

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）医療機器の感作性試験動物実験代替法の高度化と標準化に関する研究
（英 語） Study on the sophistication and standardization of alternative animal
testing methods for sensitization testing of medical devices

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）山本 栄一
（英 語） Eiichi Yamamoto

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・部長
（英 語） Director, Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

人体に接触する医療機器の承認申請においては、皮膚感作性の評価が求められる。従来、医療機器の抽出液を試料とし、モルモット最大化試験（Guinea Pig Maximization Test）やマウス局所リンパ節アッセイ（Local Lymph Node Assay）などの *in vivo* 試験法により評価されてきた。しかし近年では、国際的な動物福祉の原則に基づき、医療機器の感作性評価においても動物実験代替法の導入が強く求められている。

皮膚感作は、生体応答の4つの主要なキーイベント（Key Events：KE）を通じて誘発されると考えられており、化粧品や化学物質の評価においては、各KEに対応した試験法が経済協力開発機構により公表されている。KE1は化学物質と表皮タンパク質との共有結合であり、代表的な *in chemico* 評価法として Direct Peptide Reactivity Assay（DPRA）および Amino Acid Derivative Reactivity Assay（ADRA）がある。KE2は化学物質によるケラチノサイトの活性化であり、その *in vitro* 評価には KeratinoSensTM、LuSens、ならびに三次元皮膚モデルを用いた Epidermal Sensitization Assay（EpiSensA）等が用いられる。KE3は抗原提示能を有する樹状細胞の活性化であり、その *in vitro* 評価法として human Cell Line Activation Test（h-CLAT）やインターロイキン-8 レポーター遺伝子アッセイ（IL-8 Luc アッセイ）などが知られている。

皮膚感作は複数のKEを経て惹起されるため、化学物質分野では複数の試験結果を組み合わせるデータ統合型評価法（Defined Approach：DA）が提案されている。代表的な手法として、3つのKEに対応する試験のうち2つで一致した結果（陽性または陰性）が得られた場合に最終判定を行う「2 out of 3（2/3）アプローチ」等がある。一方、医療機器分野では ISO 10993-10 附属書 C に各種の動物実験代替法が記載されており、これらの試験法を抽出工程と整合させた評価パッケージとして構築することが課題である。

本研究では、医療機器における皮膚感作性試験の動物実験代替法の高度化および標準化を目的として、医療機器用皮膚感作性評価パッケージの開発に取り組んだ。具体的には、KE1の評価法として ADRA、KE2の評価法として EpiSensA、KE3の評価法として h-CLAT を選択し、医療機器評価に適用可能な試験条件の検討及び性能評価を進めた。さらに、開発した試験系の妥当性確認に加え、従来の公定法にも適用可能と考えられる新規陽性対照材料の開発にも取り組んだ。その結果、以下の成果を得た。

医療機器の *in chemico* 感作性試験に関する研究では、KE1の評価を目的として、ADRA 及びその応用法である光感作性評価法（Photo-ADRA）を医療機器や医用材料の抽出液を検体とする試験法に最適化したとともに、国内での共同比較試験の実施に向けた調整を進めた。さらに、ADRA と DPRA の比較検討により、ADRA は医療機器抽出液の評価に適した手法であり、実用上有用であることが示された。

医療機器の *in vitro* 感作性試験に関する研究では、感作性応答のKE2及び3の評価法である EpiSensA 法及び h-CLAT 法について、医療機器用試験法として条件検討及び性能評価を進めた。

医療機器の感作性試験に用いるモデル材料の開発では、テトラメチルチウラムジスルフィド（TMTD）含有イソプレンゴム、ジエチルジチオカルバミド酸亜鉛（ZDEC）含有エチレンプロピレンゴム、ビス（ジブチルジチオカルバミン酸）亜鉛（ZDBC）含有エチレンプロピレンゴム等を用いて評価を行った。加えて、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン含有ポリウレタンシート（DNCB-PU）を陽性対照材料として開発し、その有用性を示した。光感作性試験用にはベンゾフェノン 4%含有低密度ポリエチレン（LDPE）を見出した。

上記の3つの方法を組み合わせることで、医療機器の皮膚感作性評価に適用可能な代替法試験法パッケージとなり得ることを示した。

本研究の成果は、医療機器の皮膚感作性評価における動物実験の削減を通じて倫理的要請に応えるとともに、科学的根拠に基づく安全性予測を可能にする。これにより、近い将来には、1) 先端技術や新規医用材料を用いた医療機器に対応した評価技術の開発、2) 評価要件・技術要件の明確化に資する科学的エビデンスの蓄積、及び3) 関連する薬事上の課題の抽出等への展開が期待される。

