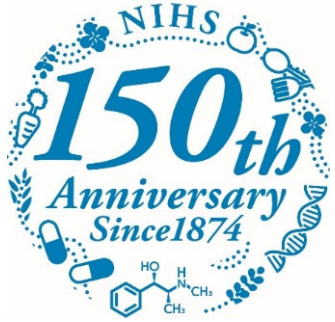
[シンポジウム4]
医療機器分野における動物実験代替法の開発状況と今後の展望

動物実験代替法にも利用可能な感作性試験用陽性対照材料の開発

国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部：**○野村祐介**、岡本悠佑、長谷川千恵、葩島由二、山本栄一
一般財団法人化学物質評価研究機構：小林俊夫、森岡久子
花王株式会社：水町秀之
テルモ株式会社：猪俣依子、金木淳史、岡田真幸



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：野村祐介

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

- 感作性試験の陽性対照材料の作製
- In vivo感作性試験での性能検証
- In vitro感作性試験での性能検証
- まとめ

本日の講演内容

- 感作性試験の陽性対照材料の作製
- In vivo感作性試験での性能検証
- In vitro感作性試験での性能検証
- まとめ

生物学的安全性評価の標準材料

第1部　**細胞毒性試験**
第2部　感作性試験
第3部　遺伝毒性試験
第4部　**埋植試験**
第5部　**刺激性試験**
第6部　全身毒性試験
第7部　発熱性物質試験
第8部　**血液適合性試験**

医療機器の生物学的安全性評価

- 生体と接触する医療機器の薬事申請の際には、ISO10993シリーズに基づき、生物学的安全性に関わる非臨床試験データを取得する必要がある
- 材料の極性/非極性溶媒抽出物が被検物質として用いられる例が多いことが特徴的である
- 一方で、大部分の試験法において、該当する毒性を発揮する化合物を陽性対照物質として用いている

⇒抽出過程（抽出効率等）が考慮されておらず、陽性対照として不十分である

⇒数種類の陽性対照材料は国立衛研を中心に開発され、日本から世界に頒布されている。

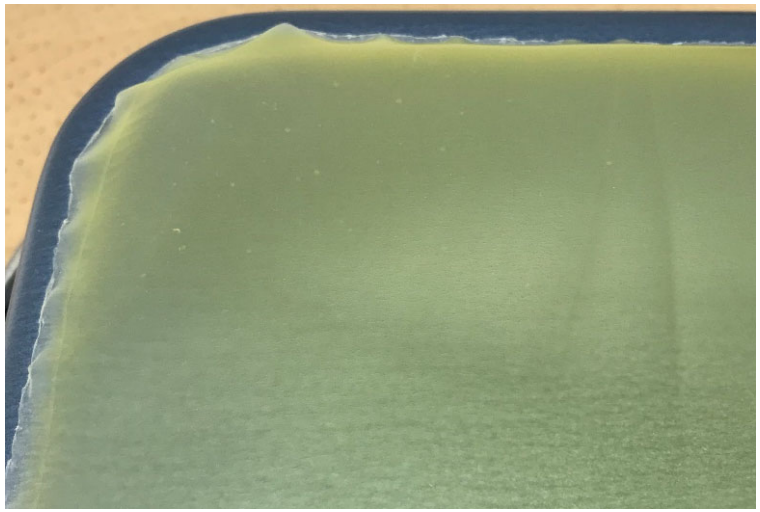
➢ **感作性試験の確度向上を目標に、極性/非極性溶媒抽出物が陽性となる対照材料を開発し、頒布体制を構築すると共に、国際標準化を目指す。**

