

201408013A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

気管・喉頭再生治療法の実用化推進研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大森 孝一

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

気管・喉頭再生治療法の実用化推進研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大森 孝一

平成27（2015）年 3月

班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	大 森 孝 一	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	教 授
研究分担者	中 村 達 雄	京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野	准 教 授
	川 上 浩 司	京都大学大学院医学研究科薬剤疫学	教 授
研究協力者	多 田 靖 宏	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	講 師
	野 本 幸 男	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	講 師
	鈴 木 亮	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助 手
	仲江川 雄太	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助 手
	浜 田 将 太	京都大学大学院医学研究科薬剤疫学	助 教

目 次

I. 総括研究報告書

気管・喉頭再生治療法の実用化推進研究

大森 孝一 …………… 1

II. 分担研究報告書

1. 医療機器クリーンルーム内における生物学的安全性試験への試験検体作製に関する研究

中村 達雄 …………… 7

2. 人工気管の生物学的安全性試験に関する研究

大森 孝一 …………… 9

3. GMP / QMS 準拠での人工気管製造に関する文書管理及び運営準備に関する研究

大森 孝一 …………… 21

4. 治験実施計画に関する研究

大森 孝一 …………… 66

5. 医療機器開発薬事戦略に関する研究

川上 浩司 …………… 104

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

気管・喉頭再生治療法の実用化推進研究

研究代表者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部）

研究要旨

われわれはポリプロピレンメッシュとブタコラーゲンスポンジからなる材料を用いた気管・喉頭の再生治療法を開発し動物実験で最長5年間の観察で安全性、有効性を検証し、施設内倫理委員会の承認のもと成人10例の気管・喉頭再建に使用し良好な成績を上げている。われわれは既に人工気管の製造技術を有しており、本研究ではこれを実用化するためにGMP/QMS準拠にて製品標準書や品質マニュアルをはじめ各種文書の作成を行った。また、医療機器の安全性を確認するために必要な試験が医療機器ガイドラインにより定められているが、PMDAとの事前面談、対面助言の結果、人工気管の性質を考慮し、クリーンルーム内で作製した試験検体を使用し試験を行った。また、治験実施にむけて治験計画書の内容について検討・作成した。

A. 研究目的

気管や喉頭は呼吸、発声、嚥下という生命維持に重要な機能を担っている。甲状腺癌進行例などの悪性腫瘍や狭窄症などの炎症性疾患で気管や喉頭を切除されると重大な機能障害を来し、生活の質（Quality of Life: QOL）が著しく低下する。

わが国の甲状腺癌の年間推定罹患数は約8,000例で死亡数は約1,500例である。福島県では原子力発電所の過酷事故により放射性ヨウ素などが飛散した。チェルノブイリ周辺では百万人に一人という稀な小児甲状腺癌が激増し、25年間で6,000例近く発症し手術を受けた（山下俊一：日本原子力学会誌2011）。福島県では甲状腺癌の増加が懸念されており、進行例の治療法を準備しておく必要がある。

本研究の目的は、気管・喉頭病変に対して、QOLの低下を来さない質の高い治療法を確立し、実用化につなげることにある。これにより日本発の医療を世界に提供できる。

われわれは既に、ポリプロピレンメッシュとブタコラーゲンスポンジを用いた気管・喉頭の再生治療法を開発した（Nakamura: Int J Artif Organs 2000, Omori: Ann Otol Rhinol Laryngol 2004）。動物実験で最長5年間の観察で安全性、有効性を検証し、施設内倫理委員会の承認のもと成人10例の気管・喉頭再建に使用した。最長5年の経過観察で再狭窄は認めておらず良好な結果を得ている。本研究ではこの治療法の実用化を推進する。なおPMDAの薬事戦略相談を受けている。われ

われの治療法は細胞を使わずに足場のみで自己組織の再生を誘導する特色があり、気道の枠組みと内腔粘膜を同時に再生させる点で独創的である。この技術を基盤にして、課題を解決して臨床研究や治験に橋渡しし、その後に実用化まで進めていくことが目的である。

B. 研究方法

本研究ではこの人工気管の実用化を推進し、医療機器として認可を受けることで施設を選ばず治療が選択されることを目標としている。

生物学的安全性試験については平成24年3月1日に通知された「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301第20号）（以下、医療機器ガイドライン）に準じて医療機器の安全性を確認するために必要な試験が選択される。人工気管の生体への接触部位及び接触期間を考慮し、一般的な非臨床試験の内容を確認し選択を行った。昨年度のPMDAとの事前面談、本年度の対面助言を踏まえ各種試験について実施する。各種試験での試験検体は京都大学再生医学研究所内に設置された医療機器クリーンルーム内で、作製された物を使用する。

また、医療機器としての薬事申請を行うには、大学では困難であり、製造販売業許可を有する企業への技術移転が必要である。前年度まで技術の導出先で有り、協力してくれる企業との折衝を行っていた。今年度は協力企業が決定し、治験に向けた体制の準備が進められた。その一環としてGMP/QMS準拠した製造

