

200501145A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等
レギュラトリ-サイエンス総合研究事業）

生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—
埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和—

H17-医薬-019

2005（平成17年度）

総括・分担研究報告書

主任研究者 児玉 幸夫
国立医薬品食品衛生研究所

平成18年（2006）3月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

研究課題名（課題番号）＝ 生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究－埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和－ （H17-医薬-019）

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 児玉 幸夫

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の

安全性評価の再評価と国際調和— (H17-医薬-019) 児玉 幸夫 ----- 1

II. 分担研究報告書

1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討 児玉 幸夫 ----- 5

2. 埋設材料の有害性に関する調査研究およびデータ解析 高木 篤也 ----- 8

3. 安全性試験に関する情報収集（各国の規制当局の情報収集を含む） 大室 弘美 ----- 12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 17

V. 参考資料

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

I. 総括研究報告書

生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究－埋設型医療機器素材の安全性評価の
再評価と国際調和

主任研究者 児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究の目的は整形外科、循環器、口腔外科領域等において、人体に埋設される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、および、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証することである。これにより、今後の埋設物安全性評価の正確性の向上が期待される。平成 17 年度より研究に着手した。これまでに得られた成果として、埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討のため、無菌動物実験に必要な専用大型ビニールアイソレーターを設計・設置した。次いで、無菌動物である IQI マウス（ICR 系マウスを無菌化した系統）を入手し、ポリエチレンシート及びガラス片と sham オペレーションを含めた埋植手術を実施した。さらに、埋植による腫瘍好発系として知られている p53 遺伝子欠失マウスの無菌動物作成を開始した。埋設材料の有害性に関する調査研究およびデータ解析では、IARC による埋め込み材料の発がん性分類の情報について整理するとともに、実際に、無菌マウスを用いた発がん性試験を行った情報を集めるため、文献を収集整理し、無菌動物埋植試験プロトコール作成に役立てた。また、埋植医療機器の安全性の適切な評価のために、ISO10993（医療機器の生物学的評価方法）及び医療機器 Good Laboratory Practice（「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」平成 17 年厚生労働省令第 37 号）に定められた基準。以下「GLP」という。）が適用される試験についての実施方法ガイドライン等に表示されている安全性試験に関する情報を収集した。

分担研究者

大室弘美（医薬品医療機器総合機構）

児玉幸夫（国立医薬品食品衛生研究所）

高木篤也（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

本研究の目的は、整形外科、循環器、口腔外科領域等において、人体に埋設される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、および、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証することにある。げっ歯類を用いた埋設材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm角、厚さ1 mm内外の板状の被検物（埋設材料）を動物の上背部皮下に埋設し、長期にわたり観察する。その結果、材料の化学的活性に殆ど依存せず、もっぱら検体の大きさと表面の性状、あるいは多孔性であるか否か、と言った物理的性質に依存して、異物好発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトにおける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に炎症性発がんが起こることが知られている。この種差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋設物安全性評価の正確性の向上に繋がり、開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考え。ヒトとげっ歯類での埋設状況の差異が最も大きいと考えられる要因の一つとして、術野の清潔性の差異がある。げっ歯類においては、免疫力がヒトに比べて高いとの理解のもと、埋設手術を含むあらゆる

手術が、簡易的消毒の元で実施されてきたことが経験される。しかし、ヒトにおける人工関節置換術など整形外科手術は、執刀医が厳重な無菌管理下で実施される。仮説として、げっ歯類の「高免疫力」が術野を瞬時に無菌化するのではなく、細菌と共存する状態を作り出すとすると、無菌環境を想定してきた今までの異物好発がんの論理に修正を加える必要がある。そこで無菌動物に板状の被検物を埋設し、無菌環境下あるいは非無菌環境下で長期飼育を行い、その発癌率を比較した。

B. 研究方法

埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討のため、無菌動物実験に必要な専用大型ビニールアイソレーターを設計・設置する。無菌動物である雌 IQI マウス（ICR 系マウスを無菌化した系統）を入手後、高分子材料及びガラス材料と sham オペレーションを含めた埋植手術を行った。動物の埋植時の週齢は12週で、一群の動物数は30匹で、総計90匹、埋植後78週間にわたって上記ビニールアイソレーター内で飼育し（1ケージ当たりの動物匹数は5匹とした）、腫瘍発生を調べる。なお、39週に15匹を中間屠殺することとした。飼料（CE-2：日本クレア、放射線滅菌済み）と水は滅菌したものを与えた。同様に埋植を行った動物をコンベンショナルな条件の動物室で飼育し、その腫瘍発生率についても調べる。さらに、埋植による腫瘍好発系として知られている p53 遺伝子ヘテロ欠失マ

