[シンポジウム4]
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

皮膚感作性試験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、辻脇直美、里見理子、野村祐介、
岡本悠佑、長谷川千恵、葩島由二、山本栄一
富士フイルム株式会社：鰐渕彩花、山本裕介、笠原利彦
花王株式会社：水町秀之
民生科学協会：藤巻日出夫

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：宮島　敦子

な　し

＊本講演の内容は規制当局等の正式見解ではありません

本日の講演内容

- 医療機器の皮膚感作性評価法の国際動向
- 皮膚感作性試験動物実験代替法の選定と改変
- 動物実験代替法の性能評価

本日の講演内容

- 医療機器の皮膚感作性評価法の国際動向
- 皮膚感作性試験動物実験代替法の選定と改変
- 動物実験代替法の性能評価

医療機器の生物学的安全性評価における感作性試験

ISO/TC 194

ISO 10993-10:2010
Tests for irritation and skin sensitization
- All in vivo tests

2021.1

ISO 10993-23:2021
Tests for irritation
- In vivo tests : Animal and human
- In vitro test : RhE model

2021.11

ISO 10993-10:2021
Tests for skin sensitization

動物実験のみ

- In vivo tests : LLNA, GPMT, Closed-patch
- In vitro tests (informative)
  DPRA, KeratinoSens, LuSens, SENS-IS, IL-18 RhE Assay, EpiSensA, SenCee Tox, h-CLAT, U-SENS, IL-8 Luc Assay, GARD

2023.8

ISO TS 11796:2023
Requirements for interlaboratory studies to demonstrate the applicability of validated in vitro methods to assess the skin sensitization of medical devices

日本　2012.3 ⇨ 2020.1 改正

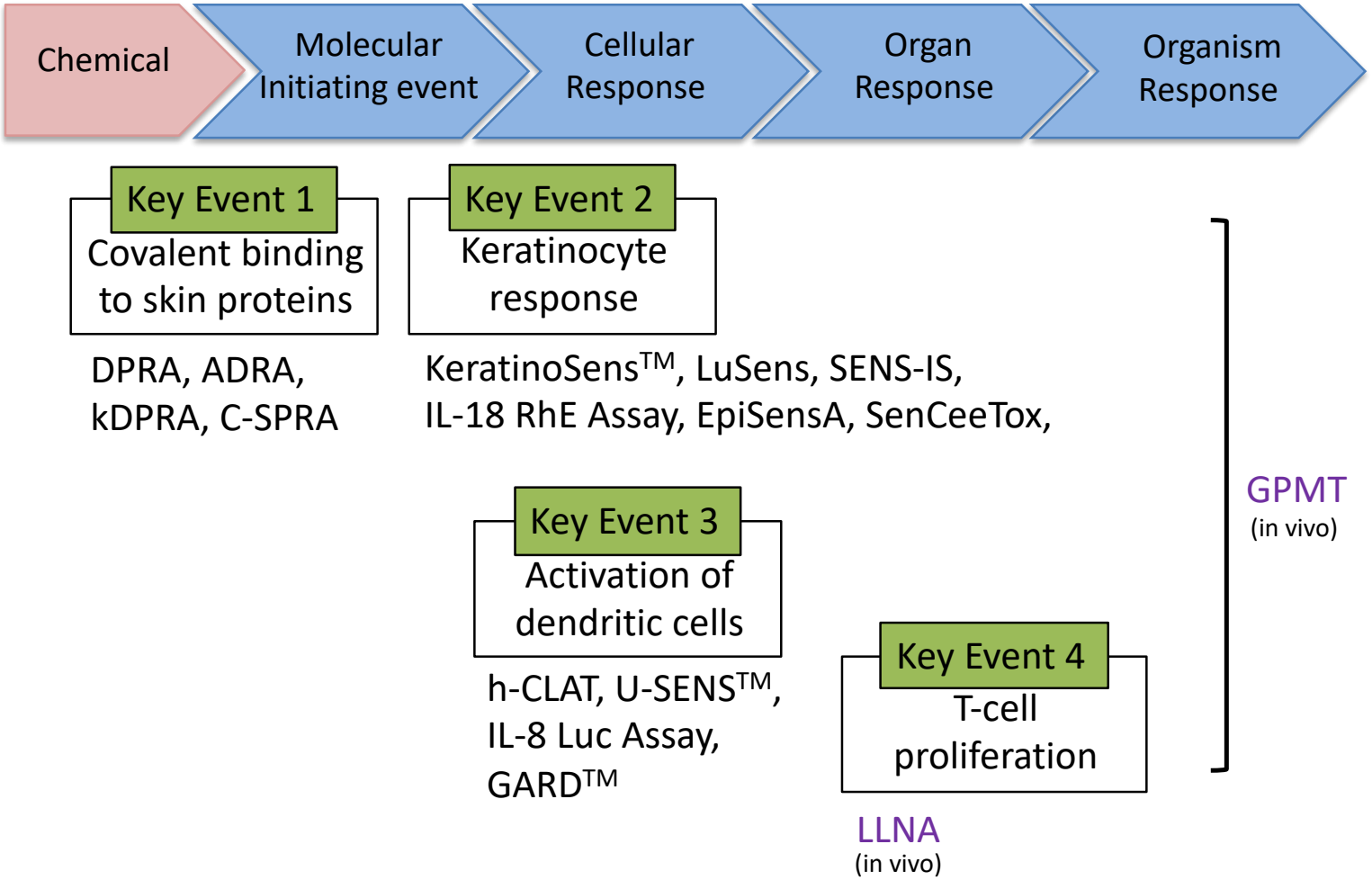
医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス
厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知、薬生機審発0106 第1号