や管理に関する文書作成が必要と考えられ、各種文書の作成を行った。

医療機器の開発についての薬事制度の調査に引き続き国内の臨床研究の実施環境についても調査検討を行う。

また、非臨床試験の後に臨床試験が想定される。医薬品・医療機器の製造販売のためには臨床試験は必ずクリアしなければならない。実施するに当たり必要な項目は多岐にわたり、それに応じた書類も多数必要になる。必要な書類の代表としては、治験概要、説明書、同意書などが挙げられる。治験計画の確定に向けて医薬品医療機器総合機構との対面助言を実施し治験計画書を作成した。

C. 研究結果

一昨年度設置した医療機器クリーンルームで後に述べる生物学的安全性試験を行う上で必要な試験検体の作製を行った。

医療機器の安全性を確認するために必要な試験の種類については、平成24年3月1日に通知された「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」(薬食機発 0301第20号)(以下、医療機器ガイドライン)に準じて試験の選択を行う必要がある。医療機器ガイドラインでは、医療機器の市販前の安全性評価の一環として、生物学的有害作用(毒性ハザード)のリスク評価を行うための生物学的安全評価に関する基本的考え方を示したものであり、評価すべき試験の選択については医療機器ガイドライン中に示されている。医療機器ガイドライン中では医療機器の接触部位及び接触期間による分類に応じて試験が選択され、評価を行う必要がある。本研究事業である、人工気管は、分類として体内植込み機器・組織/骨に、接触期間としては長期的接触(30日を越える)に該当し、この分類では生物学的安全性評価項目として細胞毒性、感作性、刺激性/皮内反応、急性全身毒性、亜急性全身毒性、遺伝毒性、埋植についての評価が必要とされる。試料検体の形態や作成方法をPMDAと協議し、クリーンルーム内で作製を行った。

作製した試験検体を用いて復帰突然変異試験、染色体異常試験、皮膚感作性試験、皮内反応試験、急性全身毒性試験、埋植検討予備試験を実施した。

対面助言にて、ブタ由来コラーゲンを使用しているため、発熱性試験、エンドトキシン試験の2試験も追加で行われ、いずれの試験でも安全性が確認された。

今後は亜急性全身毒性試験と埋植試験を行う必要があると考えている。

人工気管の医療機器としての性質を考慮しながら医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理および品質管理の基準に関する省令第2章医療機器等の製造管理および品質管理の係わる基本的要求事項に基づき、品質マニュアル、製品標準書(人工気管)、製造管理基準書、衛生管理基準書、品質管理基準書、自己点検に関する手順書、教育訓練に関する手順書出荷判定に関する手順書、バリデーションに関する手順書、逸脱管理に関する手順書、変更管理に関する手順書、苦情回収処理に関する手順書、文書管理に関する手順書、試験委託に関する手順書、手順書作成に関する手順書、用語集、リスクマネジメントに関する手順書、マネジメントレビューに関する手順書など各種文書を作成した。

医薬品・医療機器の製造販売のためには臨床試験は必ずクリアしなければならない。臨床試験を実施するに当たり必要な項目は多岐にわたり、それに応じた書類も多数必要になる。必要な書類としては、臨床試験概要、説明書、同意書などが挙げられる。本年度PMDAとの対面助言にて治験実施にあたり症例数や観察期間、観察項目等について助言を受けた。それらを基に治験実施計画書を作成した。さらに医療機器の開発についての薬事制度の調査、国内の臨床研究の実施環境についての調査に引き続き、実際に医療機器を用いた臨床研究を実施するための実施計画書に必要な項目についての考察を行った。

D. 考察

医療機器はその種類・性質毎に生体との接触部位や接触期間が異なる。「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」に準じると医療機器の接触部位による分類では非接触機器、表面接触機器、体内と体外とを連結する機器、体内植込み機器に分類され、接触期間による分類では一時的接触、短・中期的接触、長期的接触に分類される。医療機器の性質に応じて分類し必要な試験が考慮され、PMDAとの対面助言をもとに試験が行われた。

医療機器を製造販売するには臨床試験、非臨床試験等クリアしなければならない試験が多く存在する。それらをクリアするためにも画一された医療機器の生産は必要と考える。われわれが有するポリプロピレンメッシュとブタコラーゲンスポンジからなる人工材料

について、設計と製造の面から検討を行い、常に画一された医療機器が生産できるよう人工気管 製造作業標準・製造記録を作成した。昨年設置したクリーンルームのサニテーション、バリデーションを施行し清浄度を担保した。生物学的安全性試験で使用する試験検体の作製を行っている。

E. 結 論

GMP基準に適合した人工気管作製のためのクリーンルームを設置しサニテーション、バリデーションを行い清浄度を担保した。その上で生物学的安全性試験に使用する検体の作製を行った。