ウスの無菌動物作製を開始した（児玉）。

国際機関や各国政府機関で行われている埋植材料のリスク評価報告、埋植材料の毒性に関する直近の論文までを収集し、これら化合物の毒性研究の現状について調査した（高木）。

OECD GLP テストガイドラインのがん原性試験の実施方法、ISO10993-3 及び平成 15 年 2 月 13 日医薬審発第 0213001 号「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」に示された試験方法（以下、「医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法」という。）等に規定されている埋植試験及びがん原性試験の実施方法に関する情報、性能試験に関する情報収集並びに異物発がんの要因に関する情報に関して調査した（大室）。

C, D. 結果と考察

無菌動物実験に必要な専用大型ビニールアイソレーターを設計・設置した。収容匹数はアイソレーター 1 架台当たり 18 ケージ収容可能なものが 2 架台連結したもので、無菌マウスの最大収容匹数は 180 匹である。埋植に使用した素材はガラスのものとして 10mm x 5 mm 厚さ 1.1mm のもので 4 隅を研磨したものを作製した（松浪硝子工業製）。また、高分子素材として短期筋肉内埋植試験の陰性対照として我が国で使用されている高密度ポリエチレンシート（食品薬品安全センター秦野研究所頒布）を入手し、10 mm x 5 mm 角（厚さ 1mm）に切断して実験に使用した。実験は無菌動物である雌 IQI マウスにオートクレー

ブ滅菌したこれらのポリエチレンシート、ガラスを背部皮下に埋植した。また、sham オペレーションも実施した。p53 遺伝子欠失マウスの無菌動物作成を開始し、p53 遺伝子欠失マウスの繁殖を行い、続いて帝王切開を実施し、無菌の児を得た。今後、無菌 p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスへの移植及びコンベンショナルな環境下で飼育するマウスへの移植を引き続いて行う予定である（児玉）。

国際機関や各国政府機関で行われている埋植材料のリスク評価報告、埋植材料の毒性に関する直近の論文調査では、IARC の医療用の埋植材料の発癌評価についてまとめた。埋植材料の発癌性試験に関する情報では前川ら（1984）による、ラットを用いて埋植材料の発癌性試験について整理した。また、無菌動物を用いた発癌性試験に関する情報、P53 遺伝子欠失マウスでの異物発癌に関する情報をまとめ、埋植材料を選択する際の問題点、無菌動物の発癌性試験の応用例、53 遺伝子欠失マウスの異物発癌への利用の利点等に関する有用な知見が得られた。

安全性試験に関する情報収集（各国の規制当局の情報収集を含む）では、埋植医療機器の安全性の適切な評価のために、埋設材料及び術野の滅菌又は無菌性に着目して、ISO10993（医療機器の生物学的評価方法）及び医療機器 Good Laboratory Practice (GLP) が適用される試験についての実施方法ガイドライン等に示されている安全性試験（埋植試験及びがん原性試験）に関する情報収集並びに異物発がんに関する情報を収集した。その結果、上記ガイドライン（ただし、がん原性

試験については一部の情報)及び本年度検討した文献においては、材料の形状や滅菌については言及されているが手術時の無菌性についての情報は Chu FF ら (2004 年) の論文以外になかった。また、多くの論文において材料の滅菌が完全であるかどうかについては疑問が残った。このため、来年度は手術時の無菌性及び埋植材料の滅菌に関する文献等による更なる情報収集に加え、論文に記載された材料の滅菌条件における無菌性についても検証が必要と考えられた。

E. 結論

医療用埋設物安全性評価の正確性の向上のため、マウスの長期無菌飼育試験の基盤を確立し、医療素材の移植実験を開始するとともに、医療素材の移植実験に関する情報を整理した。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J., Aisaki K., Igarashi K., Nakatsu N., Ono A., Kodama Y. and Nagao T. : "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.

