

医療機器の生物学的安全性試験に用いる 対照材料の開発とその頒布状況

田中憲穂¹, 渡辺美香², 山影康次²

Development and distribution conditions of the standard reference materials

Noriho TANAKA¹, Mika WATANABE², Kohji YAMAKAGE²

はじめに

一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所では、細胞毒性試験に用いる3種類の対照材料(1種の陰性対照材料と毒性強度の異なる2種の陽性対照材料)、および筋肉内埋植試験や骨埋植試験に用いる陰性および陽性対照材料を作製し国内外に頒布している。これらの対照材料は、1990年国立衛生試験所療品部において、当時の中村晃忠療品部長を中心に開発¹⁾されたもので、完成した材料は国内3施設によって評価試験²⁻⁴⁾が行われ、対照材料として十分であることが評価された。厚生労働省の医療機器ガイドライン⁵⁾(1995)やISO 10993-5(1992, 1999, 2009)⁶⁾およびISO 10993-12(1996, 2002, 2007, 2012)⁷⁾においても、対照材料を用いて細胞毒性試験を実施することが推奨されている。現在に至るまで、国内外の多くの施設によって医療機器の試験にこれらの対照材料が用いられている。

対照材料開発の経緯

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法の国際標準化については、1989年頃よりCEN(European Committee for Standardization)やASTM(American Society for Testing and Materials)およびFDA(Food and Drug Administration, US)を中心に試験法基準の作成が検討され、1989年にはISO 10993/TC194⁸⁾が立ち上げられた。医療機器への細胞毒性試験の適用に関しては、WG5

(細胞毒性試験の作業部会)において討議され、すべての医療機器において細胞毒性試験を実施することとなった。歴史的な背景もあり各国でそれぞれ異なる試験法を採用していることから、ISO 10993-5の第1版(1992)では、各国で採用されていた試験法の紹介と対照材料を含む細胞毒性試験法の一般的な手順が記載された。その後立ち上げられたWG12(被験物質の調製と対照物質の作業部会)ではISO 10993-12の第1版(1996)を発刊し、この中で対照材料の利用を推奨した。この版では陰性材料として高密度ポリエチレン、ジメチルシロキサン、ステンレススチールなどが例としてあげられ、陽性対照には有機スズを含むポリ塩化ビニル(PVC)なども例示された。しかしながら、毒性の強さや安定性が確認されていない材料も含まれていたため、実際に使用してみると毒性が強すぎるものもあり、化学分析やバイオアッセイなどにより一定の品質が保証された対照物質が必要であることが明らかとなった。例えば、細胞毒性試験として米国ASTMでは寒天重層法⁹⁾やelution法が用いられ、日本ではコロニー形成試験が推奨されていて、これらの方法は感度に大きな差がある。このように、仮に毒性があっても異なる試験系で得られたデータ間では毒性強度の比較ができないことから、それを補完する方法として、品質面で均一な毒性物質を含む対照材料を用いることにより被験物質の毒性強度の比較が可能になることが示唆された。当時、国立衛生試験所の療品部ではジチオカーバメート系の加硫促進剤であるZDEC(zinc diethyldithiocarbamate)やZDBC(zinc dibutyldithiocarbamate)をポリウレ

1 秦野研究所研究顧問

2 代替法試験部細胞毒性学研究室

タン(PU)に混ぜて一定の細胞毒性を示すPUフィルムを試作し、細胞毒性試験の陽性の対照材料とすることを試みていた。このPUフィルムを細胞毒性の指標として用いることをISO/TC194で提案し、受け入れられた。対照材料は、継続的に規格をみたく安定性が要求される。さらに国際的に供給するため、製造方法は国立衛生試験所から秦野研究所に技術移転され、作製したものは品質確認後、規格成型して包装し国内外へ頒布されるようになった。ISO10993-5の第1版(1999)およびISO10993-12の第2版(2002)以降は、これらの対照材料が一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所から入手可能であることが紹介されている。

