

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）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
（英語）Research on advancement of non-clinical tests for evaluating the safety and efficacy of medical devices

研究開発実施期間：平成31年4月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）薮島 由二
（英語）Yuji Haishima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・客員研究員
（英語）National Institute of Health Sciences, Division of Medical Devices, Guest researcher

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

＜和文＞

1. 研究背景・目的

生体と接触する医療機器の承認申請等には、生物学的安全性試験が要求されているが、動物福祉の観点から、動物実験代替法の開発が望まれている。

現行の生物学的安全性試験法ガイダンスに指定されている感作性試験法は、いずれも *in vivo* 評価法である。近年、ISO/TC 194/WG 8 は、ISO 10993-10:2021（感作性試験）に医療機器の評価にも応用可能な種々の動物実験代替法の原理や特性等を参考情報として収載したが、*in vitro* 試験パッケージは確立されていない。

ヒト用医療機器開発における一般的な非臨床試験では、人為的に特定の疾患を誘発したモデル動物を用いる。一方、がん等の末期疾患を自然発症したコンパニオンアニマル（疾患動物）は、免疫機能を保持していると共に、慢性疾患の病態を試験対象部位や他の臓器に反映させることができるため、疾患動物を用いた医療製品の安全性・有効性評価に係る試験研究は最先端製品の効果を確認する非臨床試験として非常に有益な手法の一つになり得る。飼い主にとっては獣医師が行う治療であり、費用も企業が支出するため、動物福祉団体も受入可能なシス

テムであると思われる。医薬分野における研究は米国が先行しているが、医療機器分野への応用実績を有する国は日本のみである。

本研究では、これらの背景を踏まえて、医療機器の感作性試験動物実験代替法の開発、並びに疾患動物の診断・治療データを用いた医療機器の安全性・有効性評価システムの構築に資する一連の研究を推進した。

2. 研究成果の概要

本研究における分担課題と得られた成果の概要は以下のとおりである。

1) 感作性試験動物実験代替法の開発に関する研究

化学物質の *in vitro* 感作性試験では、感作性応答の主要な事象に着目して複数の試験を組み合わせで評価することが提唱されているが、具体的な試験パッケージは確立されていない。本課題では、感作性応答の Key Event (KE) 1-4 に着目した *in vitro* 試験法について、医用材料の感作性を反映する評価マーカの選定及び判断基準の設定を行うと共に、極性溶媒抽出液のほか、非極性及び有機溶媒抽出液にも適用可能な *in vitro* 感作性試験パッケージの構築を行った。

OECD は化学物質を対象とした種々の *in vitro* 感作性試験法を提案しているが、医療機器の評価に必要な極性溶媒 (Saline) 抽出液、非極性溶媒 (Sesame oil : SO) 抽出液、有機溶媒抽出物が全て適用可能な KE1 及び KE2 に対する試験法は、それぞれペプチド結合試験 (ADRA)、再構築ヒト表皮 (RhE) モデルを用いた評価系 (IL-18 RhE Assay, SENS-IS, EpiSensA, SenCee Tox 等) に限定された。KE3 に関する評価系である GARD も非極性溶媒を適用できるが、プラットフォームを用いた 200 遺伝子の発現解析であるため、汎用性の高い h-CLAT 法の改変を試みた。いずれの試験ともに、被験物質の濃度が化学物質に適用する場合と異なるため、暴露条件や検出限界等について検討した。

LabCyte EPI-MODEL 24 SIT (J-TEC) を用いた IL-18 RhE Assay を実施した結果、SO、Acetone/Olive oil に溶解した幾つかの感作性物質は濃度依存的に細胞毒性及び IL-18 産生が増加し、陽性と判定されたが、陰性と判定される化学物質も散見されことから、*in vitro* 代替法としての利用は不適と判断された。Liquid paraffin (LP)、SO、LP/SO (1:1) を暴露溶媒として h-CLAT を行った結果、感作性が強い物質は短時間暴露でも通常の h-CLAT と同様に検出することができた。しかし、感作性が弱い物質については感度が低く更なる改良が必要であったため、感作性物質の暴露条件について再検討した結果、h-CLAT に供する抽出溶媒としては FBS 含有培地が適切であることが確認された。