第2部　感作性試験
- In vivo tests : GPMT, A&P test (Scratched skin method), LLNA

動物実験のみ

第5部　刺激性試験
- In vivo tests : Primary skin irritation test, Intracutaneous test
- In vitro test : RhE model

皮膚感作に関する有害性発現経路（AOP）



Adverse Outcome Pathway (AOP)
Key event 1 : Covalent binding between chemicals and cysteine or lysine residues of proteins
Key event 2 : Inflammatory response and gene expression by ARE-dependent pathway in keratinocytes
Key event 3 : Activation of dendritic cells (expression of specific cell surface markers, production of chemokines and cytokines)
Key event 4 : T cell proliferation in lymph nodes

化学物質による皮膚感作Key eventの検出試験系

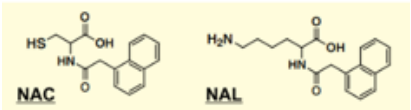
AOP event	10993-10: 2021		Guideline	Experimental system	Application
Key event 1	Annex C (1)	DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)	OECD TG 442C	Colvalent protein binding, Cys and Lys peptide, 100 mM or 20 mg/mL, HPLC, 220nm detection	(○) acetonitrile, water, isopropanol, acetone and acetonitrile/DMSO.
		ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay)	OECD TG 442C	Colvalent protein binding, NAC and NAL, 4 mM or 0.5 mg/mL, HPLC, 281nm, Ex/Em 284/333 nm detection	(○) acetonitrile, water, acetone and acetonitrile/DMSO.
		kDPRA (Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay)	OECD TG 442C	Colvalent protein binding, Cys peptide, time- and concentration dependent manner, HPLC, 220nm detection	(○) acetonitrile, water, isopropanol, acetone and acetonitrile/DMSO.
		C-SPRA (Chromophore-Solid Peptide Reactivity Assay)	none	Colvalent protein binding, Cys and Lys peptide resine,elution,	(○) polar and non-polar
Key event 2	Annex C (2)	KeratinoSens™	OECD TG 442D	Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the human AKR1C2 gene, KeratinoSens™ transgenic cell line, luciferase gene induction	(○) DMSO, aqueous solvents (×) non-polar solvents
	Annex C (3)	LuSens	OECD TG 442D	Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the rat NQO1 gene, LuSens transgenic cell line, luciferase gene induction	(○) DMSO, aqueous solvents (×) non-polar solvents
	Annex C (4)	SENS-IS	ongoing	Activation of epidermal keratinocytes, RhE models Episkin and SkinEthic RHE. 64 genes expression measured by qRT-PCR	(○) polar and non-polar medical device extracts
	Annex C (5)	IL-18 RhE Assay	none	Activation of epidermal keratinocytes, RhE models SkinEthic RHE, VUmc-EE, EpiCS, and EpiDerm, Quantification of IL-18 by ELISA and MTT test	(○) polar and non-polar medical device extracts
	Annex C (6)	EpiSensA	ongoing	Activation of epidermal keratinocytes, RhE models LabCyte EPI-MODEL 24, 4 marker genes expression measured by RT-PCR	(○) saline and sesame oil extracts
	Annex C (7)	SenCeeTox	none	Activation of epidermal keratinocytes, RhE models EpiDerm EPI-200 and SkinEthic RHE, 11 genes expression measured by qRT-PCR	(○) polar and non-polar medical device extracts
Key event 3	Annex C (8)	h-CLAT	OECD TG 442E	Activation of epidermal dendritic cells, THP-1 human monocytic leukaemia cell line, FACS, expression of CD86 and CD54	(○) saline and DMSO (×) non-polar solvents
	Annex C (9)	U-SENS™	OECD TG 442E	Activation of epidermal dendritic cells, U937, Human histiocytic lymphoma cell line, FACS, expression of CD86	(○) test chemicals that are soluble or that form a stable dispersion
	Annex C (10)	IL-8 Luc Assay	OECD TG 442E	Activation of epidermal dendritic cells, THP-1-derived IL-8 reporter cell line (THP-G8), luciferase gene induction	(○) X-VIVO 15 culture medium, DMSO and water
	Annex C (11)	GARD (Genomic Allergen Rapid Detection)	OECD TG 442E	Activation of dendritic cells, 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	(○) polar and non-polar medical device extracts
	ISO 10993-10 AneexC			Genomic assays	Polar and non-polar

