

〈企画委員会シンポジウム〉

医療機器分野における動物実験代替法の 開発状況と今後の展望

○ 薮島由二¹, 宮島敦子¹, 中岡竜介¹, 野村祐介¹, 加藤玲子¹, 福井千恵¹, 横山結実¹,
藤巻日出夫², 松永透³, 猪俣依子⁴, 笠原利彦⁵, 水町秀之⁶

国立衛研¹, 民生科学協会², シード³, テルモ⁴, 富士フイルム⁵, 花王⁶

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

薮島 由二
haishima@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〉

医療機器分野における動物実験代替法の開発状況と今後の展望

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：薮島由二

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。

本日の講演内容

① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価

- ISO 10993シリーズと国内規制の関係
- 評価のエンドポイント, 試験液の調製

② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法

- ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
- 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhEモデルを利用したin vitro刺激性試験

③ 現在開発中の動物実験代替法

- 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
- 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCEモデルを利用したin vitro刺激性試験
- 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価

④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

⇒ 新たな「Reduction」にも繋がる可能性

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



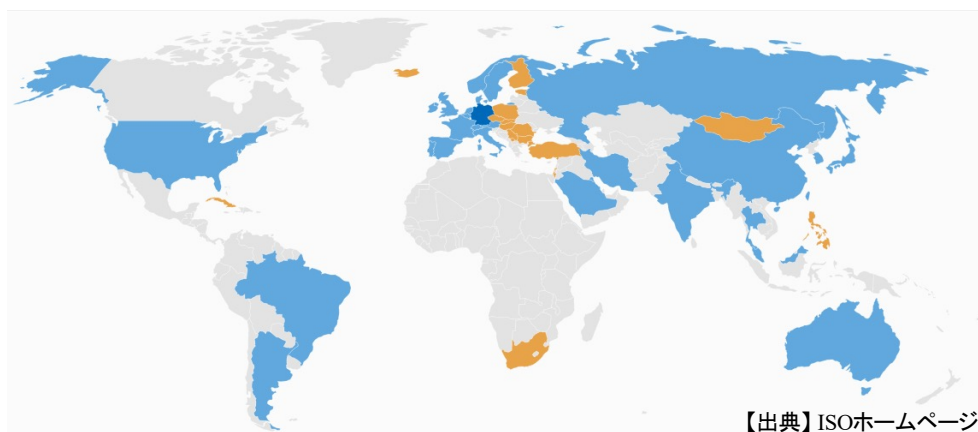
Division of
Medical
Devices

齧島 由二
haishima@nihs.go.jp

ISO/TC 194

ISO/TC 194 Biological and clinical evaluation of medical products

議長: Dr. Jeremy Tinkler (英国), 幹事国: ドイツ, 設立: 1989年



【出典】ISOホームページ

医療機器の生物学的安全性評価法の国際標準化を目的として設立されたTC

P-member(青色) 32ヶ国, O-member(黄色) 20ヶ国

17のWGのうち3つのWGの議長はFDA所属(日本も1つWG議長を取っている)

国内審議団体: 日本医療機器テクノロジー協会 (MT JAPAN)

国内委員会: 総勢37名(産官学)

委員長: 齧島由二, 副委員長: 坂口圭介(テルモ), 岸田晶夫(東京医歯大)

ISO/TC194の体制とISO 10993シリーズ

ISO/TC194 Biological evaluation of medical devices

| WG/SC No. | WG name | ISO 10993 Series |
|-----------|---|---|
| WG1 | Approach to biological evaluation and terminology | Part 1: Evaluation and testing in the risk management process |
| WG2 | Degradation aspects related to biological testing | Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys |
| WG3 | Animal protection aspects | Part 2: Animal welfare requirements |
| WG4 | Clinical investigations of medical devices in humans | ISO 14155 Good clinical practice |
| WG5 | Cytotoxicity | Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity |
| WG6 | Mutagenicity, carcinogenicity and reproductive toxicity | Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity |
| WG7 | Systemic toxicity | Part 11: Tests for systemic toxicity Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices |
| WG8 | Irritation, sensitization | Part 10: Tests for skin sensitization Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE) |
| WG9 | Effects on blood | Part 4: Selection of tests for interactions with blood |
| WG10 | Implantation | Part 6: Tests for local effects after implantation |
| WG11 | Allowable limits for leachable substances | Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances TS 21726 : Application of the threshold of toxicological concern (TTC) for assessing biocompatibility of extractable substances from medical devices |
| WG12 | Sample preparation and reference materials | Part 12: Sample preparation and reference materials |
| WG13 | Toxicokinetics | Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables |
| WG14 | Material characterization | Part 18: Chemical characterization of materials Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials |
| WG15 | Strategic approach to biological assessment | TR 15499 : Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process |
| WG16 | Pyrogenicity | TR 21582 : Principle and method for pyrogen testing of medical devices |
| WG17 | Nanomaterials | Part 22: Guidance on nanomaterials |

P-member 32カ国, O-member 20カ国

ISO/TC194の体制とISO 10993シリーズ

ISO/TC194 Biological evaluation of medical devices

| WG/SC No. | WG name | ISO 10993 Series |
|-----------|---|---|
| WG1 | Approach to biological evaluation and terminology | Part 1: Evaluation and testing in the risk management process |
| WG2 | Degradation aspects related to biological testing | Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys |
| WG3 | Animal protection aspects | Part 2: Animal welfare requirements |
| WG4 | Clinical investigations of medical devices in humans | ISO 14155 Good clinical practice |
| WG5 | Cytotoxicity | Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity |
| WG6 | Mutagenicity, carcinogenicity and reproductive toxicity | Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity |
| WG7 | Systemic toxicity | Part 11: Tests for systemic toxicity Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices |
| WG8 | Irritation, sensitization | Part 10: Tests for skin sensitization Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE) |
| WG9 | Effects on blood | Part 4: Selection of tests for interactions with blood |
| WG10 | Implantation | Part 6: Tests for local effects after implantation |
| WG11 | Allowable limits for leachable substances | Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances TS 21726 : Application of the threshold of toxicological concern (TTC) for assessing biocompatibility of extractable substances from medical devices |
| WG12 | Sample preparation and reference materials | Part 12: Sample preparation and reference materials |
| WG13 | Toxicokinetics | Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables |
| WG14 | Material characterization | Part 18: Chemical characterization of materials Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials |
| WG15 | Strategic approach to biological assessment | TR 15499 : Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process |
| WG16 | Pyrogenicity | TR 21582 : Principle and method for pyrogen testing of medical devices |
| WG17 | Nanomaterials | Part 22: Guidance on nanomaterials |