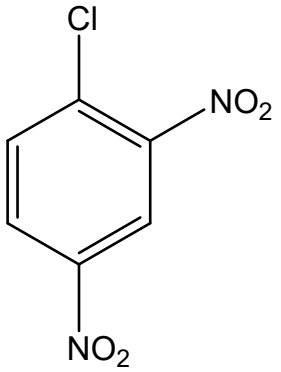
感作性試験用陽性対象材料作製

現行の細胞毒性試験用陽性対照材料
（ZDBC/ZDEC含有PUフィルム）を参考

基材：ポリウレタン（PU）
作成方法：キャスト法

- 各種試験法の陽性対象としてDNCBが記載されている
- 感作性化合物としては安定性が高いと共に、揮発しにくい





2,4-dinitrochlorobenzene
（DNCB）

1 w/w% DNCB-PU sheet

皮膚感作性試験用陽性対照材料としての性能を評価

分析評価による事前検証

抽出溶媒	試料/溶媒比	抽出温度	抽出時間	陽性対照材料使用量
メタノール	0.1g/1mL	25℃	72h (溶媒交換3回)	約0.1g
アセトン				
生理食塩水	6cm^2/1mL	37℃	72h	約8cm^2
ゴマ油				

抽出溶媒	試料/溶媒比	抽出温度	抽出時間	1% DNCBシート 抽出液中DNCB濃度（μg/mL）
メタノール	0.1g/1mL	25℃	72h (溶媒交換3回、 4回分をプール)	Confidential
アセトン				
生理食塩水	6cm^2/1mL	37℃	72h	
ゴマ油				

[1)]平均±標準偏差

DNCBの抽出効率は、
メタノール：80%程度
アセトン：80%程度
生理食塩水：2%程度
ゴマ油：90%程度

分析方法：Q Exactive GCの高分解能SIM

ISO 10993-12 及び国内ガイダンスの抽出条件により抽出液を調製後、DNCB(logP=2.0)の極性に準じた抽出が確認された。

本日の講演内容

- 感作性試験の陽性対照材料の作製
- In vivo感作性試験での性能検証
- In vitro感作性試験での性能検証
- まとめ

現行のin vivo試験における性能検証

LLNA：BrdU-ELISA
（OECD TG442B：*In vivo* マウス局所リンパ節試験）

GPMT
（ISO10993-10：*In vivo* モルモットマキシマイゼーション法）

動物実験代替法に利用するとしても、現行の試験で意図した性能を示す必要がある

LLNAによる検証

Group	Dose level	*n*	Evaluation: Weight of lymph nodes (mg)	Evaluation: BrdU labeling index	Evaluation: SI
Test group (Saline) 50%抽出液において、陽性判定基準を満たすが、SI値の標準偏差及び100%抽出液のSI値(1.3)から総合的に判断し、陰性判定。	negative control				
	solvent control				
	25%				
	50%				
	100%				
	positive control				
Test group (Sesame oil) 陽性判定	negative control				
	solvent control				
	25%				
	50%				
	100%				
	positive control				
Test group (Acetone) 陽性判定	negative control				
	solvent control				
	2.5%				
	5.0%				
	10%				
	positive control				

Confidential

- LLNAにおいて DNCB-PU シートはゴマ油及びアセトン抽出条件下で陽性

GPMTによる検証

Group	Dose level	*n*	Observation time (h)	Evaluation	
				Positive rate (%)	Score
Solvent control group (Saline)	negative control	5	24 48	Confidential	
	25%	5	24 48		
	50%	5	24 48		
	100%	5	24 48		
Solvent control group (Sesame oil)	negative control	5	24 48		
	25%	5	24 48		
	50%	5	24 48		
	100%	5	24 48		
Test group (Saline) 陽性判定	negative control	10	24 48		
	25%	10	24 48		
	50%	10	24 48		
	100%	10	24 48		
Test group (Sesame oil) 陽性判定	negative control	10	24 48		
	25%	10	24 48		
	50%	10	24 48		
	100%	10	24 48		
0.1 w/v% DNCB solution (olive oil)	positive control	5	24 48		