BMC Genomics., 7, 64 (2006)

Yoon B. I., Kaneko T., Hirabayashi Y., Imazawa T., Nishikawa A., Kodama Y., Kanno

J., Junji Yodoi J.*¹, Han J.H.*², Hirose M. and Inoue T.: Electron Microscopical Evidence of the Protective Function of Thioredoxin (TRX/ADF) Transgene against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced Cellular Toxicity in the Liver and Brain.

J Toxicol Pathol, 18, 41-46 (2005)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討

児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

埋設物安全性評価の正確性の向上のため、げっ歯類における異物発癌の要因としての「細菌共存環境影響」について調べた。本年度は IQI（ICR 系マウスを無菌化した系統）に高分子（ポリエチレン）及びガラスの 2 種類の素材の埋植手術を実施した。さらに、埋植による腫瘍好発系として p53 遺伝子欠失マウスの無菌動物の作製を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、整形外科、循環器、口腔外科領域等において、人体に埋設される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、および、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証することにある。げっ歯類を用いた埋設材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm 角、厚さ 1 mm 内外の板状の被検物（埋設材料）を動物の上背部皮下に埋設し、長期にわたり観察する。その結果、材料の化学的活性に殆ど依存せず、もっぱら検体の大きさや表面の性状、あるいは多孔性であるか否か、と言った物理的性質に依存して、異物発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトに

おける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に炎症性発がんが起こることが知られている。この種差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋設物安全性評価の正確性の向上に繋がると考えられる。開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考えられる。ヒトとげっ歯類での埋設状況の差異が最も大きいと考えられる要因の一つとして、術野の清潔性の差異がある。げっ歯類においては、免疫力がヒトに比べて高いとの理解のもと、埋設手術を含むあらゆる手術が、簡易的消毒の元で実施されてきたことが経験される。しかし、ヒトにおける人工関節置換術など整形外科手術は、執刀医が厳重な無菌管理下で実施される。仮説として、げっ歯類の「高免疫力」が

術野を瞬時に無菌化するのではなく、細菌と共存する状態を作り出すとすると、無菌環境を想定してきた今までの異物発がんの論理に修正を加える必要がある。そこで無菌動物に板状の披検物を埋設し、無菌環境下あるいは非無菌環境下で長期飼育を行い、その発癌率を比較した。

B. 研究方法

埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討のため、無菌動物実験に必要な専用大型ビニールアイソレーターを設計・設置する。無菌動物である雌 IQI マウス (ICR 系マウスを無菌化した系統) を入手後、高分子材料及びガラス材料と sham オペレーションを含めた埋植手術を行った。動物の埋植時の週齢は 12 週で、一群の動物数は 30 匹で、総計 90 匹、埋植後 78 週間にわたって上記ビニールアイソレーター内で飼育し (1 ケージ当たりの動物匹数は 5 匹とした)、腫瘍発生を調べる。なお、39 週に 15 匹を中間屠殺することとした。飼料 (CE-2 : 日本クレア、放射線滅菌済み) と水は滅菌したものを与えた。同様に埋植を行った動物をコンベンショナルな条件の動物室で飼育し、その腫瘍発生率についても調べる。さらに、埋植による腫瘍好発系として知られている p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスの無菌動物作製を開始した。

C, D. 結果と考察

無菌動物実験に必要な専用大型ビニールアイソレーターを設計・設置した。収容匹数はアイソレーター 1 架台当たり 18 ケージ収容可能なものが 2 架台連結したもので、無菌マウスの最大収容匹数は 180 匹である。埋植に使用した素材はガラスのものとして 10mm x 5 mm

厚さ 1.1mm のもので 4 隅を研磨したものを作製した (松浪硝子工業製)。また、高分子素材として短期筋肉内埋植試験の陰性対照として我が国で使用されている高密度ポリエチレンシート (食品薬品安全センター秦野研究所頒布) を入手し、10 mm x 5 mm 角 (厚さ 1mm) に切断して実験に使用した。実験は無菌動物である雌 IQI マウスにオートクレーブ滅菌したこれらのポリエチレンシート、ガラスを背部皮下に埋植した。また、sham オペレーションも実施した。p53 遺伝子欠失マウスの無菌動物作成を開始し、p53 遺伝子欠失マウスの繁殖を行い、続いて帝王切開を実施し、無菌の児を得た。今後、無菌 p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスへの移植及びコンベンショナルな環境下で飼育するマウスへの移植を引き続いて行う予定である。