P-member 32カ国, O-member 20カ国

ISO 10993-1と国内規制の関係

ISO/TC194 Biological evaluation of medical devices

| WG/SC No. | WG name | ISO 10993 Series |
|-----------|---|---|
| WG1 | Approach to biological evaluation and terminology | Part 1: Evaluation and testing in the risk management process |
| WG2 | Degradation aspects related to biological testing | Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys |
| WG3 | | |
| WG4 | | |
| WG5 | | |
| WG6 | | |
| WG7 | | |
| WG8 | | Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE) |
| WG9 | | |
| WG10 | | |
| WG11 | | IS 21726 : Application of the threshold of toxicological concern (TTC) for assessing biocompatibility of extractable substances from medical devices |
| WG12 | Sample preparation and reference materials | Part 12: Sample preparation and reference materials |
| WG13 | Toxicokinetics | Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables |
| WG14 | Material characterization | Part 18: Chemical characterization of materials Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials |
| WG15 | Strategic approach to biological assessment | TR 15499 : Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process |
| WG16 | Pyrogenicity | TR 21582 : Principle and method for pyrogen testing of medical devices |
| WG17 | Nanomaterials | Part 22: Guidance on nanomaterials |

P-member 32カ国, O-member 20カ国

ISO 10993 試験法シリーズと国内規制の関係

ISO/TC194 Biological evaluation of medical devices

| WG/SC No. | WG name | ISO 10993 Series |
|-----------|---|---|
| WG1 | Approach to biological evaluation and terminology | Part 1: Evaluation and testing in the risk management process |
| WG2 | Degradation aspects related to biological testing | Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys |
| WG3 | Animal protection aspects | Part 2: Animal welfare requirements |
| WG4 | Clinical investigation | |
| WG5 | Cytotoxicity | |
| WG6 | Mutagenicity, cytotoxicity | |
| WG7 | Systemic toxicity | |
| WG8 | Irritation, sensitization | |
| WG9 | Effects on blood | |
| WG10 | Implantation | |
| WG11 | Allowable limits | |
| WG12 | Sample preparation | |
| WG13 | Toxicokinetics | Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables |
| WG14 | Material characterization | Part 18: Chemical characterization of materials Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials |
| WG15 | Strategic approach to biological assessment | TR 15499 : Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process |
| WG16 | Pyrogenicity | TR 21582 : Principle and method for pyrogen testing of medical devices |
| WG17 | Nanomaterials | Part 22: Guidance on nanomaterials |

P-member 32カ国, O-member 20カ国

生物学的安全性評価の進め方

1. 構成原材料の特定(物理的・化学的特性)

情報収集。必要に応じ、Chemical characterizationの実施

2. 同等性(vs.既存医療機器)/毒性情報検証

同等性や安全性考察に十分な根拠があれば、3をスキップ

3. 生物学的安全性試験の実施

細胞毒性・感作性・刺激性・急性毒性・発熱性物質・溶血性(亜急性毒性・遺伝毒性)等, 表A.1を参考に項目選択

4. 毒性リスク評価

試験データ, 摂取許容値, 使用実績等の情報から

5. 安全性判断と文書化: 総括報告書

カテゴリ分類と評価のエンドポイント

Endpoints to be addressed in a biological risk assessment

| Medical device categorization by | | | Endpoints of biological evaluation | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|--|--------------------------------------|--------------|---------------|---|--------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|------------------|----------------------|-------------------|--------------|-----------------|-------------------------------------|-------------|
| Category | Contact | Contact duration A - limited (≤24 h) B prolonged (>24 h to 30 d) C - Longterm (>30 d) | Physical and/or chemical information | Cytotoxicity | Sensitization | Irritation or intracutaneous reactivity | Material mediated pyrogenicity | Acute systemic toxicity | Subacute toxicity | Subchronic toxicity | Chronic toxicity | Implantation effects | Hemocompatibility | Genotoxicity | Carcinogenicity | Reproductive/developmental toxicity | Degradation |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Surface medical device | Intact skin | A | X | E | E | E | | | | | | | | | | | |
| | | B | X | E | E | E | | | | | | | | | | | |
| | | C | X | E | E | E | | | | | | | | | | | |
| | Mucosal membrane | A | X | E | E | E | | E | E | | | | | | | | |
| | | B | X | E | E | E | | E | E | E | E | E | | | | | |
| | | C | X | E | E | E | | E | E | E | E | E | | E | | | |
| Breached or compromised surface | A | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | | | | |
| | B | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | | | | |
| | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | | | |
| Externally communicating medical device | Blood path, indirect | A | X | E | E | E | E | E | | | | | E | | | | |
| | | B | X | E | E | E | E | E | | | | | E | | | | |
| | | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | | |
| | Tissue/bone/dentin | A | X | E | E | E | E | E | | | | | | E | | | |
| | | B | X | E | E | E | E | E | E | | | | | E | | | |
| | | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | | |
| Circulating blood | A | X | E | E | E | E | E | | | | | | E | E | | | |
| | B | X | E | E | E | E | E | E | | | | | E | E | | | |
| | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | E | | |
| Implant medical device | Tissue/bone | A | X | E | E | E | E | E | | | | | | E | | | |
| | | B | X | E | E | E | E | E | E | | | | | E | | | |
| | | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | E | |
| | Blood | A | X | E | E | E | E | E | | | | | | E | E | | |
| | | B | X | E | E | E | E | E | E | | | | | E | E | | |
| | | C | X | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | E | E | E | |

X means prerequisite information needed for a risk assessment. E means endpoints to be evaluated in the risk assessment.

試験液の調製法

ISO 10993-12 / 国内ガイダンス「付録」

抽出媒体の選択方法

- 医療機器の材料特性を考慮する（金属，セラミックス，高分子，天然医用材料等）
- 製品の使用条件を考慮する（接触部位，期間等）
- 試験の目的を考慮する（ハザードの検出/臨床使用時のリスク評価等）
- 各試験に必要な抽出時間の適切性を考慮する（実臨床条件 vs ワorstケース等）

材料/溶媒抽出比

極性・非極性溶媒 + 有機溶媒

| 厚さ (mm) | 抽出溶媒 1 mL に対する試験試料の量 (許容範囲±10%) | 試験試料の形状の例 |
|--------------|---------------------------------|-----------------------|
| <0.5 | 6 cm ² | フィルム，シート，チューブ |
| 0.5~1.0 | 3 cm ² | チューブ，平板，小型の成型物 |
| >1.0 | 3 cm ² | 大型の成型物 |
| >1.0 | 1.25 cm ² | ゴム栓等の弾性材料 |
| 不規則な形状の硬質材料 | 0.2 g | 粉末，ペレット，フォーム状，非吸収性成型物 |
| 不規則な形状の多孔性材料 | 0.1 g | メンブランフィルター，繊維製品 |

抽出温度・時間

- (1) 121±2°C 1±0.1時間
- (2) 70±2°C 24±2時間
- (3) 50±2°C 72±2時間
- (4) 37±1°C 72±2時間

上記条件のうち、試験試料が耐えられる条件を選択する。試験試料が耐えられる条件とは、以下を満たすものである。

- 1) 抽出温度は材料の融点より低い。
- 2) 抽出条件で材料が著しく変形しない。
- 3) 溶出物質が揮発あるいは分解しない。

原則，攪拌・循環抽出を行う

本日の講演内容

① イントロダクション：医療機器の生物学的安全性評価

- ISO 10993シリーズと国内規制の関係
- 評価のエンドポイント，試験液の調製

② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法

- ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
- 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhEモデルを利用したin vitro刺激性試験

③ 現在開発中の動物実験代替法

- 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
- 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCEモデルを利用したin vitro刺激性試験
- 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価

