日本動物実験代替法学会 第36回大会

2023.11.28

〈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

化学分析を利用した動物実験代替法

岡本 悠佑

国立医薬品食品衛生研究所：野村祐介，長谷川千恵，葩島由二，山本栄一
Thermo Fisher Scientific：高原健太郎
Waters：宮脇俊文
東レリサーチセンター：小野田 資
一般財団法人化学物質評価研究機構：三輪怜史
住化分析センター：内原有紀

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

岡本　悠佑
y-okamoto@nihs.go.jp

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：岡本悠佑

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

講演内容

①TTC，DSTを用いた安全性評価の概念
②化学分析アプローチ

NIHS Division of Medical Devices

講演内容

①TTC，DSTを用いた安全性評価の概念

②化学分析アプローチ

TTCに基づく安全性評価の考え方

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暴露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト暴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、暴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ヵ月	>1～12ヵ月	>1～10年	>10年（生涯）
1日摂取量（μg/day）	120	20	10	1.5

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

除外成分

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

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。

Cohort of concern constituents

- 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	$\mu g/cm^2$	μg/kg/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%

- 非反応性化学物質：DST = 900 $\mu g/cm^2$
- 反応性化学物質：　DST = 64 $\mu g/cm^2$
- 非常に感作性の高い物質群（HPCs）：DST = 1.5 $\mu g/cm^2$
  - ・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

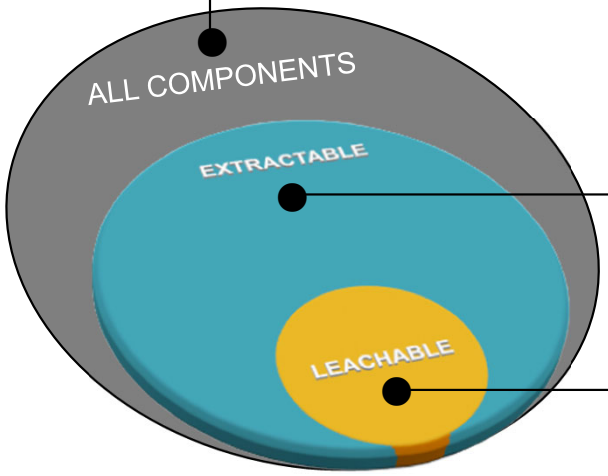
全含量試験

- THF
- Acetone/Hexane (3 : 7)