E. 結論

ポリエチレンシートまたはガラスを埋植した無菌マウスの発癌性試験を開始した。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanno J., Aisaki K., Igarashi K., Nakatsu N., Ono A., Kodama Y. and Nagao T. : "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics.*, 7, 64 (2006)

Yoon B.I., Kaneko T., Hirabayashi Y., Imazawa T., Nishikawa A., Kodama Y., Kanno

J., Junji Yodoi J.*¹, Han J.H.*², Hirose M.
and Inoue T.: Electron Microscopical
Evidence of the Protective Function of
Thioredoxin (TRX/ADF) Transgene against
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
(TCDD)-induced Cellular Toxicity in the
Liver and Brain.
J Toxicol Pathol, 18, 41-46 (2005)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定
も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 埋設材料の有害性に関する調査研究およびデータ解析

高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

埋設物安全性評価の正確性の向上のため、関連する国際機関や文献情報を収集・整理し、本研究の実験部分への情報提供や毒性評価などの背景的支持を行うことを目的としている。17年度はIARCによる埋植材料の発癌評価、埋植材料による発癌、無菌動物を用いた発癌性試験、p53欠失マウスにおける異物発癌に関して情報を収集した。

A. 研究目的

整形外科、循環器、口腔外科領域等において、人体に埋設される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すことを目的に無菌マウスや無菌p53遺伝子欠失マウスを用いた埋植発癌実験を当班で行うにあたり、実験プロトコール作成やデータ評価に有用な情報を収集整理する。

B. 研究方法

国際機関や各国政府機関で行われている埋植材料のリスク評価報告、埋植材料の毒性に関する直近の論文までを収集し、これら化合物の毒性研究の現状について調査した。

C, D. 結果と考察

IARCでの評価

IARCでは医療用の埋植材料の発癌評価を以下のように行っている(McGregor DB, 2000)。

グループ2B(ヒトでの発癌の可能性はある)

1) 薄い平滑なフィルム状の高分子埋植材料

2) 薄い平滑なフィルム状の金属埋植材料

3) コバルト、ニッケル、ニッケルクロム一鉄合金

グループ3(ヒトでの発癌性が分類不能)

1) 有機高分子材料

2) 複合材料で出来た整形外科領域の埋植材料、ペースメーカー

3) 豊胸シリコン

4) 歯科材料

5) セラミックで出来た埋植材料

埋植材料の発癌性試験に関する情報

前川ら(1984)は、ラットを用いて埋植材料の発癌性試験を実施した。3種のポリ塩化ビニル(PVC1-3)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、ジメチルポリシロキサン(各10x20mm、厚さ0.3-0.5mm)を雌雄Wistarラット(11週齢)の皮下に埋植し、2年間観察しその発癌性を比較検討した。皮下の腫瘍は全ての群で見られたが、発生率は雌雄ともPVC-3とHEMAで高かった。腫瘍の種類としては悪性線維性組織球種が最も多く見られ、次いで線

維肉腫であった。著者らは埋植材料による腫瘍発生率の差の原因は不明であるとし、また PVC には可塑剤の溶出が、HEMA には材質の変性の問題があることを指摘している。

無菌動物を用いた発癌性試験に関する情報

Chun FF ら (2004) は無菌マウスを用いた腸管の発癌性試験を実施した。腸管上皮での過酸化水素の解毒酵素であるグルタチオンパーオキシダーゼ 1 と 2 (GPX1, GPX2) の遺伝子欠失マウス (GPX-DKO マウス) を無菌化したマウスを作製した。このマウスを無菌条件下、SPF 条件下、非 SPF 条件下で飼育し腸管の腫瘍発生率を検索した。その結果、無菌条件下ではこの GPX-DKO マウスは腫瘍を発生しなかった。SPF 条件下では 9%以下の腸管腫瘍発生率であり、非 SPF 条件下では 1/4 のマウスに腫瘍発生が見られた。この結果、腸管においては細菌に関連した炎症が発癌に関与していることが強く示されたと結論している。