- DNCB-PU シートは生理食塩水及びゴマ油の両抽出条件下で陽性

現行のin vivo試験における性能検証

LLNA：BrdU-ELISA

（OECD TG442B：*In vivo* マウス局所リンパ節試験）

ゴマ油及びアセトンで抽出液陽性

GPMT

（ISO10993-10：*In vivo* モルモットマキシマイゼーション法）

生理食塩水及びゴマ油抽出液で陽性

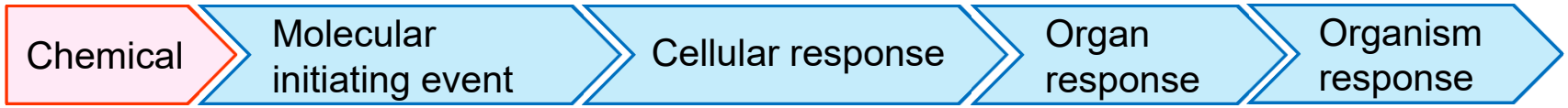
陽性対照材料はいずれの試験においても陽性を示す。

本日の講演内容

- 感作性試験の陽性対照材料の作製
- In vivo感作性試験での性能検証
- In vitro感作性試験での性能検証
- まとめ

動物実験代替法での適用

有害性発現経路（AOP）に基づいた皮膚感作性試験



Key event 1
Covalent binding to skin proteins

ADRA, DPRA

Key event 2
Keratinocyte response

EpiSensA, KeratinoSens™, LuSens, SENS-IS, IL-18 RhE Assay, SenCee Tox

Key event 3
Activation of dendritic cells

h-CLAT, U-SENS™, IL-8 Luc Assay, GARD™

Key event 4
T-cell proliferation

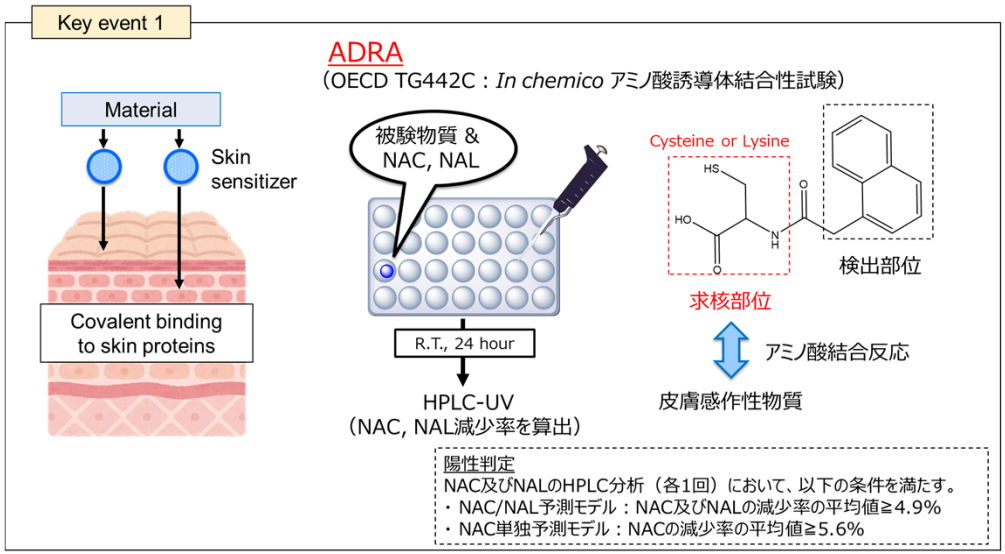
LLNA

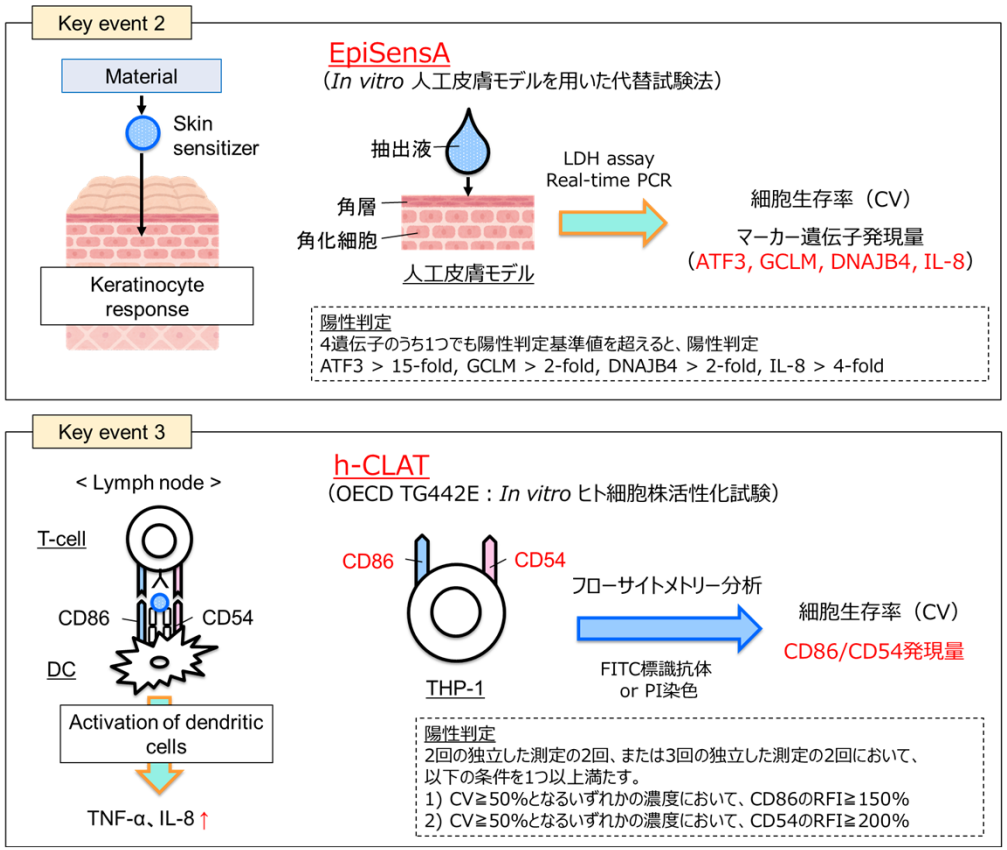
GPMT

Key event 1：化学物質とタンパク質のシステイン残基またはリジン残基との共有結合
Key event 2：ケラチノサイトにおける炎症応答とARE依存的経路による抗酸化遺伝子発現