④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

靄島 由二
haishima@nihs.go.jp

発熱性物質の種類と発熱機序

発熱性物質

①エンドトキシン

最も強力な発熱性物質

非エンドトキシン
性発熱性物質

②エンドトキシンを除く各種の微生物由来成分

③化学物質に相当する材料由来の発熱性物質
(Material-mediated Pyrogen)

発熱機序

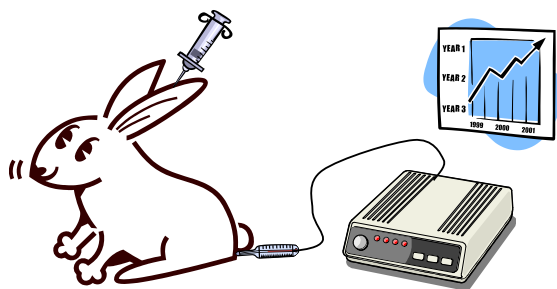
- (1) サイトカインネットワークを介して発熱を惹起する物質 → 発熱性物質①, ②
- (2) 体温調節に関与する中枢神経系に直接作用する物質
- (3) 酸化的リン酸化の脱共役剤 → 発熱性物質③
- (4) その他, 作用機序の不明な物質

検出可能な発熱性物質

- (1) 【日局】発熱性物質試験法 → 発熱性物質①, ②, ③
- (2) 【日局】エンドトキシン試験法 → 発熱性物質①
- (3) Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT) → 発熱性物質①, ②

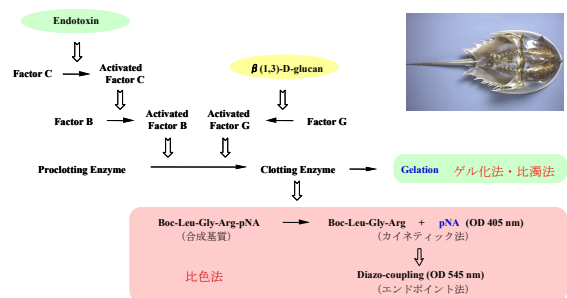
日局等に収載されている発熱性物質試験法

ウサギ発熱試験



長所: 生体における発熱反応を評価できる
短所: 低感度, 繁雑, 動物の使用

エンドトキシン試験



長所: 高感度, 簡易, 短時間
短所: 評価対象がエンドトキシンのみ

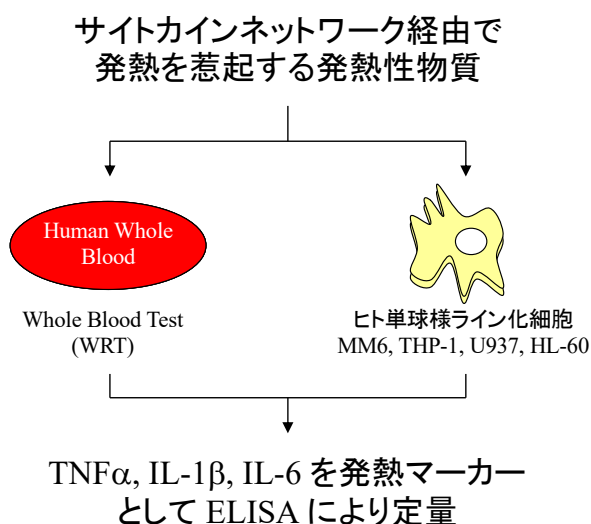
両試験法に共通した特徴

- ① ヒトに対する発熱性を間接的に予測する評価法
- ② 抽出液を試料として使用するため回収率を考慮する必要がある

ヒト細胞を利用したin vitro 発熱性物質試験(HCPT)

- JP非収載
- EP収載(2.6.30:MAT), USP(151:同等性の検証をもって使用可能)
- ISO/TR 21582:2021「Pyrogenicity」収載試験法
- 生安性ガイダンス通知「第7部:発熱性物質試験」参考情報

測定原理



長 所

- ①簡易・高感度
- ②動物を使用しない
- ③固形試料の評価が可能
- ④発熱性物質の検出範囲が広い
- ⑤ヒトに対する発熱性を直接評価可能

第3の発熱性物質試験法として
非常に有用である

JaCVAMの審議結果(抜粋)

評価報告書 In vitro 発熱性物質試験 (平成22年12月)

- 当該試験法は、エンドキシンによる発熱の機序をもとに考案された方法であり、原理面で科学的な妥当性はある。
- バリデーション研究によって、ウサギ発熱性物質試験法との相関性も概ね高いと思われるが、これを代替法として採用するためには、化合物数を増やし、多施設バリデーションを実施することが必要である。
- 現時点でエンドキシン試験にかわるものではない。本邦においては、日本薬局方15局でウサギを用いる発熱性物質試験からエンドキシン試験への移行が進められている現状を踏まえると、利用価値は限定的と言える。
- 有望な試験法と考えられるが、現時点では、ただちに代替法として採用することは妥当でない。

試験液調製時の回収効率に影響される医療機器の評価では
有用な事例が存在する

剪刀の汚染実態調査

<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
再製造単回使用医療機器の洗浄工程における
清浄性評価に関する研究

A病院の剪刀のHCPT結果

| 検体 | EU/検体 | 平均 | SD |
|-----------|-------|------|------|
| AC-1 (2本) | 1.07 | 1.35 | 0.68 |
| AC-2 (2本) | 0.994 | | |
| AC-3 (2本) | 2.56 | | |
| AC-4 (2本) | 0.997 | | |
| AC-5 (2本) | 1.15 | | |



IL-6産生量 ⇒ EU値換算

B病院の剪刀のHCPT結果

| 検体 | EU/検体 | 平均 | SD |
|-----------|-------|------|------|
| AC-1 (2本) | 1.33 | 1.85 | 0.48 |
| AC-2 (2本) | 1.75 | | |
| AC-3 (2本) | 1.53 | | |
| AC-4 (2本) | 2.53 | | |
| AC-5 (2本) | 2.10 | | |

C病院の剪刀のHCPT結果

| 検体 | EU/検体 | 平均 | SD |
|-----------|-------|------|-----|
| AC-1 (2本) | 9.54 | 11.5 | 1.9 |
| AC-2 (2本) | 10.9 | | |
| AC-3 (2本) | 12.5 | | |
| AC-4 (2本) | 10.4 | | |
| AC-5 (2本) | 14.3 | | |

D病院の剪刀のHCPT結果

| 検体 | EU/検体 | 平均 | SD |
|-----------|-------|------|-----|
| AC-1 (2本) | 3.37 | 12.0 | 6.2 |
| AC-2 (2本) | 20.7 | | |
| AC-3 (2本) | 12.6 | | |
| AC-4 (2本) | 10.5 | | |
| AC-5 (2本) | 12.8 | | |