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB : LLNA Potency Category = Extreme) を 1%含有するポリウレタン (PU) シートは、現行の公定法である GPMT (Saline・SO 抽出液) 及び LLNA (SO・有機溶媒抽出物) において明瞭な陽性反応を示す。同シートを試料として、ADRA、EpiSensA、h-CLAT を実施した結果、それぞれ水及び Acetonitrile 抽出液、SO 抽出液、FBS 含有培地抽出液において陽性反応が観察され、これらの *in vitro* 試験は *in vivo* 試験と相関性を有することが確認された。EpiSensA の感度向上を目的として、RhE モデルに添加する DNCB の絶対量が同一となるように濃度と暴露量を変化させて検討した結果、医療機器抽出液の評価については暴露量を 100 μ L に設定することが適切と考えられた。LLNA Potency Category が Strong、Moderate、Weak に属する 6 種類の感作性物質を個々に配合した PU シートを作製し、改変 EpiSensA、h-CLAT により評価した結果、いずれの検体ともに両試験系において陽性反応を示した。これらの標準材料を用いた GPMT による検証も行っている。

これらの成績から、各 KE を反映する感作性試験代替法試験パッケージとしては、ADRA (水・Acetonitrile 抽出)、改変 EpiSensA (Saline・SO 抽出)、h-CLAT (FBS 含有培地抽出) が利用できることが明らかとなった。現在、ISO/TC 194/WG 8 において *in vitro* 感作性試験の導入に関する技術仕様書「ISO/DTS 11796 : 2021」が提案され、国際ラウンドロビンの実施へ向けた討議が進められている。日本からは、本課題で開発した試験パッケージと標準材料の使用について提案する。また、将来的には国内ガイダンスへも反映させる。

2) 疾患動物を利用した医療機器の安全性・有効性評価の基本的考え方の策定に関する研究

疾患動物を用いた試験研究は、①ヒトを対象とした臨床試験と類似の治療環境をシミュレートできる、②「臨床研究法」及び「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器等法）」下では、ヒト臨床試験と比較して、有害事象発生時の社会的制裁リスクが小さい、③ “dog year”に基づく試験期間の短縮が期待できる等の利点を有している。

本課題では、関連学術・業界団体、規制当局、動物福祉団体と連携の下、動物実験と獣医療、ヒト臨床研究・治験との狭間を埋める新たな仕組みとなり得る「疾患動物を用いた治療的試験研究」を医療機器の安全性・有効性評価法の選択肢の一つとして世界に先駆けて確立するにあたり、考慮すべき法務的・倫理的基盤、遵守すべき法律、適応症例・機器、リスク評価、安全性・有効性評価法、陰性対照群の設定要否、ヒストリカルデータの存在有無、実施体制等、当該システムを構築するための方策や条件等をレギュラトリーサイエンスの視点から取りまとめた（レギュラトリーサイエンス学会誌 12(2), in press, 2022）。

疾患動物を用いたヒト用医療機器の安全性・有効性評価は、治験の実施が必要な製品の前臨床試験又は First-in-Human 代替試験として位置付けられる。その他、測定デバイスの性能確認試験やシミュレーション試験の代替として利用する選択肢もある。