Key event 3：樹状細胞の活性化（特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカインやサイトカインの産生）
Key event 4：リンパ節におけるT細胞増殖

動物実験代替法としてADRA、EpiSensA、h-CLATを選定

動物実験代替法での適用





- 医療機器評価用に検体は材料からの溶媒抽出液とした
- 陽性対照材料はDNCB-PUシートとした
- 動物実験と異なり、ポリエチレン(PE)シート及びポリプロピレン(PP)シートを陰性対象材料とした

ADRAによる検証

Material	Extraction	Depletion (%)			Prediction	
		NAC	NAL	Mean	NAC/NAL	NAC-only
DNCB-PU sheet	Water	Confidential			Positive	Positive
陽性判定	Acetonitrile				Positive	Positive
PE sheet	Water				Negative	Negative
	Acetonitrile				Negative	Negative
PP sheet	Water				Negative	Negative
	Acetonitrile				Negative	Negative

- PEシート及びPPシート由来抽出液はNAC/NAL予測モデル及びNAC単独予測モデル共に陰性判定が得られた。
- DNCB-PUシートでは、水及びアセトニトリル（ACN）の両抽出溶液においてNAC減少率 ≧ 5.6%（水:41%, ACN:97%）、NAC及びNALの減少率の平均値 ≧ 4.9%（水:21%, ACN:53%）を満たし両予測モデルで陽性判定が得られた。
- GPMTと同傾向の結果であった。