本日の講演内容

- 医療機器の皮膚感作性評価法の国際動向
- **皮膚感作性試験動物実験代替法の選定と改変**
- 動物実験代替法の性能評価

皮膚感作性AOP KE1の検出試験系

DPRA と ADRA は、in chemico の皮膚感作試験で、AOP KE1における タンパク質への共有結合を評価する。これらのアッセイは、OECD TG No. 442C に収載されている。

Assay	DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)	ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay)
OECD TG442C	2015.2	2019.6
Substrate	Cysteine containing peptide (CyP), Lysine containing peptide (LyP) Ac-RFAACAA-COOH, Ac-RFAAKAA-COOH	N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -cysteine (NAC), α-N -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -lysine (NAL) 
Solvent	Acetonitrile, water, isopropanol, acetone, DMSO/Acetonitrile	Acetonitrile, water, acetone, DMSO/Acetonitrile
Reaction	25°C, 24 hr	25°C, 24 hr
Measurement wavelength	220 nm	281 nm (Low co-elution), Ex/Em 284/333 nm
Concentration of test substance solution	100 mM	4 mM
Concentration of test substance in reaction solution	Cysteine :5 mM Lysine :25 mM	1 mM
Thiol group oxidation inhibitor	No	Yes
Reaction stop solution	No	Yes
	ISO 10993-10 Annex C	

- ADRAは、強いUV吸収及び蛍光をもつナフタレン環にシステインまたはリジンを導入したNACとNALを基質として利用している。
- ADRA は、極性および非極性の溶媒抽出物に適用でき、試験溶液の濃度は DPRA の 1/25である。
- ADRA は、蛍光検出が可能なので、共溶出がほとんど出ない。

以上より、ADRA は、医療機器抽出物の評価に役立つ可能性が高い。

皮膚感作性AOP KE2の検出試験系

Name of test system	Guideline	Principle of the test	Time of exposure	Experimental system	Application	
					Polar	Non-polar
KeratinoSens™	OECD 442D	Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the human AKR1C2 gene	48h	KeratinoSens™ transgenic cell line, luciferase gene induction	○	X
LuSens	OECD 442D	Activation of epidermal keratinocytes. ARE of the rat NQO1 gene	48h	LuSens transgenic cell line, luciferase gene induction	○	X
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	○	○
ISO 10993-10 AneexC						

- OECD TG No.442Dに収載されている、ケラチノサイトラインレポーターアッセイであるKeratinoSens及びLuSensは、極性溶媒にのみ適用可能である。そのため、医療機器の評価への適用は難しいと考えられる。
- IL-18 RhE Assayは、RhEモデルを用いており、極性溶媒及び非極性溶媒に適用可能である。本法は、いくつかのRhEモデルにおいて報告されている。また、RhEモデルを用いたin vitro刺激性試験（ISO 10993-23）とプロトコルが一部共通である。