vs

苛酷抽出，徹底抽出

- MeOH
- 2-Propanol
- Acetone
- Hexane
- Di-chloromethane
- Chloroform



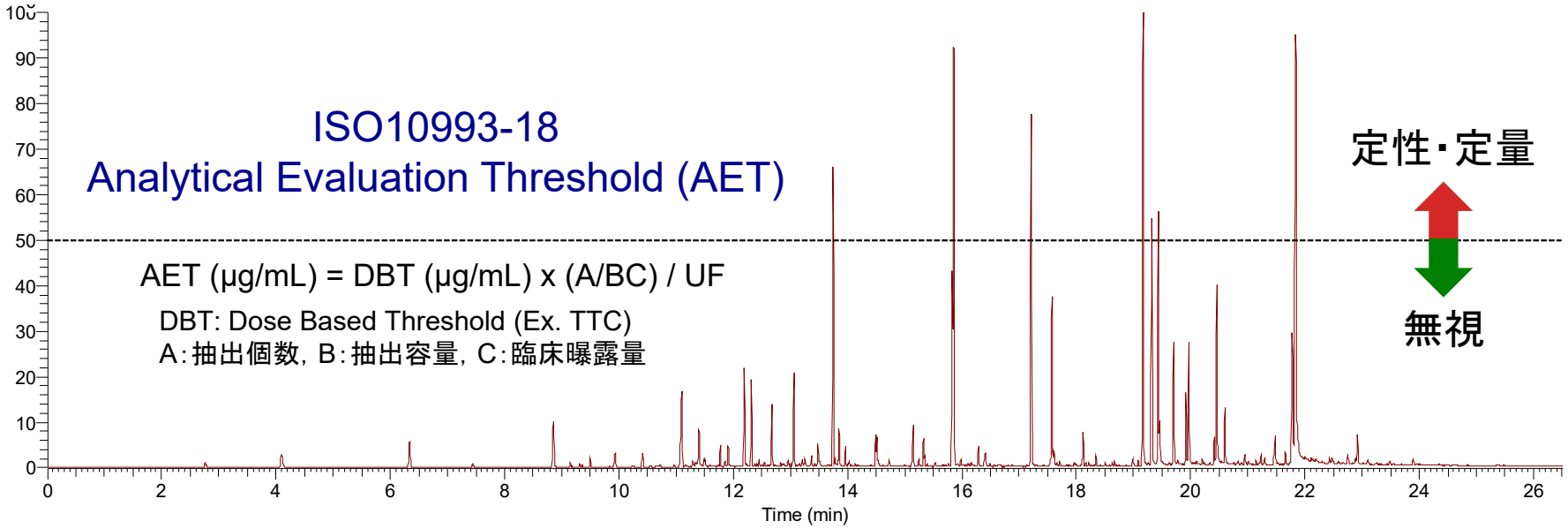
ハザード解析としては不十分な条件の試験を実施する意義があるか？

リスク評価のみで十分では？

ISO 10993
Part 12 : 抽出時に変形してはいけない
Part 18 : 組成分析時は溶解（Annex D）

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？



本日の講演内容

①TTC，DSTを用いた安全性評価の概念

②化学分析アプローチ

分析法：ISO/FDIS 10993-18 Table 3, 4 参照

医療機器の３大材料

- 金　属
- セラミックス

⇒ 分析手法，得られる結果ともに明確

- 合成高分子

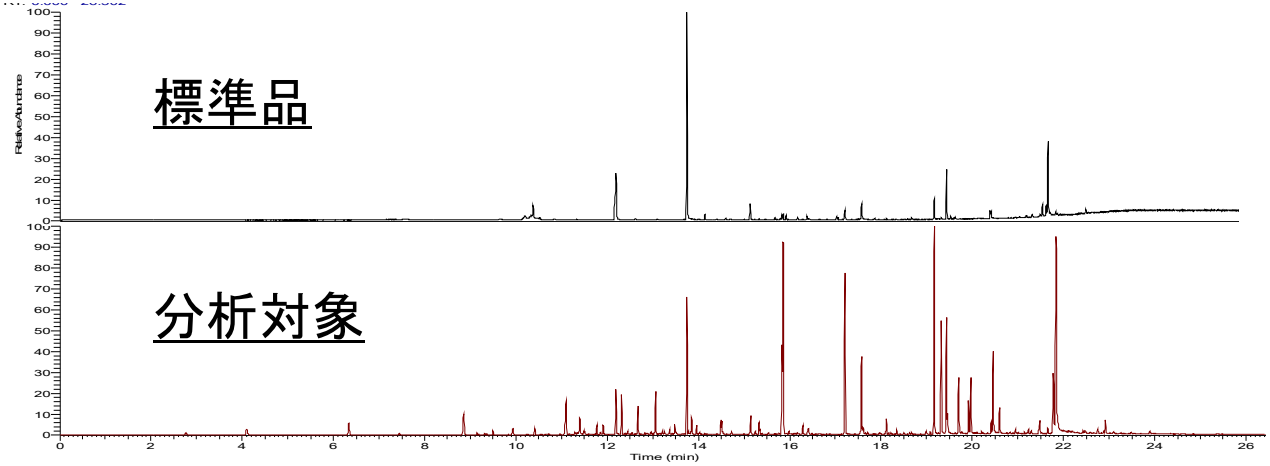
⇒ 構成成分が多様なため，質量分析計を利用した分析については，方法論の選択と得られる結果の解釈が難しい。