医療機器の安全性を確認するために必要な試験の種類については、「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」に準じて試験の選択を行う必要がある。人工気管の性質を考慮し、PMDAとの対面助言にて試験充足度、追加試験の必要性などを相談し実施した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshie S, Ikeda M, Imaizumi M, Otsuki K, Nomoto M, Wada I, Omori K. Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration. *Acta Oto-Laryngologica*,135 (in press) , 2015.
- 2) 仲江川雄太, 多田靖宏, 中村達雄, 大森孝一, 医療機器としての人工気管：実用化への課題, 日本気管食道科学会会報, 66 (掲載予定), 2015.
- 3) Sato S, Miyake M, Hazama A, Omori K. Povidone-iodine-induced cell death in cultured human epithelial HeLa cells and rat oral mucosal tissue. *Drug Chem Toxicol* 37 (3) : 268-275, 2014.
- 4) 湯田孝之, 多田靖宏, 谷 亜希子, 鈴木政博, 松塚 崇, 大森孝一：食道癌術後気管壊死をきたし気道管理に難渋した1例. 日本気管食道科学会会報. 65 (4) : 341-349, 2014.
- 5) 多田靖宏, 谷 亜希子, 大森孝一. 〈特集 音声外科 Update〉局所麻酔下の喉頭内視鏡手術. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科. 86 (4) : 348-353, 2014.
- 6) Hamaji M, Kojima F, Koyasu S, Tsuruyama T,

Komatsu T, Ikuno T, Date H, Nakamura T. Development of a composite and vascularized tracheal scaffold in the omentum for in situ tissue engineering: a canine model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*.19 : 357-362, 2014.

- 7) Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. *Laryngoscope*.124 : E81-86, 2014.
 - 8) 村田京子, 川上浩司：分子標的薬・コンパニオン診断薬の医療技術評価の現状と課題（登壇企画：コンパニオン診断－診断薬開発から承認審査、臨床応用へ－）. *医学のあゆみ*.248 (11) : 857-860, 2014.
 - 9) 大森孝一：生体内組織再生誘導型人工気管の実用化と次世代型研究開発. *日本耳鼻咽喉科学会会報*.117 (4) : 355-356, 2014.
 - 10) Kojima F, Sato T, Takahata H, Okada M, Sugiura T, Oshiro O, Date H, Nakamura T. A novel surgical marking system for small peripheral lung nodules based on radio frequency identification technology: Feasibility study in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*.147 : 1384-9, 2014.
- ### 2. 学会発表
- 1) Omori K, Otsuki K, Yoshie S, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T. Generation of ciliated epithelium derived from mouse induced pluripotent stem cells. The 61th CORLAS Meeting istanbul Turkey : 2014 08 24, Collegium. Abstract Book. 86.
 - 2) Nakaegawa Y, Tada Y, Nakamura T, Omori K. The way to the practical use of artificial trachea as medical equipment on the basis of Japanese regulations. The 9th East Asian Conference on Phonosurgery : 2014 11 29, Taipei, Taiwan.
 - 3) Omori K. 〈Joint Symposium 4: Regenerative medicine for the trachea and esophagus〉 Regenerative medicine of the trachea and cricoid cartilage. 18th WCBIP/WCBE, 2014 04 15, Kyoto.
 - 4) Omori K. 〈Keynote Speaker〉 Regenerative medicine of the trachea and larynx. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-2014 Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2014) , 2014 09 26, Daegu, Korea.
 - 5) Tani A, Tada Y, Nomoto M, Imaizumi M, Nomoto Y, Omori K. Tracheal regeneration using a collagen

- vitrigel sponge scaffold containing basic fibroblast growth factor. 18th WCBIP/WCBE, 2014 04 16, Kyoto.
- 6) Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y, Tani A, Omori K. Regeneration of tracheal cartilage using bioengineered trachea with autologous chondrocytes. 18th WCBIP/WCBE, 2014 04 16, Kyoto.
- 7) 仲江川雄太, 多田靖宏, 大森孝一. 〈シンポジウム1 気管食道科から発信する新規医療〉医療機器としての人工気管：実用化への課題. 第66回日本気管食道科学会, 2014 11 13, 高知. 予稿集. 55.
- 8) 多田靖宏, 谷 亜希子, 今泉光雅, 仲江川雄太, 野本美香, 大森孝一. 〈パネルディスカッション2 気管の外科手術〉人工気管による頸部気管・輪状軟骨の再建. 第25回日本気管食道科学会認定気管食道科専門医大会, 2015 02 22, 宇都宮. 抄録. 112-114.
- 9) 野本美香, 多田靖宏, 野本幸男, 柳川明弘, 大森孝一. 遅発性に気道狭窄を来した閉鎖性喉頭外傷の1例. 第115回日本耳鼻咽喉科学会, 2014 05 16, 福岡. 予稿集. 523.
- 10) 野本幸男, 鈴木 亮, 柳川明弘, 西條 聡, 松塚 崇, 大森孝一. 気管カニューレの不適合症例に対するオーダーメイド気管カニューレの使用経験. 第76回耳鼻咽喉科臨床学会, 2014 06 26, 盛岡. 要旨集. 77.
- 11) 湯田孝之, 多田靖宏, 谷 亜希子, 鈴木政博, 松塚 崇, 大森孝一. 食道癌術後気管壊死をきたし気道管理に難渋した1例. 第66回日本気管食道科学会, 2014 11 13, 高知. 抄録. 341.
- 12) 大森孝一. 〈特別講演〉頸部気管・輪状軟骨の再生医療. 第12回熊本甲状腺疾患懇話会, 2014 08 08, 熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業
「気管・喉頭の再生治療法の実用化推進研究」に関する会合