対照材料の意義

陰性材料に関しては、試験成立の条件として確実に陰性を示すような物質でなければならない。それが陽性の結果を示すようであれば、その試験結果は採用すべきでなく、試験条件の設定や手技的な部分を見直す必要がある。厚生労働省のガイドラインで示すコロニー形成試験法は、各国で採用している細胞毒性試験法に比べて化学物質の毒性に対する感受性が高い。しかし、わが国で推奨している陰性対照材料(RM-C)は、国内の各施設や各国で実施している試験系でもほぼ陰性を示す。一方、陽性対照材料については、毒性の弱い材料(RM-B)と中程度の材料(RM-A)の2種が導入され、試験法や細胞株の相違や試験施設間の変動があっても、これらの対照材料の毒性を比較することで被験材料の細胞毒性強度の相対的位置を知ることができ、その強度から組織刺激性の程度を予測することが可能である。

陽性対照材料は、その毒性が常に一定の範囲内にあるように作製されていることから、試験の感度や再現性を確認することができる。例えば、陽性対照材料のRM-Aを用いてISO/TC194WG5が実施したラウンド・ロビントストでは、コロニー形成試験ではその IC_{50} の平均値が0.57%を示すのに対してニュートラルレッド試験では6.7%を示し、試験法によって IC_{50} 値は大きく異なることが示された。

頒布している対照材料は1ロットあたり3回のコロニー形成試験でその細胞毒性の再現性を確認し

ている。しかし、得られる細胞毒性の IC_{50} 値は、用いる血清のロットや培養条件に左右されることもあり、試験施設では常に一定の条件で試験を実施し、背景データを蓄積しておくのが望ましい。被験材料の細胞毒性に関しては、組織刺激性との関連がNakamuraら¹⁰⁾によって報告されており、細胞毒性試験は局所刺激性や急性毒性を予測する動物実験代替法としても研究^{11,12)}が進められている。

品質管理

上述のように、細胞毒性試験用の対照材料は、定められた基準の範囲内にあるものを頒布している。一方、埋植試験に用いる陽性対照材料は、細胞毒性試験(コロニー形成試験)および筋肉内埋植試験によってロットチェックを実施したうえで頒布している。陰性対照材料については、動物愛護の観点から、2014年より細胞毒性試験のみの評価に変更した。ただし、材料品番等の変更が生じた場合には、従来通り細胞毒性試験および筋肉内埋植試験にて設計段階の評価を行ったうえで、以後のロット管理は細胞毒性試験で実施している。Rosengrenらとわれわれの共同研究¹³⁾によって、陽性対照材料(ZDECを0.75%含むPU)に関しては、埋植1週後をピークに6週後にはほとんどのZDECは溶出することが細胞毒性試験と埋植試験の結果から分かっている。また、物性としての安定性に関しては、過去の蓄積データから、製造後室温保管の条件下で、陽性対照材料は5年、陰性対照材料は7年を使用期限としている。

発注と輸送方法

秦野研究所のホームページに記載の注文書を、ファックスまたはメールでRM office宛てに発注する場合と、ネットを通じオンラインで発注することが可能である。国内からの発注は前者の場合が多く、海外の場合、前払いで銀行手数料が余計にかかることから、銀行振り込みよりもクレジットによる後者の利用が増えている。いずれの場合も在庫があれば受注後1~2日以内には発送している。国内では宅配便を、海外の場合は、輸送状況の追跡(tracking system)が可能で費用も安く、過去において紛失事故もないことから、日本郵便のEMS(Express Mail Service)を利用している。

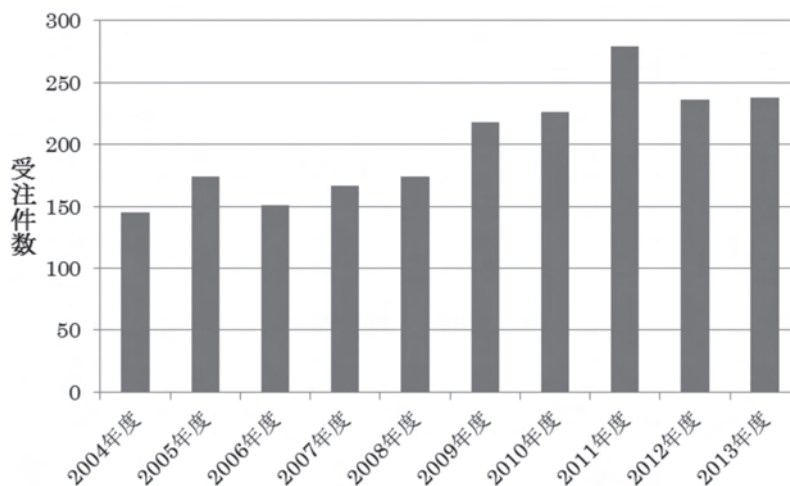


図1 過去10年間(2004~2013年度)の国内頒布受注件数の推移

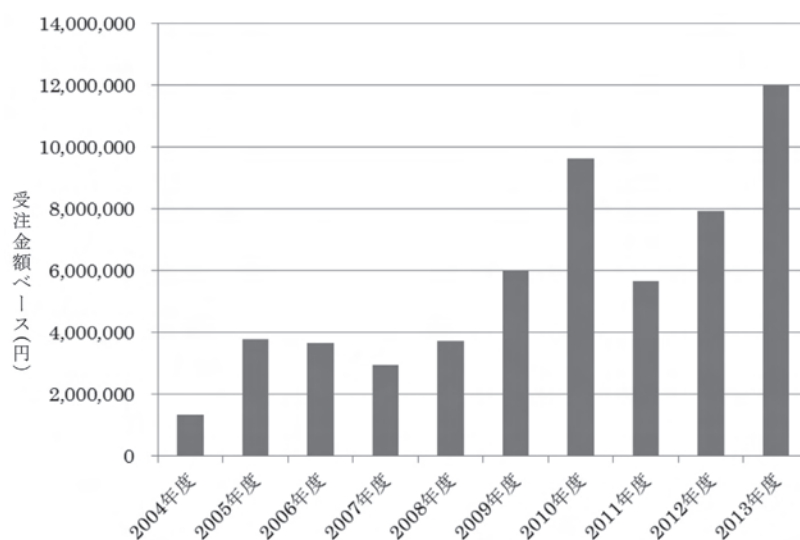


図2 過去10年間(2004~2013年度)の海外頒布状況

パッケージには、対照材料と細胞毒性試験で得られたIC₅₀値のデータが添付されている。原則として、未滅菌の状態で送られることから、利用者はオートクレーブで121℃、15分滅菌するか、EOガスで滅菌して試験に用いる。特に要望がある場合はEOガス滅菌済みの対照材料を送ることも可能である。また、細胞毒性試験用にはシートその他、短冊状にカットしたカット品も用意している。埋植試験用には、ロッド状とシート品がある。

頒布状況

過去10年間の対照材料の国内向け頒布状況を図1に、海外向け頒布状況を図2に示した。1回

の受注で数種の材料のオーダーを受ける場合が多く、件数は受注回数を表している。国内向けでは、2004年度から2008年度まではほぼ一定であるが、2009年頃より増加状態にある。また、海外からの発注も2009年度から増加し2013年度では金額ベースで2004年度の約8倍に増加してきている。

受注件数は国内が76%、海外が24%を示し(図3)、金額ベースでは国内が58%、海外からが42%となっている。海外からの受注は件数あたりの金額が多い。

国別発注状況(2013年度)

表1に示すように、受注金額ベースでアメリカ

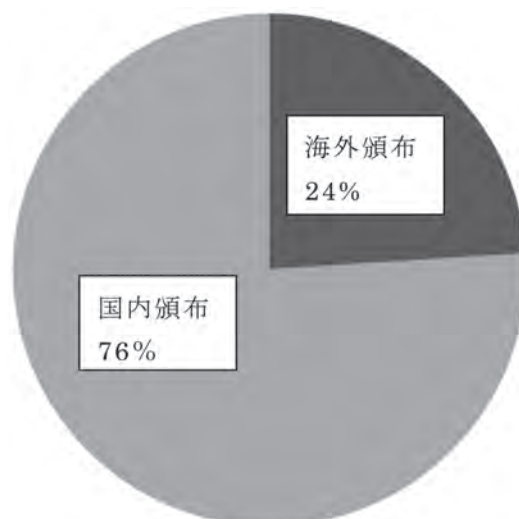


図3 国内と海外の頒布比率(2004~2013年度受注件数)

表1 国別受注件数と金額(2013年度)

国	受注件数	金額(円)	(%)	国	受注件数	金額(円)	(%)
USA	14	6,037,200	50.2	India	3	114,000	1
China	5	1,759,000	14.6	Portugal	2	90,000	0.8
Korea	21	1,236,000	10.3	Hungary	1	88,000	0.7
Finland	1	960,000	8	Thailand	2	56,000	0.5
Taiwan	6	646,000	5.4	Denmark	3	56,000	0.5
Germany	7	319,000	2.7	Mexico	1	52,000	0.4
France	2	224,000	1.9	Austria	1	30,000	0.3
Singapore	2	172,000	1.4	Poland	1	30,000	0.3
Israel	2	154,000	1.3	Brazil	1	8,000	0.1

が全体の50%を占め、他の国を大きく上回っている。次いで中国、韓国、フィンランドの順である。受注件数としては、韓国からが最も多い。ヨーロッパの中ではドイツからの受注が毎年コンスタントにある。

おわりに

医療機器の多くは単一の素材でなくポリマーやセラミック、金属などを成型加工した複合素材からなっており、その安全性評価は生体に適用する最終製品、もしくは最終製品と同様の処理工程で作製された試験片について試験する機会が多い。また、医療機器の試験では、試験方法の確認と試験データの再現性確認のため、被験材料と同様の操作で抽出する陰性もしくは陽性の対照材料を用いて試験を実施する必要がある。

医療機器の安全性評価に必須な試験である細胞

毒性、感作性などの試験では、複合素材からなる医療機器を一定の条件下で抽出して得られた抽出液、もしくは抽出物を用いて試験することになる。ISO10993-12の第4版(2012)には、抽出の温度条件、表面積や重量に対する抽出溶媒の比率などが記載され、用いる陽性および陰性対照材料とその入手先が紹介されている。しかしながら、得られる材料の品質や種類についてはまだ課題も多い。

秦野研究所で頒布している対照材料に関しては、20年以上にわたり20か国以上の国に供給を続けており、これまで同様に、品質の高い対照材料を安定的に供給することに尽力したい。

文献

- 1) 中村晃忠：医用材料の細胞毒性試験における標準材料. 組織培養, 1996; 22: 228-233
- 2) Tsuchiya T, Arai T, Ohhashi J, et al.: Rabbit

- eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: *In vivo/in vitro* correlation study using standard reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; **27**: 885-893
- 3) Tsuchiya T, Ikarashi Y, Arai T, et al.: *In vivo* tissue/biomaterials toxic responses: Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment. *Clin. Mater.* 1994; **16**: 1-8
 - 4) Tsuchiya T: Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomater. Appl.* 1994; **9**: 138-157
 - 5) 薬機第99号：医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験のガイドラインについて，平成7年6月27日
 - 6) ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices –Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (1992, 1999, 2009)
 - 7) ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices -Part 12: Sample preparation and reference materials (1996, 2002, 2007, 2012)
 - 8) 中村晃忠：医用材料の安全性. 薬学図書館, 1989; **34**: 213-221
 - 9) ASTM F895-11: Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity.
 - 10) Nakamura A, Ikarashi Y, Tsuchiya T, et al.: Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials.* 1990; **11**: 92-94
 - 11) Ohno T, Asakura M, Awogi T, et al.: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-1. Overview of the study and analyses of validations of ED50 value. *AATEX.* 1998; **5**: 1-38
 - 12) Tanaka N, Asakura M, Hattori C, et al.: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-IV. Details of colony formation assay. *AATEX.* 1998; **5**: 74-86
 - 13) Rosengren A, Faxius L, Tanaka N, et al.: Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initially toxic biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; **75A**: 115-122