  我々は、RhEモデル LabCyte EPI-MODEL 24 (J-TEC) を用いて、培養上清中のIL-18を測定した。7種の感作性物質、3種の非感作生物質を用いて検証を行なったが、予想された結果は得られなかった。暴露時間などシステムの改良を含めたさらなる検討が必要であると結論づけた。

皮膚感作性AOP KE2の検出試験系

Assay	SENS-IS	EpiSensA	SenCeeTox
OECD TG442D	ongoing	ongoing	none
Experiment system	Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of 64 genes (two groups)	Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of 4 genes	Activation of epidermal keratinocytes. Gene expression of 11 genes
RhE model	RhE models Episkin and SkinEthic RHE (EPISKIN)	RhE models LabCyte EPI-MODEL 24 (J-TEC)	RhE models EpiDerm EPI-200 (MatTek) and SkinEthic RHE (EPISKIN)
Exposure	15min (6 h after wash)	6 h	24 h
Exposure volume	30 uL	5 uL	100 uL
Measurement	64 genes expression (REDOX group (related antioxidant responsive element and the redox protective signals) and SENS-IS group (related inflammation, danger signals and cell migration)) measured by	4 marker genes (two inflammatory genes related P2X7 and two cytoprotective responses genes related Nrf2) expression measured by qRT-PCR	11 genes (eight Nrf2/ARE, one AhR/XRE and two Nrf1/MRE controlled gene) expression measured by qRT-PCR
	ISO 10993-10 AneexC	ISO 10993-10 AneexC	ISO 10993-10 AneexC

- SENS-IS、EpiSensA、SenCeeTox などのRhEモデルアッセイは、極性溶媒及び非極性溶媒に適用可能で、医療機器の評価にも有用と思われる。
- これらのアッセイは、異なるRhEモデルを使用し、プロトコル（曝露時間、曝露量、検出遺伝子など）も異なっている。
- これらのアッセイシステムは、OECD TG収載に向けて、検証が進められている。医療機器の評価に適用するためには、システムの改良と検証が必要とされる。

皮膚感作性AOP KE3の検出試験系

Name of test system	Guideline	Principle of the test	Time of exposure	Experimental system	Application	
					Polar	Non-polar
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	○	X
U-SENS™	OECD 442E	Activation of epidermal dendritic cells, CD86 expression	45±3h	U937, Human histiocytic lymphoma cell line, FACS, expression of CD86	○	X
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	○	X
GARD (Genomic Allergen Rapid Detection)	OECD 442E	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	○	○
ISO 10993-10 AneexC				Genomic assays		

- OECD TG No.442Eに収載されている h-CLAT、U-SENS、IL-8 Luc Assayは、THP-1やU937を用いた試験であり、極性溶媒にのみ適用可能である。そのため、医療機器の評価への適用は難しいと考えられる。
- GARDは、極性溶媒及び非極性溶媒に適用可能であるが、プラットフォームを用いた200遺伝子の発現解析であり、通常の実験室での実施は容易ではない。

以上を踏まえ、ADRA, EpiSensA, h-CLATについて、医療機器の感作性評価に向けて試験法の改変を試みた。

DPRA, ADRAの医療機器の評価に向けた改変

医療機器抽出物への適用を考慮し、抽出溶媒として水及びアセトニトリルを用い、100% 抽出液を用いて評価を実施した。

Assay	DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)	ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay)
Substrate	Cysteine containing peptide (CyP), Lysine containing peptide(LyP)	N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -cysteine (NAC), α-N -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -lysine (NAL)
Solvent	Acetonitrile, H_2O, isopropanol, acetone, DMSO/Acetonitrile	Acetonitrile, H_2O, acetone, DMSO/Acetonitrile
Extraction		
Reaction	25°C, 24 hr	25°C, 24 hr
Measurement wavelength	220 nm	281 nm (Low co-elution), Ex/Em 284/333 nm
Concentration of test substance	100 mM	4 mM
Concentration of test substance in reaction solution	Cysteine :5 mM Lysine :25 mM	1 mM

Modified DPRA-MD	Modified ADRA-MD
Cysteine containing peptide (CyP), Lysine containing peptide(LyP)	N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -cysteine (NAC), α-N -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L -lysine (NAL)
H_2O, Acetonitrile	H_2O, Acetonitrile
25°C, 24 hr	25°C, 24 hr
220 nm	281 nm (Low co-elution), Ex/Em 284/333 nm
100%	100%
Cysteine :5 % Lysine :25 %	25%