化学分析アプローチ

化学分析は、生物学的安全性評価を支援する

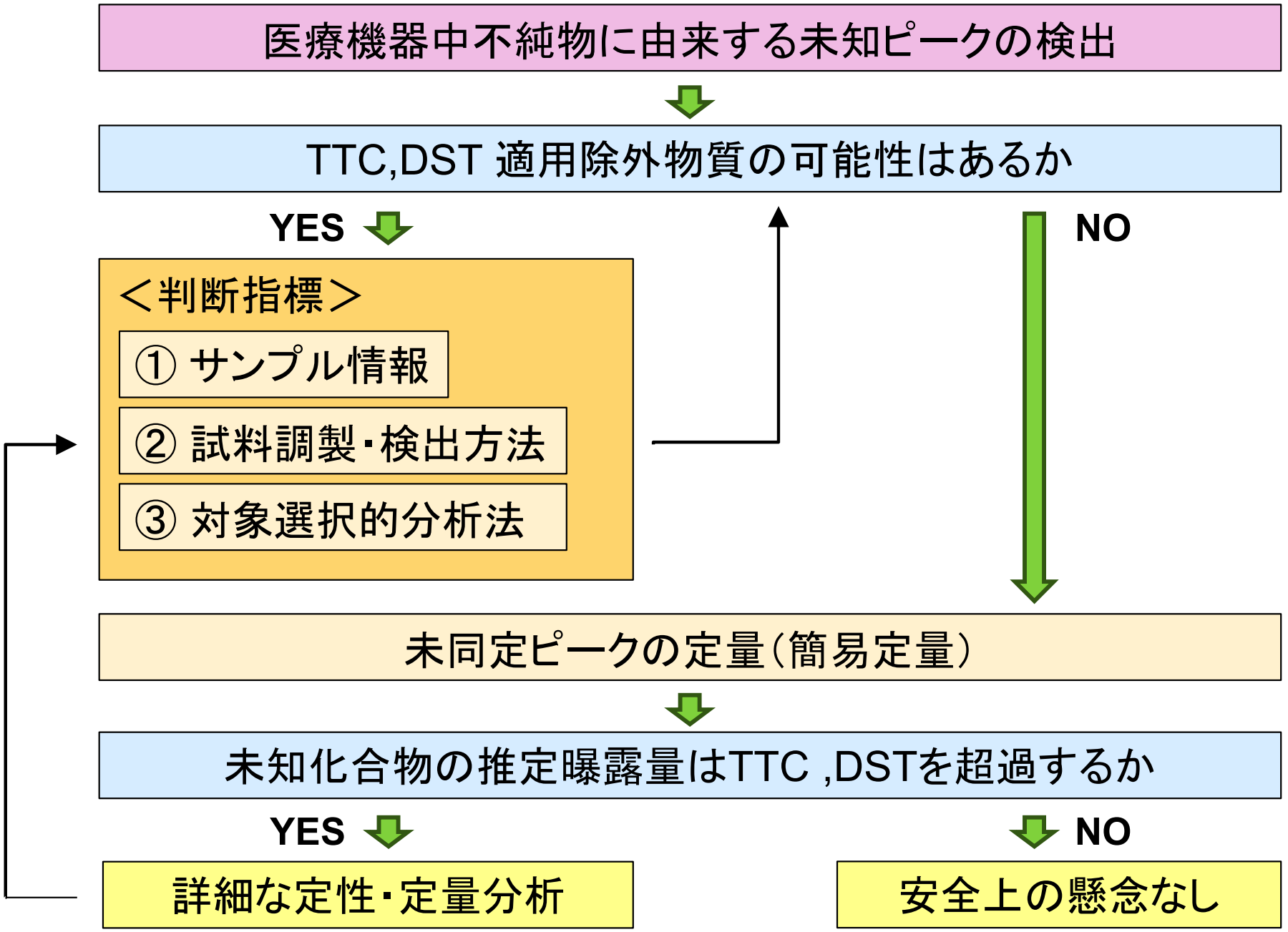
ISO 10993-18 Annex A（化学的キャラクタリゼーションの一般原則）

- 同等性の確定 （化学的同等性→材料の同等性→生物学的同等性≒生体適合性）
  対象の医療機器と臨床的に確立された医療機器との比較を可能とする化学的情報
- 適合性の確認
  対象の医療機器を該当する材料規格と比較するための化学的論拠
- 毒性学的評価の裏付け
  毒性学的リスクアセスメントの論拠となる化学的情報（定性・定量データ）