p53 遺伝子欠失マウスでの異物発癌に関する情報

癌抑制遺伝子の p53 はアポトーシスや細胞周期の制御などにより発癌抑制に働いていることが知られている。Marsella JM ら (1997) はアスベストによる中皮腫の発生率を p53 遺伝子欠失マウスを用いて調べた。一群 10-30 匹の p53 ホモ欠失、p53 ヘテロ欠失、ワイルドマウス (6-8 週齢) にアスベストを毎週 200 μ g (5.8×10^8 本) を腹腔内注射で、35 週間投与した。悪性中皮腫はサイトケラチンの免疫組織染色で確認した。その結果、投与開始から 22 週後のホモマウスで 12.5%の中皮腫の発生が見られた。ホモマウスでは残りの動物は胸腺リンパ腫や血管肉腫で死亡したため、中皮腫の

それ以上の評価は出来なかった。一方、p53 ヘテロ欠失マウスでは 44 週目で 76%のマウスが中皮腫の発生が確認された。ワイルドマウスでは 67 週目で 32%であった。この結果、p53 欠失マウスではアスベストによる発癌促進作用がみられることが推測された。

これらの情報から埋植材料を選択する際の問題点、無菌動物の発癌性試験の応用例、53 遺伝子欠失マウスの異物発癌への利用の利点等に関する有用な知見が得ることが出来た。

E. 結論

埋植材料、無菌動物を用いた発癌性試験、p53 欠失マウスを用いた異物発癌の情報を収集・整理し、情報提供を行った。

参考文献

Chu FF., Esworthy RS., Chu PG., Longmate JA., Huycke MM., Wilczynski S., and Doroshow JH., Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes, *Cancer Res.*, 64, 962-968, 2004.

Maekawa A, Ogiu T., Onodera H., Furuta K., Matsuoka C., Ohno Y., Tanigawa H., Salmo GS., Matsuyama M. and Hayashi Y., Malignant fibrous histiocytomas induced in rats by polymers, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 108, 364-365, 1984.

Maekawa A, Ogiu T., Onodera H., Furuta K., Matsuoka C., Ohno Y., Tanigawa H., Salmo GS., Matsuyama M. and Hayashi Y., Foreign-body tumorigenesis in rats by various kinds of plastics-induction of malignant fibrous histiocytomas, *J. Toxicol. Sci.*, 9, 263-272,

1984.

前川昭彦、バイオマテリアルの生体組織反応、病態生理、3、372-378、1984.

Marsella JM., Liu BL., Vaslet CA. and Kane AB., Susceptibility of p53-deficient mice to induction of mesothelioma by crocidolite asbestos fibers, Environ. Health Perspect., 105, 1069-1072, 1997.

McGregor DB et al., Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies a report of an IARC Monographs Programme Meeting, Eu. J. Cancer, 36, 307-313, 2000

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi A, Sekita K, Saitoh M and Kanno J: Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis (4,6-dimethylphenol) in rat. The Journal of Toxicological Sciences, 30 (4) 275-285, 2005.

2. 学会発表

Effects of TCDD on mouse embryonic stem cells in culture. A. Takagi and J. KANNO. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2006年3月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、第28回日本分子生物学会、2005年12月、福岡

Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced cleft palate by dimethyl sulfoxide. Atsuya Takagi, Makoto Ema and Jun Kanno, The 25th International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Canada, 2005年8月

発生毒性解析のための無血清培地を用いたマウスES細胞培養系の検討、高木篤也、菅野純、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2005年6月

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChipによる遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日～10月1日、福岡

Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema and Jun Kanno, The 23^t International Symposium on halogenated Environmental Organic

Pollutants and POPs. USA, 2003年8月

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

3. その他

なし

3. 安全性試験に関する情報収集（各国の規制当局の情報収集を含む）

大室弘美 独立行政法人医薬品医療機器総合機構

信頼性保証部 信頼性第二課

研究要旨

ヒトに埋植して使用する医療機器の開発においては、丸ごとの動物やヒトや動物の細胞を用いた安全性に関する非臨床試験(安全性試験)を行い、ヒトに使用する前に当該医療機器の材料の安全性を確認する必要がある。しかし、げっ歯類を用いた埋植材料の安全性試験により発がん性が観察された場合でもヒトで観察されることは稀である。埋設材料及び術野の滅菌又は無菌性に注目し、本年度はげっ歯類を用いた埋植医療機器の安全性の適切な評価のために、ISO10993（医療機器の生物学的評価方法）及び医療機器 Good Laboratory Practice(「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」平成 17 年厚生労働省令第 37 号)に定められた基準。以下「GLP」という。)が適用される試験についての実施方法ガイドライン（平成 15 年 2 月 13 日医薬審発第 0213001 号「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」）等に示されている安全性試験(特に、埋植試験及びがん原性試験)に関する情報収集並びに異物発がんに関する情報収集を行った。