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（PMDA）事前面談

場 所：東京都千代田区霞が関3-3-2新霞が関ビル6F第5会議室

日 時：平成26年5月29日、14時～15時

参加者：

白土 治己、深谷 李映、桐山 瑤子、橋本 裕介、小池 和央（PMDA）

大森 孝一、仲江川雄太（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

中村 達雄（京都大学再生医科学研究所）

小池 直樹（第一医科株式会社）

小林 史明（株式会社CTD）

次 第：対面助言への必要資料確認 等

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（PMDA）対面助言

場 所：東京都千代田区霞が関3-3-2新霞が関ビル6F第5会議室

日 時：平成26年8月11日、14時～15時

参加者：

白土 治己、桐山 瑤子、深谷 李映、方 眞美、井田 尚子、市川 雄大、國枝 章義、

小池 和央（PMDA）

丹生 健一（機構専門家、神戸大学大学院 医学研究科）

大森 孝一、仲江川雄太（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

中村 達雄（京都大学再生医科学研究所）

高橋 義博（新日本科学）

林 正晃、小池 直樹（第一医科株式会社）

小林 史明、渡邊 和男（株式会社CTD）

次 第：P67～P72 参照

第2回GMP（QMS）勉強会

場 所：京都大学再生医科学研究所東館、1階、小会議室（京都市）

日 時：平成26年5月23日、14時～17時30分

参加者：

福島県立医科大学 大森孝一、仲江川雄太

京都大学再生医科学研究所 石田 久恵

パナソニック／バイオメディカ・ソリューション 山崎 晶夫

次 第：QMS文書と記録

医療機器及び対外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令等について

第1回班会議

場 所：東京都千代田区霞が関3-3-2新霞が関ビル

日 時：平成26年8月11日、12時～13時30分

参加者：

福島県立医科大学 大森 孝一、仲江川雄太

京都大学再生医科学研究所 中村 達雄

次 第：1. 研究進捗状況の報告

非臨床試験

生物学的安全性試験への試験検体作製

治験実施計画書案

2. 対面助言について質問内容の確認

1) 生物学的安全性試験の充足性について

2) 治験実施計画について

3. 今後の研究事業実施の課題と行程の確認

生物学的安全性試験打ち合わせ

場 所：鹿児島県 新日本科学

日 時：平成26年10月20日、9時～12時

参加者：

仲江川雄太（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

中村 達雄（京都大学再生医科学研究所）

山下 祐介（新日本科学）

大阪商工会議所 第8回次世代医療システム産業化フォーラム

福島県立医科大学「個別ミーティング」

場 所：4号館（総合科学系研究棟）4階会議室

日 時：平成26年5月21日（水）

参加者：

大森 孝一、仲江川雄太（福島県立医科大学）

内村英一郎（大阪商工会議所 産学連携コーディネイター）

平 嗣良、山内 康治（ゲンゼ（株））

木下 義浩（榊木下技研）

久保寺正洋（吉川化成（株））

医療機器クリーンルーム内における生物学的安全性試験への 試験検体作製に関する研究

研究分担者 中村 達雄（京都大学再生医科学研究所）

研究要旨

京都大学再生医科学研究では既にポリプロピレンメッシュとブタコラーゲンスポンジからなる材料を用いた気管・喉頭の再生治療法を開発し動物実験で最長5年間の観察で安全性、有効性を検証し、施設内倫理委員会の承認のもと成人10例の気管・喉頭再建に使用し良好な成績を上げている。本研究では平成26年度にこの技術を基盤にして、人工気管の非臨床試験（生物学的安全性試験）の試料作製を行った。

A. 研究目的

われわれは既にポリプロピレンメッシュとブタコラーゲンスポンジからなる材料を用いた気管・喉頭の再生治療法を開発した。動物実験で最長5年間の観察で安全性、有効性を検証し、施設内倫理委員会の承認のもと成人10例の気管・喉頭再建に使用した。最長6年の経過観察で再狭窄はなく良好な結果を得ている。本研究ではこの治療法の実用化を推進する。なおPMDAの薬事戦略相談を受けている。われわれの治療法は細胞を使わずに足場のみで自己組織の再生を誘導する特色があり、気道の枠組みと内腔粘膜を同時に再生させる点で独創的である。この技術を基盤にして、課題を解決して臨床研究や治験に橋渡しし、その後の実用化まで進めていく。

施設内にクリーンルームを設置し、その中で上記の材料の製造工程を円滑に進めることができるように生産ラインを構築した。更にこれらの人工材料をGMP/QMSに準じて製造する方法を確立した。クリーンルームは空気清浄度を保ち、製造管理および品質管理を実施する。