Overview of Research and Development

The evaluation of skin sensitization is a mandatory component of the approval process for medical devices that come into contact with the human body. Conventionally, these evaluations have been executed through the implementation of in vivo test methodologies, including the Guinea Pig Maximization Test (GPMT) and the Local Lymph Node Assay (LLNA), with extracts from the medical devices serving as test specimens. However, in recent years, there has been a strong demand for the implementation of alternative methods to animal testing in the evaluation of medical device sensitization, grounded in international animal welfare principles.

The induction of skin sensitization is believed to be attributable to four major key events (KEs) in the biological response. For the evaluation of cosmetics and chemicals, test methods corresponding to each KE have been published by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). KE1 is defined as the covalent binding of a chemical to epidermal proteins. Representative in chemico assessment methods include the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) and the Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA). KE2 is the activation of keratinocytes by a chemical substance. The following methods are used for its in vitro evaluation: KeratinoSens™, LuSens, and the Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA). The latter is performed using a three-dimensional skin model. KE3 refers to the activation of antigen-presenting dendritic cells, and well-known in vitro assessment methods include the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and the interleukin-8 reporter gene assay (IL-8 Luc assay).

In light of the fact that skin sensitization is induced through multiple KEs, “Defined Approach” that combines the results of multiple tests has been proposed in the field of chemical substances. A representative method is the “2 out of 3 (2/3) approach,” in which a final determination is made when consistent results (positive or negative) are obtained in two of the three tests corresponding to the three KE categories. Concurrently, in the domain of medical device engineering, a range of alternatives to animal testing is delineated in Annex C of ISO 10993-10. A pivotal challenge lies in the development of an evaluation package that integrates these test methods with the extraction process.

In this study, we developed a skin sensitization evaluation package for medical devices. Our objective was to advance and standardize alternative methods to animal testing for skin sensitization testing of medical devices. Specifically, ADRA was selected as the evaluation method for KE1, EpiSensA for KE2, and h-CLAT for KE3. The examination then proceeded to the test conditions applicable to medical device evaluation and performance evaluation. In addition to validating the developed test systems, we worked on the development of new positive control materials that are considered applicable to conventional official methods. Consequently, the following achievements were obtained.

In the context of research on in chemico sensitization testing for medical devices, with the objective of evaluating KE1, we have refined ADRA and its application, the photosensitization evaluation method (Photo-ADRA), for testing using extracts from medical devices and medical materials as samples. We have also initiated preparations for conducting a interlaboratory study

in Japan. A comparative study of ADRA and DPRA demonstrated that ADRA is a suitable method for evaluating medical device extracts and is useful in practical applications.

In the context of research on in vitro sensitization testing of medical devices, a systematic approach was adopted for the condition screening and performance evaluation of the EpiSensa method and the h-CLAT method. These methods are classified as KE2 and KE3 evaluation methods for sensitization responses, respectively. The utilization of these methods as testing methods for medical devices was undertaken to enhance the reliability and validity of the research outcomes.

In the development of model materials for medical device sensitization testing, evaluations were conducted using tetramethylthiuram disulfide (TMTD)-containing isoprene rubber, diethyldithiocarbamate (ZDEC)-containing ethylene-propylene rubber, and zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC)-containing ethylene-propylene rubber, among others. Furthermore, a 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)-containing polyurethane sheet (DNCB-PU) was developed as a positive control material, and its usefulness was demonstrated. For the purpose of conducting a photosensitization evaluation, low-density polyethylene (LDPE) containing 4% benzophenone was identified as the appropriate material.

The efficacy of combining the three aforementioned methods was demonstrated, thus establishing a comprehensive alternative testing methodology for the evaluation of skin sensitization in the context of medical devices.

The findings of this study align with ethical standards by reducing the use of animal testing in the assessment of skin sensitization for medical devices, while concurrently facilitating safety predictions based on scientific evidence. These findings are expected to contribute to: 1) the development of evaluation technologies for medical devices using advanced technologies and novel medical materials; 2) the accumulation of scientific evidence that will help clarify evaluation and technical requirements; and 3) the identification of relevant regulatory issues.