医療機器の開発において、疾患動物を用いた治療的試験研究を行う上では、法務、獣医療倫理、動物実験倫理に係る要求事項を充足する必要があると共に、動物臨床倫理を考慮する要否についても検討することが求められる。当該試験は、対象機器の開発者（大学等の研究者又は製造販売業者）、施術を担う獣医師、疾患動物の飼い主のほか、必要に応じて GLP 適合性認証を取得した安全性試験受託研究機関が連携して実施する。開発者、獣医師、安全性試験受託研究機関は、適切な試験プロトコルを作成し、それぞれの所属機関における実験動物倫理委員会、並びに必要に応じて動物臨床倫理委員会の承認を取得する必要がある。獣医師は、透明性を確保した上で試験対象とする疾患動物を選定し、飼い主に当該試験の利点と不利益、同意の撤回権、得られた試験結果の使用方法（PMDA 治験前相談、学会・誌上発表等）等について十分説明し、インフォームドコンセントを取得する。試験は、術前・術後のケアを含めて、適切な治療を提供するために必要な設備が完備された環境において実施する。施術は獣医師が行い、開発者は対象となるヒト用医療機器の設置・調整、稼働による施術補助等を担当する。試験終了後、獣医師は開発者と連携して、施術結果と術後のケア等について飼い主に詳述する。試験対象とした疾患動物の QOL の改善状況を通じて提供した治療の有効性・安全性を確認するため、飼い主は術後の一定期間、施術を担当した獣医師の診察を受けさせる。試験の準備、実施、術後の通院等、当該試験に要する費用は、基本的に開発者が責任をもって負担する。

コンパニオンアニマルは飼い主にとって家族の一員であることから、疾患動物を用いた治療的試験研究の実施にあたっては、細部に渡りヒト臨床試験と同等に配慮することが基本となる。疾患動物を用いた治療的試験研究を医療機器開発に実装する段階では、ヒトへの外挿性を含めた薬事承認に必要な要件、合意形成時の説明内容と同意書の仕様、予期せぬ不具合の発生に対応できる補償制度の構築等について、更に整理する必要があると考えられる。

3) ヒト/イヌ間の組織相同性評価に関する研究

一般的に、イヌでは LDL コレステロールが低く加齢による動脈硬化が稀である。その他、雌の性周期は 1～2 回/年（げっ歯類：1 周期 4 日）とされる一方で、早期の避妊術によってホルモン環境が修飾されている場合があること等がヒトとの相異点として挙げられる。しかし、LDL の低値及びコリンエステラーゼの高値等を除き、血液生化学データはヒトの臨床データと類似している。また、前立腺がん等の腫瘍性疾患や、骨、血管、食道等の解剖学的なヒトとの相同性は基本的に高く、疾患の検査、診断及び治療において、最新の製品を用いることにより、疾患動物の治療成績の向上とヒト用医療機器の安全性評価に係る知見の取得を目指す意義は大きいと考えられる。試験対象となるヒト用医療機器が影響を及ぼす組織の強度や反応性に関して、疾患動物の種差、系統差、

個体差等による差異を把握し、その幅がヒトの個体差の範疇として外挿可能となる評価対象及び評価方法の整備が求められる。

4) イヌに自然発症する疾患の網羅的検索に関する研究

イヌに自然発症する疾患の一例として、「アニコム家庭動物白書 2018」では、国内飼育犬の場合、消化器疾患、皮膚疾患、耳疾患が発生率の高い上位 3 疾患である。消化器疾患については、下痢、嘔吐が大半を占める。新たなヒト用医療機器の開発に応用可能なモデル疾患としては、循環器疾患、消化器疾患、眼科疾患や、自然発症した各種の腫瘍性疾患等が挙げられる。

現在、獣医領域で問題となっている疾患は多くの診療領域に存在する。眼科及び腫瘍科で観察される疾患はヒトと類似しており、ヒト用医療機器の開発に応用できるモデル疾患として極めて有効と考えられる。

日本国内における腫瘍発生状況に関しては、乳腺腫瘍（乳腺腺種、乳腺腺癌）が全症例 88,514 件のうち 16%（14,131 例）を占めている。その他、医学領域では希少腫瘍である血管肉腫等はヒトのがん治療のモデルになり得ると考えられる。近年、ヒト乳がんといヌ乳腺腫瘍とを比較した論文は報告数が増加している。様々な遺伝子を対象とした比較腫瘍学的研究においては、ヒト/イヌ間で多くの類似点が認められているため、がんを発症したイヌはヒト用医療機器の開発に応用できる可能性が高い。

