

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) 脱細胞化組織を利用した医療機器の品質及び安全性評価法の開発に関する研究
(英語) A study on the development of quality and safety evaluation methods for
medical devices using decellularized tissues

研究開発実施期間: 令和4年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 野村 祐介
(英語) Yusuke Nomura

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・室長
(英語) Section Chief, Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

〈和文〉

1. 研究背景・目的

近年、生体組織から細胞成分を除去して得られる脱細胞化組織等を用いた革新的な医療機器の開発が進められており、米国を中心に多くの製品が上市されている。国内においても、異種動物や iPS 細胞由来組織等の脱細胞化組織を利用した医療機器の開発研究が進んでいる。脱細胞化組織の骨格となる細胞外マトリクス (ECM) に残存するサイトカイン及び細胞外小胞に類似したマトリックス結合ナノベシクル (MBV) 等が抗炎症性 M2 様マクロファージへの分極化や幹細胞の分化等、生体組織の再構築において多くの良好な影響を与えていることが報告されている。一方、当該機器は適用部位毎に要求される力学特性が異なり、製造過程において生じ得る力学特性変化の影響は不明であると共に、使用した化学物質の残留が生体に影響を与える懸念がある。また、当該組織を利用した医療機器の生物学的安全性評価において、細胞毒性等の陽性が疑われる成績が得られていると共に、組織再構築が困難となる事象も確認され、潜在的な未知リスクの評価法及び従来の生物学的安全性評価の適用に関する検証が必要である。

本研究では、脱細胞化組織等を利用した医療機器における未知リスクを抽出すると共に、その品質及び安全性を適切に評価できる手法の開発へ向け、① 残留物質の同定及び評価、② マクロファージ表現型を指標とした新規生体適合性評価法の開発、③ 生物学的安全性評価の問題点抽出と解決法の開発、並びに④力学特性評価に関する研究を実施した。また、当該研究成果を基に、⑤脱細胞化組織等を利用した医療機器の品質及び安全性評価法に関するガイダンスの策定を目指した。

2. 研究成果の概要

研究を遂行する上で必要な産官学連携体制を構築すると共に、研究班全体を統括し、進捗状況や研究の方向性等を管理した。脱細胞化組織等を利用した医療機器における未知リスクを抽出すると共に、その品質及び安全性を適切に評価できる手法の開発を実施した。当該成果を基に、次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業に設立された脱細胞化組織利用機器審査ワーキンググループと連携し、報告書をまとめたと共に、脱細胞化組織利用機器の評価指標案を作成した。当該評価指標案はパブリックコメントを介して、厚生労働省医薬局医療機器審査管理課長通知として発出された。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) 残留物質の同定及び評価に関する研究

残量物の同定及び評価法開発の一環として、モデル材料（未脱細胞化処理のブタ血管組織）及び実製品（脱細胞化処理組織）を用いて核酸、蛋白質等の生体由来物質及び脱細胞化試薬の残留評価法構築を進めた。また、脱細胞化処理において、界面活性剤等の薬剤を用いた化学的処理又は高水圧・凍結融解等の物理的処理を実施し、各種化学分析手法により残留物の検出及び含量測定を実施した。結果、核酸（UV 及び蛍光検出）は $\mu\text{g/g}$ （乾燥重量）、ステロイドホルモン（MS 検出）は pg/g 、蛋白質及び糖蛋白質（免疫蛍光検出）は $\text{ng} \sim \text{pg/g}$ オーダーの検出が可能であった。また、LC-QTOFMS によるプロテオーム解析では、処理別の組成変化の差異が確認され、ブタ血管組織において、細胞骨格維持・循環器系及び ECM 構成関連蛋白質群の処理前後の量的相対強度比較が可能であった。

2) マクロファージ表現型を指標とした新規生体適合性試験法に関する研究

マクロファージ様細胞株等を利用して脱細胞化組織と相互作用させた後の分極状態を種々の方法で検討し、その結果から生体適合性を評価するための新規手法を構築することを試みた。