EpiSensAの医療機器の評価に向けた改変

1) 暴露溶媒の検討

オリジナルの方法では，溶媒としてアセトン/オリーブ油（AOO）（4:1）を用いるのが一般的であるが、医療機器抽出物への適用を考慮し、極性溶媒及び非極性溶媒抽出物での暴露について検討した。

2) 暴露量の検討

オリジナルの方法では、5μL を暴露しているが、医療機器抽出物への適用を考慮し、暴露量の増加が細胞応答の検出感度に与える影響について検討した。

	EpiSensA
Solvent	AOO (4:1), Water, 50% EtOH
Exposure volume	5 uL
Exposure	6 h
Measurement	4 marker genes expression measured by qRT-PCR
Viability for judge	≥ 80%

	Modified EpisSensA-MD
Solvent	Polar (Saline) Non-polar (Sesame oil)
Exposure volume	100 uL
Exposure	6 h
Measurement	4 marker genes expression measured by qRT-PCR
Viability for judge	≥ 80%

Positive control	0.78% Clotrimazole/AOO 0.10% 4-Nitrobenzylbromide/AOO
Method	1) Dose finding study (4-fold dilution, 5-7 slope) 2) Main study (2-fold dilution from < 80% , 3-5 slope)

Extraction method ?
2-fold dilution, 3-7 slope ? Judge ≥ 80% of viability

h-CLATの医療機器の評価に向けた改変

細胞毒性試験における抽出法に倣い、h-CLATにおいても血清含有培地を用いて抽出を行い、血清含有培地にて抽出液の希釈系列を作製して評価を実施した。

	h-CLAT
Cells	THP-1 cells, 1.0×10^6 cells /well
Solvent	Saline, Medium, DMSO
Extraction	
Exposure volume	1.0 mL
Exposure	24 h
Measurement	Expression of CD86 and CD54 cell surface markers
Viability for judge	≥ 75%

Modified h-CLAT-MD
THP-1 cells, 1.0×10^6 cells /well
10% FBS-Medium
1.0 mL
24 h
Expression of CD86 and CD54 cell surface markers
≥ 75%

Positive control	4 ug/mL DNCB
Method	1) Dose finding study (2-fold dilution, 8 slope) 2) Main study (1.2-fold dilution from < 80%, 8 slope), 3 runs
Applicability	The negative results with test chemicals with a Log Kow greater than 3.5 should not be considered.

Extraction method ?
2-fold dilution, 8 slope ? Judge ≥ 75% of viability
?

本日の講演内容

- 医療機器の皮膚感作性評価法の国際動向
- 皮膚感作性試験動物実験代替法の選定と改変
- **動物実験代替法の性能評価**

感作性物質を含有するPUシートの作製

Confidential

- LLNA Potency Categoryを考慮して、感作性物質を含有する Polyurethane（PU）シートを作製し、性能検証に用いた。
- 現行の感作性試験（GPMT）と医療機器の評価用に改良したin vitro試験の性能を比較検証することにより、in vitro感作性試験の有用性と適用限界を明らかにする。

Modified DPRA-MD及びModified ADRA-MDによる感作性物質含有PUシートの評価

Confidential

- 6種類のPUシートは、Modified DPRA-MD及びModified ADRA-MDの両試験法において、陽性と判定された。また、MBTにおいては、Modified ADRA-MDの方が、感度が高かった。

Modified EpiSensA-MD による感作性物質含有PUシートの評価

Confidential

Gene expression is not determined if survival is less than 80%, following the rules of EpiSensA.