A. 研究目的

異物発がん と細菌感染の関係について更に情報を収集するために、GLP に従って実施される埋植試験及びがん原性試験の実施方法について、無菌的な手技が必要とされているかどうかを含めて検討する。また、GLP が適用されない性能試験の実施方法について、同様に検討する。さらに、異物発がんに関連する要因（無菌性、形状、その他）について情報を収集する。

B. 研究方法

収集予定である①OECD GLP テストガイドラインのがん原性試験の実施方法、ISO10993-3 及び平成 15 年 2 月 13 日医薬審発第 0213001 号「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」に示された試験方法（以下、「医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法」という。）等に規定されている埋植試験及びがん原性試験の実施方法に関する情報、②性能試験に関する情報収集並びに③異

物発がんの要因に関する情報のうち、本年度は①医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法及び ISO10993 に示されている埋植試験及びがん原性試験の実施方法並びに③に関して調査した。

C、D. 研究結果と考察

(1) 医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法及び ISO10993 に示されている埋植試験及びがん原性試験の実施方法に関して（前者は後者を参考に作成されている）

1) 埋植試験

生体内に埋め込む医療機器又は原材料の局所的な影響を肉眼的及び組織学的に動物実験によって評価するものであり、埋植部位により皮下、筋肉内、骨内埋食法等がある。

医療機器の適用時間に応じて埋植時間を変える。短期筋肉内埋植試験等がよく使用され、炎症性細胞浸潤、肉芽形成、吸収、被包化等を観察する。

短期埋植試験の1例を以下に示したが、形状を一定にし、表面を滑らかにすることにより、刺激による炎症その他の生体反応を避けて実施している。

埋植材料についての滅菌方法は規定されているが、手術時の無菌性の確保については言及されていない。

医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法及び ISO10993 等に示されている試験方法では、埋植材料の形状や

表面の刺激などによる生体反応を避ける規定があり、材料のみが引き起こす生体反応が観察できるようになっている。長期間の埋植試験において材料が引き起こすがん原性の有無に関する観察が可能と思われるが、滅菌の規定は材料のみにあり、手術に関しては規定されていないため、がん原性が観察された場合に当該材料による異物発がんであるとは断言できないと考える。また、現在のところ短期埋植試験の主な目的は炎症反応の観察である。

短期埋植法の1例

・試験動物:ウサギ、2.5kg以上の雄（げっ歯類のみ使用）

一観察期間に4匹以上

・試験試料のサイズ:長さ10~12mm、幅1.0~1.5mmの円柱に調製するのが望ましいとされている。

・試料の形状（原則の形状は規定されている）:両端を丸めた円柱体が理想、表面を滑らかにしておく。

・埋植材料についての滅菌方法が規定されている。

・陰性及び陽性対照を使用する

陰性対照:高密度ポリスチレン
又はそれと同等品等

陽性対照:ZDEC (Zinc diethyldithiocarbamate) 含有ポリウレタン等

・埋植方法 (15 ゲージ注射針による。)

2) がん原性試験

医療機器の生物学的安全性評価のための試験方法には明確には示されていないが、ISO 10993-3 には可能な限り医療機器をヒトに使用する場合と同様な形態で埋植し、また、移植部位は医療機器の臨床使用を考慮して選定することとなっている。この場合は、動物を用いた性能試験 (医療機器そのものを動物の生体に埋め込み、その性能を観察しながら、長期間留置後の生体の反応を観察するもの) と同様になる可能性がある。医療機器をそのまま又はその一部を加工せず用いた場合は、埋植試験の場合と異なり材料の形状等が発がん性に寄与する可能性があり、材料としての異物発がん性の有無を観察するには考慮すべき点が多くなる。また、埋植材料の滅菌については埋植試験に従うとされており滅菌後に使用されているが、手術時の無菌性の確保については言及されていない。