循環器疾患について、①イヌに発症する僧帽弁閉鎖不全症は体外循環回路、弁置換及び弁形成デバイスの開発、②イヌの拡張型心筋症とネコの肥大型心筋症は血栓症を併発する頻度が高く、血栓捕集デバイスの開発、③イヌ及びネコに発症する徐脈性不整脈はペースメーカーやアブレーションデバイスの開発にそれぞれ応用できる可能性がある。

米国獣医師会動物研究データベース（2020 年）では、疾患を有する小動物を利用した研究課題が 355 件登録されている（腫瘍学 255 件、神経/神経外科 38 件、整形外科 27 件、循環器 19 件、眼科 12 件、画像診断 4 件）。腫瘍学分野の課題は半数以上が薬物治療に関する研究であるが、医療製品/ヒト用医療機器に係る研究が 4 件登録されている。一方、循環器及び眼科領域の課題については、薬物治療及び病態に関する研究が中心であり、医療製品/ヒト用医療機器を対象とした課題は登録されていない。

全国獣医系大学の臨床系教員（講師以上）288 名を対象として、獣医療分野において使用されている医療機器をアンケート形式で調査した結果（回答率 41%）、CT 及び MRI はほぼ 100 %普及していた。レントゲン、超音波検査機器も広く普及しているが、CT、MRI 等と比較して安価であるにも拘わらず、動物専用機器の割合が低かった（13.8±13.0%）。軟性鏡、治療用透視装置、読影用ソフトウェア、エネルギーデバイスも普及しており、特に軟性鏡については動物専用機器の割合が高かった（61.0±25.7%）、治療用透視装置、読影用ソフトウェア、エネルギーデバイスの普及率も高かったが、動物専用機器は稀であった。これらの結果から、CT、MRI、レントゲン、超音波検査機器は、動物からヒトへの機器の適応に適していることが判明した。レントゲン、超音波検査機器については、動物専用機器のニーズもあると考えられる。また、動物用軟性鏡は小児、新生児への応用の可能性があると共に、透視装置、読影用ソフトウェア、エネルギーデバイスは動物専用機器のニーズがあると考えられる。

3. 本研究の将来展望

感作性試験動物実験代替法パッケージについては、将来的に性能、再現性、堅牢性を検証するためのラウンドロビン試験を経て、国内ガイダンスに反映させる予定である。

本研究で策定した疾患動物を用いたヒト用医療機器の安全性・有効性評価の基基本的考え方は初版として位置づけられる。時代の流れに応じて、疾患動物を用いた治療的試験研究のニーズが高まり、疾患動物の診断・治療データを含む承認申請件数が増える予兆が認められた時点で改めて研究班を設立して、当該システムを実装するために必要なポイントを「第 2 版」として取りまとめる予定である。

本研究の成果は、規制当局、関連学術・業界団体、動物福祉団体、ISO/TC 194/WG 8 と共有した。本研究の直接的な成果としては、1) 動物福祉の推進、2) 日本発の動物実験代替法の提案と将来的な標準化、3) First-in-human 前に適用可能な新たな安全性・有効性評価手法の選択肢の提案、4) 医療機器の安全性・有効性評価法の高度化、5) レギュラトリーサイエンスの推進等が期待される。また、疾患動物を用いた医療機器の安全性・有効性評価に関する一連の研究における厚生労働行政及び保健福祉に係る成果としては、6) 薬事につながる新規治療機器に関する評価系の確立、7) リスク・ベネフィットバランスの可視化、8) 医療機器改良サイクルの加速、9) 治験プロトコル作成に係る基礎データとしての利用、10) 手術ロボット等の安全性・有効性評価への活用等が挙げられる。これらの効果により、日本発の新医療機器の実用化促進と患者 QOL の向上、最先端技術によるペットの治療・延命のほか、医薬分野への展開等が期待される。

1. Background and purpose

While biological safety evaluation is required to obtain approval of medical devices contacting with human bodies, development of an alternative method to animal experiments is desirable, from the viewpoint of animal protection.