2種類のヒト由来細胞を用いて、炎症系細胞（M1）及び炎症抑制系細胞（M2）の表面マーカーに対する免疫染色を検討した結果、M1 マーカー、M2 マーカーとして利用可能な表面抗原を見出すとともに、それらを二重染色して得られる蛍光像の強度比を利用して判別が可能となることを見出した。また、脱細胞化組織の培地抽出液が細胞の分極に与える影響について予備的検討を実施したところ、脱細胞化組織の抽出液が M1 分極を阻害することを示唆する結果を得た。

一方、M1 マーカー分子の発現に伴い発光する遺伝子組み換え細胞を用いて、脱細胞化組織と直接相互作用した際の分極状態を観察・測定し、脱細胞化組織が炎症系細胞の分極に与える影響・原因を検討した。その結果、脱細胞化組織の炎症抑制には脱細胞化処理後の組織構造のみならず、細胞外小胞、並びに処理後に残存する細胞やタンパク質が寄与していることが示唆された。

3) 生物学的安全性評価の問題点抽出と解決に関する研究

本研究では、医療機器の細胞毒性評価における従来試験法を脱細胞化組織に適用した際の問題抽出とその解決策を検討した。コロニー形成法、NRU 法及び（XTT 法と類似）WST 法の試験結果から現行の評価基準でも脱細胞化組織は細胞毒性無と評価されることが判明した。しかしながら、コロニー形成法においては、コロニーを形成する細胞形態異常やコロニー内の細胞数の減少などの観察結果から、脱細胞化組織の抽出液はコロニー形成率には影響を及ぼさないものの、細胞増殖率やコロニー形態に影響を与えることが示唆された。一方、細胞形態を判定基準とする Elution 法では、接着が緩く丸い形状の細胞が多数観察され、現行の判定基準では細胞毒性有と判定された。これらの結果を勘案すると、脱細胞化組織の場合、単純に細胞の形態の変化で細胞毒性のグレード付を決定することは偽陽性判定につながる危険性があることが考えられた。これらの試験には培養液による脱細胞化組織の抽出液を適用するが、抽出工程で脱細胞化組織自体に抽出溶媒である培養液中の成分が吸着する恐れがあることから、抽出処理前の培養液と脱細胞化組織抽出後の培養液の成分比較をした結果、両者間で差があるいくつかの成分を同定した。これらの成分と細胞形態や細胞増殖の関連を明らかにすることは、脱細胞組織特有の試験法（主に抽出工程）の改良につながると思われる。

4) 力学特性評価法に関する研究

本課題では、脱細胞処理や滅菌処理による力学的影響を確認するとともに、サンプリング箇所やその方向、採取組織の生体内テンション状況により各種力学特性に与える影響があることを明らかにした。本課題で用いたブタ大動脈における脱細胞処理と滅菌処理の条件では、力学特性に大きな影響を与えなかったが、この違いがどの程度臨床成績に影響するかは、用いる部位や処理条件の違いでその影響は異なるので、製品化の条件にて、性能への影響を確認する必要がある。

その他、力学特性評価方法として2軸引張試験方法を開発し、脱細胞化処理が血管組織の力学的特性に与える影響の詳細な評価が可能となり、今後の評価において活用される可能性が示された。

3. 本研究の将来展望

本研究班では、評価指標発出の成果を得ることができた。一方で脱細胞化組織には未知の部分も山積している。また、ヒト由来組織材料等も開発されているため、これらを対象とした評価法開発を推進する必要がある。本研究の直接的な成果としては、レギュラトリーサイエンスの推進等が期待される。また、脱細胞化組織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、日本発の新医療機器の実用化促進と患者 QOL の向上等が期待される。

1. Background and purpose

Recently, decellularized tissues made from biological tissues with cellular components removed have been developed, and many products have been released in the United States and other countries. Research and development of medical devices using decellularized tissues derived from animals or iPS cells is also underway in Japan. This study aims to identify unknown risks associated with medical devices using decellularized tissues and to develop methods to evaluate their quality and safety.