B. 研究方法

大学施設内に確保した人工気管作製のスペースにおいて、GMP規格に合致したクリーンルームを設計した。人工気管作製に要するクリーンルームの仕様は医療器具製造にかかわるGMPの3原則に準じている。すなわち①人為的ミスの防止、②汚染防止、③高い品質保証システムである。具体的には

① 動線管理（モノ動線、ヒト動線分離）

② ゾーニング管理、ガウニングテクニック、サンテーション環境評価

③ 組織体制の確立、GMP文書の確立

ということが案件としてあげられている。

大学施設内に確保した本設備はこれに合致しており、これに関しては、平成25年12月2日に京都大学において開かれた第一回の学習会に続き、本年度も平成26年5月23日に第2回学習会を開催し、GMP基準について認識を深めた。

C. 研究結果

大学施設内に完成したGMP規格に適合した人工気管作製スペースにおいて、生物学的安全試験用のサンプルの作製を続けている。

なお人工気管作製スペースのクリーンルームは、サンテーション完了後、清浄度に関するバリデーションを行い、フィルターリークの確認、清浄度の確認、空圧の確認、換気回数確認、制御盤の確認、パスボックスの確認を行い、総合判定で全て合格となっている。

同室で人工気管作製に用いる装置として薬用冷蔵保冷庫（パナソニックヘルスケア MPR-715F）を調達して生産ラインを完成させた。

この施設において生物学的安全性試験用のサンプル作製を平成25年12月より開始しているが、これに続いて、Lot2を平成26年1月30日に、Lot3を平成26年2月12日に、Lot4を平成26年2月14日に、Lot5を平成26年2月28日に、Lot6を平成26年3月8日に、Lot7を平成26年3月20日に、Lot8を平成26年3月31日に、Lot9を平成26年4月7日に、Lot10を平成26年6月30日に、

Lot11を平成26年10月30日に、Lot12を平成26年11月12日に作製した。これらは、生物学的安全性試験に供した。

この他予備実験として行うビーグル犬頸部気管への埋込み手術の準備を行っている。埋込んだ人工気管の評価に用いる気管超音波装置（東芝メディカル Viamo Limited）を調達し、再建気管内腔径の計測手技を確立した。

D. 考 察

当初の計画に添って人工気管の生産ラインの構築を完成した。この生産ラインで生物学的安全試験のサンプルを作製して円滑に生産ラインが稼働するかを確かめた。人間の気管と同じサイズの実験動物としてビーグル成犬に動物における頸部気管再建（人工気管による置換）実験をめざして、その準備を当初の予定通りに行なっている。

E. 結 論

GMP基準に適合した人工気管作製のためのクリーンルームを作製しサニテーションを完了し、その内の生産ラインを完成させた。人工気管を用いた気管再建のためのビーグル犬における予備実験にも着手している。平成27年度には人工気管の試作をすすめ、安全性・有効性に関して評価をすすめる計画である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojima F, Sato T, Takahata H, Okada M, Sugiura T, Oshiro O, Date H, Nakamura T. A novel surgical marking system for small peripheral lung nodules based on radio frequency identification technology: Feasibility study in a canine model. J Thorac Cardiovasc Surg 147 : 1384-9, 2014.
- 2) Hamaji M, Kojima F, Koyasu S, Tsuruyama, T, Komatsu T, Ikuno T, Date H, Nakamura T. Development of a composite and vascularized tracheal scaffold in the omentum for in situ tissue engineering: a canine model. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 19 : 357-62, 2014.
- 3) Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Restoration of scarred vocal folds using 5

amino acid-deleted type hepatocyte growth factor.

Laryngoscope. 124 (3) : E81-6, 2014.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

人工気管の生物学的安全性試験に関する研究

研究代表者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部）

研究協力者 仲江川雄太（福島県立医科大学医学部）

研究要旨

医療機器の販売においてその安全性を確認するために必要な試験が医療機器ガイドラインにより定められている。一昨年度は、本研究事業である人工気管の性質を考慮し、今後必要とされる非臨床試験の種類とその内容について検討を行った。昨年度はPMDAとの事前面談を行い、助言内容を基に試験の実施方法、内容を確定し各種試験を開始した。本年度はPMDAと対面助言を行い試験の充足度を確認しつつ、未実施の試験について実施した。

A. 研究目的

医療機器として申請・承認を受けるにあたり、種々の安全性試験が必要となる。研究対象の医療機器の性質を考慮し生物学的安全性試験を行う。

B. 研究方法

昨年度はPMDAとの事前面談を実施し、人工気管の性質を考慮し「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301第20号）（以下、医療機器ガイドライン）に準じて必要な試験、検体の準備方法について相談した。相談の結果をもとに試験を開始し、一部結果について報告した。今年度は昨年度から引き続き生物学的安全性試験を実施する。またPMDAとの対面助言を行い試験の充足度についても確認する。

C. 研究成果

医療機器の安全性を確認するために必要な試験の種類については、平成24年3月1日に通知された「医療機器の製造販売承認申請等について必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301第20号）（以下、医療機器ガイドライン）に準じて試験の選択を行う必要がある。医療機器ガイドラインでは、医療機器の市販前の安全性評価の一環として、生物学的有害作用（毒性ハザード）のリスク評価を行うための生物学的安全評価に関する基本的考え方を示したものであり、評価すべき試験の選択については医療機器ガイドライン中に示されている。医療機器ガイドラ