Sensitization tests specified in Japanese guidance are all *in vivo* test methods. Although ISO/TC 194 is revising ISO 10993-10 to add various *in vitro* methods for sensitization, the test package required for accurately evaluating the toxicity of medical devices has not been established.

Model animals, artificially induced with a specific disease, are used in general non-clinical studies in the development of medical devices for humans. On the other hand, companion animals (diseased animals) that spontaneously develop terminal diseases such as cancer retain immune function and the pathology of the chronic disease is reflected in target-affected areas and/or other organs. Therefore, tests using diseased animals may be used as a valuable non-clinical method to confirm the safety and efficacy of medical devices with innovative techniques. Since the treatment is performed by a veterinarian, and the cost is paid by the company, the system is likely to be acceptable to animal welfare organizations. While the U.S. is leading the way in research in the pharmaceutical field, the country applied the system to the medical device field is only in Japan.

From these backgrounds, we developed a test package alternative to animal experiments for sensitization, and conducted a research contributable to develop a safety and efficacy evaluation system for medical devices using diseased animals.

2. Summary of results

1) Study on the development of alternative methods for sensitization testing

In this study, we focused on the Key Event (KE) of sensitization response and developed an *in vitro* alternative method package that can be used as a sensitization test for medical devices. Although the OECD has proposed various *in vitro* sensitization assays for chemicals, the KE1 and KE2 evaluation methods applicable to all of polar solvent extracts, non-polar solvent extracts, and organic solvent extracts required for the evaluation of medical devices were limited to peptide binding tests (ADRA) and test system using reconstructed human epidermis (RhE) model such as IL-18 RhE Assay, SENS-IS, EpiSensA, and SenCee Tox, respectively. GARD, the KE3 evaluation system, could also apply nonpolar solvents, but since it is a platform-based 200-gene expression analysis, we attempted to modify h-CLAT method that is widely used.

The IL-18 RhE Assay was determined to be unsuitable for use as an *in vitro* alternative method for medical devices, due to the presence of chemicals that resulted false negative. The PU sheets containing 1% DNCB, which showed distinct positive reactions in GPMT using saline and sesame oil extracts and LLNA with sesame oil and organic solvent extracts, were also observed to be positive in ADRA using water and acetonitrile extracts, EpiSensA with sesame oil extracts, and h-CLAT with FBS-containing culture medium extracts, respectively, indicating that these *in vitro* tests correlated with the *in vivo* tests. The sensitivity of EpiSensA with saline extracts was improved by increasing the exposure amounts from 5 μ L in the standard protocol to 100 μ L. Six types of PU sheets containing sensitizers with different LLNA Potency Category prepared as standard materials showed positive in both of EpiSensA with the modified exposure amounts and h-CLAT with the culture medium extracts. In order to evaluate the correlation between *in vitro* and *in vivo* tests, GPMT using these standard materials is now in progress. Based on these results, we propose ADRA with water and acetonitrile extracts for KE1, the modified EpiSensA with saline and sesame oil extracts for KE2, and h-CLAT with FBS-containing culture medium extracts for KE3, as alternative package methods for sensitization testing of medical devices.

2) Study on the establishment of a basic concept for evaluating the safety and efficacy of medical devices using diseased animals

Therapeutic trials using diseased animals could be a new mechanism to bridge the gap between animal testing and veterinary medicine, and animal testing and human clinical research/trials. In this study, we established the basic concept on the safety and efficacy evaluation methods for medical devices using diseased animals from the perspective of regulatory science in the points of the relevant legal and ethical bases and laws, applicable cases and devices, risk assessment, safety and efficacy evaluation methods, negative control groups, historical data, and implementation systems, with the cooperation of relevant academic societies, industry organizations, regulatory authorities, and animal welfare organizations.