比較により
不純物を検出可能

遺伝毒性及び感作性物質を対象とした化学分析アプローチ



Koster et al. 2011 を参考に作成

TTCにおける化学分析アプローチ

＜TTC 除外物質の判断基準＞

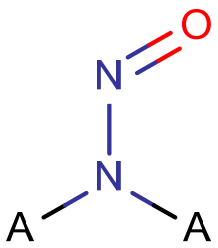
① サンプル情報

例）PP製の医用材料に生体由来の**ステロイド類**を含有する可能性は低い
⇒ 生体由来材料の場合は考慮する

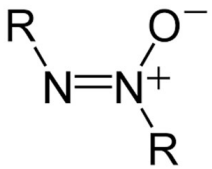
② 試料調製・検出方法

例）溶解性より極性溶媒抽出物中には**ダイオキシン類**を含有する可能性は低い
⇒ 抽出方法 ・検出系によっては「未知ピーク ≠ TTC除外物質」が成立する

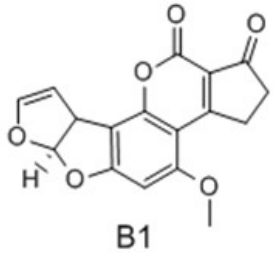
③ 対象選択的分析法



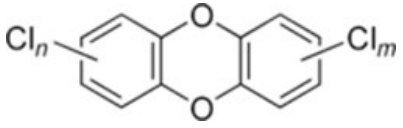
N-ニトロソ化合物



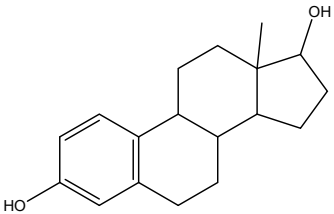
アゾキシ化合物



アフラトキシン類



ダイオキシン類

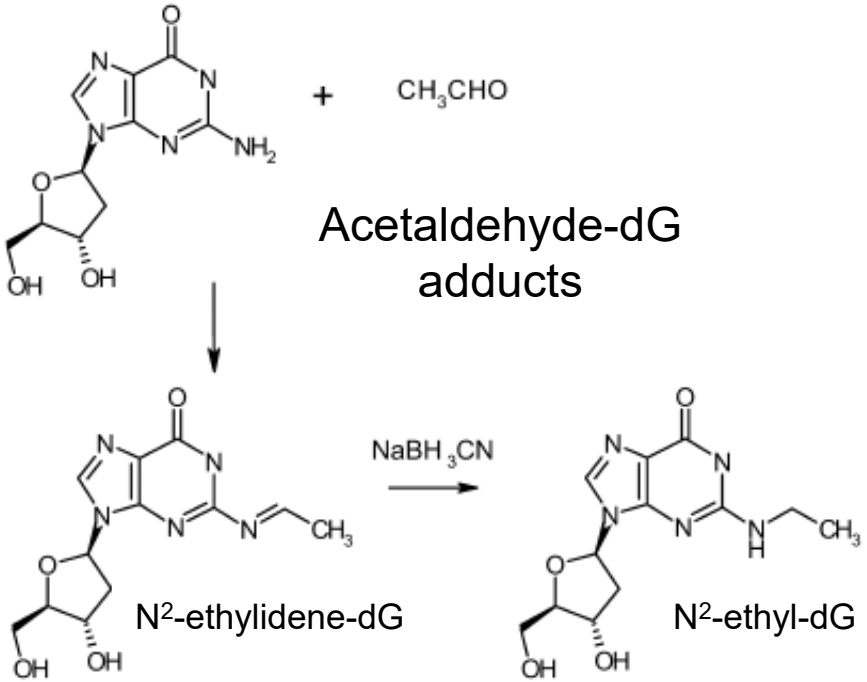


ステロイド類

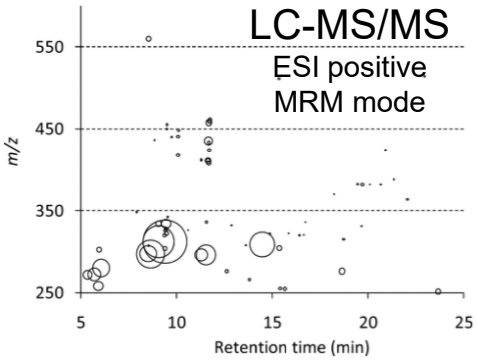
共通骨格（アラート構造）を高感度かつ網羅的に検出できる分析法を検討

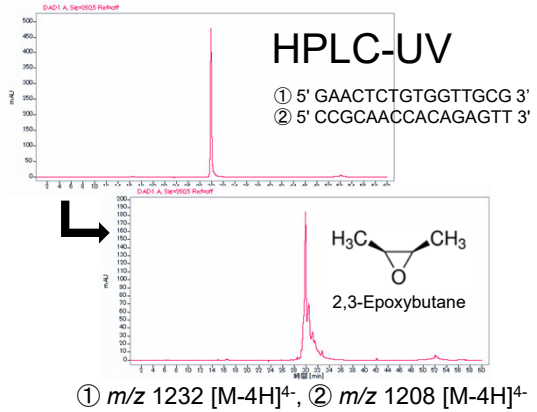
アダクト法による未知化合物検出（遺伝毒性物質）

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 57:301–304 (2009)
液体ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨﾀﾝﾃﾞﾑ質量分析法を用いたDNA損傷研究法