EpiSensAによる検証

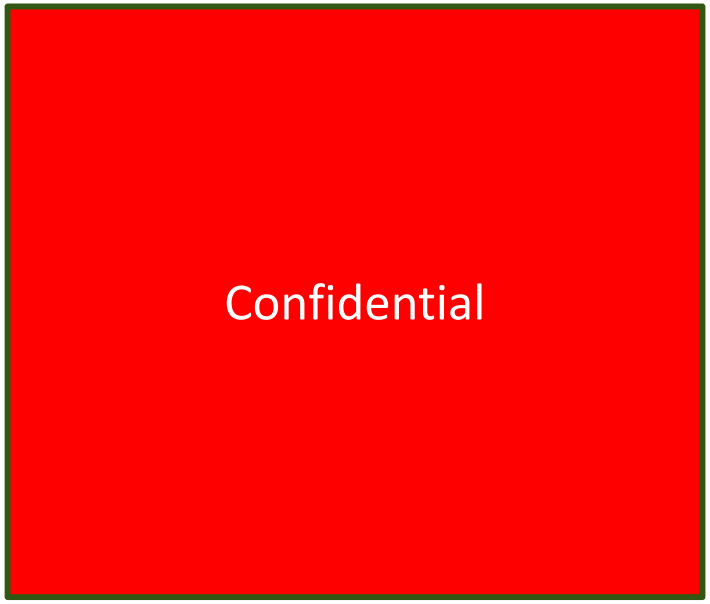
Run set No.	Group	Extraction	Dose level (%)	I_{max}				EC (w/v%)				Cell viability (%)	Prediction
				ATF3 (15-fold)	*GCLM* (2-fold)	*DNAJB4* (2-fold)	*IL-8* (4-fold)	*ATF3* EC15	*GCLM* EC2	*DNAJB4* EC2	*IL-8* EC4		
1	DNCB-PU sheet 陽性判定	Saline	12.5-100	Confidential									Negative
		Sesame oil	12.5-100										Positive
	0.78 w/v% Clotrimazole / AOO solution	-	positive control										Positive
	0.1 w/v% 4-NBB / AOO solution	-	positive control										Positive
2	PE sheet	Saline	12.5-100										Negative
		Sesame oil	12.5-100										Negative
	0.78 w/v% Clotrimazole / AOO solution	-	positive control										Positive
	0.1 w/v% 4-NBB / AOO solution	-	positive control										Positive
3	PP sheet	Saline	12.5-100										Negative
		Sesame oil	12.5-100										Negative
	0.78 w/v% Clotrimazole / AOO solution	-	positive control										Positive
	0.1 w/v% 4-NBB / AOO solution	-	positive control										Positive

＊陽性対照物質を用いた試験から成立判定

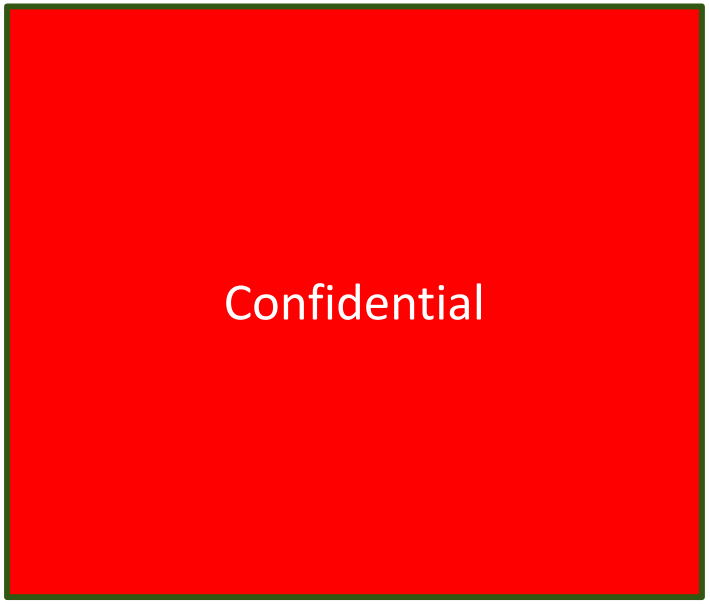
- DNCB-PUシート生理食塩水抽出液は全ての感作性マーカーで陰性
- DNCB-PUシートゴマ油抽出液でATF3(72-fold)、GCLM(5.0-fold)、DNAJB4(9.7-fold)において各Cut-Off値を超える遺伝子発現の亢進が認められた（陽性）
- 陰性対照材料であるPEシート及びPPシートにおいて、生理食塩水及びゴマ油の両抽出液で全ての感作性マーカーはCut-off値を下回り陰性とみなされた。
- LLNAの結果（生理食塩水は陰性、ゴマ油は陽性）に対して正しい予測となっている。