赤字: 脳・脊髄液接触デバイスのエンドキシン限度値 (2.15 EU/device) を超える汚染

剪刀の汚染実態調査

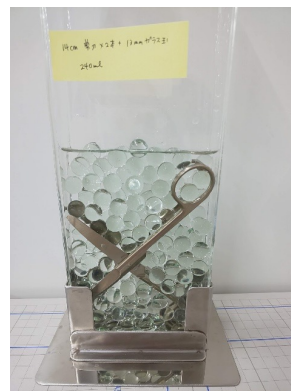
<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
再製造単回使用医療機器の洗浄工程における
清浄性評価に関する研究

各病院の剪刀のエンドキシン試験結果

| 医療機関 | 滅菌方法 | エンドキシン量 (EU/device) |
|------|------|---------------------|
| A | AC | 0.0282 |
| B | AC | ND |
| C | AC | 0.0500 |
| D | AC | 0.0315 |
| E | AC | 0.0976 |
| F | AC | 0.0431 |

Jpn J Med Instrum, 91(4):323-331 (2021) より一部抜粋

抽出方法



抽出溶媒: PEG/EDTA/Tween溶液 (400 mL)
抽出方法: 一晚膨潤⇒超音波処理
濃縮操作: 限外濾過により1 mLに濃縮

- いずれの検体からもエンドキシンは殆ど検出されない
- 400倍濃縮せずに原液で測定した場合, 全てNDとなる
- HCPTとエンドキシン試験は最大で2,000倍程度の感度差がある
- エンドキシン試験では, 擬陰性結果が得られる可能性が高い!

ISO/TR 21582:2021 ⇒ 試験目的に応じて適切な試験法を選択

本日の講演内容

① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価

- ISO 10993シリーズと国内規制の関係
- 評価のエンドポイント, 試験液の調製

② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法

- ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
- 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhEモデルを利用した in vitro 刺激性試験

③ 現在開発中の動物実験代替法

- 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
- 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCEモデルを利用した in vitro 刺激性試験
- 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価

④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

靄島 由二
haishima@nihs.go.jp

刺激性試験動物実験代替法

<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
医療機器の規制環境と国際標準化推進支援
体制の整備に関する研究

in vivo 試験



in vitro 試験

皮膚一次刺激性試験

刺激性物質が角質層を通過し浸透することを発端とした一連の現象の結果である紅斑や浮腫の程度として皮膚刺激性を評価する試験である。

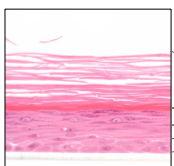
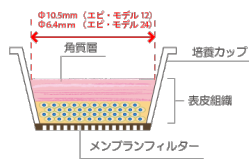
皮内反応試験

医療機器が生体内組織に接触する場合の皮膚組織傷害を紅斑や浮腫の程度として評価する試験である。

再構築ヒト培養皮膚 (RhE) モデルを利用した in vitro 刺激性試験法を開発

RhEモデル: ヒト正常皮膚と類似構造

<出典> J-TECホームページ

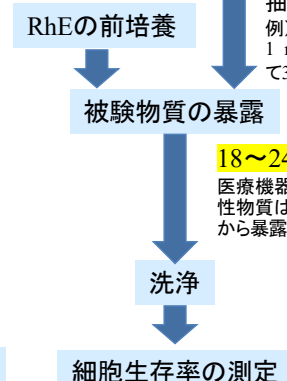
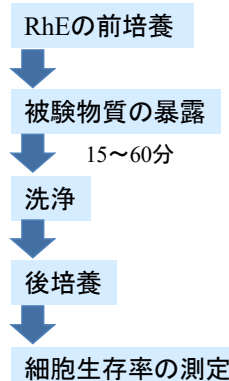


モデル表面が空気暴露の状態であるため、極性及び非極性溶媒ともに適用できることから、医療機器の抽出液(例: 生理食塩液, ゴマ油)を用いた試験にも適用可能である。

OECD TG 439と医療機器用試験プロトコルとの相違点

OECD TG 439

医療機器用試験プロトコル



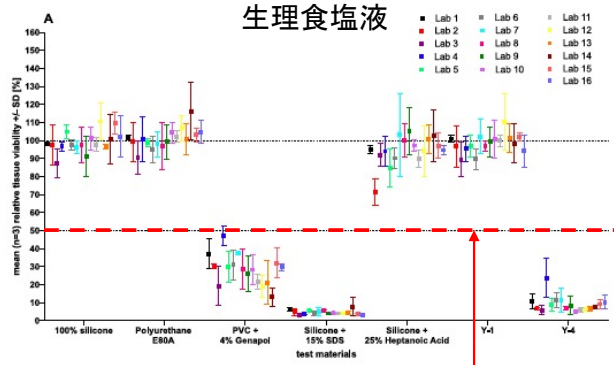
抽出液の調製

抽出はISO10993-12に従う。
例) 6 cm²の試験試料に対して
1 mLの生理食塩液及びゴマ油に
て37°C, 72時間抽出する。

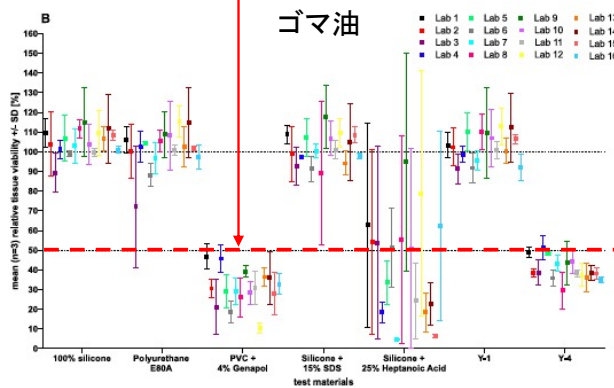
18~24時間

医療機器の抽出液中に含有される刺激性物質は低濃度であると考えられることから暴露時間が延長された。

ISO/TC 194/WG 8が実施した国際ラウンドロビンテストの結果



生存率が50%以下の場合刺激性有と判定



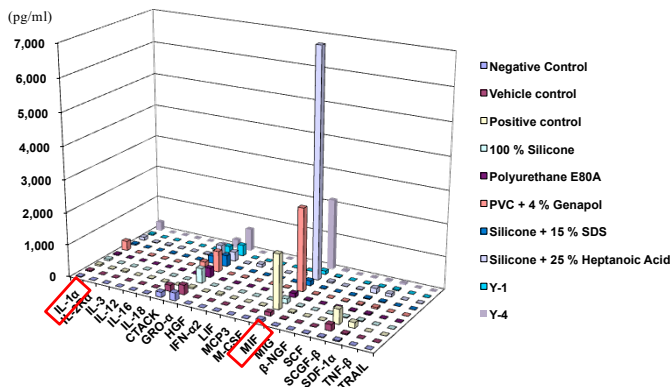
Toxicology in Vitro, 50:439-449 (2018) より一部抜粋

| No. | RRS用試験物質 | 期待される判定結果 | | |
|-----|-------------------------------|-----------|-----|------|
| | | 生食 | ゴマ油 | 総合判定 |
| 1 | 100% Silicone | NI | NI | NI |
| 2 | Polyurethane E80A | NI | NI | NI |
| 3 | PVC + 4% Genapol | ↓ | ↓ | ↓ |
| 4 | Silicone + 15% SDS | ↓ | NI | ↓ |
| 5 | Silicone + 25% Heptanoic Acid | NI | ↓ | ↓ |
| 6 | Y-1 (PVC negative control) | NI | NI | NI |
| 7 | Y-4 (PVC-Genapol X-080) | ↓ | ↓ | ↓ |