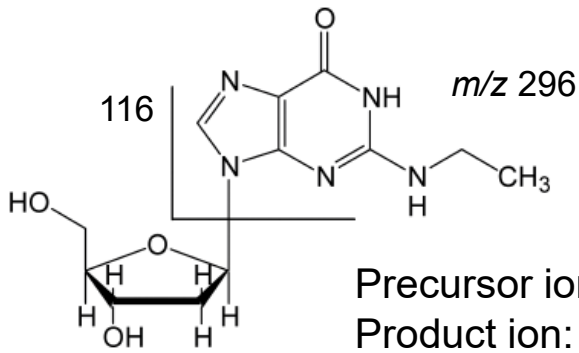
原　法	改良法
① 培養細胞 ② 化学物質添加 ③ DNA抽出	① 合成DNA ② 化学物質添加 ③ SIM mode LC–MS





① *m/z* 1232 $[M-4H]^{4-}$, ② *m/z* 1208 $[M-4H]^{4-}$

MS/MS
Collision



m/z 296 ⇒ *m/z* 180

Precursor ion: $[M+H]^+$
Product ion: $[M+H-116]^+$

アダクト法による未知化合物検出（感作性物質）

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

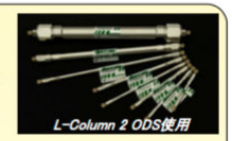
- 感作成立の初期反応である化学物質とタンパク質の結合に着目した皮膚感作性試験
- 被験物質と反応させ，ペプチドの減少率をHPLCを用いて評価

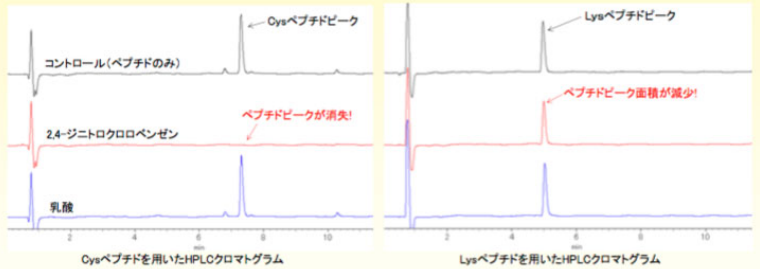
問題点
① 脂溶性物質の評価が困難
② 感度が低い

<出典> 化学物質評価研究機構HP

■DPRA試験例

被験物質
2,4-ジニトロクロロベンゼン（皮膚感作性陽性）、乳酸（皮膚感作性陰性）
反応条件
被験物質とシステイン（Cys）ペプチド及びリジン（Lys）ペプチドを混合し、25℃で24時間反応
評価
ペプチド減少率＝（1−被験物質と反応させたペプチドのピーク面積 / コントロールのペプチドのピーク面積）×100





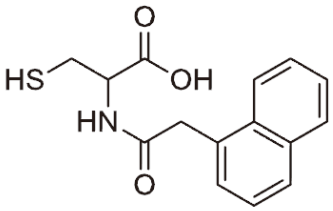
皮膚感作性評価基準

ペプチド減少率の平均	反応性区分	評価
0～6.38%	No or Minimal Reactivity	陰性
6.38～22.62%	Low Reactivity	陽性
22.62～42.47%	Moderate Reactivity	
42.47～100%	High Reactivity	

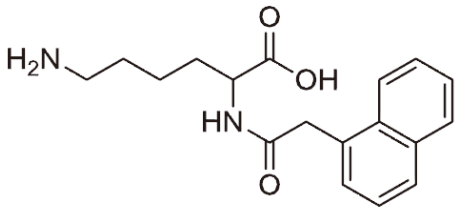
評価結果

	ペプチド減少率（%）			反応性区分	評価
	Cys	Lys	平均値		
2,4-ジニトロクロロベンゼン	100	17.6	58.8	High Reactivity	陽性
乳酸	0	0	0	No or Minimal Reactivity	陰性