2. Summary of results

We identified unknown risks associated with medical devices using decellularized tissue and developed methods to adequately assess their quality and safety. Based on these results, we collaborated with the “Development of guidance for the approval process of brand - new medical devices and cellular and tissue-based products” project to prepare a report and guidance for medical devices using decellularized tissue. This guidance was issued as a notification by the Director of the Medical Device Evaluation Division, Pharmaceutical Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare, after public comment.

1) Studies on identification and evaluation of residues in medical devices using decellularized tissue.

As part of the development of methods for identifying and evaluating residual substances, we used model materials (undecellularized porcine vascular tissue) and actual products (decellularized tissue) to develop methods for evaluating the residual biosubstances such as nucleic acids and proteins, as well as decellularization reagents. It was possible to detect nucleic acids in µg/g (dry weight sample) using by UV and fluorescence detection, steroid hormones in pg/g using LC-MS, and proteins and glycoproteins in the ng/g to pg/g order using by immunofluorescence detection. In addition, proteome analysis using LC-QTOFMS confirmed the compositional changes due to decellularized treatment in porcine vascular tissue, it was possible to compare the quantitative relative intensities of cytoskeleton maintenance, circulatory system, and ECM composition-related protein groups with and without treatment.

2) Study on a possibility to develop a new biocompatibility test method using macrophage phenotype as its indicator

We tried to establish a novel method for evaluating biocompatibility by evaluating the polarization state of various types of macrophage-like cells after their interaction with decellularized tissues.

Using two different types of human-derived cells, we examined immunofluorescence staining for surface markers of inflammatory cells (M1) and anti-inflammatory cells (M2). As a result, we identified possible surface antigens that can be used as M1 and M2 markers and found that the intensity ratio of the fluorescence images obtained by double staining can be used to evaluate their polarization state. Additionally, results of preliminary investigations for effects of culture medium extracts of decellularized tissue on cell polarization suggested that the extracts inhibit M1 polarization of the cells.

On the other hand, using genetically modified cells which emit light in response to the expression

of M1 marker molecule, the polarization state of the cells directly interacted with decellularized tissue was evaluated to estimate the effects and causes of decellularized tissue on the polarization of inflammatory cells. The results suggested that the anti-inflammatory effect of decellularized tissue is not only due to the tissue structure after decellularization but also to extracellular vesicles and cells and proteins remaining after processing.

3) Study on identifying problems and their solutions

We tried to identify issues arising from the application of conventional testing methods for evaluating the cytotoxicity of medical devices to decellularised tissues and explored potential solutions. The results of colony formation test, NRU test, and WST test (similar to XTT test) indicated that decellularised tissues are evaluated as non-cytotoxic even under current evaluation criteria. However, in the colony formation assay, observations such as abnormal cell morphology in colonies and a decrease in the number of cells within colonies suggested that the extract solution from decellularised tissue does not affect colony formation rate but may influence cell proliferation rate and colony morphology. On the other hand, in the Elution test, which uses cell morphology as the evaluation criterion, numerous cells with loose adhesion and round shapes were observed, and these were judged to be cytotoxic according to the current evaluation criteria. Considering these results, it was considered that determining the toxicity grade of decellularised tissue solely based on changes in cell morphology could lead to false-positive judgments. To address these issues, we compared the components of the untreated culture medium and the extract (culture medium) from decellularized tissue. As a result, several components were identified that differed between the two. Clarifying the relationship between these components and cell morphology and proliferation is expected to lead to improvements in test methods specific to decellularised tissue (mainly the extraction process).

4) Research on mechanical characterisation methods

In this project, the mechanical effects of decellularisation and sterilisation were confirmed, and the effects on various mechanical properties were clarified depending on the sampling site, its direction and the in vivo tension status of the collected tissue. The decellularisation and sterilisation conditions used in this project in the porcine aorta did not have a significant effect on mechanical properties, but it is necessary to confirm the effect on performance under commercialisation conditions to see to what extent this difference affects clinical results, as the effect differs depending on the site used and treatment conditions.

In addition, a biaxial tensile test method was developed as a mechanical property evaluation method, enabling a detailed evaluation of the effect of decellularisation treatment on the mechanical properties of vascular tissue, and suggesting the possibility of its use in future evaluations.