なお、入手した ISO 10993-3 資料のみでは、手術時の無菌性の確保の有無を含めた詳細が不明であるため、ISO 10993-3 に引用されている 9 つの文献のうち入手可能なものについて更に情報収集を行う予定である。

(2) 異物発がんに関連する要因 (無菌性、形状、その他) について情報収集

key word (foreign and body and tumorigenesis or carcinogenesis or sarcoma) 検索により、約 70 報を検索し、要旨から約 35 報の文献を取り寄せ検討を行っているが、現時点までに収集した情報を以下に要約する。

1) 埋植材料の滅菌について

埋植材料の滅菌については、多くの論文にその条件が記載されていた。ただし、その滅菌又は消毒が完全であったかどうかについては、以下の例のように疑問が残る例が散見された。

Karp, R. D. ら (1973 年) は、直径が同一でポアサイズ (0.025~8.0 μm の範囲の 8 つのポアサイズ) の異なるミリポアフィルターをマウスに埋植し、7~27 ヶ月間の発がん性について解析した。その結果、0.025、0.05 及び 0.10 μm のポアサイズのフィルターの場合の“発がんの見られた動物数/埋植した動物数”はそれぞれ 11/11、6/10 及び 8/10 であったが、0.22 μm 以上のポアサイズのフィルターでは発がん性が観察されなかったとされている。なお、0.05 及び 0.10 μm のフィルターは埋植部位において小さなフラグメントとなっていたとされている。本論文においては手術時の無菌性については言及されていないが、埋植材料の滅菌については高圧蒸気滅菌ではなく UV に 1 時間照射したとされており、UV による滅菌が適切に行われていたか疑問である。

2) 手術時の無菌性について

本年度調査した文献中の手術時の無菌性に関する信頼できる情報は、Chu F-Fら(2004)の無菌マウスを用いた試験のみであり、本論文は非 SPF 下では被験マウスで腫瘍発生率が SPF 下と比較して高率に発症したとされている(実験内容の詳細は国立医薬品食品衛生研究所の分担研究者高木博士の報告参照)。

E. まとめ

本年度は、埋植医療機器の安全性の適切な評価のために、埋設材料及び術野の滅菌又は無菌性に着目して、ISO10993(医療機器の生物学的評価方法)及び医療機器 Good Laboratory Practice(「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」平成17年厚生労働省令第37号)に定められた基準。以下「GLP」という。)が適用される試験についての実施方法ガイドライン等に示されている安全性試験(埋植試験及びがん原性試験)に関する情報収集並びに異物発がんに関する情報を収集した。

その結果、上記ガイドライン(ただし、がん原性試験については一部の情報)及び本年度検討した文献においては、材料の形状や滅菌については言及されているが手術時の無菌性についての情報は Chu FFら(2004年)の論文以外になかった。また、多くの論文において材料の滅菌が完全であるかどうかについては疑問が残った。このため、来年度は手術時の無菌性及び埋植材料の滅菌に関する文献等による更なる情報収集に加え、論文に記載

された材料の滅菌条件における無菌性についても検証が必要と考えられる。

参考文献(主なもののみ)

1. ISO10993(医療機器の生物学的評価方法)
2. 「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」(医薬審発第0213001号、平成15年2月13日)
3. Karp R.D., et al., Tumorigenesis by Millipore Filters in Mice: Histology an Ultra-structure of Tissue Reactions as Related to Pore size, J Natl Cancer Inst., 51, 1274-1285, 1973
4. Chu F-F., et al., Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes, Cancer Res., 64, 962-968, 2004
5. Brand K.G., Do Implanted Medical Devices Cause Cancer? J Biomaterials Appl., 8, 325-343, 1994
6. Andrews E.J., Surface Charge in Foreign Body Carcinogenesis, J.Biomed. Matl Res., 13, 173-187, 1979
7. Moizhess T.G. and Vasiliev J.M., Early and late stages of foreign-body carcinogenesis can be induced by implants of different shapes, Int. J. Cancer, 44, 449-453, 1989

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

該当無し。

IV. 研究成果の刊行物・別冊

該当無し。