HAを除く被験物質においては、殆どの参加施設で期待される刺激性・非刺激性と一致する結果が得られ、当該試験の有用性が示された。

RhEモデルを利用した刺激性試験は、令和2年1月6日付け薬生機審発0106第1号通知別添「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」とISO10993-23:2021「Tests for irritation」に記載され、医療機器の刺激性試験の第一選択肢とすることが推奨されている。

RhEモデルを利用したin vitro 刺激性試験の高度化



Toxicology in Vitro, 68:104919 (2020) より一部抜粋

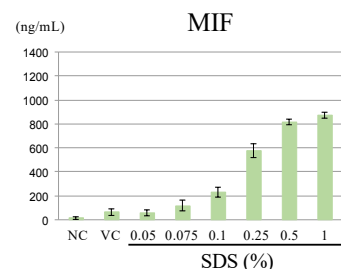
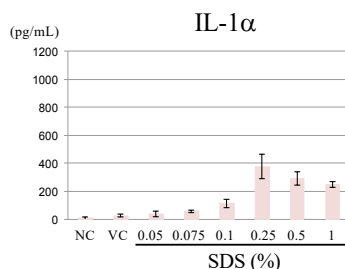
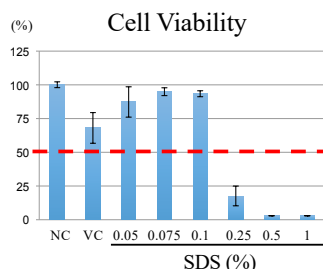
炎症性マーカーの探索

- EpiDerm model
- RRテスト標準品ゴマ油抽出液
- 培養上清
- Bio-Plex Human Cytokine 21-Plex

MIF: マクロファージ遊走阻害因子

サイトカインカスケードの上位に位置し、種々の炎症性サイトカインを誘導して炎症反応を悪化させる因子

確度・感度の向上



- 二次マーカーとして、IL-1α又はMIFを測定することにより、確度及び感度の向上が期待できる
- IL-1αと比較して、MIFは用量依存性に優れている ⇒ スコアリング化の指標になり得る？

In vitro 及び in vivo 刺激性試験の検出感度

< 1-Methyl-3-phenylpiperazine >

LabCyte モデル

| conc. | MTT (%) | MIF (S/N) | IL-1 α (S/N) |
|----------|---------|-----------|---------------------|
| PC | 0.71 | 43.72 | 212.81 |
| VC | 95.68 | 1.83 | 1.78 |
| 10 mg/mL | 74.94 | 77.28 | 483.91 |
| 15 mg/mL | 40.10 | 101.15 | 428.77 |
| 20 mg/mL | 48.00 | 127.92 | 386.08 |

in vitro
試験

EpiDerm モデル

| conc. | MTT (%) | MIF (S/N) | IL-1 α (S/N) |
|----------|---------|-----------|---------------------|
| PC | 4.36 | 31.73 | 9.35 |
| VC | 103.24 | 0.85 | 0.90 |
| 10 mg/mL | 81.93 | 6.69 | 3.78 |
| 15 mg/mL | 29.05 | 20.00 | 5.91 |
| 20 mg/mL | 12.93 | 24.62 | 5.52 |

皮膚一次刺激性試験

| conc. | 一次刺激点数 | 一次刺激指数 | 評価 |
|-----------|--------|--------|-----|
| 生食 | 0 | | |
| 10 mg/mL | 0 | 0.0 | 無刺激 |
| 50 mg/mL | 0.67 | 0.7 | 多少 |
| 200 mg/mL | 5.23 | 5.2 | 激しい |

in vivo
試験

皮内反応試験

| conc. | 実測値 | 最終評価点 | 評価 |
|----------|-----|-------|-----|
| 生食 | 0 | | |
| 5 mg/mL | 0.1 | 0.1 | 刺激無 |
| 10 mg/mL | 1.9 | 1.9 | 刺激有 |
| 20 mg/mL | 4.9 | 4.9 | 刺激有 |

| その他の化学物質 | 刺激性検出感度 |
|--|---------------------------------------|
| 2-Chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypridine | RhEモデル > 皮膚一次刺激性試験 = 皮内反応試験 |
| 1-Bromothexane | 皮内反応試験 \geq RhEモデル \geq 皮膚一次刺激性試験 |
| Cinnamaldehyde | RhEモデル > 皮内反応試験 = 皮膚一次刺激性試験 |
| Heptanal | RhEモデル > 皮内反応試験 > 皮膚一次刺激性試験 |
| Heptanoic acid | RhEモデル > 皮内反応試験 >> 皮膚一次刺激性試験 |

本日の講演内容

- ① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価
 - ISO 10993 シリーズと国内規制の関係
 - 評価のエンドポイント, 試験液の調製
- ② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法
 - ウサギ発熱試験 \Rightarrow Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
 - 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 \Rightarrow RhEモデルを利用した in vitro 刺激性試験
- ③ 現在開発中の動物実験代替法
 - 感作性試験 \Rightarrow ADRA, EpiSensA, h-CLAT
 - 兎眼装用試験 \Rightarrow 摩擦試験 + RhCEモデルを利用した in vitro 刺激性試験
 - 感作性・遺伝毒性試験 \Rightarrow 化学分析を利用した安全性評価
- ④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