- 6種類のPUシートは、4つのマーカー遺伝子のうち少なくとも1つがそれぞれのカットオフ値を超え、陽性と判定された。

Modified h-CLAT-MD による感作性物質含有PUシートの評価

Confidential

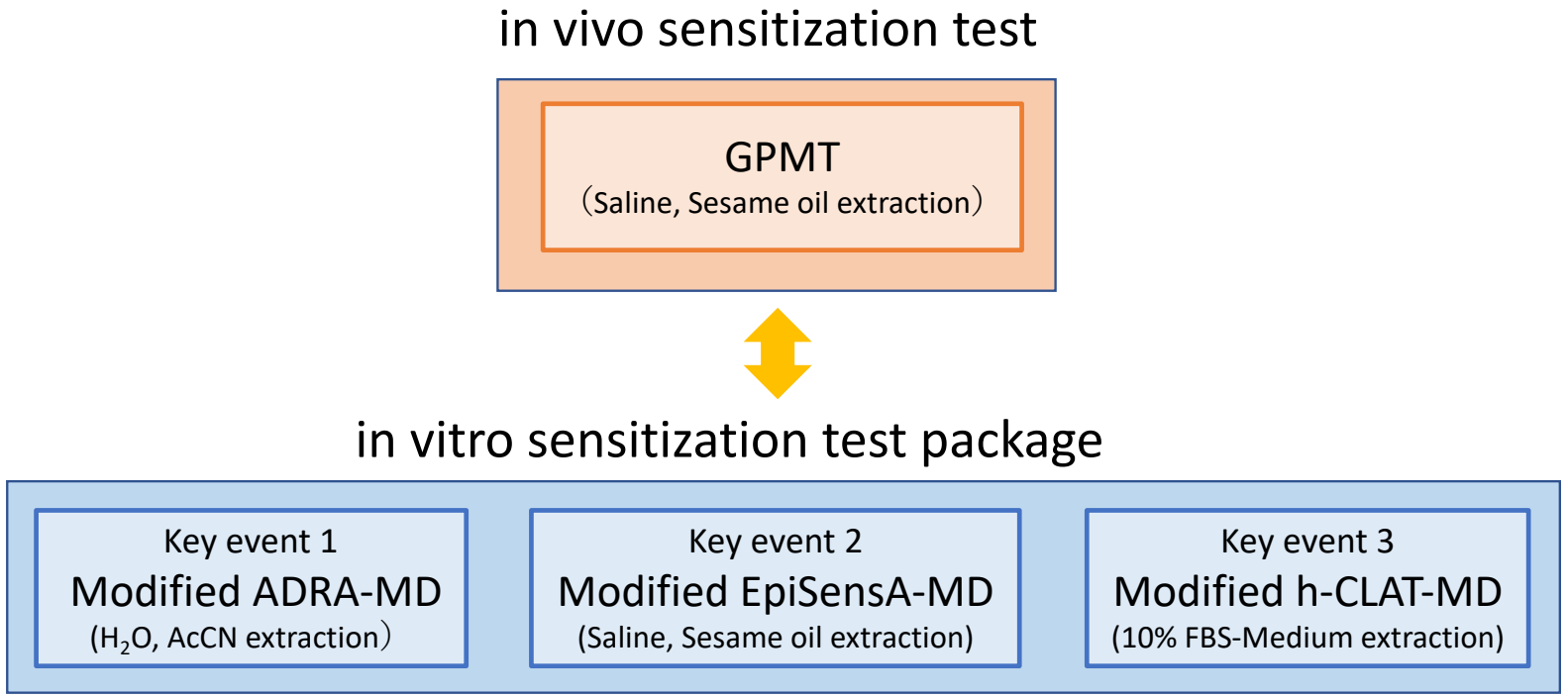
- 6種類のPUシートは、CD86とCD54の発現量のうち、少なくとも1つがそれぞれのカットオフ値を超え、陽性と判定された。

感作性物質含有PUシートのin vitro感作性試験による評価のまとめ

Confidential

- 感作性物質を含む6種類のPUシートを、各溶媒抽出物を用いたin vitro試験（Modified ADRA-MD, Modified EpiSensA-MD, Modified h-CLAT-MD）により評価し、すべての試験系で陽性と判定された。また、同シートを用いてGPMTを実施した結果、6種類のPUシート共に陽性と判定された。

まとめ



- 医療機器の感作性試験動物実験代替法として、医療機器用に改変した各KEに対する Modified ADRA-MD, Modified EpiSensA-MD, Modified h-CLAT-MDが、試験パッケージの候補となると考えられた。
- 今後は上記試験を中心に、開発した試験法の性能、再現性・頑健性を検証し、ISO/TC194/WG8に逐次情報提供すると共に、国内ガイダンスへの反映を目指す。

終わりに

ご清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

宮島　敦子
miyajima@nihs.go.jp