イン中では医療機器の接触部位及び接触期間による分類に応じて試験が選択され、評価を行う必要がある。本研究事業である、人工気管は、分類として体内植込み機器・組織／骨に、接触期間としては長期的接触（30日を越える）に該当する。この分類では生物学的安全性評価項目として細胞毒性、感作性、刺激性／皮内反応、急性全身毒性、亜急性全身毒性、遺伝毒性（復帰突然変異、染色体異常）、埋植についての評価が必要とされる。

人工気管の原材料は下記に述べる4材料からなるがいずれも医療機器・医療材料である。①Bardメッシュ・医療材料として販売されている。②ポリプロピレンフィラメント・ドイツにて医療用製品として製造されている③ポリプロピレン糸・ドイツにて医療用製品として製造されている④コラーゲンスポンジ・医療機器の原材料として販売されている。

試験の実施にあたり、一昨年度の抽出条件予備検討試験から、試験に必要な人工気管数をその重量から概算した、1本3gで計算する、およそ110本必要になることが計算された。人工気管の骨格となるメッシュの形成、リングの固定などは手作業で行うため、人工気管を1本作製するにも数週程度要する。以上を勘案すると本研究期間内に安全性試験に必要な数を準備することは困難であるため、材料の総重量、構成比を合致させることで、生物学的安全性試験を実施できるのではないかと考え、昨年度、PMDA事前面談を行い以下について確認を行った。

最終製品ではなく、各原材料を使用しての試験は可能である。また、各原材料の安全性に関する資料を購

入元から入手してリスクについて説明できれば、その製品について省略は可能である。ただし、製造工程で原材料に変化がないこと、接着剤やその他添加物の使用がないことが前提である。

各原材料の比率が同じであれば、最終製品と異なる形状（例えばシート状）で、試験を行うことも可能であり、最終製品と同じ清浄度で作製し、最終製品と同じ製造方法を模倣することが必要であること確認した。事前面談の内容を考慮し、最終製品と同じ比率としたものをクリーンルーム内で作成し（シート状など形状は選択可能）、生物学的安全性試験を実施している。昨年度は細胞毒性試験、抽出条件検討試験がなされ良好な結果が得られている。今年度は復帰突然変異試験、染色体異常試験、皮膚感作性試験、皮内反応試験、急性全身毒性試験、埋植検討予備試験を実施した。結果については別紙に記載するが良好な結果が得られている。今後は亜急性全身毒性試験と埋植試験を行う必要があると考えている。

また、対面助言にて、ブタ由来コラーゲンを使用しているため、発熱性試験、エンドトキシン試験の追加が必要であるとされた。2試験についても試験が実施され良好な結果を得ている（別紙）。

D. 考 察

昨年度から今年度にかけて各種の生物学的安全性試験が実施されたが、安全性が危惧される試験結果は認めなかった。試験結果を考慮すると人工気管の安全性が改めて示されたと考える。一方GLPレベルで人工気管を大型動物気管に移植する実験は施行困難であり、予算確保の上、安全性の確認がさらに必要であると考えらる。

E. 結 論

医療機器の安全性を確認するために必要な試験の種類については種々あるが、人工気管の性質から、細胞毒性、感作性、刺激性／皮内反応、急性全身毒性、亜急性全身毒性、遺伝毒性、埋植試験が必要と考えられた。昨年度は遺伝毒性試験と各種予備試験を実施し本年度は遺伝毒性（復帰突然変異、染色体異常）試験、皮膚感作性試験、急性毒性試験、皮内反応試験、皮下埋植予備試験を実施した。

またPMDAとの対面助言にてブタ由来コラーゲンを使用していることから発熱性試験、エンドトキシン試験が必要であるとされ、実施した。いずれの試験でも良好な結果が得られている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshie S, Ikeda M, Imaizumi M, Otsuki K, Nomoto M, Wada I, Omori K. Visualization of mouse induced pluripotent stem cells for evaluation of tracheal regeneration. *Acta Oto-Laryngologica* 135, (in press), 2015.
- 2) Sato S, Miyake M, Hazama A, Omori K. Povidone-iodine-induced cell death in cultured human epithelial HeLa cells and rat oral mucosal tissue. *Drug Chem Toxicol* 37 (3) : 268-275, 2014.
- 3) 湯田孝之, 多田靖宏, 谷 亜希子, 鈴木政博, 松塚 崇, 大森孝一: 食道癌術後気管壊死をきたし気道管理に難渋した1例. *日本気管食道科学会会報*. 65 (4) : 341-349, 2014.
- 4) 多田靖宏, 谷 亜希子, 大森孝一. 〈特集 音声外科 Update〉局所麻酔下の喉頭内視鏡手術. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科*. 86 (4) : 348-353, 2014.