靄島 由二
haishima@nihs.go.jp

皮膚感作 Key event 検出 in vitro 評価系

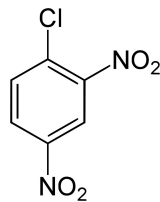
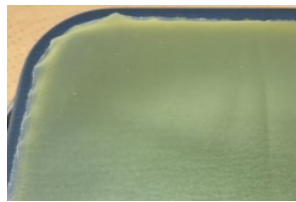
| Non-animal methods for skin sensitization | Guideline | Principle of the test | Time of exposure | Experimental system | Application | |
|--|-----------|--|------------------|---|---------------------|-----------|
| | | | | | Polar | Non polar |
| Key event 1: molecular initiating event of covalent protein binding | | | | | | |
| DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) | OECD 442C | covalent protein binding | 24h | Cys and Lys peptide, 100 mM, HPLC, 220nm detection | ○ | × |
| ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) | OECD 442C | covalent protein binding | 24h | NAC and NAL, 1 mM, HPLC, 281nm detection | ○ | ○ |
| C-SPRA (Chromophore-Solid Peptide Reactivity Assay) | none | covalent protein binding | 24h | Cys and Lys peptide resin, elution. | ○ | ○ |
| Key event 2: activation of epidermal keratinocytes | | | | | | |
| KeratiNoSens™ | OECD 442D | Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the human AKR1C2 gene | 48h | KeratiNoSens™ transgenic cell line, luciferase gene induction | ○ | × |
| LuSens | OECD 442D | Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the rat NQO1 gene | 48h | LuSens transgenic cell line, luciferase gene induction | ○ | × |
| SENS-IS | ongoing | Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of two groups | 15min, 4 dose | RhE models Episkin and SkinEthic RHE, 64 genes expression measured by qRT-PCR | ○ | ○ |
| IL-18 RhE Assay | none | Activation of epidermal keratinocytes. IL-18 release. | 24h | RhE models SkinEthic RHE, VUmC-EE, EpiCS, and EpiDerm, Quantification of IL-18 by ELISA and MTT test | ○ | ○ |
| EpiSensA | none | Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of 4 genes | 6h | RhE models LabCyte EPI-MODEL 24, 4 marker genes expression measured by qRT-PCR | ○ | ○ |
| SenCeeTox | none | Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of 11 genes | 24h | RhE models EpiDerm EPI-200 and SkinEthic RHE, 11 genes expression measured by qRT-PCR | ○ | ○ |
| Key event 3: activation of epidermal dendritic cells | | | | | | |
| h-CLAT | OECD 442E | Activation of epidermal dendritic cells, CD86 and CD54 expression | 24h | THP-1 human monocytic leukaemia cell line, FACS, expression of CD86 and CD54 | ○ | × |
| U-SENS™ | OECD 442E | Activation of epidermal dendritic cells, CD86 expression | 45±3h | U937, Human histiocytic lymphoma cell line, FACS, expression of CD86 | ○ | × |
| IL-8 Luc Assay | OECD 442E | Activation of epidermal dendritic cells, IL-8 and GAPDH expression | 16h | THP-1-derived IL-8 reporter cell line (THP-G8), luciferase gene induction | ○ | × |
| GARD (Genomic Allergen Rapid Detection) | ongoing | Activation of dendritic cells, GARD prediction signature (GPS) | 24h | The GARD skin cell line, SenzaCells, human myeloid origin similar to dendritic cells. Genomic biomarkers (200 genes in the GPS) is measured using NanoString platform | ○ | ○ |
| ISO 10993-10 AnexC 収載 | | Genomic assays | | | Polar and non-polar | |

- 医療機器の場合、極性・非極性抽出液を適用できる評価系が理想的
- h-CLATについては、細胞毒性試験と同様、FBS含有培地抽出液の利用を検討
- 現在、ADRA, EpiSensA, h-CLATの試験パッケージの性能検証を推進

感作性試験用陽性対照材料

<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
医療機器の規制環境と国際標準化推進支援体制の整備に関する研究

1% DNCB含有PUシート



In vivo 試験(公定法)

| 抽出液 | GPMT | | | LLNA | |
|------|------|---------|------|------|------|
| | 濃度 | 平均スコア | 陽性率 | 濃度 | 平均SI |
| 生食 | 50% | 0.6-0.8 | 60% | 100% | 1.30 |
| ゴマ油 | 25% | 3.0 | 100% | 100% | 2.14 |
| アセトン | — | — | — | 2.5% | 10.4 |

- 公定法, 代替法ともに陽性
- 感作性試験陽性対照材料として, 食薬センターから頒布

ADRA

| 抽出液 | Depletion (%) | | |
|--------------|---------------|-----|------|
| | NAC | NAL | Mean |
| Water | 98.5 | 2.9 | 50.7 |
| Acetonitrile | 98.3 | 9.7 | 54.0 |

h-CLAT

| 検体 | 濃度 (%) | Relative fluorescence intensity (mean ± SD) | | Cell viability (%) |
|-------|--------|---|-------------|--------------------|
| | | CD54 (>200) | CD86 (>150) | |
| MC | — | 100 | 100 | 97.1 ± 0.66 |
| MC24 | — | 83.7 ± 13.6 | 95.3 ± 5.90 | 95.1 ± 0.36 |
| DC | — | 93.0 ± 18.5 | 97.0 ± 1.70 | 95.4 ± 0.47 |
| PC | — | 551 ± 168 | 577 ± 178 | 90.3 ± 1.35 |
| 培地抽出液 | 9.4 | 212 ± 120 | 213 ± 48.7 | 94.1 ± 1.32 |
| | 13.6 | 598 ± 267 | 516 ± 68.1 | 91.9 ± 0.61 |
| | 23.5 | 637 ± 43.6 | 504 ± 165 | 85.5 ± 5.83 |
| | 33.8 | 62.3 ± 64.4 | 128 ± 77.1 | 61.0 ± 10.6 |

MC: 培地対照, MC24: 24時間培養培地, DC: 培地/媒体対照 (DMSO), PC: 陽性対照 (DNCB)

EpiSensA

| ゴマ油抽出液濃度 (%) | Fold induction (cut-off value) | | | | Cell viability (%) |
|--------------|--------------------------------|-----------|-------------|-----------|--------------------|
| | ATF3 (x15) | GCLM (x2) | DNAJB4 (x2) | IL-8 (x4) | |
| 100 | | | | | |
| 50 | | | | | |
| 25 | | | | | |

Closed

代替法試験パッケージの提案

<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
医療機器の安全性・有効性評価における
非臨床試験の高度化に関する研究

標準材料

| Chemical name | CAS No. | Physical state | LLNA potency Category (EC3 %) | Contents in PU sheet |
|-----------------------|-----------|----------------|-------------------------------|----------------------|
| 1,4-Dihydroquinone | 123-31-9 | Soild | Strong (0.11) | 5,10,25% |
| Methyl-2-octynoate | 111-12-6 | Liquid | Strong (0.45) | 5,10,25% |
| Isoeugenol | 97-54-1 | Liquid | Moderate (1.2) | 5,10,20% |
| Cinnamic aldehyde | 104-55-2 | Liquid | Moderate (1.2) | 5,10,20% |
| 2-Ethylhexyl acrylate | 103-11-7 | Liquid | Weak (10) | 5,10,30% |
| Citral | 5392-40-5 | Liquid | Weak (13) | 5,10,30% |

代替法試験パッケージ

Key event 1
ADRA (水, AcCN)

Key event 2
EpiSensA (生食, ゴマ油)

Key event 3
h-CLAT (FBS含有培地)



比較検証

GPMT
(生食, ゴマ油)

- in vitro 感作性試験法の改良 (主に暴露条件)
- 性能検証, 有用性と適用限界の明確化
- RRテストを経た代替法試験パッケージの提案

本日の講演内容

- ① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価
 - ISO 10993 シリーズと国内規制の関係
 - 評価のエンドポイント, 試験液の調製
- ② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法
 - ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
 - 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhE モデルを利用した in vitro 刺激性試験
- ③ 現在開発中の動物実験代替法
 - 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
 - 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCE モデルを利用した in vitro 刺激性試験
 - 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価
- ④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

兎眼装用試験動物実験代替法

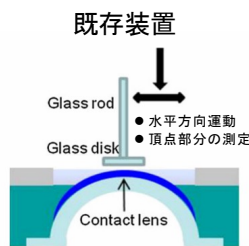
<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
眼接触型医療機器の品質及び安全性評価
手法の高度化に関する研究