h-CLATによる検証

DNCB-PU sheet 陽性判定

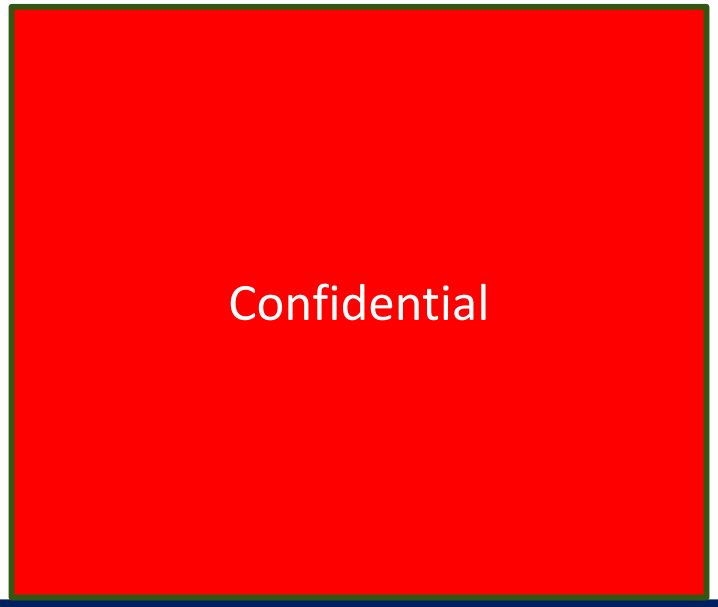


PP sheet



溶媒対照（SC）：THP-1細胞の維持培地、抽出溶媒（10%FBS培地）
陽性対照（PC）：DNCB 4 μg/mL
媒体対照（VC）：DMSO添加溶媒対照（終濃度0.2%）

PE sheet



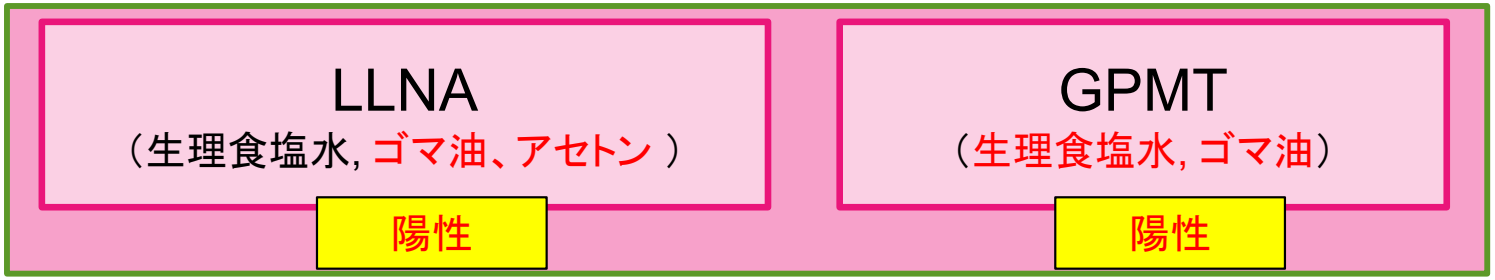
- THP-1細胞の細胞表面マーカー（CD86及びCD54）を指標
- DNCB-PUシートにおいて10%FBS培地抽出液は3回の測定でいずれも陽性（細胞生存率75%以上の添加濃度条件）
- 一方、PE及びPPシートにおける同抽出液群では3回全てにおいて陰性判定

本日の講演内容

- 感作性試験の陽性対照材料の作製
- In vivo感作性試験での性能検証
- In vitro感作性試験での性能検証
- まとめ

陽性対照材料の適用範囲

現行のin vivo 感作性試験



動物実験代替法パッケージ候補

- **DNCB-PUシートは皮膚感作性試験用陽性対照材料として公定法の*in vivo*試験並びに*in vitro*動物実験代替法に利用可能である。**
- **PE,PPシートは動物実験代替法の陰性対象材料として利用可能である。**
- **ADRA、EpiSensA、h-CLATは動物実験代替法として有用である。**
- **今後は上記3試験を中心に動物実験代替法パッケージとして評価を進める。**

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
野村　祐介
nomura@nihs.go.jp