2. 学会発表

- 1) Omori K, Otsuki K, Yoshie S, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T. Generation of ciliated epithelium derived from mouse induced pluripotent stem cells. *The 61th CORLAS Meeting Istanbul Turkey : 2014 08 24, Collegium. Abstract Book*. 86.
- 2) Nakaegawa Y, Tada Y, Nakamura T, Omori K. The way to the practical use of artificial trachea as medical equipment on the basis of Japanese regulations. *The 9th East Asian Conference on Phonosurgery : 2014 11 29, Taipei, Taiwan*.
- 3) Tani A, Tada Y, Nomoto M, Imaizumi M, Nomoto Y, Omori K. Tracheal regeneration using a collagen vitrigel sponge scaffold containing basic fibroblast growth factor. *18th WCBIP/WCBE, 2014 04 16, Kyoto*.
- 4) Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y, Tani A, Omori K. Regeneration of tracheal cartilage using bioengineered trachea with autologous chondrocytes. *18th WCBIP/WCBE, 2014 04 16, Kyoto*.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

人工気管における生物学的安全性試験の実施状況について

人工気管は体内植え込み機器の長期的接触、組織／骨に分類され、細胞毒性、感作性、刺激性／皮内反応、急性全身毒性、亜急性全身毒性、遺伝毒性、埋植試験が必要と考える。また、ブタ由来コラーゲンを使用していることから対面助言の結果、発熱性試験、エンドトキシン試験も必要とされた。

本事業内における生物学的安全性試験の実施状況

平成26年度実施試験

●皮膚感作性試験	
人工気管のモルモットにおける感作性試験	GLP
●急性毒性試験	
人工気管のマウスにおける急性毒性試験	GLP
●皮内反応試験	
人工気管のウサギにおける皮内反応試験	GLP
●皮下埋植予備試験	
人工気管のウサギにおける皮下埋植予備検討試験	非GLP
●遺伝毒性（復帰突然変異、染色体異常）試験	
人工気管の細菌を用いる復帰突然変異試験	GLP
人工気管のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	GLP
●発熱性試験	
人工気管のウサギにおける発熱性物質試験	GLP
●エンドトキシン試験	
人工気管のエンドトキシン試験	GLP

試験表題：人工気管のモルモットにおける感作性試験

試験番号：SBL714-011

試験方法

人工気管の感作性を調べるため、メタノールを用いて室温（17.9～21.5℃）で72時間15分～72時間34分の抽出を行い、得られた抽出物についてモルモットを用いてMaximization法に準じて検討した。

被験物質群では、注射用水を媒体とした人工気管の200%抽出液をFreund's complete adjuvantと共に背部肩甲骨上に皮内感作し、皮内感作後7日目に起炎剤として10w/w%ラウリル硫酸ナトリウム軟膏を同感作部位に開放塗布した。その24時間後に起炎剤を除去し、注射用水を媒体とした人工気管の100%抽出液を48時間閉塞貼付して塗布感作を行った。塗布感作終了後12日目にアセトンを媒体とした人工気管の100、50、25及び12.5%抽出液、並びにアセトンを左右側腹部に開放塗布して惹起を行い、惹起終了後24、48及び72時間に惹起部位の観察を行った。

陰性対照群では、注射用水で皮内感作及び塗布感作を行い、被験物質群と同様に惹起を行った。陽性対照群では、0.1w/v% 2, 4-dinitrochlorobenzene溶液で皮内感作、塗布感作及び惹起を行った。

結 果

被験物質群では、いずれの観察時点においても、全10例の惹起部位に皮膚反応はみられなかった。惹起終了後24、48及び72時間の平均評価点は、いずれも0.0であった。

陰性対照群では、いずれの観察時点においても、全5例の惹起部位に皮膚反応はみられず、惹起終了後24、48及び72時間の平均評価点は、いずれも0.0であった。陽性対照群では、全ての観察時点において、全5例の惹起部位に明らかな陽性反応（紅斑及び浮腫）がみられ、惹起終了後約24、48及び72時間の平均評価点は、それぞれ3.8、3.6及び3.6であった。

観察期間中、各群全例で死亡はみられず、一般状態及び体重推移に異常はみられなかった。

結 論

本試験条件下では、人工気管の抽出液はモルモットに対し感作性を示さないと結論した。

試験表題：人工気管のマウスにおける急性毒性試験

試験番号：SBL714-012

試験方法

人工気管の急性毒性について調べるため、生理食塩液あるいはゴマ油を用いて抽出した人工気管抽出液を用いて、急性毒性試験を実施した。生理食塩液及びゴマ油を用いて36.7～37.2℃、73時間9分の条件で抽出を行い、生理食塩液抽出液（生理食塩液抽出の試験液）及びゴマ油抽出液（ゴマ油抽出の試験液）をそれぞれ調製した。対照として、被験物質（人工気管）を加える操作を除き同条件で処理した生理食塩液抽出の対照液及びゴマ油抽出の対照液を調製した。各抽出液を5匹のCrI:CD1（ICR）雄マウスの尾静脈内（生理食塩液抽出液）あるいは腹腔内（ゴマ油抽出液）に50mL/kgで単回投与し、一般状態観察、体重測定及び剖検を実施した。