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



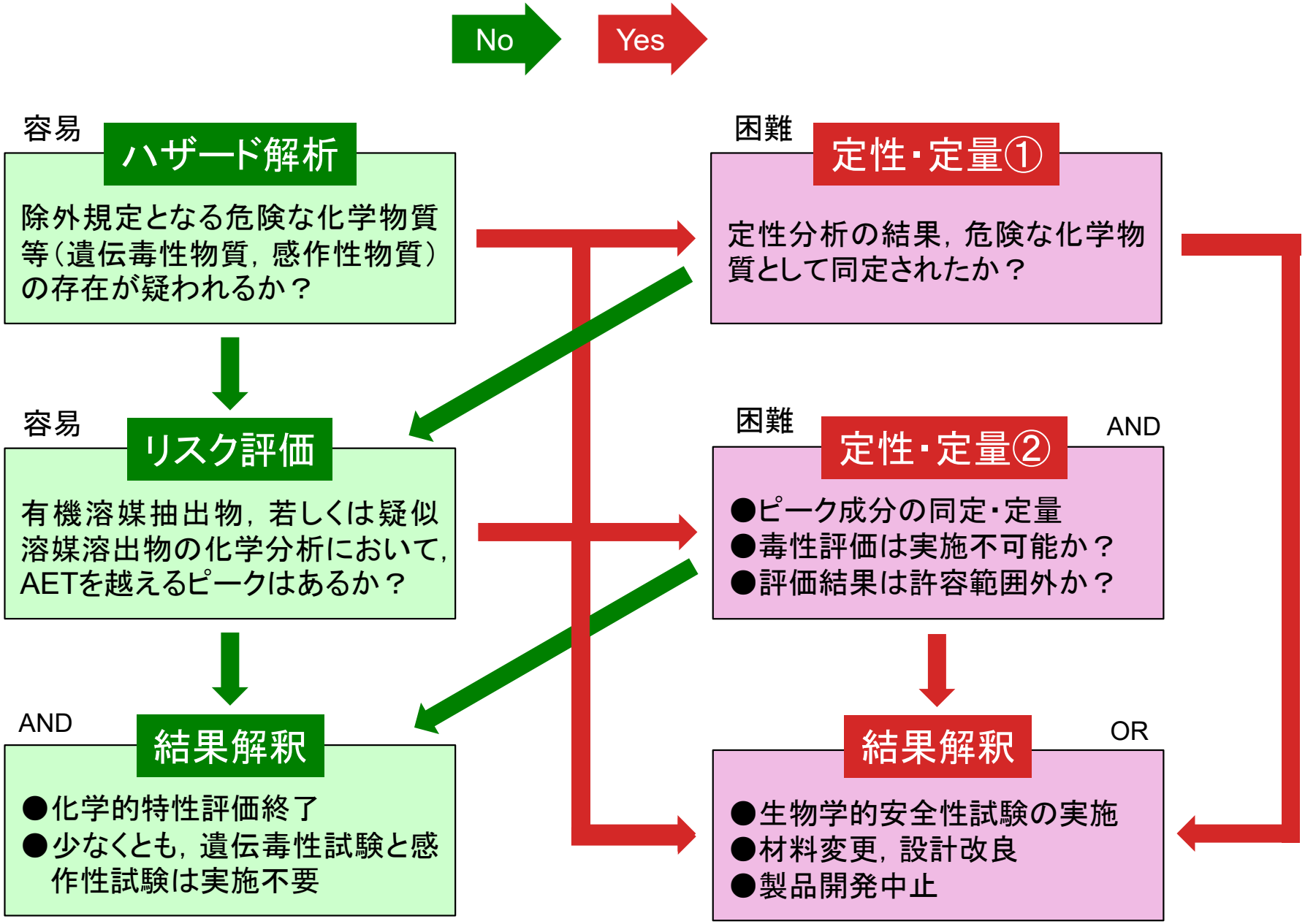
NAC



NAL

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

【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

岡本　悠佑
y_okamoto@nihs.go.jp