Ar	陽性
cyanuric chloride	S _N Ar	陽性
Toluene 2,4-diisocyanate	Acyl	陽性
Fluorescein-5-isothiocyanate	Acyl	陽性
Tetrachlorosalicylanilide	Complex	陽性
Benzoxy peroxide	Peroxide	陽性

感作性試験用陽性対照材料



手術用手袋



医療用弾性ストッキング



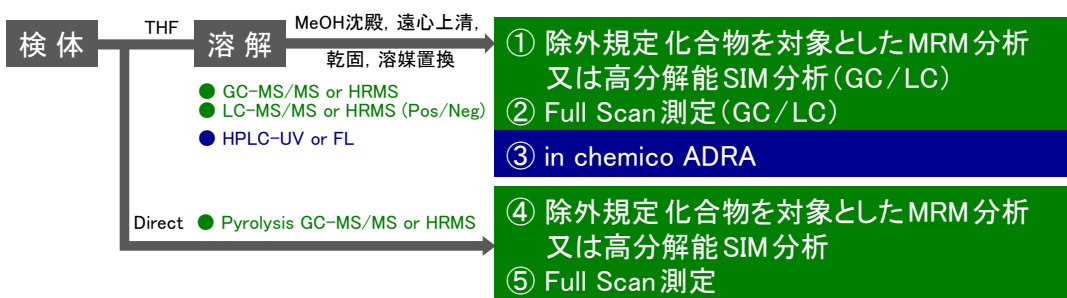
➤ 全アラート構造を検出可能

- ① Michael acceptors, ② S_NAr electrophiles,
- ③ S_N2 electrophiles, ④ Schiff base formers,
- ⑤ Acylating agents

➤ 事例収集を進める

➤ 将来的なスコア化を検討

感作性物質ハザード解析スキーム



MRM・SIM陽性 ⇒ DSTの概念が適用できないため、より詳細な分析又は動物試験を行う。

MRM・SIM陰性/ADRA陰性

- A) Full Scan分析において検出された全ピークがDSTから求めたAET以下であれば、感作性試験を免除。
- B) Full Scan分析においてAET以上のピークが認められた場合、実使用環境を模した疑似溶媒による溶出物のFull Scan分析を実施し、AET以下であれば感作性試験を免除。AET以上のピークが検出された場合は、より詳細な分析又は動物試験を行う。

MRM・SIM陰性/ADRA陽性

実使用環境を模した疑似溶媒による溶出物のFull Scan分析を実施し、検出された全ピークがAET以下であれば感作性試験を免除。AET以上のピークが検出された場合は、より詳細な分析又は動物試験を行う。

戦略的分析パッケージの提案

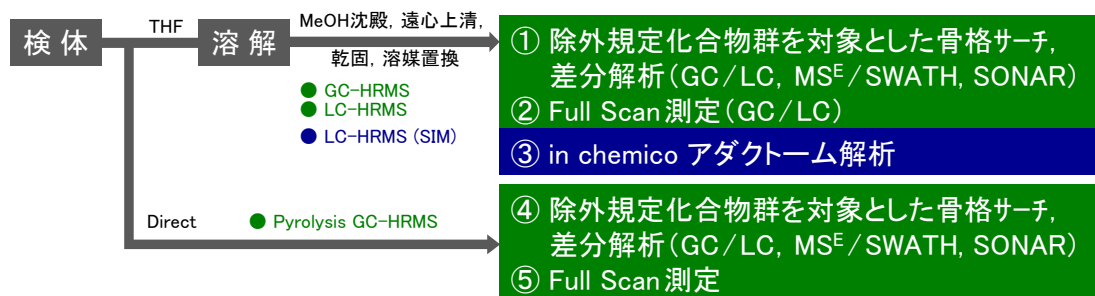
遺伝毒性物質を対象とした分析パッケージ

➤ 除外規定化合物群の高感度分析

- Aflatoxin-like compounds
- Azoxy compounds
- Heavy metal
- N-Nitroso compounds
- Steroids
- Polyhalogenated dibenzodioxins, dibenzofrans, biphenyls