CL由来の物理的・化学的影響を評価するため、兎眼装用試験の実施が要求されている
摩擦係数及び刺激性強度が異なるCL型標準材料を用いた代替法の構築と性能検証

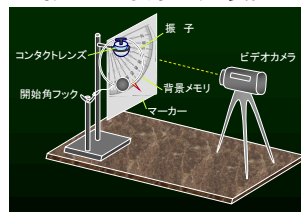
新規摩擦試験法の開発

既存試験法の課題

- 色素やセンサーがCL表面に露出している場合、物理的刺激に基づく眼障害が発生し得る。
- 現時点で利用可能な摩擦試験装置は、CL全面の摩擦特性を評価できないと共に、実使用(臨床)条件も反映されていない。



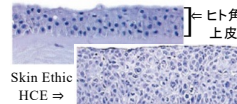
振子式摩擦測定装置



- CL全面の摩擦特性を評価できる試験系を構築する。
- CL接着部位及び摩擦面は臨床を模して形成する。
- 傾斜角センサーを利用することで、振幅角の測定結果の再現性、頑健性を向上させる。

In vitro 眼刺激性試験法の開発

- 医療機器の眼刺激性は家兎眼装用試験により評価されてきたが、代替法の開発が急務である。
- 再構築ヒト角膜様上皮(RhCE)モデルを利用できる可能性があるが、医療機器用にプロトコルを改変する必要がある。



- ヒト角膜上皮と類似構造
 - Draize試験等との相関性が高い
 - 難溶性物質の評価も可能
- <https://www.nikkol.co.jp/mail/171135686d.html>

兎眼装用試験との相関性評価

- 摩擦試験及び in vitro 眼刺激性試験と同一のCL型標準材料を使用した家兎眼装用試験を実施する。
- 兎眼装用試験における評価スコアと、摩擦試験及び in vitro 眼刺激性試験の評価結果との相関性を検証し、**動物実験代替試験法パッケージの妥当性と判断基準の確立を目指す。**

本日の講演内容

① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価

- ISO 10993シリーズと国内規制の関係
- 評価のエンドポイント、試験液の調製

② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法

- ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
- 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhEモデルを利用した in vitro 刺激性試験

③ 現在開発中の動物実験代替法

- 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
- 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCEモデルを利用した in vitro 刺激性試験
- 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価

④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
Medical
Devices

齋島 由二
haishima@nihs.go.jp

ISO 10993-18(化学的特性評価) Figure 1, 2

Fig. 1

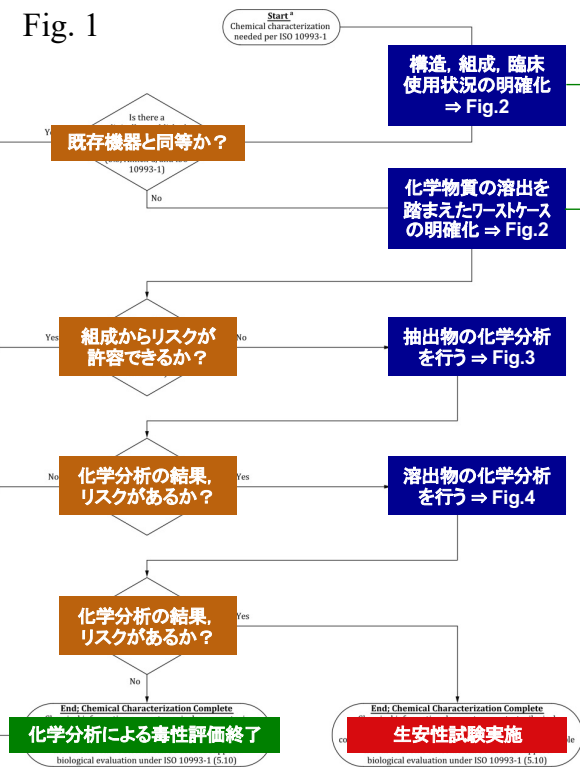
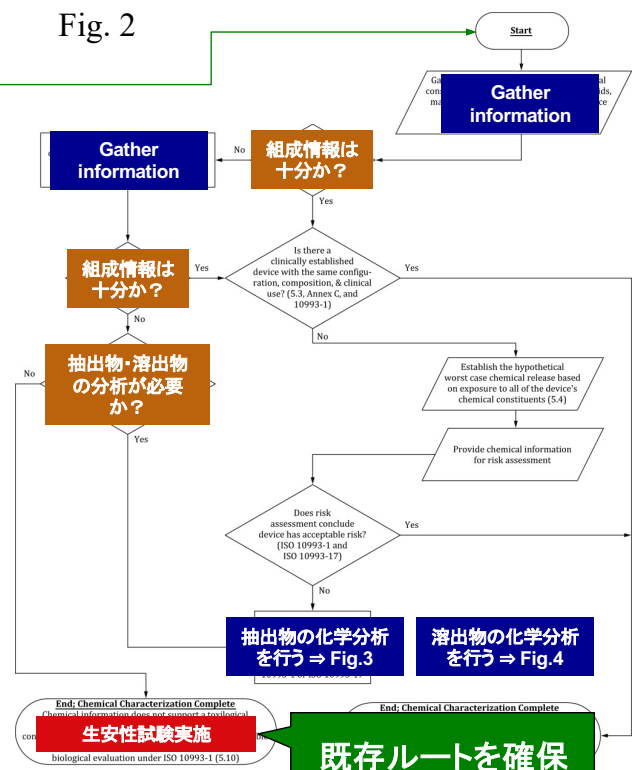


Fig. 2



ケミカルキャラクタリゼーションをどう使うか？

生物学的安全性評価において、抽出物・溶出物の化学分析データ等を用いたケミカルキャラクタリゼーションは実用的である。

ハザード検出ツールとして

例えば、ケミカルキャラクタリゼーションの結果、尿毒性の可能性があると特定された物質を含むデバイスであれば、全身毒性試験(急性・亜急性)で評価を行なう判断を行なう。

リスクの見積もりツールとして

最終製品から溶出される成分が、使用される環境をシミュレートでき、十分な毒性学的閾値が得られる場合、有害事象が起る可能性のある閾値と実際の曝露量を比較して生物学的安全性を評価することができる。

化学分析データの取り扱いの難しさ

化学分析は万能ではない！

- 医療機器の抽出物・溶出物を分析する場合、全ての化合物を同定することは科学的に不可能
- 一つの分析条件で、全ての化学物質を網羅することは不可能
- 化学物質と検出原理との相性で測定感度が大きく変化
- ISO/TC194/WG15が実施した国際RRテストでは、材料のみ共通で、分析法自体は自由選択としたところ、施設毎に分析結果が大きく異なっていた。
⇒ 個々の分析レポートまでさかのぼり確認する必要がある

化学分析による評価は、分析目的、方法、結果を吟味しないと分析結果の妥当性を判断できない！！

本日の講演内容

- ① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価
 - ISO 10993シリーズと国内規制の関係
 - 評価のエンドポイント、試験液の調製
- ② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法
 - ウサギ発熱試験 ⇒ Human Cell-based Pyrogen Test (HCPT)
 - 皮膚一次刺激性・皮内反応試験 ⇒ RhEモデルを利用したin vitro刺激性試験
- ③ 現在開発中の動物実験代替法
 - 感作性試験 ⇒ ADRA, EpiSensA, h-CLAT
 - 兎眼装用試験 ⇒ 摩擦試験 + RhCEモデルを利用したin vitro刺激性試験
 - 感作性・遺伝毒性試験 ⇒ 化学分析を利用した安全性評価
- ④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価
⇒ 新たな「Reduction」にも繋がる可能性