Tests using diseased animals are positioned as preclinical or First-in-Human alternative studies for products that require clinical trials. It is also useful as performance verification testing and an alternative to simulation testing, for measurement devices. In order to conduct tests using diseased animals, it is necessary to fulfill requirements related to legal affairs,

veterinary ethics, and animal experimentation ethics. It is also necessary to discuss whether animal clinical ethics should be considered. This test will be conducted in collaboration with the developer of the subject device (a researcher at a university or other institution, or manufacturers), the veterinarian responsible for the medical treatment, the owner of the diseased animal, and if necessary, a contract research organization for safety testing that has obtained GLP conformity certification. Since companion animals are members of the family for their owners, it is fundamental that the same attention to detail be given in conducting tests using diseased animals as in human clinical trials.

3) Study on evaluation of tissue homology between humans and dogs

In general, age-related atherosclerosis is rarely observed in dogs because of their low LDL cholesterol. Other differences with humans include that the sex cycle of female dogs is considered to be 1-2 times/year (rodents: 4 days per cycle), while the hormonal balance may be modified by early contraception. However, except for low LDL and high cholinesterase levels, the blood biochemical data are similar to clinical data in humans. In addition, it is basically homologous with humans to oncologic diseases such as prostate cancer, and anatomical property of tissues such as bone, blood vessels, and esophagus. Therefore, it is highly significant to obtain knowledge on the safety and efficacy evaluation of medical devices for human use through the examination, diagnosis, and treatment of diseased animals. With regard to the strength and reactivity of tissues affected by medical devices for human use to be tested, differences based on species, strain, and individual differences in diseased animals need to be identified, and it is necessary to develop evaluation targets and methods that allow the degree of the difference to be extrapolated as a category of individual differences among humans.

4) Comprehensive study on diseases naturally occurring in dogs

The top three diseases that occur naturally in domestically bred dogs are gastrointestinal, skin, and ear diseases. Model diseases that can be applied to the development of medical devices for human use include cardiovascular, gastrointestinal, ophthalmologic, and various spontaneous oncological diseases. In particular, since many similarities between humans/dogs have been observed in comparative oncology studies of various genes, dogs with diseases such as breast cancer and intravascular sarcoma are likely to be applicable for the development of medical devices for human use. In the case of cardiovascular disease, mitral regurgitation in dogs may have applications in the development of extracorporeal circuits, valve replacement and valvuloplasty devices. Dilated cardiomyopathy in dogs and hypertrophic cardiomyopathy in cats is associated with thrombotic complications with a high frequency and may be used to develop thrombus trapping devices. Bradyarrhythmias that occur in dogs and cats may be applicable to the development of pacemakers and ablation devices.

There are 355 research projects using small animals with disease registered in the 2020 American Veterinary Medical Association Animal Research Database. More than half of the oncology issues are related to drug therapy, but four studies related to medical products/medical devices for human use are registered.

A survey of the types of medical devices used in the veterinary field in Japan revealed that CT, MRI, X-ray, and ultrasound diagnostic device is almost 100% widespread and suitable for animal-to-human adaptation. Veterinary flexible endoscope is expected to be applied to the development of the devices for children and neonates.

3. Future prospects

The findings of the alternative package methods for sensitization testing will be provided to ISO/TC 194, and in the future, the test method may reflect to Japanese guidance, after completion of Round Robin test to verify performance, reproducibility and robustness.

The basic principles for evaluating the safety and efficacy of medical devices using diseased animals established in this study are positioned as the 1st edition. When the needs for therapeutic trial research using diseased animals increase in accordance with the trends of the times, and there are signs that the number of applications for approval including diagnostic and therapeutic data of diseased animals will increase, a new research group will be established to compile the points necessary for the implementation of this system in a 2nd edition.

The results of this study will lead to advancements in non-clinical studies, and may contribute to promote animal protection and development of new medical devices with improved safety.