➤ DNA アダクトーム解析による化学分析の補填

遺伝毒性物質ハザード解析スキーム



骨格サーチ・差分解析陽性

⇒ TTC概念が適用できないため, より詳細な分析又は動物試験を行う。

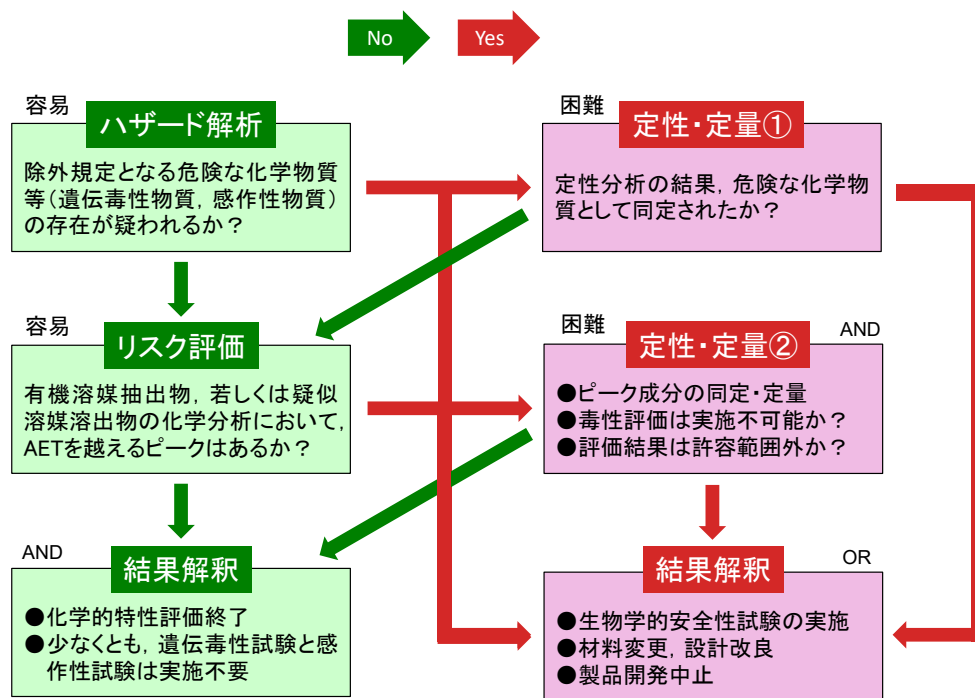
骨格サーチ・差分解析陰性/アダクトーム陰性

- A) Full Scan 分析において検出された全ピークがTTCから求めたAET以下であれば, 遺伝毒性試験を免除。
- B) Full Scan 分析においてAET以上のピークが認められた場合, 実使用環境を模した疑似溶媒による溶出物の Full Scan 分析を実施し, AET以下であれば遺伝毒性試験を免除。AET以上のピークが検出された場合は, より詳細な分析又は動物試験を行う。

同陰性/アダクトーム陽性

- 実使用環境を模したリスク評価を実施する。
 - 必要に応じて, より詳細な分析又は動物試験を行う。
- ⇒ 現実的には, 材料変更?

【総括】化学分析によるリスク評価手法の提案



化学分析を利用した安全性評価のポイント

化学分析の妥当性

- 分析の目的は何か? 何を分析したいのか? 定性? 定量?
- 計画した分析試験は目的の化学物質を分析する上で適切か?
- AET等の閾値の算出方法及び妥当性について説明しているか?
- 使用した分析システムは適切か?

信頼できる分析結果であると判断された場合

化学物質のリスク評価

- 有害性確認を行い, 用量反応評価, 曝露評価を行っているか?
- 評価過程における計算値(例: TI, POD)の適切性について説明されているか?
- 実臨床使用下における最大曝露量を想定しているか?
- 安全域(MOS)の計算根拠と結果から導き出される安全性評価を行っているか?

【令和2年1月6日付け薬生機審発0106第1号】

化学的分析の結果に基づき生物学的安全性評価に係る試験の一部を省略しようとする場合は, 承認申請前にPMDAが行う対面助言(医療機器評価相談(安全性)等)を利用することが望ましい。

終わりに

ご静聴ありがとうございました

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

野村 祐介
nomura@nihs.go.jp