結 果

人工気管の生理食塩液抽出の試験液及びゴマ油抽出の試験液を投与した動物では、一般状態、体重推移及び剖検において、全例に異常はみられなかった。

対照の生理食塩液抽出の対照液及びゴマ油抽出の対照液を投与した動物では、一般状態、体重推移及び剖検において、全例に異常はみられなかった。

結 論

人工気管の生理食塩液抽出液及びゴマ油抽出液は、マウスに対し急性全身毒性を示さないと結論した。

試験表題：人工気管のウサギにおける皮内反応試験

試験番号：SBL714-013

試験方法

人工気管の皮内における刺激性について調べるため、生理食塩液あるいはゴマ油を用いて抽出した人工気管抽出液を用いて、皮内反応試験を実施した。生理食塩液及びゴマ油を用いて36.9～37.1℃、73時間の条件で抽出を行い、生理食塩液抽出液（生理食塩液抽出の試験液）及びゴマ油抽出液（ゴマ油抽出の試験液）をそれぞれ調製した。対照として、被験物質（人工気管）を加える操作を除き同条件で処理した抽出液（生理食塩液抽出の対照液及びゴマ油抽出の対照液）を調製した。各抽出液を3匹の日本白色種雄ウサギの背部皮内に0.2mL / siteをそれぞれ5カ所ずつ投与し（計20カ所／背部）、投与後24、48及び72時間の投与部位の皮膚を肉眼的に観察した。各試験液及び対照液の平均評点を算出し、各試験液の平均評点から各対照液の平均評点の差を求め、差が1.0以下であれば刺激性無しとした。

結 果

人工気管の生理食塩液抽出の試験液及び生理食塩液抽出の対照液を皮内投与した部位では、いずれの観察時点（投与後24、48及び72時間）においても全例で皮膚反応はみられなかった。試験液の平均評点（0.00）と対照液の平均評点（0.00）の差は0.00であり、「刺激性無し」と判断した。

人工気管のゴマ油抽出の試験液を皮内投与した部位では、全3例で投与後24から72時間において評点1の紅斑及び浮腫がみられた。投与後24から72時間における紅斑／痂皮及び浮腫の評点の合計は5.53で、平均評点は1.84であった。

ゴマ油抽出の対照液を皮内投与した部位では、全3例で投与後24から72時間において評点1の紅斑及び浮腫がみられた。投与後24から72時間における紅斑／痂皮及び浮腫の評点の合計は5.67で、平均評点は1.89であった。試験液の平均評点（1.84）と対照液の平均評点（1.89）の差は-0.05であり、「刺激性無し」と判断した。

観察期間中、全例で死亡はみられず、一般状態及び体重推移においても異常はみられなかった。

結 論

人工気管の生理食塩液抽出液及びゴマ油抽出液は、ウサギの皮内において刺激性を示さないと結論した。

試験表題：人工気管のウサギにおける皮下埋植予備検討試験

試験番号：SBL714-014

試験方法

人工気管をウサギの背部皮下に埋植したときの、被験物質周囲組織にみられる変化を調べ、被験物質が周辺組織に与える影響について予備的に検討するため、6匹の雄ウサギ（Kbl:NZW）の背部皮下に人工気管、陰性対照として高密度ポリエチレンシート及び比較対照としてコントロールPPプレート（厚さ約2mm）をそれぞれ2部位ずつ埋植し、埋植28、56あるいは85日目に埋植部位の肉眼的検査及び病理組織学的検査を実施した。

結 果

全例において、一般状態、体重推移に異常はみられず、肉眼的検査で埋植部位に異常はみられなかった。

投与4、8及び12週目の病理組織学的検査では、被験物質、陰性対照物質及び比較対照物質群の全例において壊死はみられなかった。被験物質、陰性対照物質及び比較対照物質群の投与部位において初期の炎症反応と考えられる多形核細胞、リンパ球、マクロファージ及び巨細胞が全投与期間においてみられたが、投与4及び8週目のスコアと比較して投与12週目ではスコアが減少し、回復傾向がみられた。なお、被験物質、陰性対照物質及び比較対照物質群間に明確な差はなかった。また、被験物質投与部位において血管新生及び線維化のスコアが投与4週目から投与8週目にかけて増加傾向がみられたが、投与12週目ではスコアは減少し、一方、脂肪組織の増生については投与8週目から投与12週目にかけて増加傾向がみられた。これらの変化から、被験物質の成分であるコラーゲンは投与期間の経過とともに吸収され、線維あるいは脂肪組織に置換されたと考えられた。一方、生体内で分解されにくい高密度ポリエチレンからなる陰性対照物質及び比較対照物質ではこのような変化はみられなかった。

結 論

人工気管はウサギの背部皮下の周辺組織に対し異物に対する軽度の刺激性反応がみられたが、その程度は陰性対照物質及び比較対照物質と同程度であり、時間の経過とともに回復性がみられた。また、被験物質（コラーゲン）は線維あるいは脂肪組織に置換されることが示唆された。