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

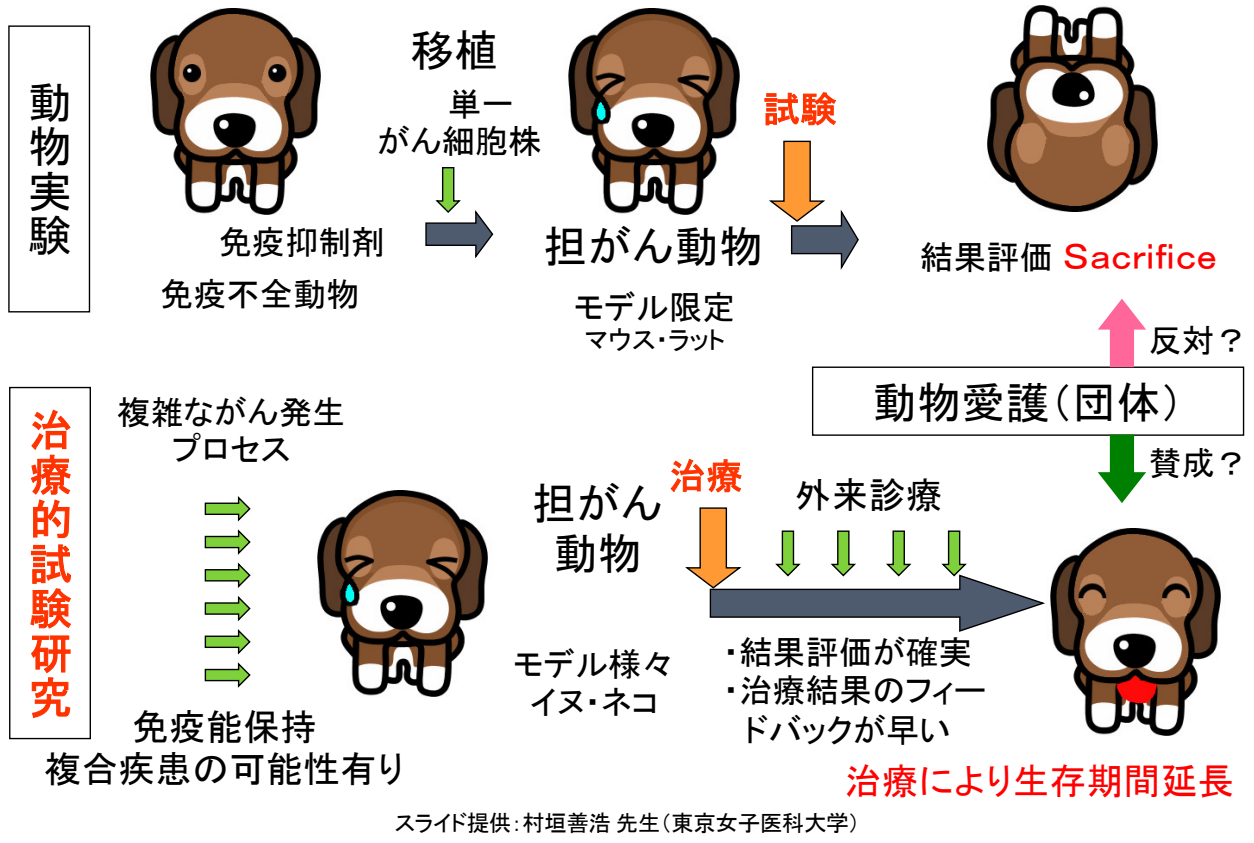


Division of
MD
Medical
Devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

<AMED医薬品等規制調和・評価研究事業>
医療機器の安全性・有効性評価における非臨床試験の高度化に関する研究



医薬分野における実施状況



CCR Central | Login

Search... Search

- COP HOME
- PET OWNERS
- RESEARCH
- TRIAL SPONSORS

Home » COP - Trial Sponsors - Trials Consortium



Comparative Oncology Trials Consortium

The Comparative Oncology Trials Consortium (COTC) is an active network of twenty academic comparative oncology centers, centrally managed by the NIH-NCI-Center for Cancer Research's Comparative Oncology Program, that functions to design and execute clinical trials in dogs with cancer to assess novel therapies. The goal of this effort is to answer biological questions geared to inform the development path of these agents for future use in human cancer patients. Trials conducted by the COTC are pharmacokinetically and pharmacodynamically rich with the product of this work directly integrated into the design of current human Phase I and II clinical trials. Our trials are carried at COTC member institutions, which currently include 22 sites.

All veterinary universities that met the established criteria have been invited to join the Comparative Oncology Trial Consortium.

Click a star on the map to visit that member's website

- 動物種: イヌ
- 医薬品: 抗がん剤, 鎮痛剤 等
- Closed Clinical Trial: 12件
- 進行中の Trial: 2件 (骨肉腫, Oral p97 inhibitor)

- Trials Consortium
- Overview
- Pharmacodynamic

Clinical Trials



疾患動物を利用した安全性・有効性評価法

目的・特徴

- 疾患動物(コンパニオンアニマル)を用いたヒト用医療機器の安全性・有効性評価システムの構築
- がん等の自然発症した疾病に対する最先端製品の治療効果の確認
- 人為的に発症させたモデル動物の試験と比較して、より確実な試験が実施可能
- First-in-Human前の試験として非常に有益
- 獣医師が行う治療であり、末期疾患のコンパニオンアニマルを救命又は延命できる可能性がある
- ヒト用医薬品の試験研究、動物用医薬品・医療機器の試験にも応用可能

関連省庁・団体

- 厚生労働省, 農林水産省
- 医薬品医療機器総合機構(PMDA)
- 動物医薬品検査所
- 関連学会・学術団体
- 関連業界団体, 動物福祉団体

コンソーシアムの設立

- 企業と飼い主のマッチングシステムの構築
- 医療機器メーカーが費用支出
- 企業は自社新規製品の承認申請用データを取得
- 必要に応じて、GLP対応施設内で試験を実施
- 飼い主は無償でコンパニオンアニマルの治療を受ける

解決すべき課題

- 法的規制(薬機法, 獣医師法, 動愛法等)
- 疾患動物を利用した未承認医療機器の試験研究に係る法務的・倫理的基盤
- 適応症例・機器: イヌに自然発症する疾患, ヒト/イヌ間の組織相同性
- リスク評価, 陰性対照群の設定要否, ヒストリカルデータの存在有無, 実施体制

【研究目標】

基本的考え方の策定

終わりに

- ① イントロダクション: 医療機器の生物学的安全性評価
- ② 医療機器分野において利用可能な動物実験代替法

③ 現在開発中の動物実験代替法

感作性試験代替法, 兎眼装用試験代替法, 化学分析を用いた安全性評価

④ 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価

早期導入を
目指す

その他の in vitro 試験法: 抗血栓性試験等

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

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp