



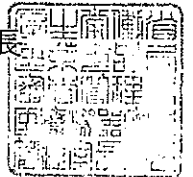
薬食機発0301第20号

平成24年3月1日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局

審査管理課医療機器審査管理室長



医療機器の製造販売承認申請等に必要な
生物学的安全性評価の基本的考え方について

医療機器の製造販売承認申請等に際して添付すべき資料のうち、生物学的安全性評価に関する資料の取扱いについては、「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」（平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）及び「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（平成15年3月19日付け医療機器審査No. 36厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡）に基づき取り扱ってきたところです。今般、医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方について別紙のとおり定めしましたので、下記に御留意の上、貴管内関係団体、関係業者等への周知方お願いします。

また、これに伴い、「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」（平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）及び「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（平成15年3月19日付け医療機器審査No. 36厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡）は廃止します。

なお、本通知の写しを独立行政法人医薬品医療機器総合機構理事長、日本医療機器産業連合会会長、米国医療機器・IVD工業会会長、欧州ビジネス協会医療機器委員会委員長及び薬事法登録認証機関協議会代表幹事宛て送付することを申し添えます。

記

1. 本通知は、医療機器の製造販売承認申請、認証申請及び届出（一部変更承認申請、一部変更認証申請及び届出事項変更届出を含む。以下「製造販売承認申請等」という。）に際しての生物学的安全性評価の基本的考え方を示したものであること。
2. 本通知は現時点において妥当とされる科学的知見に基づき作成されたものであり、科学の進歩等を反映した合理的根拠に基づくものであるならば、本通知によらずに試験を行い、その結果を申請資料等として用いても差し支えないこと。また、既に実施された試験等について、合理的根拠をもって妥当性を明らかにした上であれば、申請資料等として用いても差し支えないこと。
3. 平成25年3月31日までに行う製造販売承認申請等に係る生物学的安全性評価に関する資料については、なお従前の例によることができること。
また、既に実施された試験、現在実施中の試験、医療機器の製造販売承認申請等以外の目的で実施された試験又は外国での医療機器の承認申請その他の目的で実施された試験であって、本基本的考え方の意図する評価項目を満たし、得られた結果が品質、有効性評価又は、臨床上の安全性評価に足るものであると判断される試験については、個々の試験方法が本基本的考え方に示された試験方法に合致しないものであっても、判断根拠を明らかにした上であれば、原則、本基本的考え方に基づく試験に代えて差し支えないこと。

医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方

1. 目的

本文書は、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性評価に関する基本的考え方を示すものである。

2. 定義

本文書において用いられる用語の定義は以下によるものとする。

1) 原材料

医療機器の材料又は医療機器の製造工程中で用いられる材料をいい、合成又は天然高分子化合物、金属、合金、セラミックス、その他の化学物質などをいう。

2) 最終製品

出荷可能な医療機器をいい、滅菌品については滅菌後の製品をいう。ただし、出荷後、用時加工・調製され使用されるものにあつては、実際に使用される状態の製品をいう。

3) ハザード

人の健康に不利益な影響を及ぼす原因となりうる遺伝毒性、感作性、慢性全身毒性などの要素をいう。

4) リスク

ハザードにより引き起こされる人の健康に不利益な影響の発生確率及びその影響の程度をいう。

3. 公的規格の活用

医療機器の生物学的安全性評価は、原則として、JIS T 0993-1 あるいは国際規格である ISO 10993「医療機器の生物学的評価」シリーズに準拠して行うこととする。すなわち、JIS T 0993-1 及び ISO 10993-1「リスクマネジメントプロセスにおける評価及び試験」に準拠して、個々の医療機器の接触部位と接触期間に応じて必要な評価項目を選定し、更に各評価項目は ISO 10993 シリーズの各試験法ガイダンスを参考として適切な試験法を選定し安全性評価を行うこととする。各試験法については、医療機器の安全性評価を適切に行える場合にあつては、他の公的規格に準拠した試験法による評価も受け入れることができる。また、ISO 10993 シリーズ中の各試験法ガイダンスでは、多くの場合、評価項目ごとに複数の試験法が列記されているが、個々の医療機器についてどの試験法をどのように適用することが適切であるか、また試験結果をそれぞれの医療機器の評価にどのように用いるべきかは明確に規定されていない。このため、試験実施にあたっては、4. 以下を踏まえて適切な試験法を選択することが必要である。本文書及び別添の「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」では、生物学的安全性評価で留意すべき点を追記している。

なお、公的規格及び基準は科学技術の進展に伴って逐次改訂されるものであるため、試験を実施する時点における最新の規格・基準を考慮し、適切な試験法を選択する必要がある。

4. 生物学的安全性評価の原則

- 1) 医療機器及び原材料の生物学的安全性評価は、JIS T 14971「医療機器—リスクマネジメントの医療機器への適用」に示されたリスク分析手法により実施されなければならない。すなわち、意図する使用又は意図する目的及び医療機器の安全性に関する特質を明確化し、既知又は予見できるハザードを特定し、各ハザードのリスクを推定する必要がある。このようなリスク分析手法のアプローチにおいては、陽性結果は、ハザードが検出・特定できたことを意味するものであって、それが直ちに医療機器としての不適を意味するものではなく、当該医療機器の安全性は、引き続き行われるリスク評価により評価されるものである。
- 2) 生物学的安全性評価は、以下の情報や本文書に準拠して実施された安全性試験結果、当該医療機器に特有の安全性評価項目の試験結果、関連の最新科学文献、非臨床試験、臨床使用経験（市販後調査を含む）などをふまえて、リスク・ベネフィットを考慮しつつ、総合的に行う必要がある。
 - ア) 原材料に関する情報
 - イ) 原材料、製造過程からの混入物、それらの残留量に関する情報
 - ロ) 溶出物に関する情報（例えば、最終製品からの溶出物質の定性・定量）
 - エ) 分解生成物に関する情報
 - カ) その他の成分及びそれらの最終製品における相互作用に関する情報
 - キ) 最終製品の性質、特徴（物理的特性を含む）
- 3) 生物学的安全性評価は、教育・訓練が十分になされ、経験豊富な専門家によって行われなければならない。
- 4) 生物学的安全性評価が既に行われている医療機器において、以下の項目のいずれかに該当する場合には、原則として生物学的安全性評価を改めて行う必要があるが、試験の再実施などの必要性については、十分に検討すること。例えば、最終製品の溶出物が化学的に特定され、その溶出物の量が毒性学的見地から無視し得る場合や、その毒性が既知のものであって受け入れられるものである場合など、生物学的安全性において同等である場合には、必ずしも試験を再実施する必要はない。
 - ア) 原材料の供給元又は規格が変更された場合
 - イ) 原材料の種類又は配合比、製造工程、最終製品の滅菌方法又は一次包装形態が変更された場合
 - ロ) 保存中、最終製品に変化があった場合
 - エ) 最終製品の使用目的に変更があった場合
 - カ) 有害事象を予測する知見が得られた場合

5. 評価項目の選択

- 1) 個々の医療機器の生物学的安全性について評価すべき項目の選択については、JIS T 0993-1 及び ISO 10993-1 に示されているとおりであり、以下に示す医療機器の接触部位及び接触期間による分類に応じて、原則として、表 1 に示す項目について評価する必要がある。分類のいずれにも該当しない医療機器を評価する場合には、最も近いと思われる分類を選択すること。また、医療機器が複数の接触期間の分類にあてはまる場合は、より長期間の分類に適用される項目について評価すること。また、複数の接触部位の分類にまたがる場合は、それぞれの分類に適用される項目について評価すること。

①医療機器の接触部位による分類

ア) 非接触機器 : 患者の身体に直接的にも間接的にも触れない医療機器

イ) 表面接触機器

○皮膚 : 健常な皮膚にのみ接触する医療機器

○粘膜 : 健常な口腔、食道、尿道などの粘膜器官に接触する医療機器

○損傷表面 : 傷ついた皮膚あるいは粘膜器官に接触する医療機器

ウ) 体内と体外とを連結する機器

○血液流路間接的 : 血管と一点で接触し、血管に薬液などを注入する医療機器

○組織／骨／歯質 : 組織、骨、歯髄又は歯質と接触する医療機器

○循環血液 : 循環血液と接触する医療機器

エ) 体内植込み機器

○組織／骨 : 主として組織又は骨と接触する医療機器

○血液 : 主として血液と接触する医療機器

②接触期間による分類

○一時的接触 : 単回又は複数回使用され、その累積接触期間が 24 時間以内の医療機器

○短・中期的接触 : 単回又は複数回使用され、その累積接触期間が 24 時間を超えるが 30 日以内の医療機器

○長期的接触 : 単回又は複数回使用され、その累積接触期間が 30 日を超える医療機器

2) JIS T 0993-1 附属書 B の B.2.2.2 「生物学的ハザードの特定」に記載されている項目に基づき、既承認医療機器又は既認証医療機器との同等性評価や、適切な公表文献による評価などを、表 1 に示す項目の評価に代えることも可能であり、必ずしも全項目の試験実施を求めるものではない。ただし、公表文献による評価を行う場合にあっては、JIS T 0993-1 附属書 C 「推奨する文献レビューの手順」を参考とし、客観性及び第三者による検証に耐え得るよう、その妥当性を明らかにする必要がある。

3) 医療機器の接触部位、接触期間、原材料の特性などに応じて、慢性毒性、発がん性、生殖／発生毒性、生体内分解性などに関する評価を実施すること。

4) 急性全身毒性、亜急性全身毒性又は慢性全身毒性試験に関しては、埋植試験あるいは使用模擬試験が、各毒性試験で必要とされる観察項目及び生化学データなどを含んでいる場合は、これらの毒性試験に代えることができる。

5) 体内植込み機器のリスク評価では、全身的影響及び局所的影響を考慮しなくてはならない。

6) 表 1 に示された項目のみで生物学的安全性評価が不十分な場合や単純には適用不可能な場合もあるため、当該医療機器の特質を十分考慮して評価項目を検討する必要がある。例えば、歯科裏装用セメントの場合の歯髄・象牙質使用模擬試験やコンタクトレンズの場合のレンズ装用試験のように医療機器固有の試験が必要となる場合や、毒性試験結果などから免疫毒性が疑われた場合に免疫毒性に関する評価が必要となる場合、細胞組織医療機器のようにここで示された試験を単純に適用するのが困難な場合もある。また、生体内で経時的に吸収されるなど、性状が変化する医療機器では、変化を考慮した試験条件などを設定することも必要で

ある。

6. 試験法

- 1) ISO 10993 シリーズ中の各試験法ガイダンスには、それぞれの評価項目ごとに多様な試験法が並列的に記述されており、その中のどの試験法を選択すべきかについては、明確に規定されていない。ある評価項目に関して複数の試験法の中からどれを選択すべきかについては、目的とする医療機器の生物学的安全性評価の意義との関連において、試験の原理、感度、選択性、定量性、再現性、試験試料の適用方法とその制限などを勘案して決めるべきである。なお、細胞毒性試験、感作性試験及び遺伝毒性試験については以下の点に留意すること。
 - ア) 細胞毒性試験に関しては、ISO 10993-5 細胞毒性試験に、抽出液による試験法、間接接触法（寒天重層法、フィルター拡散法）、直接接触法が示されている。これらの試験法は、感度、定量性などが異なるため、リスク評価のためのハザード検出に当たっては、感度が高く定量性のある方法（例えば、抽出液による試験法）を用いる必要がある。一般的に、抽出液による試験法は感度が高く、すべての医療機器に適用可能であることから、抽出液による試験法を第一選択とし、半定量的あるいは定性的試験法を選択する場合にはその妥当性を説明する必要がある。
 - イ) 感作性試験及び遺伝毒性試験のハザード検出に当たっては ISO 10993-12 の抽出溶媒に関する規定や ISO 10993-3 及び ISO 10993-10 に記載されている抽出法を参照し、各材料に適したものであって、かつ抽出率の高い抽出溶媒を選択して医療機器の安全性を評価することが必要である。その際、抽出溶媒の種類や抽出条件によって試料溶液中の溶出物の濃度や種類が異なることから、結果が偽陰性を示す可能性があることに留意する。
- 2) 全ての医療機器について一律の試験法を定めることは合理的ではなく、特定の試験法を固守するよう求めるものではないが、選定した試験法から得られた結果が臨床使用上の安全性を評価するに足るものであると判断した根拠と妥当性を明らかにする必要がある。

7. 試験試料

- 1) 医療機器の生物学的安全性試験を実施する場合の試験試料としては、最終製品、最終製品の一部及び原材料などが考えられるが、試験試料の選択においては、最終製品の安全性を十分に評価できるかどうかを検討し、その選択の妥当性を明らかにする必要がある。
- 2) 医療機器は複数の材料を組み合わせで製造されることが多く、その製造工程（滅菌工程を含む）において材料が化学的に変化することがある。製造工程において材料が変化する場合には、最終製品から切り出した試験試料、あるいは同じ条件で製造した模擬試験試料を用いて試験を実施する必要がある。一方、製造工程において材料が化学的に変化しない場合には、原材料を試験試料として試験を実施することで差し支えない。
- 3) 原材料の一部の成分を新規の化学物質に変更し、かつ、それが材料中で化学的に変化していない場合などで、原材料又は最終製品を試験試料として試験を実施するよりも当該化学物質について試験を実施する方が試験実施の上でも評価の上でも合理的な場合は、当該化学物質の試験をもって、原材料又は最終製品の試験に

代えることができる。

8. 動物福祉

試験に動物を用いる際の動物の取扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律（平成 17 年法律第 68 号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び ISO 10993-2 動物福祉に関する要求事項などに従い、動物実験の代替法の 3R の原則 [1.Replacement（実験動物の置き換え）、2.Reduction（実験動物数の削減）、3.Refinement（実験方法の改善による動物の苦痛の軽減）] に則り動物の福祉に努めつつ、適正な動物実験を実施すること。

表 1 考慮すべき評価項目

下表は生物学的安全性評価項目選択のための原則である。

本文記載のとおり、表 1 は実施すべき試験項目として網羅したものではなく、適切なリスク評価を行う際に考慮すべき項目として示したものである。また、特定の医療機器では、この表に示される試験の組み合わせに加えて、慢性毒性、発がん性、生体内分解性、トキシコキネティクス、免疫毒性、生殖／発生毒性、その他臓器特異的毒性についても評価が必要となる場合がある。

医療機器の分類	接触期間（累積）	生物学的安全性評価項目								
接触部位	A：一時的接触 （24 時間以内） B：短・中期的接触 （24 時間を超え 30 日以内） C：長期的接触 （30 日を超える）	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	発 熱 性	埋 植	血 液 適 合 性
非接触機器										
表面接触機器	皮膚	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○					
	粘膜	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○		○	○		
	損傷表面	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○		○	○		
体内と体外とを連結する機器	血液流路間接的	A	○	○	○	○			○	○
		B	○	○	○	○			○	○
		C	○	○		○	○	○	○	○
	組織/骨/歯質	A	○	○	○					
		B	○	○	○	○	○		○	
		C	○	○	○	○	○		○	
	循環血液	A	○	○	○	○			○	○
		B	○	○	○	○	○	○	○	○
		C	○	○	○	○	○	○	○	○
体内植込み機器	組織/骨	A	○	○	○					
		B	○	○	○	○	○		○	
		C	○	○	○	○	○		○	
	血液	A	○	○	○	○	○		○	○
		B	○	○	○	○	○	○	○	○
		C	○	○	○	○	○	○	○	○

本表の評価項目には、JIS T 0993-1 の附属書 A 生物学的評価試験の表 A.1 の項目に、発熱性を加えている。発熱性については、ISO では全身毒性（急性）の評価の一部としているが、評価項目として示すことがリスク評価を行う上で有用であると判断し、別項目として記載した。

医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス

目次

	ページ
第1部 細胞毒性試験	8
第2部 感作性試験	20
第3部 遺伝毒性試験	35
第4部 埋植試験	41
第5部 刺激性試験	54
第6部 全身毒性試験	67
第7部 発熱性物質試験	75
第8部 血液適合性試験	87
付録	95

第1部 細胞毒性試験

1. 適用範囲

本試験法は、医療機器又は原材料の細胞毒性をほ乳類培養細胞を用いて評価するためのものである（4.1 項参照）。

ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity には、抽出法 (Test on extracts)、直接接触法 (Test by direct contact)、間接接触法 [Test by indirect contact、寒天重層法 (Agar diffusion)、フィルター拡散法 (Filter diffusion)] が含まれている。これらの試験法は更に、試験に使用する細胞株の種類、試験条件、細胞毒性の指標及びその評価法などによって、多種多様となるが（4.2 項参照）、ISO 10993-5 では定量的に評価可能な試験法を推奨している。また、そのような試験法として4種類の試験法（ニュートラルレッド法、コロニー形成法、MTT 法、XTT 法）が Annex に記載されている（4.3 項参照）。ここでは、ISO 10993-5 に記載されている試験法の中から、感度の高い試験法である抽出法によるコロニー形成法について紹介する。加えて、組織との直接接触による影響を評価できる直接接触法についても紹介する（4.4 項参照）。

なお、医療機器の接触組織を勘案した時、適切な感度・再現性又は用量依存性が示されれば、ISO 10993-5 に準拠した他の方法で試験を実施してもよい（4.2 項参照）。

2. 引用規格

2.1 ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity

2.2 第十六改正日本薬局方、一般試験法、7.02 プラスチック製医薬品容器試験法、1.7. 細胞毒性試験

3. コロニー形成法による細胞毒性試験

3.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）の試験液（抽出液）又は試験試料そのものと細胞を接触させて培養することにより、試験試料から溶出する物質の細胞毒性を確認するための試験である。

3.2 試験の要約

試験試料を血清添加培地で抽出し、播種した細胞に添加し、培養後のコロニー形成能を評価する。又は、試験試料上に直接細胞を播種し、培養後のコロニー形成能を評価する。

3.3 試験試料 (test sample) 及び対照試料 (control sample) の取扱い

3.3.1 試験試料

試験は、試験試料の抽出液、又は試験試料そのもので行う。液体の試験試料や抽出液の場合は、適切な溶媒や培地で希釈して試験を実施する。必要であれば、溶媒のみを培地で適切な濃度まで希釈して試験し、使用した溶媒の影響を

明らかにする。

3.3.2 対照試料

1) 陰性対照材料 (negative reference materials)

陰性対照材料は、ここで示した方法に従って試験した時、規定された基準値を満たす材料であり、以下のものが入手可能である。

抽出法用：高密度ポリエチレンシート（検定済みのもの。4.6 項参照）

直接接触法用：和光組織培養用プラスチックシート、トルエン耐性（和光純薬、カタログ No.160-08893 又は No.162-09311）

2) 陽性対照材料 (positive reference materials, 4.5 項参照)

陽性対照材料は、ここで示した方法に従って試験した時、中程度の細胞毒性を示す陽性対照材料 A 及び弱い細胞毒性を示す陽性対照材料 B の 2 種類であり、以下のものが入手可能である（4.6 項参照）。検定済みのものを使用する。

陽性対照材料 A：0.1%ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (zinc diethyldithiocarbamate, ZDEC) 含有ポリウレタンフィルム

陽性対照材料 B：0.25%ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛 (zinc dibutyldithiocarbamate, ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム

3) 陽性対照物質 (positive control substance)

細胞の感度及び精度を明らかにするために使用する物質である。以下のものが入手可能である。

陽性対照物質：ZDBC（例えば和光純薬、1 級）

3.4 滅菌

試験試料は、最終製品と同じ方法で滅菌する。滅菌方法が定まっていない場合には、生化学的又は物理化学的特性などを考慮し、適切な滅菌処理を行う。

エチレンオキシドガス滅菌をした場合には、エチレンオキシド又はエチレンクロルヒドリンが残留しないように十分ばっ気した後、試験する。

臨床使用時に滅菌を必要としない試験試料は、無菌的に取り扱う。しかし、微生物による汚染が生じた試験結果は誤った試験評価に繋がることから、そのような汚染を避けるためには滅菌するのが妥当である。ただし、滅菌操作によって材料が変化しない方法を選択すべきである。

滅菌後の試料は、無菌的に取り扱う。

3.5 細胞株及びその取扱い

3.5.1 細胞株

以下に示した細胞株を使用する。他の細胞株及び初代培養細胞を使用する場合は、その細胞での検出感度を陽性対照物質によって判断し、一定レベルの感度及び精度があることを確認する必要がある（4.7 項参照）。

①L929 細胞：CCL 1 (NCTC clone 929)

②Balb/3T3 細胞：CCL 163 (Balb/3T3 clone A31)

③V79 細胞：JCRB0603 (V79)

試験に用いる細胞については、良好なコロニー形成能（3.6.5 項参照）を有することを確認する。

3.5.2 培地（培養液）

培地は牛胎児血清を 10 vol% 添加した Eagle の Minimum Essential Medium (MEM10 培地) を使用する。細胞に影響を及ぼさない濃度で抗生物質を添加してもよい。

3.5.3 細胞の取扱い

- 1) 微生物による汚染を防ぐため、全て無菌的に操作する。
- 2) 溶液などは、細胞と接触させる前に、予め 37℃ 付近に温めておく。
- 3) 培養容器内で細胞が単層で増殖し、飽和に近い状態の時、トリプシン処理などにより細胞を剥がして均一な細胞懸濁液とし、細胞株に最も適した細胞濃度あるいは継代比率に従って、新しい培養容器に植え込む。
- 4) 培地交換及び継代は、使用する細胞株に適切な間隔で行う。
- 5) 細胞株は、市販の細胞凍結保存液又は凍結保護剤を含む培地中で保存する。
-80℃ 以下の超低温槽では短期間（1 年間程度）保存は可能であるが、長期間保存は液体窒素保存容器中とする。
- 6) 細胞の履歴を記録する。
- 7) 凍結保存細胞は、ロットごとにマイコプラズマ汚染の有無をチェックする。

3.6 抽出法によるコロニー形成法

3.6.1 抽出溶媒

試験試料の化学的性状を考慮して抽出溶媒を選択することが原則であるが、ほ乳動物培養細胞を用いる細胞毒性試験では、血清を含む培地の使用が望ましい（4.8 項参照）。なぜなら、血清含有培地は極性物質と非極性物質の両方を抽出できると同時に細胞の増殖にも必須のためである。また、極性物質（例えば、イオン性物質）を抽出する場合などについては、血清を含まない培地の選択も考慮する必要がある。その他の適切な溶媒には、精製水などが含まれるが、細胞の暴露量を考慮して抽出溶媒を選択する（4.9 項参照）。血清含有培地以外の抽出溶媒を選択した場合には、その理由を報告書に記載する。

3.6.2 抽出条件

医療機器の使用条件や性状を考慮して抽出条件を選択すべきであるが、抽出溶媒として培地を使用する細胞毒性試験では、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間抽出する。ただし、体内植込み機器ではなく、正常皮膚あるいは粘膜に短時間しか接触しない医療機器（累積接触期間が 4 時間未満）については、4 時間以上 24 時間未満で抽出した試験液での試験も可能である。その他の抽出条件での試験を選択する場合は、医療機器の使用状態を十分に考慮し、細胞毒性に関する安全性を適切に評価できる適切な抽出条件で試験を実施する。ただし、3.6.6 項の条件を満たすことを確認する必要がある。また、その理由を報告書に記載する。

3.6.3 抽出操作

- 1) 可能であれば、試験試料を切断（約 2×15 mm 程度の大きさ）する。特別な表面処理をした試験試料は、細切しないものについて試験を実施する。
- 2) 細切した試験試料は、スクリーキャップ付き滅菌ガラス容器又はプラスチック管に入れ、1 g 又は厚みを考慮した実表面積 60 cm^2 に対して培地を 10 mL の割合で加え、軽く栓をする。対照材料については、1 g に対して培地を 10 mL の

割合で加える（4.7項参照）。

- 3) 培地の pH が中性域（培地の色で判断）であることを確認後、37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、静置して抽出する（通常は 24 時間）。
- 4) 抽出容器から、試験液のみを取り出す（100%試験液）。試験液をろ過、遠心、あるいは試験液を試験に適用する前に他の方法による何らかの処理を行った場合には、その詳細及び妥当性を報告書に記載する。
- 5) 100%試験液を、更に培地で、原則として 3 倍以下の割合で段階希釈する。

3.6.4 試験操作

- 1) 継代した細胞からトリプシン処理などにより単離細胞を調製し、培地（4.8 項参照）に懸濁する。
- 2) 直径 60 mm シャーレには 100～200 個（培地 4～6 mL）、35 mm シャーレには 50～100 個（1～3 mL）、12 穴又は 24 穴プレートのウェルには 40～50 個（0.5～2 mL）の細胞を播種する。
- 3) 細胞を播種した培養容器を 37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、4～24 時間静置し、細胞を培養容器底面に接着させる。
- 4) 培地を除き、各試験液を培養容器に加える。加える液量は、細胞播種時の培地量と同様とする。
- 5) 陰性対照材料及び陽性対照材料の試験液についても同様に加える。
- 6) 各濃度の試験液について、少なくとも 3 つのウェル又はシャーレを使用する。
- 7) 試験液を加えた培養容器は、直ちに炭酸ガス培養器に入れ、静置して培養する。
- 8) 培養期間は、使用する細胞株により異なるが、陰性対照群における染色した個々のコロニー（50 個以上の細胞集団）が明確に区別できるまで培養する（4.11 項参照）。
- 9) 培養終了後、培地を捨てる。メタノール又は 10 vol%ホルマリン溶液などを加えて固定する。必要があれば、固定前に平衡塩類溶液で洗う。
- 10) 固定後、ギムザ染色液など（4.12 項参照）を加え、コロニーを染色する。
- 11) コロニーが良く染色されたことを確認後、染色液を捨て、水洗して乾燥させる。

3.6.5 観察

- 1) 各シャーレ（又は各ウェル）内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは、実体顕微鏡又は肉眼で観察し、細胞が 50 個以上集まっている集団について数える。迅速な判定法として、コロニーカウンターを用いたコロニー数測定も可能である。その際は、機械での測定結果の精度など結果の信頼性が確保されていることを確認する。
- 2) 新鮮培地のみで培養した培養容器をコントロール群とする。コントロール群に播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数からコロニー形成能（形成したコロニー数／播種した細胞数）を求める。コントロール群でのコロニー数の平均値を 100%として、試験液で形成されたコロニー数を百分率（%）で示す。
- 3) 実験結果は、縦軸がコロニー形成率（コントロール群のコロニー数の平均値を 100%とする）を、横軸が試験液の濃度（対数）を示すグラフ上にプロットする。グラフより、コントロール群のコロニー数を 50%阻害する試験液の濃度（%）を求め IC₅₀ 値とする。
- 4) 統計理論式から得られる IC₅₀ 値を、コンピュータで計算することもできる。

5) IC_{50} 値を細胞毒性強度の指標とする。

3.6.6 試験成立条件

以下に記載する内容を満たした試験において、試験試料の細胞毒性を正しく評価できる。

- 1) コントロール群でのコロニー形成能が良好である。
- 2) 陰性対照材料での 100%抽出液の各培養容器で形成されたコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- 3) 溶媒を使用した時は、使用溶媒濃度で試験した各培養容器で形成されたコロニー数が、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- 4) 陽性対照材料 A 及び陽性対照材料 B を試験試料と同様の温度と時間で抽出して試験したとき、陽性対照材料の試験液の濃度とコロニー形成阻害の強さに各々用量反応関係を認め、更に、得られた IC_{50} 値は陽性対照材料 A 及び陽性対照材料 B において各々下記の値を満たす（4.7、4.10 項参照）。

陽性対照材料 A の IC_{50} 値：7%未満

陽性対照材料 B の IC_{50} 値：80%未満

- 5) 必要に応じて、陽性対照物質 (ZDBC) の細胞毒性強度 (IC_{50} 値) を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする（4.7 項参照）。

3.6.7 評価

コントロール群に対する 100%試験液処理群のコロニー形成率が 30%を超えて低下した場合、細胞毒性作用有りと評価する（4.13 項参照）。その他の基準値を採用した場合には、その理由を報告書に記載する。

3.7 直接接触法によるコロニー形成法（4.4 項参照）

3.7.1 試料調製

- 1) 試験に使用する培養容器（12 穴又は 24 穴プレート）の形状に合うように、円板の試験試料及び対照材料（陰性対照材料及び陽性対照材料 B）を作製し、可能な場合には、重量及び表面積を測定する。
- 2) 陰性対照材料及び陽性対照材料 B は、試験試料と同様に切断する。
- 3) 未滅菌の試験試料及び対照材料については、その使用目的に合った滅菌処理を施す。

3.7.2 試験操作

- 1) 細胞株は V79 細胞を、培地は MEM10 培地を用いる。
- 2) 試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料 B を、培養容器によく密着させる。
- 3) 12 穴プレートのウェルには 40～50 個（培地 1～2 mL）、24 穴プレートのウェルには 40～50 個（培地 0.5～1 mL）の細胞を播種する。
- 4) 細胞を播種した培養容器を 37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、6～7 日間静置して培養する。
- 5) 培養終了後、培地を捨てる。試験試料に適した固定液で固定する。必要があれば、固定前に平衡塩類溶液で洗う。
- 6) 固定後、ギムザ染色液など（4.12 項参照）を加え、コロニーを染色する。
- 7) コロニーが良く染色されていることを確認後、染色液を捨て、水洗・乾燥させる。
- 8) 各培養容器のコロニー数を数える。

3.7.3 観察

- 1) 培養容器に直接播種した細胞のコロニー数をコントロール群とし、その平均値を100%とする。
- 2) 試験試料上に直接播種した細胞のコロニー数を数え、コントロール群のコロニー数に対する割合(%)を求める。
- 3) 陰性対照材料及び陽性対照材料Bのコロニー形成率(%)を求める。

3.7.4 試験成立条件

- 1) 以下に記載する内容を満たした試験において、試験試料の直接接触法での細胞毒性を正しく評価できる。

陰性対照材料でのコロニー形成率：80%以上

陽性対照材料Bでのコロニー形成率：10%以下

- 2) 必要に応じて陽性対照物質(ZDBC)の細胞毒性強度(IC₅₀値)を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする。

3.7.5 評価

抽出法におけるIC₅₀値が100%以下で、試験試料上に直接播種した細胞のコロニー形成率が30%未満の場合には、細胞毒性作用ありと評価する(4.13項参照)。ただし、試験試料上に直接播種した細胞のコロニー形成率が30%未満で、抽出法におけるIC₅₀値が100%を超える場合には、試験試料の抽出を72時間行った抽出液で試験を実施し、その結果も考慮して評価する。なお、コロニー形成率低下の原因を特定できれば、必ずしも72時間抽出した試験液での試験を実施する必要はない。

3.8 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 使用した対照材料(陰性対照材料、陽性対照材料及び陽性対照物質)
- 5) 試験試料の試験への適用方法(滅菌した場合は、その方法を含む)
(例：採取重量又は面積、細切の方法、滅菌方法など)
- 6) 試験液の調製
- 7) 使用した細胞株
- 8) 使用した培地(使用した抗生物質の種類及び含量)
- 9) 使用した細胞及び培地でのコントロール群のコロニー形成能(形成したコロニー数/播種した細胞数)
- 10) 抽出法での細胞毒性試験結果：
試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料での個々のデータ及びその計算値(平均値、標準偏差)の表、データをプロットしたグラフ、IC₅₀値
直接接触法での細胞毒性試験結果：
試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料でのコロニー形成率とその顕微鏡写真(プレート全体と1個のコロニーの状態が判定可能な写真)

- 11) コントロール群のコロニー数を 50%阻害する陽性対照物質 (ZDBC) の濃度
[IC₅₀ (μg/mL)]
- 12) 結果の評価と考察
- 13) 参考文献

4. 参考情報

4.1 細胞毒性試験の位置づけ

細胞毒性試験は感度の高い試験系であり、*in vivo* での毒性作用の可能性を検索するために、全てのカテゴリーの医療機器の生物学的安全性評価項目となっている。

本試験系は、動物レベルでの毒性試験結果を、より単純な実験系として、細胞レベルで明らかにしようとするものであり、主に、毒性発現メカニズムを明らかにするための手段として、初代培養細胞や樹立細胞株を用いて研究されてきた。しかし、通常試験に使用されている細胞株の場合には、生体臓器を構成する細胞とは異なる感受性をもっており、*in vivo* での有害作用とは完全には相関しないことも常に考慮しておくことが重要である。

その一方で、従来からある方法のみにとらわれることなく、科学的根拠に基づいた精度の高いデータを得るための代替試験法を取り入れて評価することも重要である。

4.2 各種細胞毒性試験法の特徴

医療機器又は原材料の細胞毒性試験には、材料の抽出液を用いる方法と、材料と細胞との直接接触及び間接接触による方法とがある。直接接触による方法には、細胞の上に材料を載せる方法と逆に材料の上に細胞を播種する方法がある。

細胞の上に材料を載せる方法は、材料の物理的重みなどによる細胞の傷害が伴う可能性がある。一方、材料の上に細胞を播種する場合には、細胞が付着しにくい材料の場合には、細胞毒性を評価しにくい。それぞれ欠点があるが、材料からの溶出成分と細胞とが即反応するため、不安定な化合物例えば過酸化水素などの毒性を検知するのには優れており、細胞毒性の検出感度は一般的に高いと考えられている。

材料と細胞との間接接触による方法には、寒天重層法やミリポアフィルター重層法、ならびにセルカルチャーインサート法がある。これらは、細胞と材料との間に寒天やフィルターが存在する。寒天は脂溶性の化合物は拡散しにくく検出感度が低く、半定量的評価法である。ミリポアフィルター重層法は寒天重層法の改良型であり、寒天重層法と同様に *in situ* で重合する材料（例：コンポジットレジン）の試験としては有用であるが、細胞毒性の検出感度は低く、眼粘膜刺激を示す材料でも陽性とならないことがあるので、眼粘膜に直接接触する医療機器へ適用するには不適切である。一方、セルカルチャーインサート法はウェル底面に材料を置き、その上にセルカルチャーインサートを置き、そのフィルター上に細胞を播種することにより、感度よく細胞毒性作用を評価することが可能で、直接接触法の結果を補足する試験として利用できる。

培地抽出液を用いる抽出法は最も一般的に行われている方法である。無血清

MEM 培地を用いて 6 cm²/mL で、37℃、24 時間抽出した陽性対照材料 B の溶液を、USP 24 <87> Biological reactivity tests, *In vitro* (以下、Elution Test) に従って試験を実施すると、スコア 2 を示し、細胞毒性は合格判定となる。同材料を 5～10% 血清含有培地で抽出した溶液の場合には、スコア 4 を示し、細胞毒性は不合格となる。蒸留水を用いて 6 cm²/mL で、37℃、24 時間抽出した陽性対照材料の溶液を Elution Test で評価すると、陽性対照材料 A 及び B とともにスコア 0 を示し、材料中に含まれる細胞毒性を検知できない。更に、蒸留水を用いて、50℃で 72 時間、70℃で 24 時間、121℃で 1 時間抽出した溶液について、Elution Test で試験した結果、陽性対照材料 A 及び B とともに、細胞毒性を検知することは出来なかった。蒸留水や無血清培地では、オリゴマーや添加剤のような物質は溶出されにくいこと、また、化合物によっては高温で分解されることが検知できない原因として考えられる。したがって、通常は、血清を 5～10% 含有する培地で抽出した溶液を細胞毒性試験用抽出液として試験する。また、抽出液を試験する時の細胞密度や判定方法により、検出感度や精度が異なるが、採用する試験法の妥当性を明らかにすることができれば、どの方法で試験を行ってもよい。

4.3 掲載試験法選択背景

ISO 10993-5 で Annex としてニュートラルレッド法、コロニー形成法、MTT 法、XTT 法が紹介されているが、これらの方法は細胞毒性作用を定量的に評価する方法である。また、ニュートラルレッド法及びコロニー形成法については、国際バリデーション試験や国際 round-robin 試験で化学物質や医療機器の検出に適していることが示されており、MTT 法及び XTT 法は定量的方法として広く使用されている方法である。

本ガイダンスでは、医療機器の安全性評価を目的とすることから、検出感度が高く、特殊な測定機器がなくても、定量的に判定できる方法を導入することを念頭に入れ、コロニー形成法を掲載した。

4.4 直接接触法の実施とその注意点

すべての医療機器で直接接触法による細胞毒性を評価する必要はないが、抽出時に失活することが予想される材料及び眼粘膜に接触する材料については、直接接触法で試験を実施する。試験が困難な材料でも、眼粘膜に接触する材料や、刺激への感受性が敏感な組織に使用する材料については、直接接触法に相当する感度で細胞毒性の評価を実施する。なお、直接接触法は、細胞が付着しにくい材料の場合には見かけ上コロニー形成能が低下することや、抽出条件や処理条件が抽出法と必ずしも同じではないことから、その評価が困難な場合がある。そのような場合には、半円板の試験試料を用いる方法や、セルカルチャーインサートのフィルター膜に細胞を播種し、直接接触法と同様の条件で試験を実施して試験試料の細胞毒性作用を評価する方法もある。

4.5 陽性対照材料

実験系の適切性及び検出感度を判定する物差しとして、弱い細胞毒性を示す陽性対照材料 B と中程度の細胞毒性を示す陽性対照材料 A を採用した。2 種の陽性

対照材料を導入した目的は、①試験法や細胞の相違、実験室間の変動があっても、これらの陽性対照材料と比較することで試験試料の細胞毒性強度の相対的位置を知る、②その相対的位置から組織刺激性の程度を予測する、ことにある。

4.6 陰性対照材料及び陽性対照材料の入手先

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所 総務部 対照材料担当
電話 0463-82-4751、 FAX 0463-82-9627
e-mail : RM.Office@fdsc.or.jp

4.7 陽性対照物質及び陽性対照材料の IC₅₀ 値

L929 細胞、Balb/3T3 細胞及び V79 細胞 (M05 培地を使用 : 4.8 項参照) を用いた時の IC₅₀ 値の幅を参考のため記す。

陽性対照	IC ₅₀ 値の幅		
	L929 細胞	Balb/3T3 細胞	V79 細胞
ZDBC (μg/mL)	2.5~5.5	0.2~0.4	1.0~4.0*
陽性対照材料 A (%)	2~5	2~6	1~3*
陽性対照材料 B (%)	50~60	15~25	50~60*

* 陽性対照物質 (ZDBC) 及び陽性対照材料 A 及び B の IC₅₀ 値は MEM10 培地を使用した V79 細胞の場合、M05 培地使用時に比べて、弱い細胞毒性を示す (例えば、ZDBC の IC₅₀ 値 : 4~8 μg/mL、陽性対照材料 A の IC₅₀ 値 : 3~8%、陽性対照材料 B の IC₅₀ 値 : >100%)。

また、ISO/TC 194 のワーキンググループ 5 が 2005~2006 年に実施した国際 round-robin 試験で行われた試験法間の比較結果は以下のとおりであった。

陽性対照	IC ₅₀ 値の幅 (平均)	
	コロニー形成法 (V79 細胞)	NR 法 (Balb/3T3 細胞)
陽性対照材料 A (%)	0.36~1.6 (0.57)	7.0~26 (6.7)
陽性対照材料 B (%)	24~80 (55.9)	32~93 (89.4)

以上の結果は、0.1 g/mL の抽出割合で抽出した対照材料の結果であり、この抽出割合でのコロニー形成法が ISO 10993-5 の Annex B に掲載されている。また、コロニー形成法は感度の高い試験法であることから、本ガイダンスでは、試験試料の抽出割合を 0.1 g/mL 又は 6 cm²/mL とした。

4.8 抽出に用いる培地の種類

L929 細胞及び Balb/3T3 細胞については、MEM10 培地を抽出溶媒として使用する。V79 細胞を用いる抽出法による試験では、MEM10 培地も使用可能であるが、M05 培地を使用すると陽性対照物質及び陽性対照材料に対する感度が高くなる (4.7 項参照)。M05 培地の調製法を以下に示した。

Eagle の MEM で Earle の平衡塩類溶液を含む培地に、MEM 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11 g/L)、L-グルタミン (0.292 g/L)、炭酸水素ナトリウム (2.2 g/L) 及び牛胎児血清 (5 vol%) を加える。細胞に影響を及ぼさない濃度で抗生物質を添加してもよい。

なお、血清又はタンパクがある種の溶出物に結合することがあることを認識しておく必要がある。

4.9 培地以外の抽出溶媒

培地以外の抽出溶媒として、精製水を用いた場合には、培地に添加できる量は限られる（通常、10 vol%が最大量である）。抽出可能な溶出物の検出力を高めるには、試験系に添加する試験液の量を多くする必要がある。そのための方法として、2～5 倍濃い濃度の培地で精製水抽出液を希釈して試験する方法もある。また、DMSO を抽出溶媒とすることも考えられるが、DMSO は 0.5 vol%以上の濃度では試験系において細胞毒性作用があるため、培地への添加量は 0.5 vol%程度までとなる。したがって、血清含有培地よりも希釈率が高くなるため DMSO で抽出可能な溶出物の濃度は必ずしも高いとは言えない。このように、培地以外の抽出溶媒を選択する場合には、抽出可能な溶出物の細胞への最終的な暴露量を考慮して決める必要がある。

4.10 細胞毒性強度と組織刺激性との相関

細胞毒性強度を示す IC_{50} (%) 値と種々の生体組織での刺激性強度との関係を図 1 に示す。ZDEC を種々の濃度で含む対照材料をこのガイダンスに従って抽出し、

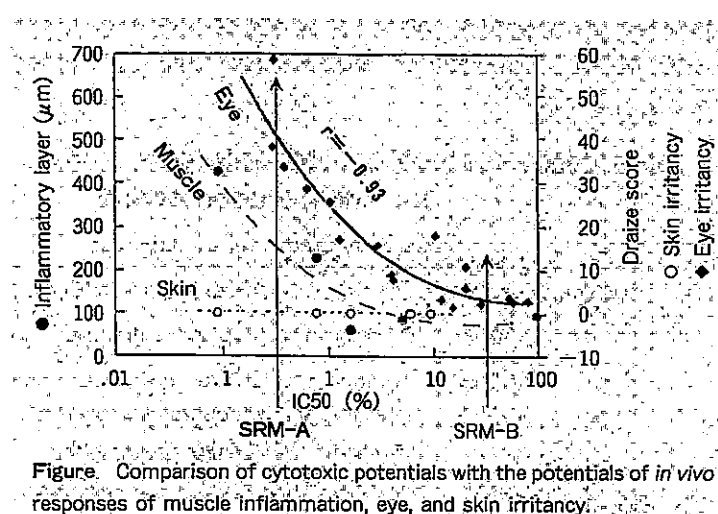


図1 材料の細胞毒性強度と異なる組織での刺激性との関係

値が 5% 近辺以下の材料で炎症反応がおきた。一方、健常皮膚では、0.1% の IC_{50} 値を示す強い対照材料でも皮膚刺激性は認められなかった。このように対照材料を用いると組織間の感受性の違いも明らかになる。

Balb/3T3 細胞を用いたコロニー形成法で IC_{50} 値を求めた。一方、対照材料をコンタクトレンズにコーティングし、ウサギ眼への装用試験、対照材料のウサギ筋肉内埋植試験、及び健常皮膚へのパッチ試験を行い、 IC_{50} 値と *in vivo* 刺激性強度との関係を明らかにした。その結果、同じ細胞毒性強度を示す材料では、眼粘膜が最も感受性が高く、 IC_{50} 値 35% 近辺以下を示す材料を装用すると眼刺激性を生じた。

筋肉組織に対しては、 IC_{50}

細胞毒性強度 (IC ₅₀ 値)	予測される生物学的反応
100%以上	細胞毒性は無いか非常に弱い [#] 。
陽性対照材料 B より弱い	弱い細胞毒性が示された。 弱い眼粘膜刺激が起こりうる。
陽性対照材料 A と B の中間	中程度の細胞毒性が示された。 粘膜組織に対しても炎症反応がおきる場合がある。
陽性対照材料 A より強い	強い細胞毒性が示された。 筋肉組織に対しても炎症反応がおきる可能性が高い。

: 抽出法によるコロニー形成法で 100%以上の IC₅₀ 値を示す場合でも Draize score 4 以下の眼粘膜刺激性を示す場合があることを認識する必要がある。

4.11 コロニー形成までの培養期間

肉眼で判断できるコロニーを形成させるまでの培養期間は、細胞株の種類によって異なる。一般的には、Balb/3T3 細胞は 9～11 日間、L929 細胞は 7～9 日間、V79 細胞は 6～7 日間が目安である。しかしながら、コロニーのサイズや形態は、細胞の増殖率に依存することから、試験条件、特に試験に使用する血清のロットによる影響が大きい。したがって、試験施設ごとに試験条件を検討し最適な培養期間を決定するとよい。

4.12 染色液

コロニーの染色は、一般的には市販のギムザ染色液を使用直前にリン酸緩衝液 (M/15、pH 6.4) で 10～50 倍に希釈して使用する。染色時間は、コロニーがはっきりと染色される時間で十分である。また、染色の目的は、コロニーの判別を容易にすることであるから、クリスタルバイオレットなどで染色してもよい。

4.13 結果の評価

細胞毒性試験結果の評価は、他の生物学的安全性試験結果や製品の使用目的を考慮して行うべきである。もしも、細胞毒性作用有りという結果が得られた場合には、血清の濃度や血清不含の培養液を用いた抽出法による追加試験や原因物質の特定などの他の試験を実施することを検討する。何らかの細胞毒性作用が考えられる場合においても、それは生体内における毒性の可能性を示唆する結果ではあるが、必ずしも医療機器として不適切であるということを意味する訳ではない。

5. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

- 1) 試験手順の記載を簡略化し、参考情報に必要な説明を記載した。
- 2) ISO 10993-5:2009 との整合性を考慮し、以下の点を改正した。
 - (1) コロニー形成法が ISO 10993-5:2009 に掲載された定量的試験法の一つであることを明確にした。
 - (2) 短時間接触医療機器の場合には、4 時間以上 24 時間未満の抽出液の使用が可能であることを記載した。

- (3) 細胞毒性作用の有無の判断基準を記載した。
- (4) 細胞毒性試験結果の評価に関する考え方を参考情報に記載した。
- 3) 直接接触法実施の判断基準と注意点を参考情報に記載した。

6. 参考文献

- 1) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法，朝倉書店 (1991)
- 2) 大野忠夫編著：動物実験代替法マニュアル，培養細胞を用いた理論と応用，共立出版 (1994)
- 3) 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 22:228-233 (1996)
- 4) 日本薬剤師研修センター：医薬品 GLP ガイドブック，薬事日報社 (2008)
- 5) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi M.: Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials* 11, 92-94 (1990)
- 6) Ikarashi, Y., Toyoda, K., Ohsawa, N., Uchima, T., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Takahashi, M., Nakamura, A.: Comparative studies by cell culture and *in vivo* implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 339-356 (1992)
- 7) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T., Tanaka, N., Sasaki, K., Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J. Applied Biomaterials* 4, 153-156 (1993)
- 8) Tsuchiya, T., Arai, T., Ohhashi, J., Imai, K., Kojima, H., Miyamoto, S., Hata, H., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi M., Nakamura, A.: 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.* 27, 885-893 (1993)
- 9) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Arai, T., Ohhashi, J., Isama, K., Nakamura, A.: *In vivo* toxic tissue/biomaterials responses: Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment. *Clinical Materials* 16, 1-8 (1994)
- 10) Tsuchiya, T.: Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomaterials Applications* 9, 138-157 (1994)
- 11) Ohno, T. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-1. Overview of the study and analyses of validations of ED50 value. *Alternatives to Animal Testing & Experimentation (AATEX)* 5, 1-38 (1998)
- 12) Tanaka, N. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-IV. Details of colony formation assay. *AATEX* 5, 74-86 (1998)
- 13) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y., Tsuchiya, T.: Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.* 119, 61-64 (2001)

第2部 感作性試験

1. 適用範囲

本試験は、医療機器又は原材料が遅延型アレルギー反応の一つである感作性を引き起こす可能性を評価するためのものである。ここでは、モルモットを用いる試験法としてMaximization Test（別名: Guinea pig maximization test: GPMT）とAdjuvant and Patch Test（A&P, 別名: scratched skin method）の2種と、マウス局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay : LLNA) を記載した。

なお、この試験は、即時型アレルギー性（抗原性）を検出する目的のものではない。

2. 引用規格

ISO 10993-10:2010, Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and skin sensitization

3. 試験試料と試験法の選択

3.1 原則

試験の具体的手技は、引用規格及び他の公的規格を参考にする。上述の3試験法は、適切な抽出液や試験試料を用いて試験を実施する場合には感度は同等と見なされ、リスク評価に用いることが可能である。

新規原材料を使用している機器、使用方法や設計企画が新規である機器、又は使用期間が短期から長期に変更されたり、表面接触から体内植込み機器へ変更された場合には、試験試料の作製及び試験法の選択には十分留意してリスク評価を行う必要がある。以下に代表的な試験法の特徴を示した。

- 1) GPMT : 感作性試験として確立された方法。試験試料（最終製品又は原材料）あるいは試験試料からの抽出物が皮内投与可能な溶媒に溶解するか、又は均一に分散する場合（フロッキングなどを起こさず注射針を通過する場合）に用いられる。GPMT の特性として、偽陽性が多いこと、色素の評価が困難であることが知られている。
- 2) A&P : 試験試料からの抽出物が皮内投与可能な溶媒に溶解あるいは分散しない場合（フロッキングなどを起こして注射針を通過しない場合）に用いられる。また、医療機器の臨床使用方法が貼付の場合には、GPMT に優先して実施されることがある。A&Pでは、貼付物の粒子サイズや形状による刺激性が結果に影響することがある。
- 3) LLNA : 単一化学物質を対象に、GPMTの代替法として国際的に認められている。現在、化学物質に対しては動物愛護の観点も含め、優先される試験となりつつある。LLNAの特性として、偽陰性や偽陽性物質の存在、ある種の金属や高分子化合物といった皮膚に浸透しないものでは正確な評価は難しいことが知られている。同様に、水系媒体では評価が困難な場合がある。また、刺激によりLLNAが陽性反応を示す可能性のあることも認識しておかなければならない。試験試料は溶液、懸濁液、ゲルもしくはペーストなど、マウスの耳に適用できる性状でなければならない。

以上のとおり、各試験法にはメリット、デメリットが存在し、いずれの試験法

も万能でないことを理解し、適切な試験法を選択することが重要である。また、試験試料からの抽出物を溶解又は分散させる際に用いる溶媒が強い全身毒性又は局所刺激性を示すものである場合は、その毒性を勘案して試験法を選択することが必要である。

3.2 試験試料・試験液の調製と試験法の選択

試験試料の生化学的又は物理化学的特性は試験法の選択に重要である。「基本的考え方」に則り、1. 既知の知見を確認し、2. 化学的キャラクタリゼーションを行い、3. 医療機器のクラス分類、4. 原材料の新規性などを十分に評価し、生物学的安全性試験実施の要否を判断しなくてはならない。試験試料と試験法の選択に関しては図1に概要をフローチャートとして示した。その詳細を以下に記載する。

3.2.1 金属又はセラミックス

材料を構成する金属のイオンとしての感作性が、適切な感作性試験によって既に確認されている場合は、あらためて試験を実施する必要はない。十分な感作性のデータがない金属元素種が材料に含まれる場合は、当該金属のイオン溶液について、感作性の強さを評価する。例えば、一旦、酸（希塩酸など）による過酷条件で抽出し、中和して（水酸化ナトリウムなどによる中和）pHを中性付近にした（この時金属イオンの一部又は大部分は通常水酸化物などとして沈殿する）金属イオンと金属沈殿物微粒子から成る懸濁液について、感作性の強さを評価することも可能である。

3.2.2 水又はアルコールに溶解するもの

水又はアルコールに溶解するものについては、蒸留水（生理食塩液）又は適切なアルコールに溶解してGPMTにより評価する。あるいは適切なアルコール又はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解してLLNAにより評価する。

3.2.3 低分子有機化合物

低分子有機化合物については、試験結果の判定に影響を与えない適切な溶媒に溶解又は均一に分散させてGPMTもしくはLLNAにより感作性試験を実施する。GPMTの溶媒としては、植物油、DMSO又は蒸留水が使用可能であるが、これらに溶解せずアセトンなどの有機溶媒に溶解する場合は、有機溶媒に溶解させた後、その溶液に植物油又はDMSOを混ぜながら有機溶媒を揮散させて分散させることも可能である。LLNAでは、アセトン：オリーブ油＝4：1（AOO）の媒体が用いられることが多い。また、アセトンなどの有機溶媒に溶解する場合は、有機溶媒をそのまま媒体として用いることも可能である。

3.2.4 ポリマー樹脂

ポリマー樹脂については、原則として抽出率の最も高い有機溶媒による抽出物の溶液を試験液としてGPMTもしくはLLNAにより感作性試験を実施する。この場合の抽出溶媒及び試験液の調製については、以下の点に留意すること。なお、単回かつ一時的接触（24時間以内）医療機器あるいはリスクの低い医療機器と分類されている医療機器については、新規原材料が用いられていない場合には、有機溶媒以外の抽出液を用いた試験によるリスク評価も可能と考える。

抽出溶媒は、ISO 10993-10 Annex E, E.2.1に記載されている溶媒及び抽出条件を参考に、抽出率の最も高い溶媒を選択する。

有機溶媒としては、通例、メタノール又はアセトンを用いる。ただし、①溶媒

中で試験試料が溶解したり、原形をとどめないほど変形・変質するような場合、又は、②メタノール、アセトンによる抽出では十分な量の抽出物が得られない場合は、他の適切な有機溶媒を選ぶ。2-プロパノール/シクロヘキサン混液(1:1)を使用してもよい。他に n-ヘキサンも用いられる。

抽出は、ISO 10993-10 Annex Eに準じて行う。細切することで特に問題がなければ試験試料を細切しその重量の10倍から20倍容量の溶媒を加え、室温で攪拌又は振とうして行う。抽出時間は24時間から72時間とする。

有機溶媒抽出液からの試験液の調製方法には、以下の二とおりが考えられる。すなわち、必要な量の抽出物が得られる場合(第1法)と、得られない場合(第2法)である。

1) 第1法(抽出物【残留物】を用いる方法)

抽出液からロータリーエバポレーターを用いて可及的に低温下で溶媒を留去して残留物を得、これらの残留物を植物油、DMSO又は蒸留水に溶解又は均一に分散させて試験液として感作性試験を実施する。これらに溶解せずアセトンに溶解する場合は、アセトンに溶解させた後、その溶液を植物油又はDMSOに混ぜながらアセトンを揮散させて分散させるのもよい方法である。局所適用濃度は、感作の成否の重要な因子であることから、投与濃度は結果に悪影響を与えない範囲で可能な限り高くすることが望ましい。したがって、抽出物の投与濃度は一般的に10%を目安とし、実際に試験に使用した濃度の設定理由を説明すること。

2) 第2法(抽出液を用いる方法)

クデルナ・ダニッシュ濃縮器(目盛り付き)などを用いて抽出液を濃縮又は乾固し、試験試料1g当たり1mLに濃縮・調製するか、溶媒留去後適切な他の溶媒に溶解して試験試料1g当たり1mLに調製し、それを試験液として感作性試験を実施する。医療機器が100g以上の重量を有する大型の医療機器などの場合は最終濃度を10g当たり、あるいは100g当たり1mLに濃縮調製することも考慮する。

第1法、第2法とも抽出率を求めておくことが必要であり、乾固した抽出物の重量を直接測定して求めるか、又はソックスレーフラスコなどを用いて抽出残量を測定して求める。

備考：「必要な量の抽出物が得られる場合」とは、通例試験試料から得られる抽出物量が試験試料の重量の0.5%以上を目安とする。ただし、1回に用いる医療機器(最終製品)の重量が0.5g未満の小さな医療機器の場合は1%以上を目安とする。

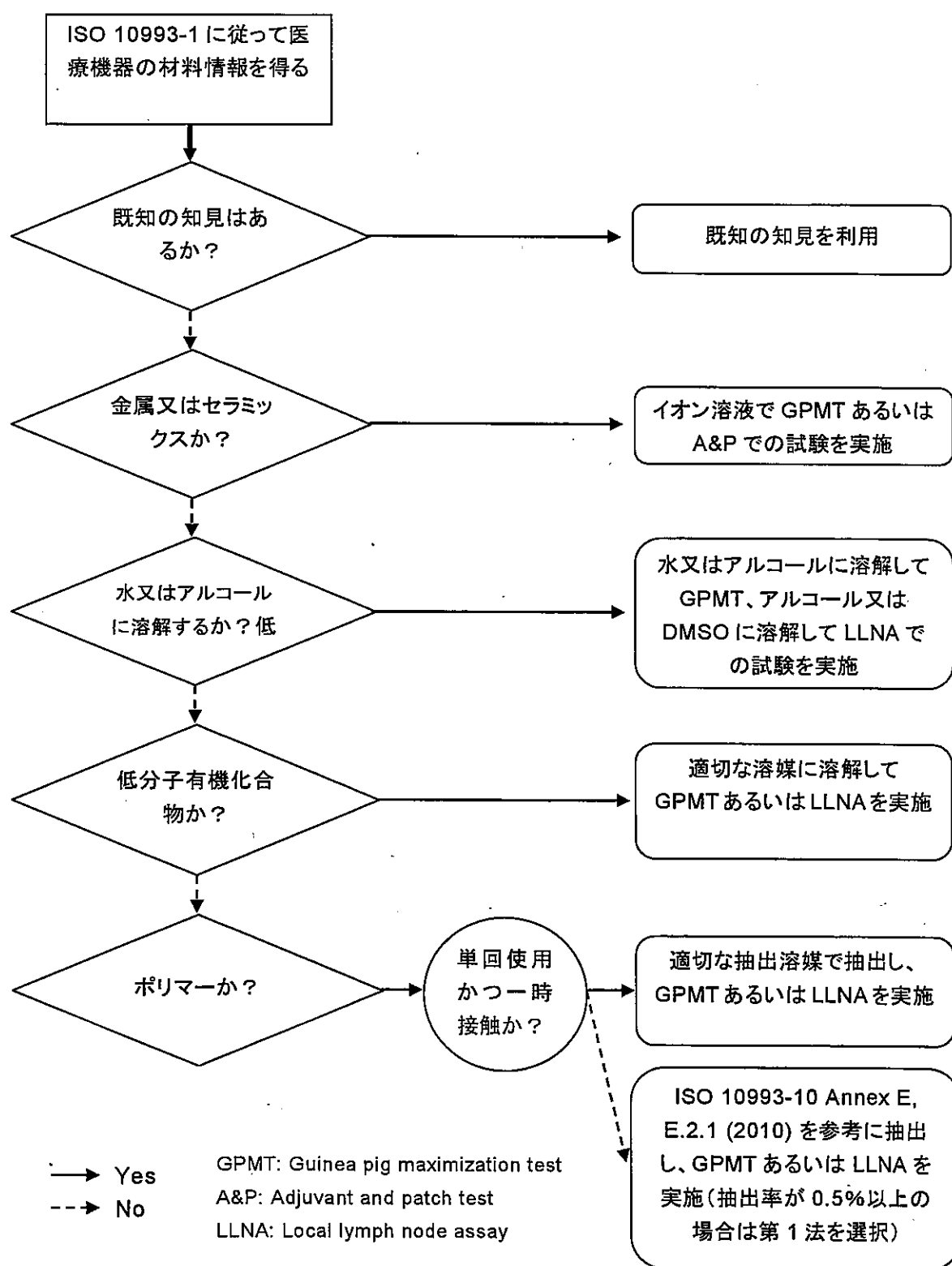


図1 試験試料と試験法選択のフローチャート

4. GPMT

4.1 試験法

4.1.1 試験動物と動物数

体重400 g前後の健康な若齢白色モルモット（通常1～3カ月齢）を使用する。雄ないし雌の動物を使用することが可能であるが、雌を使用する場合は妊娠していない未経産の動物を使用する。

動物数は、試験群10匹、対照群は最低5匹とする。感作性評価が困難な場合には、再惹起あるいは動物数を増やすなどの対応が必要である。また、動物は無作為に各群に振り分けるようにする。

4.1.2 群構成及び陽性対照物質

試験群と陰性対照群、陽性対照群を設定する。惹起濃度を複数設定できる場合には試験群を1群とし、陰性、陽性対照群の3群設定する。また、試験液を希釈あるいは濃縮して濃度を複数設定できる場合には最低3群設定し、用量依存性を評価する方法もある。生理食塩液抽出液のように、濃縮処理などが困難でかつ抽出液の原液で感作することで十分に安全性を評価できると判断される場合も、試験群を1群とし、陰性、陽性対照群の3群での試験も可能である。

陽性対照物質は、試験動物の感度及び感作性の強さの比較に必要であり、次のような物質が用いられている。p-フェニレンジアミン (CAS No. 106-50-3)、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CAS No. 97-00-7)、重クロム酸カリウム (CAS No. 77781-50-9)、硫酸ネオマイシン (CAS No. 1405-10-3)、硫酸ニッケル (CAS No. 7786-81-4)。その他、文献で知られた感作性物質も使用可能である。

4.1.3 感作

1) 一次感作

あらかじめ刈毛したモルモットの肩甲骨上部皮膚（約2 × 4 cm）に、以下のものを図2に示すように左右対称に0.1 mLずつ皮内注射する。

(a) 蒸留水とFreund 完全アジュバント (FCA) の1 : 1の油中水型 (W/O) 乳化物 (E-FCA)

(b) 各試料液（試験液、陽性対照液、陰性対照（溶媒）液）

(c) (b)の試料液（(b)の2倍濃度）とFCAとの等量乳化混合物

2) 二次感作

皮内注射後1週間目に、皮内注射部位（刈毛した肩甲骨上部皮膚部、図2）にラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）を塗布する。ただし、試料液に刺激性がある場合、この操作は不要である。翌日、ラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）の残留が認められた場合はそれを拭き取った後、同一部位に試料液 (b) 0.2 mLを48時間閉塞貼付する。

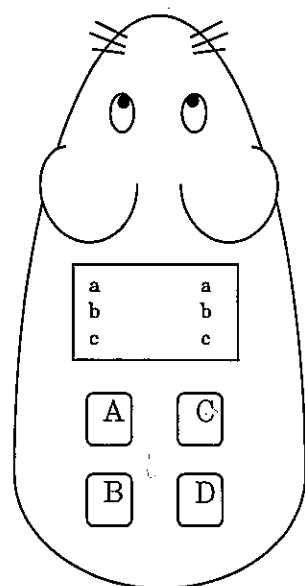


図2 皮内注射及び貼付による感作誘導部位と惹起貼付部位

a、b及びcは皮内注射部位、は貼付部位 (2 cm × 4 cm) を示す。
は惹起部位を示す。

4.1.4 惹起

閉塞貼付後2週間目に、試料液を適切な溶媒に溶解あるいは混合したもの及びその段階希釈した試料液をあらかじめ刈毛した背部又は側腹部に適用する。試験群には、溶媒のみ (0%液) も適用し、判定の参考にする。

惹起に用いる濃度は、予備試験で刺激性を示さなかった最高濃度から段階的に希釈したもの各0.1 mLを個々のモルモットの皮膚に適用する (図2)。

適用は、閉塞貼付あるいは開放塗布で行う。原料化学物質あるいは金属材料を試験する場合であって、それらが水溶性の場合は水溶液を用いてもかまわない。

植物油 (オリブ油、綿実油及びゴマ油など) は刺激性あるいは感作性を示すことがあるので、陰性対照群の反応などを十分考慮して判定すること。

4.1.5 皮膚反応の判定

閉塞貼付の場合は、24 時間後に貼付物を取り去り、その24 及び48 時間後に皮膚反応を通常の判定基準に従って採点し、以下のように表示する。通常の判定基準とは、表 1 に示した評点などをさす。

開放塗布の場合は、塗布後24、48、72時間の皮膚反応を採点する。
 なお、平均評価点が約 1.0になる惹起濃度から、およその最低感作濃度を推定することができる¹⁾。

表1 皮膚（皮内）反応の評点付けシステム(ISO 10993-10, 6 Irritation tests)

紅斑及び痂皮の形成	
紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑（かろうじて認識できる）	1
はっきりした紅斑	2
中程度ないし高度紅斑	3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成（深部損傷まで）	4
[最高点 4 点]	
浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫（かろうじて認識できる）	1
軽度な浮腫（はっきりとした膨隆による明確な縁が識別できる）	2
中程度浮腫（約 1 mm の膨隆）	3
高度浮腫（1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり）	4
[最高点 4 点]	
[紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点 8 点]	

4.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（医療機器又は原材料）を特定する要素
（例:医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 使用した対照物質（陽性対照物質）
（例:対照物質名、入手先、製造番号など）
- 5) 試験液の調製方法
（抽出方法、抽出率を含む）
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別
- 7) 試験方法
- 8) 実験開始時及び終了時の個別体重
- 9) 個々の動物の皮膚反応結果及び総括表
- 10) 結果の評価と考察
- 11) 参考文献

採点結果は下表に例示するごとく、惹起濃度、陽性率、平均評価点などが見やすいものを作成する。

第1法の総括表の例（抽出率 0.5%）

感作濃度	惹起濃度 %	観察時間 (hr) ^{*1}	評価	
			陽性率 ^{*2}	平均評価点 ^{*3}
10% ^{*4}	10	24	100	3.1
		48	100	4
	1	24	80	1.5
		48	90	2
	0.1	24	20	0.2
		48	20	0.2
	0.01	24	0	0
		48	0	0
	0	24	0	0
		48	0	0

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) × 100

*3 当該群における皮膚（皮内）反応評点付けシステム(ISO 10993-10)などによる反応評価点の総計/動物総数

*4 抽出物の重量を測定し、投与用媒体に希釈して調製

第2法の総括表の例（抽出率 0.1%）

感作濃度 (抽出液濃度)	惹起濃度 抽出液濃度 (%)	観察時間 (hr) ^{*1}	評価	
			陽性率 ^{*2}	平均評価点 ^{*3}
100% ^{*4} (0.1%)	100	24	100	3.6
		48	100	3.2
	50	24	100	2.2
		48	100	2
	25	24	100	1.2
		48	100	1
	12.5	24	100	1
		48	0	0
	0	24	0	0
		48	0	0

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) × 100

*3 当該群における皮膚（皮内）反応評点付けシステム(ISO 10993-10)などによる反応評価点の総計/動物総数

*4 抽出液を濃縮した後、適切な投与用溶媒で元の試験試料1g当たり1mL溶液にする。

5. A&P

5.1 試験法

5.1.1 試験動物と動物数

4.1.1と同様に動物を選択し、準備する。

5.1.2 群構成及び陽性対照物質

試験群と陰性対照群、陽性対照群を設定する。惹起濃度を複数設定できる場合には試験群を1群とし、陰性、陽性対照群の3群設定する。また、試験液を希釈あるいは濃縮して濃度を複数設定できる場合には最低3群設定し、用量依存性を評価する方法もある。最終製品で直接感作することで十分に安全性を評価できると判断される場合も、試験群を1群とし、陰性、陽性対照群の3群での試験も可能である。

陽性対照物質は、4.1.2に従って適切な物質を選択する。

5.1.3 感作

- 1) あらかじめ刈毛したモルモットの肩甲骨上部皮膚（約2×4 cm）の4隅に、4.1.3(a) E-FCAを0.1 mLずつ皮内注射する。
- 2) E-FCA注射部位に注射針を用いて#型の傷をつける。その部位に試料約0.1 mLを24時間閉塞貼付する。揮発性の有機溶媒による試験液で試験する場合は、開放適用してもよい。
- 3) 1日1回、計3回連続して2)の操作を繰り返す。
- 4) 感作開始1週間後に、皮内注射部位（刈毛した肩甲骨上部皮膚部）にラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）を塗布する。
- 5) 翌日、ラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）を拭き取った後、同一部位に試料0.2 mLを48時間閉塞貼付する。

5.1.4 惹起

上記適用後2週間目に、4.1.4と同様に適用する。

5.1.5 評価

惹起後、4.1.5に従って評価する。

5.2 試験報告書

4.2項参照。

6. LLNA

6.1 試験法

6.1.1 試験動物と動物数

CBA/CaもしくはCBA/J系統の健康な雌性マウスを使用する。マウスは非妊娠、未経産で、8～12週齢を用いる。動物数は試験群、対照群ともに1群最低5匹を使用し、個体別の反応を測定することが望ましい。

6.1.2 群構成及び陽性対照物質

試験試料が濃縮あるいは希釈により用量を変化させて投与可能な場合には、試験群を3群、陰性、陽性対照群を各1群設定することが望ましい。陽性対照物質は4.1.2を参考にして適切なものを選択する。

6.1.3 感作

初回投与時にマウスの体重を個別に記録する。適切な媒体で調製された試験試料を3日間連続でマウスの両耳の背部に25 µL塗布する。3回の投与は可能な範囲で同等な時間帯に行うことが望ましい。

6.1.4 放射性物質の投与

初回投与から6日後マウスの体重を個別に測定、記録した後、最後の感作

投与から 72 ± 2 時間後に、細胞増殖確認用のラベル化合物を静脈内に投与する。すべての群のマウスに $20 \mu\text{Ci}$ (740 kBq) の ^3H -メチルチミジンを含むリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) $250 \mu\text{L}$ を尾静脈から投与する。

6.1.5 測定試料の調製

標識化合物の投与 5 ± 0.75 時間後、マウスを安楽死させ、耳介リンパ節を採取する。個別にマウスの両耳のリンパ節をプールする。調製した単離細胞は、遠心分離により2回洗浄を行い、PBSに再懸濁する。細胞を5%トリクロロ酢酸 (TCA) 中、 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ で 18 ± 1 時間沈殿させる。最後の遠心分離後、ペレットを 1 mL の TCA に再懸濁し、 ^3H の計測をシンチレーションカウンタで行う。

6.1.6 放射活性測定

マウス1匹当たりのカウント毎分 (cpm) でリンパ節の細胞中の放射活性レベルを測定する。cpm を壊変毎分 (dpm) に換算する。

6.1.7 反応性評価

陰性対照群の平均 dpm に対する試験群の平均 dpm の比を Stimulation Index (SI) で表し、3以上のSIを示した物質を感作性陽性とみなす。必要に応じて統計学的考察を行う。

陽性対照のSIは3以上でなければならない。

6.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料 (医療機器又は原材料) を特定する要素
(例: 医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 使用した対照物質 (陽性対照物質)
(例: 対照物質名、入手先、製造番号など)
- 5) 試験液の調製方法
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別
- 7) 試験方法
- 8) 実験開始時及び終了時の個別体重及び一般状態
- 9) 個別の放射活性値及び総括表
- 10) 結果の評価と考察
- 11) 参考文献

7. 参考情報

7.1 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

事務連絡No. 36は、薬機第99号 (平成7年6月27日付け「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」) を踏襲して作成された。その際、ハザードを特定することを目的とした抽出法について医療機器や原材料の種類によって適切な方法を選択できるようフローチャートを示し、解説した。更に、その時までには得られた多くの試験結果や情報から、有機溶媒抽出による抽出物での試験を1溶媒に減らした。今回、事務連絡No. 36を改正するに当たり、原則は踏襲した。その上で今までより表現を明確化し、合わせてISO 10993-10

の改訂内容を盛り込み、主として以下の改正を行った。

- 1) 3 試験法を示し、適切な試験条件を設定することで、どの試験法を選択してもよいことを示した。
- 2) 抽出率により第1法と第2法を選択する目安を示した。
- 3) LLNA の試験方法を示した。

ISO 10993-10の改訂を盛り込んで作成したものであるが、すべてがISO 10993-10と整合している訳ではない。今までのハザード検出に関する部分についてはISOより詳細な記述となっているところもある。また、今までの実績を優先した部分もある。

7.2 試験法の選択

今までモルモットを用いる皮膚感作性試験を2種類例示してきたが、今回新たにLLNAを示した。GPMTとA&Pについては多くの経験により、通常の試験試料では、GPMTの感度が高いものの、試験試料の形状によってはA&Pが適していることが示されている²⁾。LLNAは単一化学物質については、GPMT及び臨床試験との相関性が認められているが、医療機器の分野ではまだ十分なデータが得られていない。しかし、今回ISO 10993-10では、化学物質の試験結果を外挿して医療機器でも十分に感作性を評価できると判断した。また、モデル物質を作製し、その抽出液で試験を行った場合、LLNAでもGPMTと同様の結果が得られたという報告³⁾があり、抽出液による試験でも同等性が示されている。LLNAで注意すべき点は、抽出媒体の選択である。特にLLNAは耳に塗布して感作する試験であるため、塗布による感作が十分に行われなければ感度は低下する。そのため、媒体としては生理食塩液などの水系は不適切であり、刺激性の少ないアセトンなどの有機溶媒が適切である。他の媒体を選択することも可能であるが、媒体による刺激性について確認しておく必要がある。

以上の点に留意して試験法を選択する場合には、いずれの試験法を用いても感作性を評価することが可能であると判断した。

7.3 抽出率による試験法の選択

ポリマー製品など、有機溶媒抽出で試験を実施する場合、予備検討として、抽出率を確認しておくことが望ましい。また、その抽出物を用い、投与用媒体の検討を行うことも重要である。抽出溶媒は、メタノール、アセトン、2-プロパノール/シクロヘキサン混液（1:1）、あるいはn-ヘキサンが一般的に用いられている。これらのうち、メタノールは感作性が知られているので、メタノール抽出物の試験では、投与用媒体にはメタノールを用いない方がよい。

7.4 試験液の調製溶媒について

抽出方法はISO 10993-12に述べられている。試験液の調製溶媒は、抽出物を可溶化し、皮膚透過性を高めることなどを考慮して選択すべきである。

GPMTでは、試験試料を溶解させて投与した方が、検出感度が高まることが知られている。通常、水、植物油（オリーブ油、綿実油及びゴマ油など）、DMSO、アセトンなどが汎用されている。DMSO及びアセトンについては、皮内注射によって壊死が生じるために試験の感度が下がることも予想されるが、ごく局所にとどまるような影響で、全身に対する毒性がない場合は、物質を溶解して投与した方が感

度は上がるが多い。

LLNAでは、一般的に原料化学物質の溶媒として、アセトン/オリブ油混液(4:1)が用いられている。親水性試料あるいは耳介の皮膚に十分に付着しない液体の試料などは耳介に十分付着するよう塗布方法を工夫すべきである。例えばカルボキシメチルセルロースや水酸化エチルセルロース (0.5%w/v) のような懸濁液を添加する方法もある。一部の水溶性の化学物質に対しては、DMSOやN,N-ジメチルホルムアミド、エタノールなどが界面活性剤Pluronic® L 92より好ましい。他の溶媒も投与用媒体として使用できるが、抽出媒体への添加や溶媒成分の変更による影響を十分に検証し、記録しなければならない。この影響は陽性対照物質として一般的に用いられる弱もしくは中等度の感作性物質を使用した実験によって検証可能である。更に、陽性対照物質を試験試料に添加して行う試験によって、調製された抽出液が媒体などによる妨害を受けることなく十分に感作性物質の存在を検出できることを実証することが可能である。

7.5 試験動物について

試験動物の選択に当たっては感受性の高い動物を用いることが原則である。

GPMTやA&Pではいずれもモルモットが用いられている。モルモットが選ばれたのは、感作性反応の感度の良さに加えて、外観的に紅斑及び浮腫を形成し、種々の化学物質においてヒトに類似した反応を示すことが知られており、更に、豊富な背景データの蓄積があることが主たる理由である。動物の体重は重要な要因であり、あまり小さいと操作がやりにくく、あまり大きい(600 g以上)と反応性が鈍くなるため、実験開始時の体重が400 g前後の、健康な若齢白色モルモット(通常1~3カ月齢)を用いるのが望ましい。雄ないし雌の動物を使用することが可能であるが、雌を使用する場合は妊娠していない未経産の動物を使用する。

LLNAではDBA/2, B6C3F1, BALB/cなどの系統でも使用可能であるとの報告はあるが、実際に用いる場合にはCBA系統と感度が同等であることを確認する必要がある。各試験で使用するマウスは同一週齢(1週間以内のもの)とする。感度が雌と同等であることを示すことができれば、雄を使用してもよい。

群数に関しては、医療機器では、試験に用いる試料は抽出液になることが多いので、1用量のみしか設定できない場合もあるが、抽出液を濃縮乾固後に再溶解することで用量を複数設定できる場合には3群程度設定し、用量依存性を確認することが望ましい。陽性対照群も試験ごとに設定することが望ましい。LLNAでは特に媒体の刺激性が反応に大きく影響することから、試験試料と同じ媒体を使用できる物質を選択すべきであるが、適切な陽性対照物質が存在しない場合には、別途陽性対照用の媒体群も設定して試験を行い、それぞれの陰性対照に対するSIを求めるべきである。

7.6 LLNA の試験方法について

7.6.1 感作について

LLNAにおいて投与部位が乾きにくい場合にはドライヤーなどで冷風を当てて乾燥させることも可能である。感作投与物質が他の動物に影響することが予想される場合には個別飼育することを考える。

7.6.2 放射性物質の投与

¹²⁵I-iododeoxyuridine の場合は、2 µCi (74 kBq) を含有する PBS を 250 µL、

fluorodeoxyuridine の場合は 10^{-5} M を含有する PBS を 250 μ L 尾静脈から投与する。

7.6.3 測定試料の調製例

リンパ節採取の際、群間の組織試料の交叉汚染に気をつけなければならない。細胞の単離はリンパ節を 200 μ m のステンレスメッシュかナイロンメッシュあるいはスライドガラスのフロスト部分などを利用して優しく押しつぶして行う。遠心分離（例えば 4℃、10 分、 $190 \times g$ ）により 2 回洗浄を行い、PBS に再懸濁する。次いで細胞を 5% TCA 中、 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ で 18 ± 1 時間沈殿させる。最後の遠心分離後、ペレットを 1 mL の TCA に再懸濁し、 ^3H の計測には 10 mL のシンチレーション溶液を入れたシンチレーションバイアルに移し、シンチレーションカウンタで測定する。 ^{125}I の測定には直接 γ カウンターに移して測定する。

7.6.4 放射活性測定

それぞれの結果からバックグラウンドを差し引いた後、群ごとの平均と標準偏差（個体ごとの検体採取の場合）を計算する。

7.6.5 反応性評価

結果が判定基準値に近似している場合などは、補足的に統計処理を行うことも有用である。

7.6.6 他の LLNA

他に放射性ラベルを使用しない代替法が存在する。医療機器の評価における正当性が示される場合には使用可能である。（例：bromodeoxyuridine (BrdU) を用いる LLNA-BrdU 法、adenosine triphosphate (ATP) を測定する LLNA-DA 法）

7.7 皮膚反応の採点基準について

モルモットの場合、血管拡張に基づく紅斑と、血管透過性亢進に基づく浮腫とが容易に区別できることから、一般的に皮膚反応の判定基準は、紅斑 (erythema) の程度に浮腫 (edema) の形成を加味して行っているものが多い。ISO 10993-10 では、総合的に 4 段階でスコアをつけているが、より多くの情報が得られることから、本ガイダンスでは今までのスコアを再掲した。LLNA では評価に用いるものではないが、投与期間中の耳介の状態を観察することが重要である。刺激性が強い物質では、耳介の状態が悪化し、結果として感作性の反応が低下するおそれがあるため、試験結果の評価に重要な情報となる。

7.8 感作性の強さの評価について

GPMT 及び A&P における皮膚反応の平均評価点は、皮膚反応（紅斑及び浮腫）の程度をスコア化し、その総点を使用動物数で割った値であり、皮膚の炎症の程度を表わす²⁾。最低感作濃度は感作性が認められる最も低い感作濃度を示し、実験的に求めることは可能であるが、試験規模が膨大となり、現実的でない側面がある。最低感作濃度は最高感作濃度群における MRI 惹起濃度（皮膚の平均評価点がおおよそ 1.0 を示すところの最も低い惹起濃度）とほぼ同程度であることが明らかにされている¹⁾ことから、MRI 惹起濃度からおおよその最低感作濃度を類推することが可能である。LLNA では用量依存性が認められた場合、求められた SI を基に SI が 3 を示す濃度 (EC3) を算出し、この EC3 濃度を既存の感作性物質と比較することにより、感作性の強さを評価することが可能である³⁾。

8. 引用文献

- 1) Nakamura, A., Momma, J., Sekiguchi, H., Noda, T., Yamano, T., Kaniwa, M.-A., Kojima, S., Tsuda, M., Kurokawa, Y.: A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 31, 72-85 (1994)
- 2) Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F., Ohta, S.: A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis* 7, 225-237 (1981)
- 3) Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitization: Local lymph node assay, OECD Publications (2010)

9. 参考文献

- 1) van Ketal, W.G., Tan-lim, K.N: Contact dermatitis from ethanol. *Contact Dermatitis* 1, 7-10 (1975)
- 2) Stotts, J., Ely, W.J.: Induction of human skin sensitization to ethanol. *J. Invest. Dermat.* 69, 219-222 (1977)
- 3) Kero, M., Hannuksela, M.: Guinea pig maximization test open epicutaneous test and chamber test in induction of delayed contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 6, 341-344 (1980)
- 4) Goodwin, B.F.J., Crevel, R.W.R., Johnson, A.W.: A comparison of three guinea-pig sensitization procedures for the detection of 19 reported human contact sensitizers. *Contact Dermatitis* 7, 248-258 (1981)
- 5) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay. *Toxicol. Lett.* 62, 53-61 (1992)
- 6) Ikarashi, Y., Momma, J., Tsuchiya T., Nakamura, A.: Evaluation of skin sensitization potential of nickel, chromium, titanium and zirconium salts using guinea-pigs and mice. *Biomaterials* 17, 2103-2108 (1996)
- 7) Ikarashi, Y., Kaniwa, M., Tsuchiya, T.: Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs. *Biomaterials* 23, 4907-4914 (2002)
- 8) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Toyoda, K., Kobayashi, E., Doi, H., Yoneyama, T., Hamanaka H.: Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater. Trans.* 43, 3065-3071 (2002)
- 9) Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H. *et al.*, A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48, 53-61 (2002)
- 10) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Uchima, T., Doi, H. Nakamura, A., Ohshima, Y., Fujimaki, M., Toyoda, K., Kobayashi, E., Yoneyama, T., Hamanaka, H.: A method to monitor corrosion of chromium-iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine. *Mater. Trans.* 43, 3058-3064 (2002)
- 11) Cockshott, A., Evns, P., Ryans, C.A. *et al.*, The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. *Human Exp. Toxicol.* 25, 387-394 (2006)

- 12) Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J., Kimber, I.: Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 41, 54-60 (2007)
- 13) ASTM Standard F 2148-07: Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)

第3部 遺伝毒性試験

1. 適用範囲

本試験は、医療機器又は原材料の遺伝毒性評価を目的としている（4.1項参照）。ISO 10993-3, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity においては、遺伝子突然変異及び染色体異常を検出する試験を推奨しており、ここでは細菌を用いる復帰突然変異試験及び培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験の実施を基本とする。ただし、得られた試験結果が陽性になった場合や、医療機器又は原材料の使用期間や使用条件によっては、*in vivo* 試験系を含む他の試験系の実施についても考慮しなければならない（4.2項参照）。

2. 引用規格

2.1 ISO 10993-3:2003, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity

2.2 OECD 471, Bacterial Reverse Mutation Test

OECD 473, *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

OECD 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

OECD 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test

OECD 476, *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test

OECD 487, *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test

2.3 平成11年11月1日付け医薬審第1604号「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」

3. 試験の適用

3.1 試験試料は最終製品又は原材料である。ただし、試験試料に含まれる原料化学物質、添加剤などについて遺伝毒性に関する安全性が確認されており、含まれる原料化学物質の相互作用などにより未知物質が生成される可能性が低い場合は、これら試料の試験を実施する必要はない。その場合、その科学的妥当性を明らかにする必要がある。

3.2 文献又は既存データなどにより遺伝毒性に関する安全性が確認できない場合は、引用規格に示したガイドラインなどを参照し、以下の試験の実施を基本とする（4.2項参照）。

1) 細菌を用いる復帰突然変異試験

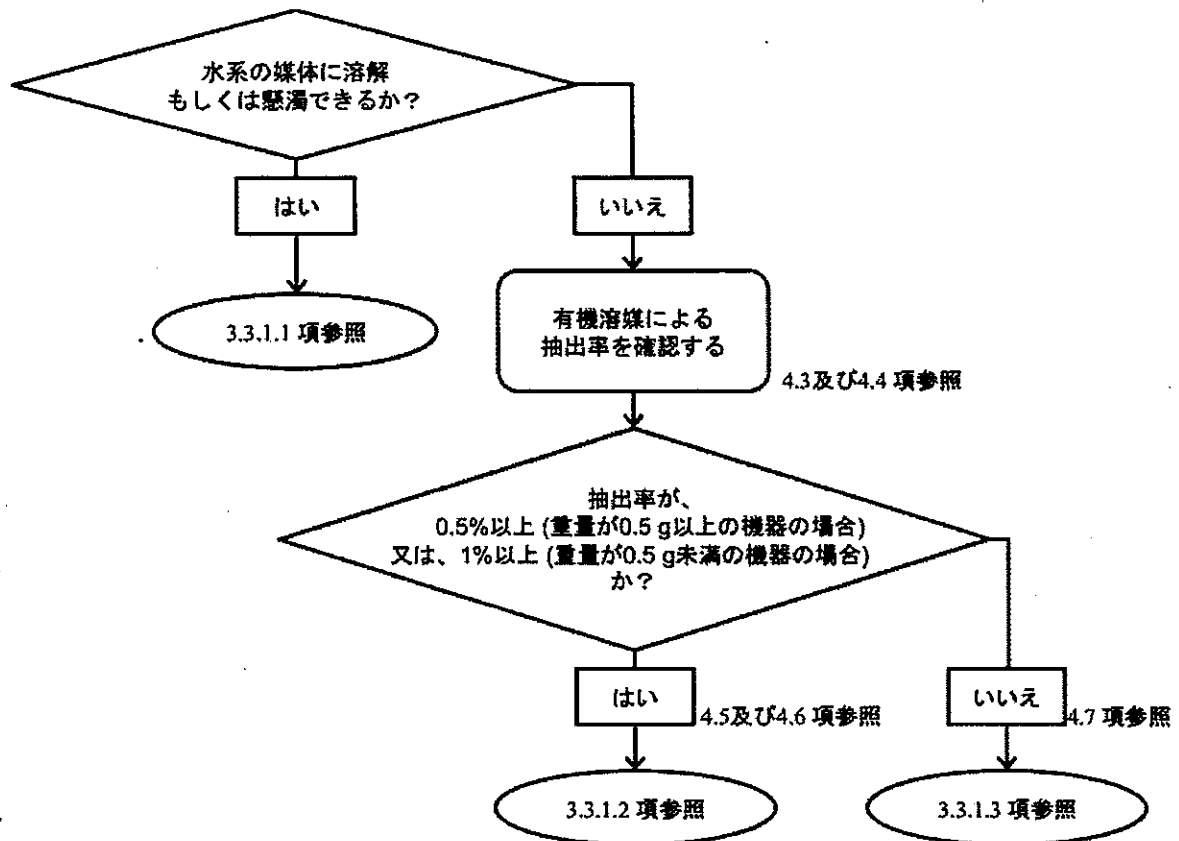
2) 培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験、又はマウスリンフォーマ TK 試験

3.3 試験液の調製

3.3.1 有機材料の場合

試験試料（最終製品又は原材料）の材質、性状、溶解性などの物理化学的特

性を考慮して、以下の手順により試験に適用するための試験液を調製する。



3.3.1.1 水系の媒体に溶解もしくは懸濁できる試験試料は、媒体（水・生理食塩液・血清含有培養液など）に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。

3.3.1.2 水系の媒体に溶解又は懸濁できないが、有機溶媒により抽出物が得られる試験試料は、メタノール及びアセトンによる抽出率を確認する（4.3、4.4 項参照）。メタノール又はアセトンによって抽出物が得られる場合（4.5、4.6 項参照）は、より抽出率の高い溶媒を用い、細切した試験試料にその重量の10倍容量の溶媒を添加し、室温で24時間攪拌して抽出液を調製する。溶媒を留去し、必要量の抽出物を得、抽出物は試験系に適切な媒体に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。

3.3.1.3 水系の媒体に溶解せず、有機溶媒でも抽出物が得られない試験試料は（4.7 項参照）、復帰突然変異試験においてはジメチルスルホキシド (DMSO) による抽出液を、染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験においては血清含有培養液による抽出液を用いて試験を実施する（4.3 項参照）。

1) 復帰突然変異試験

可能な場合は試験試料を細切し、その 0.2 g に対して DMSO 1 mL（あるいは試験試料 6 cm² に対して DMSO 1 mL）の割合で添加し、37℃で振盪攪拌しながら 48 時間抽出し、その抽出液を試験液として、プレート当たり最高 100 µL を

添加して試験を実施する。

2) 染色体異常試験、小核試験、マウスリンフォーマ TK 試験

可能な場合は試験試料を細切し、その 0.2 g に対して試験に用いる血清含有培養液 1 mL（あるいは試験試料 6 cm² に対して培養液 1 mL）の割合で添加し、37℃で 48 時間抽出する。その抽出液を 100%抽出液とし、培養液で希釈して試験を実施する。

3.3.2 無機材料の場合

金属材料あるいはセラミックなどの無機材料における遺伝毒性の多くは、溶出する金属イオンの影響で評価することができる。したがって、これらの遺伝毒性試験は以下に留意する。

- 1) 文献あるいはこれまでの実験によって、これらの材料を構成する金属元素種のイオンの遺伝毒性に関する情報が得られる場合は、試験を実施する必要はない。
- 2) 構成金属元素種に関して遺伝毒性に関する十分な情報が得られない場合は、その代表的な金属イオン溶液又は材料からの抽出液について試験を実施する。
- 3) 遺伝毒性の最終評価を行う際には、当該金属イオンの試験試料からの溶出量も考慮する。

3.3.3 原材料化学物質の場合

適切な溶媒に溶解又は懸濁して試験に供する。

3.4 判定及び評価

本ガイダンスに記載されている代表的な試験法については、試験結果の判定はガイドライン（2. 項参照）に従う。陽性結果が得られた場合は、遺伝毒性の重要性から、更に *in vivo* 試験を含む他の遺伝毒性試験を実施することにより、ヒトへのリスク評価の一助となる場合も考えられる。ただし、医療機器の安全性評価は、遺伝毒性の強さや濃度依存性、抽出に用いた溶媒の種類や抽出率、医療機器の接触部位や接触期間など、種々の条件を総合的に考慮して行う。

3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する要素
例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など
- 4) 対照物質（背景データ）
- 5) 試験液の調製方法
例：溶媒による抽出法と抽出率、滅菌方法など
- 6) 試験方法
例：菌株又は細胞
- 7) 試験結果
必要に応じて、表、図、写真を添付すること
- 8) 結果の評価と考察

9) 参考文献

4. 参考情報

4.1 背景

遺伝毒性試験 (genotoxicity test) は、1 個の細胞に生じた DNA 傷害 (DNA damage) から派生して、細胞や個体レベルで遺伝子突然変異 (gene mutation) や染色体異常 (chromosomal aberration) を誘発する遺伝毒性物質の検出を目的とする試験である。遺伝毒性物質の作用は、その傷害が生体内の体細胞で起きるか、もしくは生殖細胞で起きるかにより傷害の現われ方が異なる。各組織の体細胞において DNA 傷害が生じると、がんの原因となる場合がある。その意味で、遺伝毒性試験は発がん物質の短期スクリーニング試験の役割を果たしている。一方、卵子や精子など生体内の生殖細胞に DNA 傷害が生じると、傷を持つ大部分の細胞は生殖細胞や胚の発生過程で淘汰を受けるが、次世代に遺伝子突然変異や染色体異常が伝わる可能性がある。また、妊娠中の母体が暴露を受け、胎児の体細胞 DNA に傷害が生じた場合、奇形や身体的障害を有する新生児が産まれる可能性もある。このように、遺伝毒性物質は DNA に作用して、がんの発生や次世代に遺伝的影響を及ぼすことから、医療機器は短期的又は長期的いずれの使用条件下においても、生体に作用して遺伝毒性を示さないことが望まれる。

4.2 試験法の選択

本ガイダンスは、原則として、遺伝毒性の主たる事象である遺伝子突然変異及び染色体異常の誘発を検出することができる試験系として、微生物（ネズミチフス菌、大腸菌）を用いる復帰突然変異試験とほ乳動物培養細胞を用いる試験（染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験）の二種の *in vitro* 試験の実施を基本としている。

試験種の選択に関しては、ISO 10993-3 “Biological evaluation of medical devices –Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity” において上記の *in vitro* 試験に加えて *in vivo* 試験の実施が必要な場合も記載されており、本ガイダンスにおいても、医療機器の使用期間あるいは使用条件、得られた試験結果の科学的妥当性などを総合的に勘案して、*in vivo* 試験系を含む他の試験系の実施を考慮することとしている。

4.3 抽出溶媒

試験試料から抽出物を得るための有機溶媒として、主に水溶性物質を抽出するメタノールと脂溶性物質を抽出するアセトンの二種類をあげた。これは試験試料から可能な限り多くの抽出物を得ることを目的とした組み合わせであり、体内植込み機器のように低濃度かつ長期にわたる暴露の影響が想定される場合をも考慮したものである。有機溶媒で抽出物が得られないと判断された試験試料で、さらに DMSO が使用不可能な場合には、生理食塩液やリン酸緩衝液、血清含有培養液などでの抽出が考えられる。どのような抽出媒体を選択する場合であってもその妥当性を説明すること。

4.4 抽出率（試験試料の重量に対する試験試料から得られる抽出物量の割合）

メタノール及びアセトンによって試験試料から得られる抽出物量に関する情報がない場合は、3.3.1.2に従って抽出率を求める。抽出率が0.5%以上（又は1%以上）と、0.5%未満（又は1%未満）の場合では、試験液の調製法が異なる。ここで、抽出率0.5%は最終製品重量が0.5 g以上の医療機器に、抽出率1%はその重量が0.5 g未満の医療機器に適用する。したがって抽出率をもとに試験計画を立案する必要がある。なお抽出率を調べるには、乾固した抽出物の重量を直接測定して求めるか、又はソックスレーフラスコなどを用いて抽出残量を測定して求める。

4.5 「抽出物が得られる場合」の判断

医療機器（最終製品）の重量0.5 gを基準として、抽出率の基準を以下のように定めた。「抽出物が得られる場合」とは、通例、抽出率が0.5%以上（医療機器の重量が0.5 g以上の場合）又は抽出率が1%以上（医療機器の重量が0.5 g未満の場合）の場合とする。0.5%又は1%という抽出率の限界値は、試験に必要な抽出物量を得るための試験試料の量から設定したものである。

4.6 抽出物量

抽出物を用いて遺伝毒性試験を実施する場合に必要な抽出残留物の量は、試験計画によって増減はあるが、およその目安として、少なくとも復帰突然変異試験では1 g、染色体異常試験では2 g程度が必要である。

4.7 「抽出物が得られない場合」の判断

「抽出物が得られない場合」とは、通例、抽出率が0.5%未満（医療機器の重量が0.5 g以上の場合）又は抽出率が1%未満（医療機器の重量が0.5 g未満の場合）の場合とする。ただし溶媒中で材料が溶解する場合、又は原形をとどめないほどに変形するような場合、抽出物は得られないものとする。

また、抽出物を用いて試験を実施せずに、原材料に含まれる原料化学物質（モノマーや添加物）の試験を実施するとともに、試験試料からの原料化学物質の溶出量を定量して評価することも可能である。

5. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

- 1) *In vitro* 小核試験の OECD 試験法ガイドラインが作成された (2010. 7.22) ことから、その感度、再現性は検証されたと考えられるため、*in vitro* 小核試験を実施可能な試験に追加し、引用規格に OECD 487 を追加した。
- 2) 実施可能な *in vivo* 試験として、現時点では小核試験と染色体異常試験が適切と考えられるため、該当する OECD 試験法ガイドラインを引用規格に追加した。
- 3) 引用規格を現在有効で、直接参考となるものに更新した。
- 4) 有機材料からの試験液調製について、手順流れ図を追加した (3.3.1 項参照)。
- 5) 無機材料については、最終評価を行う時、遺伝毒性試験結果だけでなく、試験試料からの金属イオンなどの溶出量を考慮できることを明記した (3.3.2 項参照)。

6) 試験液の調製において、原材料化学物質の項を追加した (3.3.3 項参照)。

6. 参考文献

- 1) 石館基監修：微生物を用いる変異原性試験データ集，エル・アイ・シー，東京 (1991)
- 2) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法，朝倉書店，東京 (1996)
- 3) 林真：小核試験－実験法からデータの評価まで－，サイエンティスト社，東京 (1999)
- 4) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集－改訂 1998 年版－，エル・アイ・シー，東京 (1999)
- 5) 三宅幸雄他編：医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A，サイエンティスト社，東京 (2000)
- 6) 小島幸一，田中憲穂：医療用具の生物学的安全性試験の新ガイドライン，秦野研究所年報 26, 53-68 (2003)
- 7) Wever, D.J., Veldhuizen, A.G., Sanders, M.M., Schakenraad, J.M., van Horn J.R.: Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18, 1115-1120 (1997)
- 8) Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K.I., Kodani, N.U., Nishi, Y., Nakadate, M., Sofuni, T.: Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutagenesis* 14, 5-22 (1999)
- 9) Chauvel-Lebret, D.J., Auroy, P., Tricot-Doleux, S., Bonnaure-Mallet, M.: Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. *Biomaterials* 22, 1795-1801 (2001)
- 10) Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Ono, H., Tanaka, N.: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals. *Mutat. Res.* 517, 187-198 (2002)
- 11) Müller, B.P., Ensslen, S., Dott, W., Hollender, J.: Improved sample preparation of biomaterials for *in vitro* genotoxicity testing using reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 61, 83-90 (2002)
- 12) Muramatsu, K., Nakajima, M., Kikuchi, M., Shimada, S., Sasaki, K., Masuda, S., Yoshihara, Y.: *In vitro* cytocompatibility assessment of β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite. *J. Biomed. Mater. Res. A* 71, 635-643 (2004)
- 13) Matsuoka, A., Isama, K., Tsuchiya, T.: *In vitro* induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests. *J. Biomed. Mater. Res. A* 75, 439-444 (2005)
- 14) Matsuoka, A., Haishima, Y., Hasegawa, C., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the *in vitro* chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. A* 86, 13-22 (2008)

第4部 埋植試験

1. 適用範囲

本試験は、体内植込み機器又は原材料の局所への影響を動物試験により評価するものである。埋植材料の材質、表面性状、又は分解過程などによって、周囲組織に引き起こされる組織反応の種類と程度を評価するもので、特に製品そのものを臨床模擬として埋植して評価する場合を除き、製品の設計仕様により引き起こされる影響を評価するためのものではない。また、本試験により埋植試料の毒性病理学的異常だけではなく、新生骨の形成や組織再構築などの適合性を含め、生体適合性を総合的に評価することが可能である。

試験に用いる埋植材料の形状による物理的刺激などの非特異的反応を引き起こさないよう注意すべきであり、また、ラット皮下への固形物の長期埋植による異物発がんなど、動物種、埋植期間によって特異的に引き起こされるが、ヒトでは想定されない傷害が発生する可能性のある試験設計をしてはならない。

埋植初期から安定期にかけての組織反応の経時的変化を確認することは、ヒトでの体内植込み機器の影響を予測する上で有用な情報を提供する。また、吸収・分解性の医療機器では、吸収・分解過程で様々な分解物に局所が暴露されることから、どのような組織反応を惹起するかを確認することは極めて重要である。

埋植試験の中で全身毒性を評価する場合の注意事項についても、本パートにおいて言及する。

2. 引用規格

ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation

3. 一般的注意事項

3.1 試験法

3.1.1 それぞれの埋植部位における試験法として、筋肉内、皮下及び骨内埋植試験法を例として後述する。

3.1.2 埋植試験による局所の炎症反応を考察するに際し、細胞毒性、感作性、刺激性などの試験データを参考にすることは重要である。

3.2 試験試料及び対照材料

3.2.1 最終製品を用いる場合は、最終製品そのもの又は最終製品の一部を切り出すなどして調製した試料を用いる。

3.2.2 埋植用試験試料を調製する場合には、その形状、断端の形状、大きさ、表面性状が組織反応に影響することを考慮し、物理的影響を最小限に抑えるために、できる限り平滑な形状とすることが求められる。また、試験試料と同様の形状の対照材料を埋植することが評価を容易にする。なお、表面処理を施す場合は、最終製品と同じ表面性状に加工する。

3.2.3 滅菌は最終製品と同じ方法を用いる。試験試料を調製する場合は、無菌的に加

工するか、滅菌前の製品を加工した後最終製品と同じ滅菌工程を経たものを用いることが望ましい。再滅菌する場合は、試料が変質などの影響を受けない方法を採用する。

- 3.2.4 陰性対照材料としては、高密度ポリエチレンや純チタン、既承認品として使用実績のある材料などを用いる。陽性対照材料は必須ではないが、試験法や動物の感度を比較したい場合などにおいて設定してもよい(7.3項参照)。滅菌は、必ずしも試験試料と同じ方法にする必要はなく、材料が変質などの影響を受けない方法を採用する。
- 3.2.5 吸収・分解性材料の場合は、消失した後に埋植部位を特定することが困難になる恐れがあるため、①埋植時に写真を撮影するなどして埋植位置を特定しておく、その位置に試験試料がない場合は吸収されたものとみなす、②陰性対照材料や局所への影響がないことが知られている物質をマーカーとして同時に埋植してその付近を観察する、③X線撮影などを経時的に行って埋植部位を特定するなど、消失した後の取り扱いを明確にしておく、あるいは消失した場合でも観察位置が特定できるよう工夫する。
- 3.2.6 骨セメントや歯科材料など、生体内で硬化する医療機器を評価する場合は、臨床適用を模擬して非硬化物を局所に埋植する。埋植が技術的に困難な材料に対しては、すでに硬化したものを整形して埋植する場合がある。後者の場合は、硬化中の生体反応について、別の生物学的安全性試験を実施することにより評価することが望ましい。
- 3.2.7 非固形(例：粉末)を評価する場合は、①ペレット化する、②粉末状態で臨床適用されるものであれば、臨床適用される形状で一定の面積、容積を埋植する、③シリコンやポリプロピレン製などの刺激性の低いことが知られている開口チューブに充填して埋植するなどの設計とする。③の充填時にはコンタミネーションがないよう注意し、対照材料のひとつとしてチューブのみを埋植する。
- 3.2.8 組織工学により製造される医療機器を試験する場合、生体由来材料は埋植する動物種に対して免疫反応を引き起こす可能性があることに留意する。
- 3.2.9 複数の部材からなる医療機器を埋植する場合、それぞれの部材による局所影響が明確に解析できる設計とする。最終製品そのものを埋植した時、それぞれの部材の組織反応が組織標本において特定できないと想定される場合は部材を単離して埋植する、表裏などが異なる材料ではそれが明確に区別できる方法で埋植するなどである。ただし、部材間の相互作用が予測される場合や、血管内埋植などにおいて臨床模擬試験として埋植試験を実施する場合は、最終製品そのものを埋植することにより評価する。
- 3.2.10 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、動物への埋植試料の総量とヒトの埋植量を比較して一定の安全係数を担保できる設計とすべきである。ただし、人工関節材料など、ヒトへの埋植量が大きいものについては、一定の安全係数を担保する設計は困難である。このような場合は、できる限りヒトの適用量を下回らない設計として、合わせて抽出液などによる全身毒性試験を検討する。また、生体内分解材料の場合は、*in vitro*における分解動態が生体内と同程度であることが判明していない限り、抽出液を用いるべきではなく、埋植によって全身毒性を検索すべきである。

3.3 埋植部位

3.3.1 埋植部位は臨床適用部位に近い組織とする。本試験法では、例として筋肉内、皮下及び骨内埋植試験法について記載しているが、これ以外の組織・器官に臨床適用される場合は、その組織・器官の起原、構成組織、細胞種などを総合的に勘案して、例として挙げた組織のいずれか又は複数を選択する。また、新たな組織への標準的な試験法が ISO 10993-6 などで明らかとなった場合は、それを示した上で、採用することができる。文献などで明らかとなった方法を採用する場合は、その妥当性を示した上で、十分なサンプル数（1 埋植期間について 10 箇所以上）の観察を行う設計とする。

3.3.2 局所への影響を確認する場合、動物の個体差の指標とするため、原則として対照材料と試験試料は同じ個体に埋植する。

3.3.3 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、予め試験計画立案の際に全身毒性を評価できるよう、血液学的、血液生化学的、病理組織学的検査などを計画する。対照材料と試験試料を同一の動物に埋植すると全身毒性の評価が困難となることから、試験試料埋植群と対照群は別々に設定する。また、複数の材料を同一動物に埋植しても、全身毒性の評価は困難となる。ただし、複数の部材から構成される医療機器の埋植試験を設計する場合は、複数の部材を同一動物に埋植することで、臨床適用を模擬することが可能となる。

3.4 埋植期間

3.4.1 埋植期間は、臨床適用期間を超える必要はないが、ヒトにおける埋植反応を予測し得る期間とする。吸収・分解性の材料でない場合、埋植初期の反応、埋植中期の埋植試料と生体界面の組織反応、そして安定化（すれば）した場合の反応を評価することが望ましい。複数の期間を観察して安定化することが明らかであった場合は、それ以上の期間の埋植群を省略することを検討する。ただし、試験計画を立案する際には、短中期の試験を予め行った上で長期埋植を計画するなど、動物愛護の観点から動物数を減らすことを検討する。

3.4.2 短期の埋植を 1 週から 4 週とし、長期埋植は 12 週を超える期間とする。また、その間を中期埋植とする。生体適合性の高い材料の場合、短期において、埋植後 2 週間程度は埋植手術の影響が残るが、対照材料と比較することにより、試料に起因する炎症反応を区別して観察することができる。また、器質化や新生骨の形成は埋植後 2 週間程度でも開始されており、生体適合性に関する情報が多く得られる。埋植後 4 週には、すでに安定化する場合が多い。中期では、周囲組織の多くは埋植前の状態に近づいており、界面や周囲はおおむね安定化し、その後の長期における反応を推測するための時期である。長期では、周囲組織は正常組織と同様となり、界面は非常に薄い被膜や新生骨で覆われ安定化する。

3.4.3 吸収・分解性材料の場合は、その過程で様々な物質が細粒化又は溶出するなどして、埋植局所は初期とは異なる環境となるため、分解過程を評価し得る埋植期間を設定する。ただし、数年にわたって分解するなど動物試験では分解時間が長期間にわたるため評価できない材料の場合、材料の分解過程がその期間中同様に推移し、局所への影響が最小限であれば、代表的な期間を評価すること

で代用できる。また、加速分解した材料を埋植することによって評価してもよいが、その分解過程が生体内分解と同等であることを予め確認しておく。

3.5 試験動物

3.5.1 短中期の埋植試験には、げっ歯類、ウサギなどが一般的に用いられる。長期埋植では、げっ歯類、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどが用いられる。ラットでは異物発がんが知られているため¹⁾、26週を超える皮下埋植試験に用いる場合は注意を要する。表1に長期埋植の際の動物種の選択を示した。

表1 長期埋植における動物種の選択

種	埋植期間 (週)				
	12	26	52	78	(104)
ラット	○	○	○		
モルモット	○	○	○		
ウサギ	○	○	○	○	○
イヌ	○	○	○	○	○
ヒツジ	○	○	○	○	○
ヤギ	○	○	○	○	○
ブタ	○	○	○	○	○

注: ISO 10993-6:2007 Table 1 を引用した。医療機器の臨床使用に応じた試験期間とする。すべての期間を実施する必要はない。ラットの場合、26週を超える皮下埋植は異物発がんの可能性を考慮する。また、104週は特定の場合のみに設計する。

3.5.2 動物数は複数を用いることとするが、ISO 10993-6 に記載された動物数以上とする (4.2、5.2、6.2 項参照)。

3.5.3 動物の性は、臨床適用の際にいずれかの性に特化される場合その性について設計し、性差が予測される場合は両性とし、それ以外はいずれかの性でよい。

3.5.4 各埋植期間終了後、動物を適切な方法で安楽死させる。

3.6 埋植方法

3.6.1 埋植手術は原則として全身麻酔下で行う。全身麻酔には、一般的医薬品又は動物用医薬品を用い、動物に苦痛をもたらす薬品を用いてはならない。

3.6.2 術野は刈毛後、適切な消毒薬を用いて清拭する。熟練した術者により滅菌した清浄な器具を用いて切開し、出血は最小限になるよう埋植を行う。埋植後は、刺激性の低い縫合糸やステープラーで切開創を閉じ、消毒する。また、動物が縫合部位を舐めないよう、ウサギやイヌの場合は埋植初期には首にカラーを装着するとよい。抗菌剤や抗生物質などの医薬品の投与は、知見や予備検討などにより当該医薬品が埋植部位の組織反応に影響しないことを予め確認する必要があり、確認されていない場合は原則として使用しない。

3.6.3 適当な対照材料がない場合や埋植術により手術の影響が残ることが予想される場合は、偽手術群を設定することを考慮する。偽手術群で著しい反応が見られた場合は、試験試料の反応がマスクされる可能性があるため、試験法に問題

があると判断し、埋植法などを再検討する。

- 3.6.4 埋植期間中は、動物の一般状態を定期的に観察し、体重測定を行う。埋植初期は手術の影響により体重が減少することがあるため、摂餌量や摂水量をモニターしてもよい。
- 3.6.5 埋植期間中に動物の状態が悪化し、回復の見込みがない場合は、動物を安楽死させる。その場合、埋植局所の観察は通常どおり行い、すべてのデータを記録する。この場合、状態の変化が試料の埋植に起因するか否かを十分検討する。評価の対象としない例としては、骨内埋植した直後に離断骨折し、治療を行わない限り苦痛を与え続けるなどで安楽死させ、観察の結果埋植部位以外の骨折が原因であった場合など、原因が試料の埋植による影響ではないことが明らかな場合がある。
- 3.6.6 埋植部位の皮膚が哆開するなど、再手術の必要がある場合は、直ちに麻酔下で縫合するなどの処置を行う。化膿が見られる場合はできるだけ除去し、多量の生理食塩液や緩衝液を用いて洗浄する。この場合でも抗菌剤や抗生物質の使用はできるだけ控える。これらの処置を行った場合は、すべて記録する。
- 3.6.7 埋植期間終了後は、動物を全身麻酔下で安楽死させる。原則として放血処置を行う。

3.7 観察

3.7.1 肉眼的観察

- 3.7.1.1 埋植試験試料周囲組織及び試料を肉眼又は拡大鏡を用いて観察し、少なくとも以下の項目について記録する。

- 1) 試験試料周囲組織における出血、被包形成、新生骨形成、変色の有無とその程度（広がり、厚さなど）
- 2) 試験試料の変色及び変質（ひび割れ、硬さなど）の有無とその程度
- 3) 埋植周囲リンパ節²⁾の腫脹などの変化

- 3.7.1.2 埋植部位を破壊しないと観察できない場合は、組織観察標本用の組織を固定した後、埋植試料を引き抜く際などに埋植部位の肉眼観察を行い、組織観察用の標本と兼ねてもよい。この場合、予め試料が固定液により変色するか否かなどを確認しておく。

3.7.2 組織学的観察

- 3.7.2.1 埋植組織及び埋植周囲リンパ節（肉眼的に異常が見られた場合）を、直ちに固定液に浸す。一般的には10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、固定完了後、切り出し、パラフィン包埋、薄切を行う。ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光学顕微鏡下で観察する。必要に応じて、その他の固定法、包埋法及び染色方法を採用してもよい。
- 3.7.2.2 薄切片の作製に際し、ミクロトームによる薄切が可能な柔らかい試料の場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷せず、界面の観察が可能となる。
- 3.7.2.3 試料が硬い場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷する恐れがあるため、固定（脱灰）後に引き抜く、適当な溶媒で溶解させるなど、試料を除去し、組織損傷がないことを確認した後、薄切することを検討する。
- 3.7.2.4 試料が硬く有機溶媒などにも不溶である、多孔性であるなど、引き抜く際に

界面の周囲組織を破壊してしまうおそれがある場合は、埋植部位全体を樹脂包埋し、研磨標本作製する。一般的にギムザ染色やトルイジンブルー染色が用いられる。骨内埋植の場合、在来骨又は新生骨と試料の界面が重要な観察ポイントであり、研磨標本作製により、界面の保存が容易となる。また、ビラヌエバ染色を施した標本を蛍光顕微鏡で観察すると、石灰化骨と類骨の判別が容易になる。ただし、炎症性細胞の種類などを検索する際、標本が厚く細胞レベルの観察が困難である場合には、骨組織を脱灰後、試料を引き抜くなどしてパラフィン包埋し、薄切標本作製・観察する。

- 3.7.2.5 作製した標本は、顕微鏡下で観察する。埋植周囲に認められた炎症性細胞の種類や出現の程度及びその他に見られた異常所見を記録する。例えば、被膜を構成する成分とその状態、線維芽細胞の増生、好中球（ウサギ及びモルモットの場合、偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、マクロファージ、巨細胞などの浸潤、変性・壊死、脂肪化、新生骨形成などについて観察し、評価を加える。筋肉内埋植の場合、炎症性細胞の浸潤や炎症反応は筋線維間に延びる線維性結合組織の方向に拡大し易く、また、筋肉の収縮方向に長くなり、紡錘形となる傾向がある。観察にあたっては、そのようなことに留意して所見をとる。
- 3.7.2.6 筋肉内埋植の場合は、炎症領域の幅を測定するなど、組織形態計測を行うことにより、局所への傷害を定量的に評価することが可能である。この際、標本中における試料の薄切面を一定にするなど、組織形態計測におけるばらつきを少なくすることに留意する。吸収・分解性の試料では貪食などにより形状が維持されないため、また、多孔性や繊維状のものでは、内部に線維組織が侵入するため、炎症領域の幅を測定することはできない。また、皮下や骨内埋植では、炎症領域の幅の計測が困難又は必ずしも炎症を定量化するための指標とはならないため、他に適切なパラメータがある場合はその根拠を示した上で組織形態計測を行ってもよい。

3.8 評価

- 3.8.1 各観察項目について、程度とともにその現象を観察する（評価基準を設けて観察し、表に示す）。表2に評価のために着目すべきポイントを示した。スコアリングの後、統計学的検定を行ってもよいが、その場合は観察項目ごとに比較する。すべてのスコアの合計値を指標とする場合、それぞれの観察項目が評価において同等の重みとなるよう適切な係数を乗じるなどの処理を行うことを原則とする。
- 3.8.2 組織形態計測を行った場合は、その数値を表にして示す。
- 3.8.3 ある観察期間において、試験試料の反応が陰性対照材料と比較して有意（7.6項参照）に強い場合、陽性と判定する。
- 3.8.4 肉眼的観察では、反応の広がり全体として捉えることが可能であり、組織学的観察では肉眼的観察で見られた反応がどのような細胞が主体になって起きているのかがわかる。反応が微弱であれば、組織学的観察でのみ見られるにとどまり、局所的反応は肉眼的観察においてしか見られない可能性もある。したがって、組織学的観察を評価するに当たっても、肉眼的観察結果も考慮すべき

である。

- 3.8.5 まれに動物個体の感受性が異常に高い（陰性対照でも細胞浸潤などの反応が見られる）場合があり、評価が困難となることがある。このような場合には、その動物を評価の対象から外し、新たに動物を追加、補充する。ただし、評価の対象外とした動物のデータも試験の報告に含めるべきである。

3.9 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する情報
（例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 対照材料
（例：対照材料名、入手先、入手年月日、製造番号など）
- 5) 試験試料及び対照材料の調製方法
（例：切断、滅菌、サイズなど）
- 6) 試験動物（種、系統、性、週齢、体重、入手元。動物の収容方法及び飼育方法）
- 7) 試験方法（麻酔方法及び術後処置を含む試料の埋植方法、回収方法、病理組織標本の作製方法）
- 8) 試験結果
試料及び試料周囲組織の肉眼的観察結果
試料周囲組織の組織学的観察結果（組織形態計測結果を含む）
肉眼及び組織の代表例の写真
- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

表2 埋植局所の組織学的観察ポイント

埋植組織	観察ポイント
筋肉内	線維性被膜の状態（被膜、被包の成熟度合いと線維芽細胞の増生程度）及びその厚み、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球、肥満細胞など）、変性・壊死、出血、血管新生、脂肪化など
皮下	筋肉内と同様
骨内	組織と埋植試料の界面の状態（軟組織又は骨の介在の程度）、新生骨の形成（埋植試料周囲の骨新生の程度と石灰化骨/類骨の割合など）、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球、肥満細胞など）、変性・壊死、出血など

注：吸収・分解性の試料の場合は、残存した試料の形状や残存の程度などについて評価する。

4. 筋肉内埋植試験法

4.1 試験試料の大きさ

4.1.1 埋植する動物によって適切な大きさを設定する。なお、ウサギの場合は、幅(又は直径) 1~3 mm、長さ約 10 mm とし、断端の角をできるだけ滑らかにする。筋肉を切開して埋植するよりも、15 ゲージ程度の穿刺針で埋植する方が、動物の全身状態と周囲組織へのダメージが少ない。

4.1.2 製品の材質や形状、サイズなどにより、試験試料が整形不可能な場合、あるいは最終製品が試験試料の規定サイズよりも細かい若しくは薄い場合で、それらを規定サイズに整形した場合に、臨床適用の場合とはかけ離れた組織反応が生じると推定される場合は、その旨を示した上で規定サイズとは異なるサイズの試験試料を埋植しても差し支えない。その場合は、できる限り陰性対照材料も同じ形状に整形すること。

4.2 試験動物と埋植部位

4.2.1 ウサギの脊柱旁筋肉内への埋植が推奨される。ウサギであれば左右の脊柱旁筋肉内へ各 4 箇所程度の埋植が可能である。

4.2.2 1 埋植期間につき、肉眼的観察用と組織学的観察用に少なくともそれぞれ 2 匹以上の動物を用い、試験試料及び対照材料ともに、肉眼的観察用と組織学的観察用それぞれ 10 箇所以上の埋植部位を観察する。

4.2.3 既承認品などの対照材料を用いる場合で、ある程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため陰性対照材料を埋植する。

4.2.4 陰性対照材料はすべての埋植期間において埋植、観察すべきであるが、やむを得ず 1 埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

4.3 埋植方法

4.3.1 埋植時は全身麻酔下で、皮膚を切開し、埋植は 15 ゲージ程度の穿刺針か、トロッカーを用いて埋植する。

4.3.2 穿刺針などに試料が装填できない場合は、筋肉を外科的に切開して埋植する。この場合は、陰性対照材料などの対照材料も同様の方法で埋植する。

4.3.3 筋線維方向に並行するよう各試料を埋植する。

4.3.4 埋植箇所は 25 mm 程度の間隔を開ける。

4.3.5 必要に応じて、切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

4.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

4.5 評価方法

3.8 項参照。

4.6 試験報告書

3.9 項参照。

5. 皮下埋植試験法

5.1 試験試料の大きさ

5.1.1 シート状の場合は、厚み 0.3～1.0 mm、直径約 10～12 mm の円板状とする。

5.1.2 直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm として、断端を丸く加工したものでもよい。

5.1.3 非固形試料の場合は、直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm のチューブに充填する。チューブに充填した量を記録すること。

5.1.4 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

5.2 試験動物と埋植部位

5.2.1 成熟したマウス、ラット、モルモット、ウサギのうち 1 種を用いる。

5.2.2 埋植期間につき、少なくとも 3 匹の動物を用いて、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計 10 箇所以上の埋植部位を観察する。

5.2.3 既承認品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。

5.2.4 陰性対照材料はすべての埋植期間において埋植、観察すべきであるが、やむを得ず 1 埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

5.3 埋植方法

5.3.1 背部皮下に埋植する場合

5.3.1.1 全身麻酔下で、皮膚を切開して切開部位から約 1 cm 離れた部位を鈍性剥離して皮下ポケットを作製し、1 個の試料を埋植する。複数の試料を埋植する場合は、それぞれを 1 cm 程度離す。

5.3.1.2 穿刺針などを用いて埋植してもよい。

5.3.1.3 切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

5.3.2 頸部皮下に埋植する場合

5.3.2.1 マウスを用いる場合は、全身麻酔下で腰部を切開して、頸部までゾンデなどを用いて皮下を鈍性分離して皮下トンネルを作製し、1 個の試料を頸部皮下に埋植する。

5.3.2.2 ラットの場合は、全身麻酔下で両側の頸部に皮下トンネルを作製して埋植する。体幹、後肢に埋植してもよい。

5.3.2.3 切開部位を非刺激性の縫合糸で縫合するとともに、皮下トンネルを通して試料が移動しないよう、縫合しておく。

5.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

5.5 評価方法

3.8 項参照。

5.6 試験報告書

3.9 項参照。

6. 骨内埋植試験法

6.1 試験試料の大きさ

- 6.1.1 円柱状に加工したものとする。スクリュー状に加工したものの方が骨への初期密着性に優れるが、標本作製時は試料の長軸に沿って切断しないと骨と試料の界面の観察がしづらい。
- 6.1.2 ペースト状のものは、そのまま骨に充填するが、予め骨に埋植腔を作製して充填する。埋植前後の容器込み重量を差し引きするなどして埋植量を記録しておく。
- 6.1.3 ラットなどの小動物の場合は、直径約 1 mm、長さ約 5 mm の円柱状とする。
- 6.1.4 ウサギなどの中型動物の場合は、直径約 2 mm、長さ約 6 mm の円柱状とする（最大でも直径 4 mm 以下とする）。
- 6.1.5 イヌ、ヒツジ、ヤギなどの大型動物の場合は、直径約 4 mm、長さ約 12 mm の円柱状とする。
- 6.1.6 スクリュータイプのインプラントをウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタに埋植する場合は、2～4.5 mm の径とする。
- 6.1.7 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

6.2 試験動物と埋植部位

- 6.2.1 成熟したげっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギのうち 1 種を用いる。
- 6.2.2 埋植部位はできるだけ臨床適用部位に近い部位とする。大腿骨や脛骨が用いられることが多いが、いずれにおいても、骨体部の緻密骨に埋植する場合と、骨端部の海綿骨部に埋植する場合では、組織反応は異なるため、注意を要する。
- 6.2.3 埋植期間につき、少なくとも 3 匹の動物を用い、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計 10 箇所以上の埋植部位を観察する。
- 6.2.4 既承認品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。
- 6.2.5 1 個体に複数の試料を埋植してもよいが、ウサギでは骨が比較的薄く、骨折する場合があるため、左右の大腿骨と脛骨にそれぞれ 1 箇所ずつ、計 4 箇所の埋植が現実的である。

6.3 埋植方法

- 6.3.1 全身麻酔下で、埋植局所の皮膚を切開し、骨を露出した後、リーマーを用いて孔を開ける。この際、発熱による局所の組織ダメージを最小にするよう、また、切削した組織片が周囲に付着しないように生理食塩水などを注水して洗浄する。
- 6.3.2 埋植孔は、試料のサイズにできるだけ一致するものとし、ギャップをできる限り少なくする。
- 6.3.3 切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

6.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

6.5 評価方法

3.8 項参照。

6.6 試験報告書

3.9 項参照。

7. 参考情報

7.1 試験法の選択

埋植試験法としては、ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation があり、体内植込み機器の原材料を試験する際には、ISO 基準に従うことで基本的には十分である。一方、Nakamuraらの報告^{3,4)}にあるように、筋肉内埋植試験では炎症領域の幅が細胞毒性などとの相関性がよいことも事実であるため、組織学的評価のみならず、炎症領域の幅のような定量的指標を利用することが望ましい。また、骨内埋植試験では、標準仕様書⁵⁾において新生骨形成におけるいくつかの形態計測パラメータが示されており、これを利用することで生体適合性評価の一助となる。

7.2 滅菌法

高圧蒸気滅菌、乾熱滅菌、煮沸滅菌などの加熱による滅菌の場合には、熱による試験試料の変質、変形に注意する必要がある（例：純ニッケルなどは、酸化被膜の形成により毒性発現に影響があるため、乾熱滅菌などの高温環境を避ける）。エチレンオキシドガスなどを用いてガス滅菌を行う場合には、ガスの残留のないよう注意しなくてはならない。また、アルコールに長時間浸漬して消毒する場合には、試料中に含まれる化合物がアルコール中に溶出しやすく、真の毒性を検出し得ない恐れがあるため、本試験の滅菌法としては不適切である⁶⁾。また、他にγ線滅菌や電子線、紫外線滅菌などがあるが、照射によって試料の変質や劣化が起こる場合があるので注意しなくてはならない。いずれにしても、採用した滅菌法によって、試験試料とする原材料の変質や変形、及びガスや化合物の残留・吸着などによって実際に生体に適用する最終製品と異なった組織反応を起こすような変化が試験試料及び対照材料に生じてはならず、原材料の性質や臨床適用時の滅菌法などを十分に考慮した上で適切な滅菌法を選択すべきである。

7.3 陽性対照材料

陽性対照材料としては、天然ゴム製品の毒性原因物質のひとつであるジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (ZDEC) を種々の濃度で含有させたポリウレタンシート/ロッドが代表的である。これは、ZDEC の含有量と、ウサギ筋肉内埋植試験における「炎症領域の幅」及び *in vitro* 細胞毒性試験との相関性を調べた結果をもとに設定されたものである⁷⁾。陰性対照材料（検定済み高密度ポリエチレンシート/ロッド）と共に、陽性対照材料も財団法人食品薬品安全センター秦野研究所（第1部細胞毒性試験 4.6 項参照）から入手可能である。

また、骨内埋植試験の場合は、純ニッケルを用いることができる。

7.4 埋植期間による組織像の変化

陽性対照材料などを用いたウサギ筋肉内埋植における組織反応の経時的検索では、「炎症領域の幅」が最大となるピークは偽好酸球などの炎症細胞浸潤のピーク時期とほぼ一致しており、その後、肉芽形成、瘢痕化による線維性被膜の形成へと組織反応の進行に伴って徐々に幅は狭くなっていくようである。この炎症性細胞浸潤のピークの時期は、試料中に含まれる毒性物質の絶対量、溶出速度、毒性強度などによって異なるものと考えられる。したがって、幅の計測部位の名称を便宜上「炎症領域の幅」としているものの、組織傷害性が低い物質であれば、埋植から1週間後では、マクロファージや線維芽細胞を主体とする細胞浸潤から肉芽形成に至るステージ、4週間後では線維性被膜が形成されるステージにあると考えられ、主として線維性被膜の幅を測定することとなる。

7.5 埋植周囲リンパ節の変化

局所に炎症がある場合、その支配領域下のリンパ節にリンパ管を經由して異物あるいは抗原物質などが達すると、炎症が起きてリンパ節が腫脹することがある。組織学的には、充血、リンパ組織の増生、胚中心細胞の増生が認められる⁸⁾。埋植試験では埋植局所の生体組織に及ぼす影響を検索することが目的であるが、支配領域のリンパ節を確認することにより、局所に生じた炎症の種類や程度を把握する一助となる。なお、ラットなどでは安楽死操作に起因して、アーティファクトとしてリンパ洞や皮質に赤血球が見られることがある⁹⁾。

7.6 組織反応について

「有意に強い組織反応」とは、単に統計学的手法を用いた判定のみを意味するものではなく、対照材料の観察結果と比較して、試験試料の炎症性あるいは組織傷害性が強く認められた場合や質的に異なる反応が生じる場合を指すと考える。ただし、組織形態計測を実施した場合は、対照材料と試験試料との微妙な差の判定根拠について苦慮することが想定され、判定に客観性を持たせる方法として統計学的手法を用いることもひとつの対応策と思われる。なお、炎症とは、静的な反応ではなく、時間の経過とともに循環障害や浸潤細胞の種類と、反応の強さが変化する動的な反応であるため、組織像の評価に際しては炎症反応の時間的経過を十分に考慮しておく必要がある。複数の観察期間を設けているのは、このような動的な反応の変化を検索するためであり、いずれかの埋植期間の情報が重要というわけではなく、すべての情報から総合的に組織反応を評価すべきである。

8. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

構成及び内容を全面的に見直したが、要点は以下のとおり。

- 1) 一般論として埋植部位を問わず共通する事項をまとめ、その後に埋植部位ごとの方法の概略を記載した。
- 2) 埋植試験において全身毒性を検索する際の留意事項を記載した。
- 3) 埋植周囲リンパ節を肉眼観察することとし、異常が見られた場合は組織学的観察を行うこととした。
- 4) 埋植部位は基本的に臨床適用部位であることを示し、例として筋肉内埋植の他、

皮下及び骨内埋植方法を追加した。その他の組織への埋植については、ISO 10993-6などの標準的試験法が明らかとなった場合などにおいて採用できることを示した。

9. 引用文献

- 1) Maekawa, A., Ogiu, T., Onodera, H., Furuta, K., Matsuoka, C., Ohno, Y., Tanigawa, H., Salmo, G.S., Matsuyama, M., Hayashi, Y.: Malignant fibrous histiocytomas induced in rats by polymers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108, 364-365 (1984)
- 2) Tilney, N.: Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J. Anat.* 109, 369-383 (1971)
- 3) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi, M., Ohsawa, N., Uchima, T.: Correlation among chemical constituents, cytotoxicities and tissue: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials* 11, 92-94 (1990)
- 4) Ikarashi, Y., Toyoda, K., Ohsawa, N., Uchima, T., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Takahashi, M., Nakamura, A.: Comparative studies by cell culture and implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 339-356 (1992)
- 5) TS T 0011:2008 骨組織の薄切標本の作製方法
- 6) Bouet, T., Toyoda, K., Ikarashi, Y., Uchima, T., Nakamura, A., Tsuchiya, T., Takahashi, M., Eloy, R.: Evaluation of biocompatibility, based on quantitative determination of the vascular response induced by material implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 1507-1521 (1991)
- 7) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T., Tanaka, N., Sasaki, T., Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J. Appl. Biomat.* 4, 153-156 (1993)
- 8) 菊池浩吉, 吉木敬編: 新病理学各論, pp. 109-113, 南山堂 (1992)
- 9) Stefanski, S.A., Elwell, M.R., Strongberg, P.C.: Spleen, lymph nodes, and thymus. *In: Pathology of the Fischer Rat.* Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., MacKenzie, W.F. (eds.) pp. 369-393, Acad. Press, San Diego (1990)

10. 参考文献

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 74 Surgical Implants and Other Foreign Bodies. IARC, Lyon (1999)

第5部 刺激性試験

1. 適用範囲

本試験は、試験試料（医療機器又は原材料）の抽出液による組織傷害性、刺激性を評価するものである。ここでは、皮内反応試験、皮膚刺激性試験、眼刺激試験の標準的な方法を記載した。当該医療機器の臨床適用部位に応じて、刺激性試験の項目を選択する。なお、ISO 10993-10 には、口腔粘膜刺激試験や膣粘膜刺激試験などの記載もあることから、これらを利用してもよい。また、試験試料の臨床適用方法あるいは性状により、動物への投与物質は必ずしも抽出液でなく、最終製品など、より適切なリスク評価ができるものを用いるべきである。

なお、引用規格などに挙げた試験基準で既に実施された試験結果がある場合には、本試験を改めて実施する必要はない（6.5 項参照）。

2. 引用規格

- 2.1 ISO 10993-10:2010, Biological evaluation of medical devices - Part10: Tests for irritation and skin sensitization
- 2.2 ASTM Standard F 749-98: Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit
- 2.3 USP General Chapters: <88> Biological Reactivity Tests, *In vivo* - Intracutaneous Test
- 2.4 ASTM Standard F 719-81: Standard Practice for Testing Biomaterials in Rabbits for Primary Skin Irritation

3. 皮内反応試験

3.1 目的

本試験は、試験試料から抽出した抽出液（以下「試験液」とする。）を皮内投与し、組織傷害性や炎症誘発性の有無を確認するための試験である。

3.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液及び植物油を用いて抽出した試験液を、3 匹のウサギの背部に皮内投与し、投与部位を投与後 72 時間まで観察して、組織傷害性や炎症誘発性の有無を評価する。なお、3 匹の動物を用いた試験の反応が疑わしい場合は、更に 3 匹を追加して試験を実施する（6.5 項参照）。

3.3 試験液の調製

3.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局又は同等品）、植物油（綿実油又はゴマ油、日局又は同等品）を用いる。

3.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録 1 の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

原則として、付録 2 の規定に従うものとする。抽出液の保存温度条件は付録

3の規定に従うものとする。

3.3.4 操作方法

抽出後、直ちに室温（20℃以下にならないよう）に冷やし、激しく振とうする。その後直ちに容器の内容液を無菌的に別の乾燥した滅菌容器に集める。

3.3.5 対照液の調製

抽出溶媒単独（試験試料を加えない）で、試験液調製と同条件で操作を行ったものを対照液とする。

3.4 試験法

3.4.1 試験動物

栄養状態のよい健康なウサギ3匹を使用する。体重、週齢、性は特に規定しないが、試験の評価が可能な皮膚を有する動物を用いる（6.3項参照）。使用前1週間以上、馴化する。

投与前までに背部の毛を刈り（又は剃り）、投与及び皮膚観察が容易な状態にする（6.4項参照）。

3.4.2 投与液量

試験液及び対照液の投与液量は、原則として1ヶ所当たり0.2 mLとする。

3.4.3 投与経路及び投与期間

背部皮内投与を1回行う。

3.4.4 投与部位

脊柱をはさみ、両側20ヶ所（片側10ヶ所）に2種類の溶媒で得られた各試験液及び各対照液を各5ヶ所ずつ投与する（例：図1参照）。

3.4.5 観察

全例について投与直前に皮膚の状態を観察する。全例について投与後約24、48、72時間に、投与部位の皮内反応状態を、表1に従って観察・記録する。体重は、投与日及び観察終了日に測定し、記録する。

3.4.6 評価

観察結果より組織傷害性と炎症誘発性を評価する（6.5項参照）。

図1 投与部位（例）

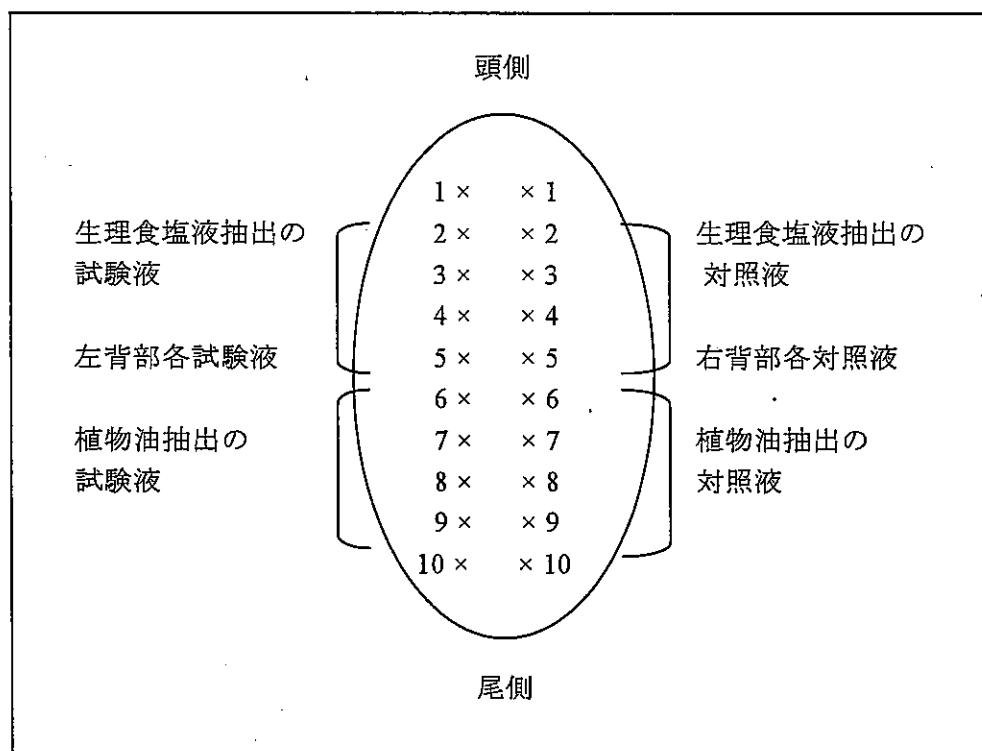


表1 皮膚（皮内）反応の評点付けシステム(ISO 10993-10, 6 Irritation tests)

紅斑及び痂皮の形成

紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑（かろうじて認識できる）	1
はっきりした紅斑	2
中程度ないし高度紅斑	3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成（深部損傷まで）	4
	[最高点 4 点]

浮腫の形成

浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫（かろうじて認識できる）	1
軽度な浮腫（はっきりとした膨隆による明確な縁が識別できる）	2
中程度浮腫（約 1 mm の膨隆）	3
高度浮腫（1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり）	4
	[最高点 4 点]

[紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点 8 点]

投与部位に見られた他の有害作用も記録及び報告すること。

3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 対照液を特定する要素
(例：対照液名、入手先、製造番号など)
- 5) 試験液の調製方法
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別
- 7) 試験方法
- 8) 試験結果
表：投与日及び観察終了日の個別体重
個々の動物の皮内反応結果（評点のスコア）
写真：投与部位の状態（代表例でよい。）
- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

4. 皮膚刺激性試験

4.1 目的

本試験は試験試料（最終製品又は原材料）から抽出した抽出液（以下「試験液」とする）中に、皮膚刺激性を有する物質が存在するかどうかを確認する試験である。

4.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液及び植物油を用いて抽出した抽出液を試験液とし、1 溶媒当たりウサギ 3 匹を用い、背部の擦過傷及び無傷皮膚区画に塗布し、刺激性を観察する。なお、3 匹の動物を用いた試験の反応が疑わしい場合は、更に 3 匹を追加して試験を実施する（6.5 項参照）。

4.3 試験液の調製

3.3 項に従う。

4.4 試験法

4.4.1 試験動物

健康なウサギ計 6 匹（1 群 3 匹、2 溶媒）を使用する。体重、週齢、性は特に規定しないが、試験の評価が可能な皮膚を有する動物を用いる（6.3 項参照）。使用前 1 週間以上、馴化する。

投与前までに背部の毛を刈り（又は剃り）、投与及び皮膚観察が容易な状態にする（6.4 項参照）。

4.4.2 投与液量

試験液及び対照液の投与液量は、原則として 1 投与区画当たり 0.5 mL とする。

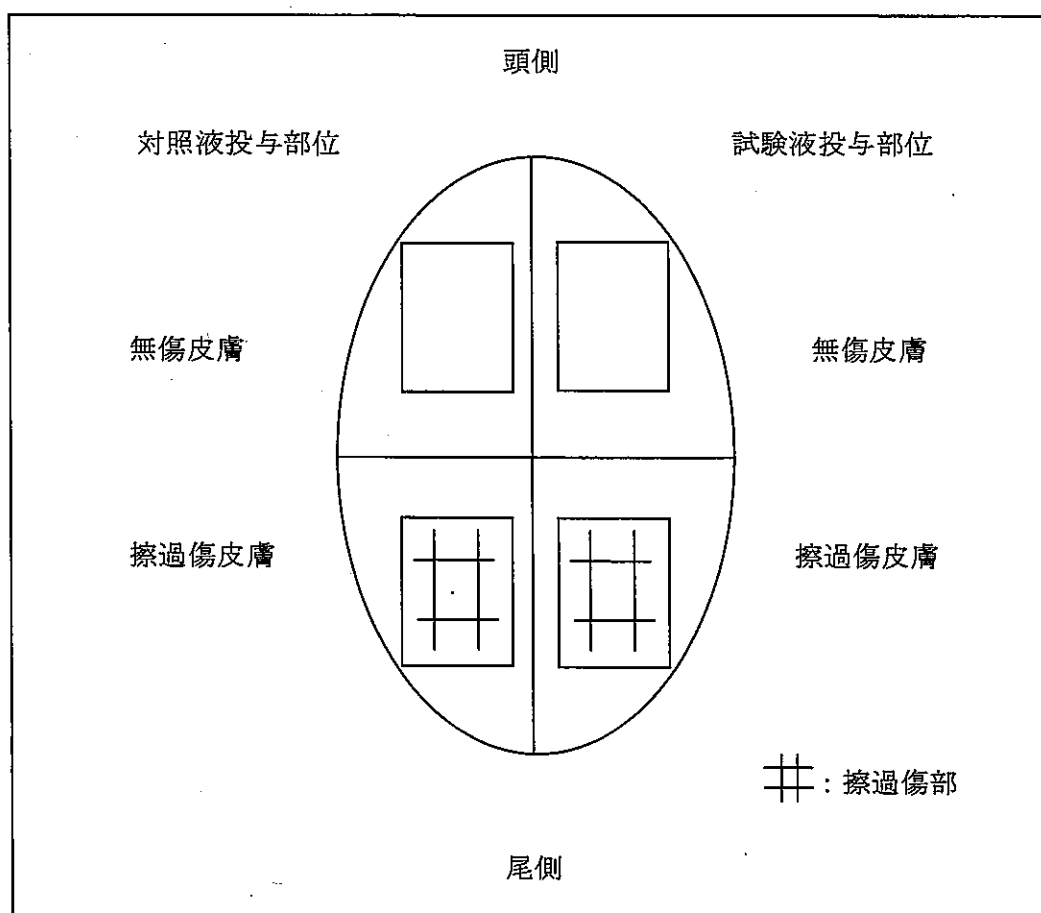
4.4.3 投与経路及び投与期間

塗布による投与を1回行う。

4.4.4 投与部位

背部を上下、左右計4区画に分ける（例：図2参照）。投与前に、2区画の皮膚角質層（真皮にまで傷を付けないよう）に、滅菌したメス刃などを表皮に対し直角にあて井桁状に4本の線の擦過傷（約2.5 cm×2.5 cm）を作る。上部2箇所は無傷皮膚とする。投与液量は1区画につき0.5 mLとし、これを4枚1組の滅菌ガーゼ（2.5 cm角）にしみ込ませてテープで貼りつける。その上をポリエチレンフィルムなどで覆い、固定する。

図2 皮膚刺激性試験（例）ウサギ背部図



4.4.5 観察

投与直前に皮膚の状態を観察する。投与後24時間目にガーゼを除去し、丁寧に塗布面を拭き取る。ガーゼ除去1時間後、24時間後及び48時間後に皮膚の状態を観察し（6.6項参照）、表1に従って観察・記録する。ガーゼ除去48時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて14日を超えない範囲で観察期間を延長する。

体重は、投与日及び観察終了日に測定し、記録する。

4.4.6 評価

観察結果より組織傷害性と刺激性を評価する（6.5 項参照）。

擦過傷皮膚の部位は感染を受けやすいことから、感染により一次刺激性と同様の発赤や浮腫を起こす可能性がある。感染が疑われる場合には、新たな動物で試験を実施すると共に、試験試料の無菌試験を実施する。

4.5 試験報告書

3.5 項参照。ただし、8) 試験結果については、ここでは、表として投与日及び観察終了日の個別体重及び個々の動物の皮膚反応結果（評点スコア）を、写真として投与部位の皮膚状態（代表例）を示す。

5. 眼刺激試験

5.1 目的

本試験は、ウサギの眼に試験試料（最終製品又は原材料）の抽出液を点眼することによって眼組織に及ぼす影響を評価するためのものである。

5.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液及び植物油を用いて抽出した試験液を、それぞれ3匹のウサギに点眼し、前眼部を点眼後72時間まで観察して、眼組織への影響を評価する（6.2 項参照）。点眼72時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて21日を超えない範囲で観察期間を延長する（6.8, 6.9 項参照）。

5.3 試験液の調製

3.3 項に従う。

5.4 試験法

5.4.1 試験動物

- 1) 健康で、過去に眼を用いた試験に使用していないウサギ計6匹（1群3匹、2溶媒）を使用する。体重、週齢、性は特に規定しないが、試験の評価が可能な眼を有する動物を用いる。
- 2) 使用前1週間以上、馴化する。角膜をスリットランプで観察する場合、瞬膜を切除した方が容易に観察できるため、瞬膜の切除は適宜とする。切除する場合は、試験に使用する2週間以上前に行う。
- 3) 投与前にウサギの前眼部を観察し、結膜充血、角膜混濁などの異常がないことを確認する。更に、角膜については、フルオレセインナトリウム溶液又は試験紙を用いて観察し、染色のないことを確認する（6.7 項参照）。

5.4.2 試験方法

- 1) 投与前に5.4.1に従い6匹のウサギを選択し体重を測定し、記録する。
- 2) ウサギの片目の下眼瞼を引っ張り、袋状にし、その中に生理食塩液抽出の試験液を0.1 mL点眼し、眼を閉じて約30秒間そのままの状態にする。

- 3) 他眼には、生理食塩液抽出の対照液を同様に点眼する。
- 4) 2) から 3) の操作を 3 匹のウサギに実施する。
- 5) 同様に、植物油抽出の試験液を残し 3 匹のウサギの片目に点眼し、他眼には、植物油抽出の対照液を点眼する。
- 6) 点眼 1、24、48 及び 72 時間後に、スリットランプを用いて両眼を観察し、ISO 10993-10 の眼病変の評点付けシステム（付表 1）又は McDonald-Shadduck の評価基準（付表 2）に従い評価し、記録する。点眼 72 時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて 21 日を超えない範囲で観察期間を延長する（6.8、6.9 項参照）。
- 7) ISO 10993-10 の眼病変の評点付けシステムで刺激性陽性反応がみられた場合は、前眼部の写真撮影を行う。
- 8) 試験終了後、ウサギの体重を測定し、記録する。

5.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 対照液を用いた場合は、それを特定する要素
(例：対照液名、入手先、製造番号など)
- 5) 試験液の調製方法
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別
- 7) 試験方法
- 8) 試験結果

表：投与日及び観察終了日の個別体重

個々の動物の眼反応結果（評点のスコア）

個々の動物の結果は、表 2 の様な表形式にした全データを添付することが望ましい。

写真：前眼部の状態（刺激性陽性反応がみられた場合）

- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

6. 参考情報

6.1 コンタクトレンズの眼装用試験

コンタクトレンズの生物学的安全性試験として、ウサギを用いる眼装用試験が要求される。眼装用試験は、通常“ISO 9394:1998, Ophthalmic optics - Contact lenses and contact lens care products - Determination of biocompatibility by ocular study using rabbit eyes”に従って実施され、眼組織への影響を、肉眼的及び病理組織学的観察結果をもとに評価されることから、対象試験試料がコンタクトレンズで、眼装用試験が実施されている場合には、抽出液による眼刺激試験を実施する必要はない。

6.2 試験液の調製

試験液の pH が強酸性又は強アルカリ性 ($\text{pH} \leq 2$ 又は ≥ 11.5) を示す場合は試験を実施しない。必要に応じて生理食塩液抽出液（極性液）については、調製後に pH を確認して記録する。

6.3 動物種

試験に使用するウサギとしては、日本白色種、ニュージーランド白色種などが汎用される。皮内反応試験及び皮膚刺激性試験は、いずれも背部皮膚を用いるが、皮膚の状態は試験結果の評価に大きな影響を与える。すなわち、ウサギには皮膚の生理的現象としてヘアサイクルがあり、いわゆるアイランドスキンと呼ばれる皮膚が部分的に肥厚した状態の動物は試験動物としては適さない。試験には、ヘアサイクルができるだけ休止期（スムーススキン）にある動物を選択する必要がある。

6.4 動物の毛刈り

ISO 10993-10 では、投与の 18～4 時間前に毛刈りするよう規定されているが、これは投与時に毛刈りの影響が残っていないこと、毛の伸びが観察に影響しないこと、あるいは動物福祉の観点から動物を必要以上に毛のない状態にしないことなどを目的としたものと考えられる。したがって、上記目的が達せられることが明らかな場合には、毛刈りの時期を変更することも可能である。なお、刺激性の無いことが確認出来ている場合には、脱毛クリームを使用してもよい。

6.5 判定方法

試験により得られた結果（組織傷害性や刺激性）が、許容できる範囲にあることを判断するために、引用規格に記載されている判定方法を用いることも可能である。例えば、ISO 10993-10 の皮内反応試験では、投与後の紅斑と浮腫のすべての評点から求めた試験液の平均スコアから対照液の平均スコアを引いて求め、試験液の平均スコアと対照液の平均スコアの差が 1.0 以下の時、試験の要件を満たすとしている。また、皮膚刺激性試験では、同様に平均スコアとして一次刺激指数(PII)を求め、判定することになっている。なお、皮膚反応に著しい個体差があり、3 匹の皮膚反応では刺激性の有無を評価できなかった場合には、更に 3 匹を追加して試験を実施すべきである。

6.6 試験液の接触時間

ここでは、皮膚における一次刺激性を評価する方法を示した。そのため、試験液の接触時間は標準的に 24 時間としたが、当該医療機器の接触期間により変更することも可能である（ISO 10993-10 参照）。また、当該医療機器が臨床において反復使用される場合には、皮膚刺激性試験においても、反復投与による影響を評価する必要がある。

6.7 フルオレセインナトリウム溶液の点眼

フルオレセインナトリウム（日局）溶液をウサギ眼に直接点眼し、染色をすることは避けることが望ましい。1～2%フルオレセインナトリウム溶液を涙液の分泌の少ないウサギ眼に直接点眼するとフルオレセインナトリウムの蛍光が強く、染色された組織を識別することが困難である。フルオレセインナトリウム溶液でウサギ眼を染色する場合、まず、ウサギ眼に生理食塩液を点眼しフルオレセインナトリウム溶液を眼科用の硝子棒に採り、上又は下眼瞼を引っ張り投与する。両眼瞼を指で軽く閉じ、角膜などを染色する。直接フルオレセインナトリウム溶液を点眼し染色する場合は2%フルオレセインナトリウム溶液を生理食塩液で5～10倍に希釈使用するとよい。なお、この場合、希釈したフルオレセインナトリウム溶液は防腐性を失うため、調製後長期間保存しないこと。

フルオレセインナトリウム溶液又は試験紙を用いて観察すると、ひっかき傷や毛が入ったための傷によると思われる染色がよく観察される。このような場合は試験に使用しても構わない。ただし、記録を残すこと。

6.8 眼刺激の評価基準

ISO 10993-10 の眼病変の評価システム（付表1）でアスタリスクが付された所見は、刺激性陽性反応と考えられている。

6.9 試験動物の福祉

ISO10993-10 には、非常に強い眼の損傷、出血性又は化膿性の分泌物、あるいは著しい角膜潰瘍が見られる動物は、直ちに安楽死させるように記載されている。さらに、点眼後 24 時間以内に回復の徴候が見られない対光反射消失又は角膜混濁、あるいは点眼後 48 時間以内に回復の徴候の見られない結膜炎が見られる動物も安楽死させるよう記載されている。

7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

- 1) ISO 10993-10 の刺激性の評価付けシステムを採用した。
- 2) 動物数の削減を考慮し、皮膚刺激性試験に用いる動物数を、1 溶媒当たり 6 匹から 3 匹に減じ、試験の反応が疑わしい場合は、更に 3 匹を追加して試験を実施するとした。
- 3) 全体の構成について整合をとった。

8. 参考文献

- 1) Francis, N., Marzulli, H.L. edited: Dermatotoxicology, 4th ed., Eye irritation (Robert B.Hackett, T. O. McDonald), pp. 749-815, Hemisphere Publishing (1991)
- 2) McDonald, T.O., Shadduck, J.A.: Dermatotoxicology and Pharmacology, pp. 139, John Wiley & Sons, New York (1977)

表2 眼の刺激性反応結果の記載例

		試験液を点眼した眼（右眼）			対照液を点眼した眼（左眼）		
動物番号		2481	2482	2483	2481	2482	2483
開始時体重 (kg)		2.96	3.31	2.99			
終了時体重 (kg)		3.05	3.34	3.02			
点 眼 前	角膜混濁	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0
	角膜新生血管	0	0	0	0	0	0
	角膜染色	0	0	0	0	0	0
	前房	0	0	0	0	0	0
	虹彩	0	0	0	0	0	0
	結膜充血	0	0	0	0	0	0
	結膜浮腫	0	0	0	0	0	0
	分泌物	0	0	0	0	0	0
点 眼 1 時 間 後	角膜混濁	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0
	角膜新生血管	0	0	0	0	0	0
	角膜染色	0	0	0	0	0	0
	前房	0	0	0	0	0	0
	虹彩	0	0	0	0	0	0
	結膜充血	0	0	0	0	0	0
	結膜浮腫	0	0	0	0	0	0
	分泌物	0	0	0	0	0	0
点 眼 24 時 間 後	角膜混濁	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0	0×0
	角膜新生血管	0	0	0	0	0	0
	角膜染色	0	0	0	0	0	0
	前房	0	0	0	0	0	0
	虹彩	0	0	0	0	0	0
	結膜充血	0	0	0	0	0	0
	結膜浮腫	0	0	0	0	0	0
	分泌物	0	0	0	0	0	0

付表1 ISO 10993-10の眼病変の評点付けシステム

I 角膜

不透明度:混濁の程度(最も混濁した領域を読み取る)

不透明度なし	0
虹彩を明視できる程度の散在からび慢性の不透明化	1*
容易に識別できる半透明、虹彩の細部がわずかにぼやけて見える	2*
真珠様、虹彩の細部が観察できないが、瞳孔の大きさはかろうじて識別できる	3*
不透明、虹彩が透視できない	4*
角膜損傷域	
1/4 未満、0ではない	0
1/4 以上、1/2 未満	1
1/2 以上、3/4 未満	2
3/4 以上、全域に及ぶまで	3

II 虹彩

正常	0
皺襞形成亢進、充血、腫脹、角膜周囲の充血(いずれか1つ、あるいは全て、若しくは組み合わせ)が見られるが、対光反射は認められる(緩徐反応陽性)	1*
対光反射消失、出血、広範囲の破壊(いずれか1つ、あるいは全て)が見られる	2*

III 結膜

A 発赤(角膜及び虹彩を除く眼瞼、眼球結膜)

正常	0
充血亢進	1
広範囲かつ深紅色となり、血管の識別困難	2*
全域の深紅色化	3*

B 結膜浮腫

正常	0
腫脹亢進(瞬膜を含む)	1
眼瞼の部分的反外を伴う明らかな腫脹	2*
1/2 程度の眼瞼閉鎖を伴う腫脹	3*
1/2 以上の眼瞼閉鎖を伴う腫脹	4*

C 分泌物

正常	0
常量以上の分泌物(正常な動物の内眦に見られる少量は含まない)	1
眼瞼及び眼瞼に接する被毛を湿潤	2
眼瞼及び眼の周囲を相当範囲湿潤	3

*: 刺激性陽性反応

付表2 Scale for Scoring Ocular Lesions-Slit Lamp (McDonald-Shadduck)

角膜

- 0=正常。スリットランプでは、上皮及び内皮表面は明るいグレイに、実質は大理石様のグレイに見える。
- 1=わずかに透明性を失う。実質の前 1/2 程度が損傷している。下部構造は、わずかな曇りがあるが、散乱光でははっきりと見える。
- 2=中程度に透明性を失う。曇りが内皮まで広がる。実質は均一な白色となる。下部構造は、散乱光でははっきりと見える。
- 3=実質は全体が損傷しているが、内皮表面は見える。散乱光により、下部構造はわずかに見える。
- 4=実質は全体が損傷し、内皮表面は見えない。散乱光でも、下部構造も見えない。

角膜不透明度

- 0=混濁のない正常な角膜。
- 1=1～25%の実質混濁。
- 2=26～50%の実質混濁。
- 3=51～75%の実質混濁。
- 4=76～100%の実質混濁。

角膜血管新生

- 0=血管新生なし。
- 1=血管新生は存在するが、血管は角膜周辺部以内に侵入せず、侵入部位は限られている。
- 2=血管が2mm又はそれ以上にあらゆる方向から角膜内に侵入する。

角膜染色

- 0=フルオレセイン染色なし。
- 1=わずかな範囲に限られたかすかなフルオレセイン染色。散乱光による下部構造の観察は容易である。
- 2=わずかな範囲に限られた中程度のフルオレセイン染色。散乱光による下部構造の観察では、細部がはっきりと判らない。
- 3=著しいフルオレセイン染色。染色が角膜の広い範囲に及ぶ。散乱光による下部構造の観察は、全く見えないことはないが困難である。
- 4=著しいフルオレセイン染色。散乱光による下部構造の観察は、不可能。

前房

- 0=前房内に光の乱反射を認めない。
- 1=チンダル現象をわずかに認める。前房内の光は、水晶体を通過した光より弱い。
- 2=チンダル現象を明らかに認める。前房内の光は、水晶体を通過した光と同程度である。
- 3=チンダル現象を明らかに認める。前房内の光は、水晶体を通過した光より強い。

虹彩

- 0=充血のない正常な虹彩。時々、12時から1時及び6時から7時方向の瞳孔縁に直径1～3 mmのかすかに充血した部位が存在する。
- 1=2次血管がわずかに充血しているが、3次血管は充血していない。
- 2=2次血管が中程度に充血し、3次血管がわずかに充血している。
- 3=虹彩実質のわずかな腫脹を伴う、2次及び3次血管の中程度の充血。
- 4=虹彩実質の著しい腫脹を伴う、2次及び3次血管の著しい充血。

結膜充血

- 0=正常。
- 1=4～7時及び11～1時の部分に限られたリンバス周辺部の充血を伴う眼瞼結膜の紅赤色。
- 2=75%程度のリンバス周辺部の充血を伴う眼瞼結膜の赤色。
- 3=明白なリンバス周辺部の充血と、結膜の点状出血を伴った暗赤色の眼瞼、眼球結膜充血。

結膜浮腫

- 0=正常。
- 1=眼瞼の外反のない腫脹。
- 2=上眼瞼の部分的な外反を伴った腫脹。
- 3=上下眼瞼の同程度の部分的な外反を伴った腫脹。
- 4=下眼瞼の部分的な外反と上眼瞼の著しい外反を伴った腫脹。

分泌物

- 0=正常。
- 1=常量より多く眼内に存在するが、眼瞼や被毛には存在しない。
- 2=豊富で容易に見られ、眼瞼や眼瞼周囲の被毛に付着する。
- 3=眼瞼周囲の被毛を十分に湿らし、眼瞼より流出する。

第6部 全身毒性試験

1. 適用範囲

本ガイダンスは、医療機器又は原材料の全身毒性を評価するためのものである。

2. 引用規格

ISO 10993-11:2006, Biological evaluation of medical devices – Part 11: Tests for systemic toxicity

3. 用語及び定義

引用規格に記載されている以下の定義を用いる。

3.1 急性全身毒性

試験検体の単回、又は継続的暴露後 24 時間以内に生じる毒性作用。

3.2 亜急性全身毒性

試験検体の反復又は継続的暴露後 24 時間以降、28 日間までの時期に生じる毒性作用。

注：この毒性の評価のために行われる反復投与による全身毒性試験の投与期間は、最も一般的な国際的ガイドラインでは 14 日～28 日間とされている。一方、静脈内投与による亜急性全身毒性試験の投与期間は、一般的に 24 時間より長く 14 日間より短いとされている。

3.3 亜慢性全身毒性

寿命の一部の期間、試験検体を反復又は継続的に暴露することにより生じる毒性作用。

注：亜慢性全身毒性試験は、通常、げっ歯類では 90 日間、他の動物種では寿命の 10%を超えない期間で行われる。一方、静脈内投与による亜慢性全身毒性試験の投与期間は、14 日間から 28 日間とされている。

3.4 慢性全身毒性

寿命の過半の期間（通常 10%を超える期間）にわたり、試験検体を反復又は継続的に暴露することにより生じる毒性作用。

注：慢性全身毒性試験は、通常、6～12 ヶ月間の期間で実施される。

4. 急性全身毒性試験

4.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）から抽出した抽出液（以下「試験液」とする。）中に、急性全身毒性を有する物質が存在しないことを確認するための試験である。

4.2 試験の要約

本ガイダンスに示す試験法は、基本的に引用規格に基づくものである。試験試料から生理食塩液又は植物油を用いて抽出した試験液を、1群5匹のマウスに対し、それぞれ静脈内投与（生理食塩液抽出液）又は腹腔内投与（植物油抽出液）する。投与後72時間まで観察し（6.1項参照）、対照液投与群と比較して、急性全身毒性の有無を評価する。本試験法は、米国薬局方¹⁾などで医薬品容器の毒性試験として古くから用いられてきた、いわゆる pharmacopoeia-type の試験である。

4.3 試験液の調製

4.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局又は同等品）、植物油（綿実油、ゴマ油など、日局又は同等品）を用いる。

4.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

4.3.3 抽出条件

原則として、付録2の規定に従うものとする。

4.3.4 操作方法

抽出後、直ちに室温（20℃以下にならないよう）まで冷却し、振とうする。次いで容器の内容液を無菌的に別の乾燥した滅菌容器に回収し、20～30℃で保存し、24時間以内に試験に用いる。

4.3.5 対照液の調製

対照液は、抽出溶媒単独（試験試料を加えない）で、試験液調製と同一の条件で加熱処理し調製する。

4.4 試験法

4.4.1 試験動物

体重17～25gの健康なマウスで、1週間程度馴化後、体重の減少をみなかったものを試験動物として使用する。雌雄どちらを用いてもよいが、試験液投与群と対照液投与群を構成する動物の性は同一とする。想定される医療機器が、いずれかの性に用いられるものである場合、試験動物の性別はその性を選択することが望ましい。雌動物を使用する場合は妊娠していない未経産の動物を用いる。

4.4.2 投与液量

試験液の投与液量は、原則として、体重1kg当たり50mLとする（6.2項参照）。

4.4.3 投与経路

生理食塩液抽出液及び生理食塩液対照液は静脈内投与とし、植物油抽出液及び植物油対照液は腹腔内投与とする。

4.4.4 観察及び測定項目

一般状態観察：全例について投与直後、4時間後、その後は投与から24時間、48時間、72時間経過後に行う。一般状態は、引用規格のAnnex Cの指標などを参考に観察し記録する。死亡例が認められた場合、ただちに剖検する。毒性

兆候が発現した場合に、この消長を確かめるため観察期間を延長したり、観察頻度を増やすことが推奨される。

体重測定：全例について投与前、投与から24時間、同48時間、同72時間経過後に測定する（6.3項参照）。

病理解剖：観察期間終了後、すべての個体について、投与部位、心臓、肺、消化管、肝臓、脾臓、腎臓、及び生殖器を含む主要器官を肉眼的に観察する。

血液検査・尿検査・病理組織学的検査：血液学並びに血液生化学検査、病理組織学的検査は器官・組織における毒性作用の内容、強さを精査するために実施される（6.5項参照）。病理解剖によって異常所見が認められた場合には、これらの検査の実施を考慮するとよい。また尿検査は、影響が予測される場合に実施を考慮するとよい（表2参照）。

4.4.5 判定方法

観察期間を通して、試験液投与群の全ての動物に、対照液投与群の動物と比較して強い生物学的反応が認められない場合に急性全身毒性はないと判定する。

試験液投与群の動物が2匹以上死亡した場合、あるいは2匹以上の動物で痙攣や衰弱など著しい毒性症状を示した場合や、10%を超える体重減少が3匹以上に認められた場合は急性全身毒性ありと判定する。

試験液投与群のいずれかの動物が、対照液投与群の動物と比較してわずかな生物学的反応を示した場合、あるいは1匹の動物だけが強い生物学的反応又は死亡が認められた場合には、試験液投与群及び対照液投与群の例数を各々10匹にして再試験を実施する。

再試験を実施した結果、試験液投与群の動物が対照液投与群と比較し、全観察期間を通して、科学的に有意な生物学的反応を示さなかった場合、急性全身毒性はないと判定する。

4.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（医療機器又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 用いた媒体（抽出溶媒）など、試験液の調製方法
- 5) 試験に用いた動物
- 6) 試験条件
- 7) 試験結果

表：一般状態、死亡率（必要に応じて）、体重集計、病理検査集計

写真：病理解剖学的検査（毒性学上問題と考えられる所見が認められた場合のみ）

8) 結果の評価と考察

9) 参考文献

5. 反復投与による全身毒性試験（亜急性・亜慢性・慢性全身毒性試験）

5.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）から抽出した抽出液（以下「試験液」とする。）中に、亜急性（亜慢性）全身毒性を有する物質が存在しないことを確認するための試験である。本ガイダンスに示した試験法は、引用規格に基づいたものである。全身毒性を検出するための投与方法や評価（検査・観察）項目は、引用規格の Annex A、B、C、D 及び E などを参考に、試験試料の種類や想定される医療機器の種類を勘案して、試験計画にあたり個々に検討すべきである。

5.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液を用いて抽出した試験液を、雌雄のラットの静脈内に 14 日間（亜慢性全身毒性試験の場合は 14～28 日間、慢性毒性試験の場合はそれ以上の期間）反復投与し、対照液投与群との間で毒性を比較して評価を行う。1 群の動物数は亜急性全身毒性試験の場合は雌雄各 5 匹とし、亜慢性、慢性全身毒性試験の場合は試験期間中の動物の死亡の可能性などを考慮して動物数を増やす（表 1 参照）。試験液の pH、浸透圧などの物理・化学的性状は試験の計画にあたり十分に考慮すべき要因である。試験液の刺激性、腐食性が強く、投与にあたり試験動物に著しい苦痛を与える場合などには、その試験液を用いて亜急性（亜慢性・慢性）全身毒性試験を実施してはならない。技術的に可能であり、想定される医療機器の適用経路としても適切であるならば、埋植試験と一体化させてもよい（6.4 項参照）。また医療機器として臨床で用いられる期間・形態に合わせた投与期間及び評価期間が求められるが、その必要性については、実施した全身毒性試験結果及び試験試料の構成材料・成分などに関する既知の成績などを検証し、科学的に判断すべきである。

5.3 試験液の調製

抽出溶媒には、生理食塩液（日局又は同等品）を用いることとし、その他の条件は 4.3 項に従う。

5.4 試験法

5.4.1 試験動物

原則としてラットを用いるが、全身毒性試験の動物として適切であるならば、他の動物種を用いてもよい。また、基本的に雌雄の動物について試験を行い、片性で行う場合は一用量当たりの動物数を増やす。動物数は表 1 を参考とする。投与開始時の体重の幅は平均体重の $\pm 20\%$ 以内とする。

表1 1群当たりの最小動物数（推奨）

	げっ歯類	非げっ歯類
急性全身毒性試験 ^a	5	3
亜急性全身毒性試験	10（雌雄各5） ^a	6（雌雄各3） ^a
亜慢性全身毒性試験	20（雌雄各10） ^a	8（雌雄各4） ^a
慢性全身毒性試験	40（雌雄各20） ^{b, c}	^c

^a 雌雄いずれかの性で試験を実施してもよい。その医療機器がいずれかの性に臨床使用されるものならば、試験はその性の動物で実施するのがよい。
^b 一つの用量群で構成される試験において推奨される動物数。過剰投与の用量群を追加する場合には、各用量群当たり雌雄各10匹まで減らしてもよい。
^c 試験動物数は、その試験が意義あるデータを提供するための必要最低限の数とする。動物評価期間の終了時に、試験結果の統計学的評価に十分な数の動物が残るよう設定しなければならない。

5.4.2 投与液量

ラット静脈内反復投与による試験の場合、試験液の投与液量は、原則として、試験動物の体重1 kg 当たり20 mL とする。他の動物及び他の投与経路を選択する場合は、引用規格の Annex B を参考にする。この場合、投与液量は、想定される医療機器による暴露量から十分に安全率を見込んだものである必要がある（6.6 項参照）。

5.4.3 投与経路及び投与期間

静脈内投与が汎用されるが、想定される医療機器の適用経路を勘案して決定することが望ましい。標準的投与期間は、亜急性全身毒性試験では3.2 項に、亜慢性全身毒性試験では3.3 項に、慢性全身毒性試験では3.4 項にそれぞれ従うものとする（6.7 項参照）。

5.4.4 観察及び測定項目

表2 と、引用規格の Annex C、D 及び E などをも参考に設定する。

表2 全身毒性試験の観察項目

評価項目	急性全身毒性	亜急性全身毒性	亜慢性全身毒性／慢性全身毒性 ^a
体重変化	要	要	要
一般症状観察	要	要	要
血液検査・尿検査	b	a, b	要
病理解剖学的検査	要	要	要
臓器重量	b	要	要
病理組織学的検査	b	a, b	要

^a 慢性全身毒性試験は、通常、亜慢性全身毒性試験の期間延長であり、その期間は臨床暴露期間を根拠に設定する。評価項目はできる限り共通化する。測定を行う目的のためにサテライト群を設けることが必要となっており、一群当たりの動物数が増えることもありうる。
^b 臨床症状が認められた場合や、当該試験より長期の試験が予定されていない場合には、ここに挙げた項目の評価も考慮するとよい。推奨される測定項目は、引用規格 Annex D 及び E に示されている。

5.5 試験報告書

4.5 項参照。ただし、ここでは、7) 試験結果については、表として、一般状態、死亡率（必要に応じて）、平均体重集計、血液検査集計、病理検査集計を、写真としては、病理解剖学的検査（毒性学上特に問題と考えられる所見が認められた場合のみ）及び病理組織学的検査（毒性学上特に問題と考えられる所見が認められた場合のみ）を含むこと。

6. 参考情報

6.1 急性全身毒性試験の観察期間

急性全身毒性試験の観察期間は、標準的には投与後 72 時間までとする。ただし、試験試料の特性や試験中の動物の状態に応じて、観察期間を延長してもよい。この場合、観察期間を通じて一般状態は毎日観察し、体重は 1 週間に 1 回以上、並びに投与最終日と病理解剖実施日に測定する。

6.2 急性全身毒性試験の投与液量及び投与速度

急性全身毒性試験の投与液量は、十分な実績を持つ米国薬局方¹⁾及び ASTM Standard F 750-87²⁾に採用されている量を標準とした。毒性検出の目的から判断すると、投与液量を大きくすることが望ましいが、一時的な循環血液量の増大と血液希釈による試験動物への影響や動物福祉の観点から、十分に考慮すべき試験条件の一つである³⁾。原則として、試験動物の体重 1 kg 当たり試験液、対照液とも、マウスの静脈内及び腹腔内投与にあつては 50 mL、ラットの場合は、静脈内投与 40 mL、腹腔内投与では 20 mL とする（引用規格 Annex B 参照）が、試験試料の臨床使用形態などにより、十分な安全係数を確保した投与液量を一回で投与する事が不可能な場合には、24 時間を超えない期間で分割して投与してもよい。投与経路や投与液量、投与の間隔を変更する場合、その科学的根拠を示すことが必要である。また急性全身毒性試験の投与速度は特に静脈内投与において試験成績に影響を与える因子の 1 つである。静脈内投与にあたっては、投与速度は 1 分間につき 2 mL を下回るものとする。

6.3 急性全身毒性の評価について

体重変化は全身毒性評価の重要な目安となる。米国薬局方¹⁾のマウスを用いた急性全身毒性試験の基準では、5 匹中 3 匹以上の個体に 2 g 以上の体重減少を認めた場合、不適合（全身毒性有り）と判定する規定がある。OLAW ガイダンス⁴⁾では、著しい毒性症状とは、痙攣や衰弱、継続的な背臥や側臥、明確な呼吸困難、ラ音呼吸、4～6℃以上の体温低下を挙げている。動物福祉⁵⁾の面から、これらの症状を最低限の humane endpoints と考え、該当する動物は安楽死させるなどの対応が望ましい。

6.4 埋植試験の利用

「5. 反復投与による全身毒性試験（亜急性・亜慢性・慢性全身毒性試験）」には試験液の投与による亜急性全身毒性試験の方法を示したが、適当な動物（ラ

ット以外の試験動物でもよい)に試験試料の埋植が可能な場合で、かつ、本ガイドンスに挙げた評価項目が適切に評価されていれば、埋植による試験の結果を亜急性全身毒性試験(亜慢性・慢性全身毒性試験)の結果としても用いることができる。吸収性の試験試料による亜急性、亜慢性、慢性全身毒性を埋植によって評価する場合で、極めて速やかな吸収が想定される場合には、埋植のための手術による局所の反応が終息し、試験試料による生体への影響が評価可能となった段階で速やかに剖検を行い、評価を実施する。試験試料全量が吸収されると想定される期間と、投与期間の関係については根拠を示して考察する必要がある。

6.5 急性全身毒性試験の試験動物及び代替

急性全身毒性試験で血液・血液生化学検査を行う場合には、ラットを用いるとよい。一般的に体重150~300 gの動物が汎用される。また5.項に示した反復投与による全身毒性試験の実施が計画されている場合、急性全身毒性の評価も合わせて行なうことが可能と考えられる。

6.6 反復投与における投与液量

5.項では、引用文献⁶⁾に基づき、ラットにおける投与液量を20 mL/kgとした。一方、引用規格においては静脈内投与の最大投与液量は40 mL/kgである。投与液量、投与経路を決定する場合には、当該医療機器の臨床での使用を考慮し、妥当性のある投与液量を設定し、根拠を説明することが重要である。

6.7 投与期間及び観察期間

投与期間及び観察期間は、当該医療機器の臨床での使用時間を考慮して設定し、その根拠を記載する。

6.8 試験液の調製

生理食塩液を抽出溶媒として試験液を調製する際、試験試料がポリ乳酸など加水分解性のポリマーの場合には、試験液のpHが酸性に傾くことがある。このような場合には、少量のアルカリを使用して中和する、リン酸緩衝生理食塩液を抽出溶媒に用いるなどの対応が考えられる。

7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

ISO 10993-11:2006 との調和を考慮し、主として以下の改正を行った。

- 1) 急性毒性から慢性毒性まで各種全身毒性を定義し、試験の実施期間の目安を示した。
- 2) 全身毒性試験に用いる推奨動物数を示した。
- 3) 全身毒性試験における観察・検査項目を示した。

以上により、試験試料の埋植による全身毒性試験の実施指針が明確になったものと考えられる。

8. 引用文献

- 1) USP General Chapters: <88> Biological Reactivity Tests, *In vivo* - Systemic Injection

Test

- 2) ASTM Standard F 750-87 (Reapproved 2007): Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the Mouse
- 3) Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch C.: A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 21, 15-23(2001)
- 4) Office of Laboratory Animal Welfare, National Institutes of Health: Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook 2nd Edition, pp. 103 (2002)
- 5) ISO 10993-2:2006, Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements
- 6) Derelanko, M.J., Hollinger, M.A.: CRC Handbook of Toxicology. CRC Press, New York, pp. 78 (1995)

第7部 発熱性物質試験

1. 適用範囲

本試験の目的は、医療機器又は原材料中に存在する発熱性物質（エンドトキシン及び非エンドトキシン性発熱性物質）の有無を調べることにある（5.1項参照）。ただし、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸塩などの天然由来材料から構成される医療機器の場合には、材料に由来するエンドトキシン汚染の可能性があることから、発熱性物質試験の一環としてエンドトキシン試験も実施して、エンドトキシン量を測定することが望ましい。

ISO 10993 シリーズでは、発熱性物質試験は Part 11: Systemic toxicity に含まれ、米国薬局方 (USP)、欧州薬局方 (EP) 及び日本薬局方 (JP) の発熱性物質試験を推奨している（5.2項参照）。これらの試験法は、本ガイダンスと試験感度的にほぼ同等と考えられることから、ISO 10993-11 あるいは各国薬局方に従って実施された試験結果が存在する場合には、改めて本試験を実施する必要はない。

2. 引用規格

- 2.1 第十六改正日本薬局方 一般試験法 4.04 発熱性物質試験法
- 2.2 第十六改正日本薬局方 一般試験法 4.01 エンドトキシン試験法
- 2.3 JIS K 8008:1992 4.3 エンドトキシン試験
- 2.4 ISO 10993-11:2006, Biological evaluation of medical devices – Part 11: Systemic toxicity

3. 発熱性物質試験

3.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）から抽出した抽出液（以下「試験液」とする）中に、原材料に由来するエンドトキシン及び非エンドトキシン性発熱性物質が存在しないことを確認するための試験である（5.3項参照）。

3.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液（日局）を用いて抽出した試験液を、JP の発熱性物質試験に準拠して、3匹のウサギに静脈注射し、直腸温を注射後3時間測定し、注射直前の体温との比較により、発熱性物質の存在を評価する。

3.3 試験液の調製

3.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局）を用いる。

3.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

付録2に示した温度・時間条件の中から、適切な条件を選んで抽出する（5.4項参照）。

3.3.4 試験液の取り扱い

抽出後、直ちに室温（20℃以下にならないよう）に冷やし、振とうする。次いで、容器の内容液を無菌的に別の乾燥した滅菌容器に集め、20～30℃で保存し、これを試験液として24時間以内に発熱性物質試験を実施する。なお、試験を実施する直前に、試験液を超音波処理することが望ましい（5.5項参照）。

3.4 発熱性物質試験法（5.6項参照）

3.3で調製した試験液を用いて、第十六改正日本薬局方・発熱性物質試験法に準拠して、試験を実施する（5.1、5.7項参照）。

3.4.1 試験動物（5.8項参照）

体重1.5 kg以上の健康なウサギで、1週間以上の馴化後、体重の減少をみなかった3匹を試験動物とする。ウサギは個別ケージに入れ、興奮させないよう刺激のない環境で飼育する。試験前48時間以上及び試験中は室温を20～27℃の範囲内で一定に保つ。初めて試験に用いるウサギは、試験前1～3日間以内に注射を除く全操作を含む偽試験を行い、試験に馴化させる。ウサギを再使用する場合には、48時間以上休養させる。ただし、発熱性物質陽性と判定された試料を投与されたウサギ、又は以前に試験試料と共通な抗原物質を含む試料を投与されたウサギは再使用しない。

3.4.2 装置及び器具（5.9項参照）

温度計は、測定精度 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 以内の直腸体温計又は体温測定装置を用いる。試験に用いるガラス器具、容器、注射筒、注射針などは、あらかじめ250℃で30分間以上加熱して、発熱性物質を除去する。発熱性物質が検出されないことが確認された製品を用いてもよい。

3.4.3 投与液量（5.10項参照）

原則として、試験動物体重1 kg当たり試験液10 mLを投与する。

3.4.4 試験方法（5.11項参照）

試験は、飼育室と同じ室温の部屋で、刺激のない環境で行う。飼料は対照体温測定の数時間前から試験終了まで与えない。試験動物は、通例、自然な座姿勢のとれる穏やかな首枷固定器に固定する。体温は、直腸体温計又は体温測定装置の測温部分を直腸内に60～90 mmの範囲内で一定の深さに挿入して測定する。試験液注射の40分前から注射までの間に、30分の間隔をとって2回測温し、それらの平均値を対照体温とする。これら2回の体温測定値の間に 0.2°C を超える差がある動物、又は対照体温が 39.8°C を超える動物は使用しない。

試験液は $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ に加温し、試験動物の耳静脈に緩徐に注射する。ただし1匹への注射は10分以内に完了させる。低張な試験液には、発熱性物質を含まない塩化ナトリウムを加えて等張としてもよい。注射後3時間まで、30分以内の間隔で体温を測定する。対照体温と最高体温との差を体温上昇度とする。体温が対照体温より低下した場合、体温上昇度を 0°C とする。

3.4.5 判定（5.12項参照）

3匹の試験動物を用いて試験を行い、3匹の体温上昇度の合計により判定する。ただし、試験結果により試験動物を3匹単位で追加する。初めの3匹の体温上昇度の合計が 1.3°C 以下のとき発熱性物質陰性、 2.5°C 以上のとき発熱性物

質陽性とする。体温上昇度の合計が 1.3℃と 2.5℃の間にあるとき、3 匹による試験を追加する。計 6 匹の体温上昇度の合計が 3.0℃以下のとき発熱性物質陰性、4.2℃以上のとき発熱性物質陽性とする。6 匹の体温上昇度の合計が 3.0℃と 4.2℃の間にあるとき、更に 3 匹による試験を追加する。計 9 匹の体温上昇度の合計が 5.0℃未満のとき発熱性物質陰性、5.0℃以上のとき発熱性物質陽性とする。発熱性物質陰性のとき、試験試料は発熱性物質試験に適合する。

付録 2. (1)～(3) のいずれかの条件で得た試験液について陽性と判定された場合は、室温下、適切な時間抽出して得た試験液を用いて、エンドトキシン特異的ライセート試薬を用いた試験（例、JIS K 8008 4.3）を実施し、エンドトキシンの有無を確認する。これらの結果を総合して発熱性物質の由来を考察する。エンドトキシン特異的ライセート試薬によるエンドトキシン試験については、7. 引用文献も参照されたい（5.13 項参照）。

3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（医療機器又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 試験液の調製方法
- 5) 試験方法
- 6) 試験結果
表：個体ごとの体温値
- 7) 結果の評価及び考察
- 8) 参考文献

4. エンドトキシン試験（5.13 項参照）

天然由来の医用材料（例、キチン、キトサン、植物ガム、ペクチン、アルギン酸塩、コラーゲン、ゼラチン）は、原材料に由来するエンドトキシン汚染の可能性が否定できないことから、室温下、可能なら連続振とう又は超音波処理を行って適切な時間抽出し、エンドトキシン特異的ライセート試薬によるエンドトキシン試験（第十六改正日本薬局方エンドトキシン試験又は JIS K 8008 4.3）を実施する（3.4.5、5.4、5.14 項参照）。

5. 参考情報

5.1 発熱性物質の分類と体温調節・発熱機序

発熱性物質は、最も強力な発熱性を示すエンドトキシンとその他の非エンドトキシン性発熱性物質に大別される。更に後者は、化学物質に相当する Material-mediated pyrogen とエンドトキシンを除く各種の微生物由来成分に分類される。ウサギを用いた試験では、基本的に全ての発熱性物質の存在の有無を評価できるが、エンドトキシン試験により検出できる発熱性物質はエンドトキシン

のみである。ただし、医療機器又はその材料に微生物汚染が生じる場合、通常、グラム陰性細菌以外の微生物汚染も同時に起こるため、エンドトキシン試験の結果から、その他の微生物由来成分の混入の有無を予測することは可能である。発熱性物質は、その作用機序から、(1) サイトカインネットワークを介して発熱を惹起する物質、(2) 体温調節に関与する中枢神経系に直接作用する物質、(3) 酸化的リン酸化の脱共役剤、(4) その他、作用機序の不明な物質に大別される。エンドトキシンをはじめとした各種微生物成分は (1) に該当する発熱性物質である。一方、化学物質である Material-mediated pyrogen は (2) ～(4) に相当する発熱性物質である (5.7 項参照)。

ウサギを用いた発熱性物質試験法は、かつてはエンドトキシンの検出を主目的として、ヒトとの反応相関性を見ながら開発された試験法である。恒温動物における体温調節機構の研究は、その多くがウサギを用いた本試験法の手技により行われている。体温調節は、なお未解明のところも多いが、視床下部、脊髄及び皮膚粘膜の関与するものであり、視床下部の体温調節神経回路網における中枢モノアミン (ノルアドレナリン、セロトニン) やアセチルコリンなどの神経伝達物質の作用によって行われていると考えられている。

Toll-like receptor (TLR) family は微生物感染に対する宿主の初期免疫応答を制御する生体防御蛋白質¹⁾であり、肺、胃腸管のような外部環境に接する組織やマクロファージのような免疫応答細胞に優先的に発現している。生体内におけるエンドトキシンの一次標的はマクロファージであり、血中に投与されたエンドトキシンは LBP (LPS Binding Protein) 及び CD14 分子と複合体を形成し、TLR4/MD-2 を介して発熱をはじめとした様々な生理活性を発現する。多くの TLR はホモ二量体を形成して機能を発現するが、TLR2 は TLR1 又は TLR6 とヘテロ二量体を形成することにより、グラム陽性細菌の細胞外膜に局在するリポタイコ酸や細胞膜の構成成分であるリポ蛋白質などを認識する。その他、ウイルス由来の二本鎖 RNA、細菌鞭毛及び細菌 DNA はそれぞれ TLR3、TLR5 及び TLR9 を介して生物活性を発現することが知られている。TLR7 及び TLR8 は合成抗ウイルス分子に対する親和性を持つことが知られている²⁾。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカン³⁾は TLR2 アゴニストとして作用すると考えられていたが、近年、精製したペプチドグリカンは TLR2 を介さずに活性を発現することが報告され、NOD1 や NOD2 などのその他の蛋白質の関与が示唆されている^{3, 4)}。これらの菌体成分が TLR に認識されると、セリンキナーゼ (IL-1-R-associated kinase, IRAK) の活性化や NF- κ -B 転写因子の活性化など、一連のシグナルカスケードを経て、IL-1 β 、TNF α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が誘導される。これらのサイトカインは COX-2 の発現を介して、体温調節に関与する最終的なメディエーターと考えられている PGE₂ 合成を促進することにより発熱作用を誘導する。活性発現の強度はそれぞれ異なるが、TLR family に認識されるこれらの菌体成分はいずれも発熱性物質となる。

5.2 ISO/TC 194/WG 16 の設立と新規 *in vitro* 発熱性物質試験法

発熱性物質試験について個別に協議するため、2007 年に ISO/TC 194/WG 16 が新設された。近い将来、ISO 10993-11 とは独立した形として、発熱性物質試験に

利用できる各手法の特徴などを概説したテクニカルレポートが取りまとめられる予定である。

同テクニカルレポートには、ウサギを用いた発熱性物質試験法及びエンドトキシン試験法のほか、ヒト細胞を使用した新規 *in vitro* 発熱性物質試験法 (Human-cell based pyrogen test, HCPT) に関する情報も収載されている。HCPT はヨーロッパを中心にウサギを用いた発熱性物質試験の代替として開発された試験法である。医療機器に適用するためには更なる検証実験が必要であるが、医薬品については検証実験が終了しており、既にヨーロッパにおいて利用されている^{5,6)}。

HCPT は固形試料を用いる直接法 (direct HCPT) と、従来同様、抽出液を試料として用いる間接法 (indirect HCPT) に大別される。ヒト細胞としては、ヒト血液 (全血) のほか、THP-1、MM6、MM6-CA8、U937、HL-60 などの株化細胞を利用することができる⁵⁻⁹⁾。いずれの測定系も、(1) ヒトに対する発熱性を直接予測できる、(2) エンドトキシン以外の発熱性物質 (主に微生物成分) を比較的感度よく広範囲に探知できる、(3) 直接法においては、煩雑な抽出を必要とせず、発熱性物質の回収率に留意する必要がない、(4) 動物を使用しないなどの利点があるため、HCPT はウサギを用いた発熱性物質試験法とエンドトキシン試験法に次ぐ、第3の試験法として有用であると思われる。

HCPT においては、単球やマクロファージなどの免疫応答細胞の細胞膜上に発現している TLR をはじめとした生体防御に関与する受容体を介して認識される全ての発熱性物質が探知される (5.1 項参照)。HCPT では、各種の TLR アゴニストによって活性化されたマクロファージなどの免疫応答細胞が産生する炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF α など) を発熱マーカーとして ELISA により検出・定量する。HCPT では、マクロファージなどに貪食される摩耗粉などの微粒子が生体に及ぼす影響も評価できる可能性があるが、その原理上、サイトカインネットワークを介することなく発熱を惹起する物質 (Material-mediated pyrogen) は探知されない可能性が非常に高い (5.1 項参照)。また、HCPT では、細胞に影響を及ぼす物質を含む検体や生きた細胞から成る再生医療品などの発熱性を評価できないほか、直接法に適用できる検体の大きさに制限があるなどの欠点が存在する。

ウサギを用いた発熱性物質試験法、エンドトキシン試験法及び HCPT にはそれぞれ特徴があるため、目的に応じて適切な試験法を選択することが重要である。

5.3 試験の目的

本試験は品質管理に用いることを目的としたものではなく、試験試料中に存在する発熱性物質の有無を測定することを主目的としたものである。品質マネジメントシステム (Quality Management System, QMS) において、原材料の受入れ時や製品製造過程における微生物汚染又はエンドトキシンをはじめとした菌体成分の残存をチェックすることが必要になることは当然であるが、この場合に用いる試験法は個別の製品の QMS 中や規格・基準中で定められるべきものである。

いわゆる合成ポリマーなどの場合、非常にまれではあっても添加された化学物質による発熱の可能性を否定できず、Material-mediated pyrogen の有無も調べるために、ウサギを用いた試験を実施する必要がある。

一方、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸塩などの天然由来の生体材料は、その製造過程においてエンドトキシン汚染が避けられず、また、エンドトキシンの除去も容易でないため、設計段階でエンドトキシン量を測定しておく必要がある。このような認識に基づいて、本試験のスキームが組み立てられた。

本試験は、試験試料中から抽出された物質の発熱性を検出する試験である。試験試料中に低濃度のエンドトキシンが存在していても、付録2.(1)～(3)の条件で抽出すると、発熱活性が検出できないことがある(5.4項参照)。

5.4 抽出温度

従来の試験液の調製は付録2.の「抽出温度・時間」のうち(1)～(3)のような高温かつ長時間の条件で行われていた。この場合、エンドトキシンが極めて強い耐熱性を有するリポ多糖であるという根拠に基づいて、試験液中に認められた発熱性物質は、「エンドトキシン」であるとの判定がなされてきた。しかし、引用文献¹⁰⁻¹²⁾及びその他の報告にもあるように、エンドトキシン溶液を加熱処理すると活性が失われることがあり、その現象はエンドトキシン濃度、加熱の温度並びに時間の3因子に依存することが示された。特に、低濃度のエンドトキシンであれば付録2.(1)～(3)のような条件下ではかなり活性が下がる可能性があることが明らかにされた。エンドトキシンの血清型(O-抗原性)を決定する多糖体部分は非常に強い耐熱性を示すが、エンドトキシンの生物活性を担うリポドA部分は弱酸性及びアルカリ性条件下では容易に加水分解(リポドA遊離による溶解度低下、活性低下に直接関係するグリコシド結合型リン酸又は脂肪酸残基の脱離)を受ける。また、エンドトキシンの活性は緩衝液中で加温・加熱した場合でも低下することが確認されている。そのため、付録2.(1)～(3)に規定した加温条件で抽出した場合、材料表面に存在する活性基又は材料から遊離する化学物質の影響による抽出液のpH変動のほか、エンドトキシン自体の物性(酸性)により、リポドA部分の分解が起こり得ることから、エンドトキシンの抽出は室温で行うことを基本とする。最適な抽出時間は材料の種類によって異なる。また、エンドトキシン濃度が低い場合は、材料表面への非特異的吸着やイオン結合による回収損失も無視できない。引用文献¹⁰⁻¹²⁾及びその他の報告に見られた活性低下は、おそらくこれらの要因も関与しているものと思われる。

5.5 抽出条件

抽出では、抽出溶媒とサンプル表面との接触、その時間と温度、冷却、振とう(例：超音波処理)、無菌的取扱い、保存が重要な要素である。高温で抽出する場合に、抽出時には溶解性が良くても、保存時の温度が低下すると溶解度が低下して不溶性物質が生成されてくる場合がある。抽出液は20℃以下にならないよう冷却した後、無菌的にエンドトキシンフリーの容器に移す必要がある。抽出液の採取はデカンテーション又はその他の適切な方法により行い、もし、肉眼観察により不溶性の物質が認められる場合は、遠心して、これを除去する。不溶性物質の除去の目的で、除菌用のメンブランフィルターなどを用いることは避けることが望ましい(エンドトキシンが存在する場合、エンドトキシンはメンブランに吸着される可能性があるため)。また、無菌的取り扱い(抽出及び保存)に可能

な限り注意し、抽出後 24 時間以内に、発熱性物質試験を実施することと定めている。なお、容器壁に吸着したエンドトキシンを再溶解させるとともに、均一にミセル化するため、ウサギに投与する前に超音波処理することを推奨する。

なお、抽出後あるいは注射前に抽出液に認められる不溶性物質を遠心により除去した場合は、試験報告書に遠心分離の理由及び遠心条件を明記する必要がある。やむを得ずメンブランフィルターを使用する場合には、同様に、その理由と使用したメンブランフィルターの名称も記載する必要がある。

5.6 発熱性物質試験法

本ガイダンスに記載されている発熱性物質試験法は、JP の方法に準じたものである。本試験法は、後述するように各国薬局方において試験液の投与液量や試験動物の再使用などに関して若干の相違があるが、多くの部分は共通しているため、現行の USP あるいは EP の方法を参考に実施してもよい（5.8 項参照）。

5.7 化学物質による発熱事例

医療機器に関連した化学物質による発熱についての報告数は、決して多くはないが、例えば、下平らは、ゴムの老化防止剤として用いられていた *N*-フェニル-β-ナフチルアミン及びアルドール-α-ナフチルアミンは、いずれもウサギに対して発熱性がみられ、体温上昇のピークは注射後 1~2 時間であったと報告している¹³⁾。また、実際に食道カテーテル用のゴムからは *N*-フェニル-β-ナフチルアミンが検出されたと報告されている。しかし、現在ではこれらのナフチルアミンは発がん性を有する疑いがあるために使用されていない。

体温上昇を起こすその他の化学物質として次のようなものがある¹⁴⁾。駆虫剤として使用される 4,6-ジニトロ-*o*-クレゾールや黒色硫化染料中間体として使われているジニトロフェノールなどは、酸化リン酸化の脱共役により、高エネルギーのリン酸化物を減少させて酸化的代謝を刺激し、生体の熱産生を促進させるために体温が上昇する。*o*-ニトロフェノール、*m*-ニトロフェノール、*p*-ニトロフェノールなどは有機合成中間体、防黴剤、殺虫剤などに使用されるが、これらは実験的に高体温を起こすことが知られている。また、殺菌剤や染料の製造などに使用されるピクリン酸もイヌの実験で体温の上昇がみられている。LSD、モルヒネなどの向神経性物質は、直接中枢系に作用して体温調節機構を攪乱することにより、体温の上昇をもたらすことが知られている。

5.8 試験動物

体重 1.5 kg 以上の健康で成熟したウサギを用いる。4~5 週齢の幼若ウサギではエンドトキシンに対する感受性が低く、また、反応の変動が大きいことより成熟したウサギを使用する。伝染病予防の上から、また、ウサギは同居すれば騒ぐ場合が多いので、個別ケージで 1 匹ずつ飼育する。雌雄いずれのウサギも使用できるが、情緒的刺激を避けるために何れかの性に統一して試験を実施することが望ましい。

飼育室及び試験室内の温度変化は、各国薬局方ともに ±3℃ 以内の変動にと定めている。JP では、室温を 20~27℃ の範囲内で一定に保つこととしているが、

USP では 20～23℃と規定している。飼育室及び試験室の間はドアで区切られていて、両室内の温度・湿度は同じ条件で一定に制御されていることが望ましい。試験時におけるウサギの保定は、首枷固定法により行う。数時間に及ぶ首枷固定での拘束を行うので、できるだけストレスを軽減させるために背中と脚は拘束されないような固定器を使用する。首枷固定時にウサギは騒音その他の刺激に対して動揺して暴れることがあり、このことが原因となつてしばしば腰抜け現象を起こして体温が下降することがある。このような状態になったウサギは正常な状態に復帰することはほとんどなく、おおむね数日以内に死亡する。したがって、初めて試験に用いるウサギは、試験前 1～3 日以内に注射を除く全操作を含む偽試験を行い、試験に馴化させる。USP では試験前 7 日以内に JP と同様の馴化を行うように規定している。EP では、2 週間以上使用していないウサギを用いて、本試験の 1～3 日前に実際に滅菌生理食塩液を注射する予備試験を行い、注射前 90 分から注射後 3 時間の間に体温上昇度が 0.6℃を超えないウサギを本試験に使用することになっている。

USP と同様、発熱性物質陰性と判定されたウサギは 48 時間の休養期間をおいた後、再使用できる。EP ではこれが 3 日間と規定されている。

発熱性物質陽性と判定されたウサギ又は以前に試験試料と共通な抗原物質を含む試料を投与されたウサギの再使用はできないこととされている。これはエンドトキシンを投与されたウサギはトレランスを生じ、次回のエンドトキシン投与に対する反応が減弱し、時には消失する現象が起こり得ることに基づいている。一方、USP では 2 週間、EP では 3 週間が経過すれば再使用ができることになっている。

5.9 装置及び器具

温度計としては水銀温度計、熱電対温度計、電気抵抗温度計などが用いられる。しかし、今日では多くの施設でサーミスター温度測定装置 ($\pm 0.1^\circ\text{C}$ 以内の精度を有する) とパーソナルコンピューターなどによる自動測定が行われている。センサーを直腸に留置した状態で平衡温度を測定する場合、あらかじめ試験動物の直腸体温測定に必要な時間を計測する必要はない。直腸温測定にあたり、温度計の挿入は JP では 60～90 mm の範囲内としている。これは、USP (7.5 cm 以上) や EP (5 cm) の規定にほぼ対応したものであるが、熱電対温度計及び電気抵抗温度計においては、ある一点のみの温度を示すものの他、ある一定面積に感知される温度の代数平均を記録計に示すものがあるので、これらの電氣的連続測温の普及とともに挿入深度の幅を考慮することも必要となり、上記の挿入範囲が定められた。

耐熱性のガラス器具、容器、注射筒及び注射針などは、環境中に存在するグラム陰性細菌によって汚染されている可能性があるため、あらかじめ 250℃で 30 分間以上の乾熱滅菌により、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンの生物活性を不活化させる。EP では、200℃、1 時間の加熱処理も利用できるようになっている。また、リポ多糖体であるエンドトキシンは通常の滅菌法では殆ど分解を受けないため、試験に使用する器具類の脱パイロジェンには強い加熱処理が必要である。エンドトキシン試験のための試験液を調製する際に用いるガラス製の器具・

容器の乾熱滅菌は、エンドトキシンによるリムルス反応が発熱性物質試験よりも数百倍も感度が高いことより、250℃での30分間では充分でなく、250℃で少なくとも60分間の加熱処理を行う方が安全である。注射筒及び注射針は発熱性物質が検出されない（ピロジェンフリー）ことが保証された単回使用の市販製品を用いることもできる。

抽出及び希釈には生理食塩液を用いるが、JPの生理食塩液を用いればピロジェンフリーであることが保証されている。

5.10 投与液量

USPと同様に投与液量は、通例、体重1kgにつき試験液10mLとしており、1匹への注射は10分間以内に完了させる。EPでの規定では、投与液量が0.5mL/kg～10mL/kgの範囲内となっており、4分以内に注射を完了させるように規定されている。少量の投与液量の場合は試験液の加温は特に必要ではないと考えられる。また、試験液の注射器への充填の際には、試験液のエンドトキシンによる汚染がないように、特に、手指などが試験液と接触することがないようにして行う必要がある。ただし試験液の注射器への充填を手早く無菌的に実施すれば、室内での落下細菌などの影響は無視できるので、必ずしもクリーンベンチなどの無菌環境下で行う必要はないと考えられる。

5.11 試験方法

従来は対照体温の測定だけに3時間以上を要していたが、現在はEPと同様、試験液注射の40分前から注射までの間に、30分の間隔をとって2回測温し、それらの平均値を対照体温とするように改正された。USPでは試験液を注射する30分前までに対照体温を測定すればよいことになっている。

対照体温の規定は、従来（第七改正日本薬局方）38.9～39.8℃であった。ウサギを固定器に固定するときは38.9～39.8℃の範囲に収まるものは、通常使用ウサギの約30%にとどまるに過ぎないが、この下限を著しく逸脱しない限り、発熱性物質に対する感受性は変化しないことが観察されたので、第八改正日本薬局方以降は39.8℃以下と改められている。USPはJPと同じ規定だが、EPは38.0℃以下と39.8℃以上の個体を除外するように規定している。また、JPでは、2回の体温測定値の間に0.2℃を超える差がある動物は使用できないことになっている。一方、USPとEPでは、個体間で1℃以上の差異があるウサギは使用できないと定められている。

JPとUSPは試験液の加温温度を37±2℃と定めているが、EPは38.5℃と規定している。以前、試験液投与後の体温の測定は、1時間間隔で3回行うことになっていたが、現在はUSP及びEPと同様、注射後3時間まで、30分以内の間隔で体温を測定するように改正されている。現在では、ほとんどの施設で電氣的連続測温記録計が用いられており、2～3分間隔で温度の記録が可能となっているので、発熱を観察する3時間の間で最も高い発熱度を検知する方法を採用してもよい。例えば、エンドトキシンによる発熱の場合は、エンドトキシン投与後ほぼ1.5時間後に発熱のピークがみられ、投与量が多い場合には更に3～3.5時間後に第2のピークがみられることが分かっている。このように、3時間の体温をできるだ

け狭い間隔で測定することにも意味があるので、本法に従い30分以内の間隔で測定した値を採用する場合であっても、試験液投与後3時間の体温変化に注意して、発熱性の判定を行うことが勧められる。

5.12 判定

本試験での判定が、極めて変動を受けやすいウサギの体温のわずかな上昇によるものなので、体温上昇の程度によっては、再試験を行って最終的に判定するという慎重な手段がとられている。本試験法は現行の第十六改正日本薬局方の方法である。基本的にEPも同様の判定方法を採用しているが、判定温度に若干の相違がある。また、JPは最終判定に至るまで必要に応じて3段階の試験を実施するように規定しているが、EPはこれが4段階である。一方、USPでは、3匹のウサギを使用した初回の試験において、 0.5°C 以上の体温上昇が認められた場合、5匹のウサギを使用した再試験を実施することになっており、初回の試験を含めた8匹のウサギ中3匹の体温上昇度が 0.5°C 未満又は8匹のウサギの体温上昇度の合計が 3.3°C 未満のとき、試験に適合すると規定されている。

5.13 エンドトキシン試験法

エンドトキシン試験法に関しては、第十六改正日本薬局方・一般試験法のエンドトキシン試験法とJIS K 8008 4.3が参考となる。その他、JPの技術情報誌JPTI¹⁵⁾及びその他の資料¹⁶⁻¹⁸⁾には、測定手法、試験例、注意事項、分析法バリデーションなどが記載されている。

エンドトキシン試験法は、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンがカプトガニ(*Limulus polyphemus* 又は *Tachypleus tridentatus* など)の血球抽出成分LAL (Limulus Amebocyte Lysate)を活性化し、ゲル化を引き起こす反応に基づき、エンドトキシンを検出又は定量する *in vitro* 試験法である。試験法としては、ゲル形成を指標とするゲル化法、ゲル形成時の濁度変化を指標とする比濁法及び発色合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。エンドトキシン試験法は、エンドトキシンに対する反応特異性が高く、また、ウサギによる発熱試験に比較して数百倍もの高感度であることより、エンドトキシンを対象とした発熱性物質試験法の代替法として製薬、臨床、医療機器の分野で汎用されている。

別に規定するもののほか、エンドトキシン試験用の試料は水(注射用蒸留水)抽出により調製するが、エンドトキシンの回収率は材料の種類により大きく異なる。水抽出により100%近い回収率を得ることができる材料も存在するが、プラスチック、金属、ハイドロキシアパタイトのほか、コラーゲン、キチン、キトサンなどの天然医用材料から効率良くエンドトキシンを回収するためには工夫を要する。プラスチックからのエンドトキシン回収率は、EDTA、PEG/Tween 20/EDTA又はヒト血清アルブミンなどの溶媒を利用することにより改善されることがある。金属からの回収にはEDTA溶液が有効である。ハイドロキシアパタイト、コラーゲン、キチン、キトサンからのエンドトキシン回収には塩酸抽出を利用することができる。また、ハイドロキシアパタイトについてはEDTA抽出、コラーゲンの場合は精製コラゲナーゼ/塩酸抽出を行うことにより更に回収率を改善することができる。

なお、製造工程中の微生物汚染をチェックする意味で最終製品の規格としてエンドトキシン試験が設定されることがあり、その場合にも本試験法を適用できる。

5.14 エンドトキシン特異的ライセート試薬

従来、エンドトキシン試験に使用する試薬は、その起原から LAL 試薬と呼ばれていたが、*Tachypleus tridentatus* の追加により、ライセート試薬と改称された。真菌の細胞壁構成成分である β -グルカンやセルロース系の物質（キュープロファン膜による人工腎臓抽出物など）などは発熱活性を示さないとされているが、LAL に対して強く反応することがわかり、現在では、 β -グルカン類によって活性化される LAL 成分である Factor G を除去又はその機能を飽和させることにより、エンドトキシンと特異的に反応するライセート試薬が開発・市販されている¹⁹⁾。また、 β -グルカンはエンドトキシンが示す生物活性やアレルギー反応を増強する可能性があることが知られている²⁰⁾。

6. 事務連絡医療機器審査 No.36 からの変更点

本ガイダンスにおいては、(1) JP、USP、EP 最新版の内容と整合させたと共に、ISO/TC 194/WG 16 が作成したテクニカルレポート「Principle and method for pyrogen test of medical devices」に準拠して、(2) 発熱性物質及び発熱機序の概要、(3) HCPT の概要、(4) エンドトキシン試験用サンプルの調製に関する情報などを追記した。旧版 2.4 項「USP 24 Biological Reactivity Tests, *In vivo*」は発熱性物質試験法と無関係であることが確認されたため、引用規格から削除した。また、本ガイダンス第 4 項におけるエンドトキシンの抽出条件については、過去の研究成果に基づき、室温抽出を採用することとし、その旨の解説を参考情報として追記した。

7. 参考文献

- 1) 三宅健介: エンドトキシン (LPS) 認識分子機構, エンドトキシン研究 6, pp. 23-30, 医学図書出版株式会社 (2003)
- 2) Hemmi, H., Kashiho, T., Takeuchi, O. *et al.*: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196-200 (2002)
- 3) Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J. *et al.*: Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5, 1000-1006 (2004)
- 4) Girardin, S.E., Jehanno, M., Mengin-Lecreulx, D. *et al.*: Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem.* 18, 38648-38656 (2005)
- 5) Hofmann, S., Peterbauer, A., Schindler, S. *et al.*: International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J. Immunol. Methods* 298, 191-173 (2005)
- 6) Jahnke, M., Weigand, M., Sonntag, H.G.: Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit *in vivo* pyrogen

- test and the LAL test. Eur. J. Paren. Sci. 5, 39-44 (2000)
- 7) Hasiwa, M., Kullmann, K., Aulock, V.S., Klein, C., Hartung, T.: An *in vitro* pyrogen test for immune-stimulating components on surfaces. Biomaterials 28, 1367-1375 (2007)
 - 8) Nakagawa, Y., Maeda, H., Murai, T.: Evaluation of the *in vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 588-597 (2002)
 - 9) Nakagawa, Y., Murai, T., Hasegawa, C., Hirata, M., Tsuchiya, T., Yagami, T., Haishima, Y.: Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 66, 347-355 (2003)
 - 10) 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進: 医療用具のエンドトキシン試験法ーリムルス試験と発熱試験の関係ー, 防菌防黴 19, 561-566 (1991)
 - 11) Kanoh, S., Mochida, K., Ogawa, Y.: Studies on heat-inactivation of pyrogen from *Escherichia coli*. Biken Journal 13, 233-239 (1970)
 - 12) Miyamoto, T., Okano, S., Kasai, N.: Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5058-5063 (2009)
 - 13) 下平彰男, 風間成孔, 松本茂: 発熱性物質に関する研究 (III) 輸血セット類の発熱性と理化学試験, 東京都立衛生研究所年報 22, 147-152 (1970)
 - 14) 毒性試験講座: 産業化学物質, 環境化学物質, 和田攻編, pp. 129-151, 地人書館 (1993)
 - 15) 日本薬局方技術情報 1995: エンドトキシン試験法, pp. 46-53, 薬業時報社 (1995)
 - 16) 田中重則: 検査材料からの直接検査法 (エンドトキシン検査法) 臨床と微生物 18, 81-87 (1991)
 - 17) 田中重則: 血中エンドトキシンの微量定量法; エンドトキシンの試験法 (細菌学技術叢書 11 巻) 日本細菌学会教育委員会編, pp. 128-147, 菜根出版, 東京 (1990)
 - 18) Haishima, Y., Hasegawa, C., Yagami, T. *et al.*: Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. J. Pharm. Biomed. Anal. 32, 495-503 (2003)
 - 19) 土谷正和他: 大過剰のカルボキシメチル化カードランによる G 因子系阻害作用を利用したエンドトキシン特異的リムルステストの開発とその応用, 日本細菌学雑誌 45, 903-911 (1990)
 - 20) Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T.: Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1-3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN) isolated from *Grifola frondosa*. Biol. Pharm. Bull. 17, 1554-1560 (1994)

8. 参考文献

- 1) USP General Chapters: <151> Pyrogen test
- 2) EP Methods of Analysis: 2.6.8 Pyrogens

第8部 血液適合性試験

1. 適用範囲

本試験は、血液に接触する医療機器や原材料の血液適合性を評価するためのものである。

2. 引用規格

2.1. ISO 10993-4:2002/Amd.1:2006, Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood

2.2. ASTM Standard F 756-08: Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials

3. 試験項目

血液適合性試験は、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目に分類される。試験項目の選択にあたってはISO 10993-4 Amendment 1 (Table 1 と Table 2) の例示を参考にされたい。ISO 10993-4 では、血液と間接的に接触する医療機器について試験項目の記載はないが、これらの溶出物（又は抽出物）の化学的分析などによりリスク評価ができない医療機器の場合は、使用方法を勘案した上で、試験項目を選択すべきである。例えば、抽出液を用いて溶血毒性試験を行い、血液との相互作用に関するリスク評価の1つとしてもよい。なお、血液との接触期間が極めて短い医療機器（ランセット、皮下針など）は原則、血液との相互作用の評価を行う必要はない。

4. 評価項目

必要な試験項目を選択後、1つ以上の適切な評価項目を設定する。標準的な評価項目を表1に示す。これらの項目は、医療機器の血液適合性評価の実施において、精度や汎用性の観点から選択されたものである。勿論、これら以外の評価項目を選択してもよいが、その場合は、評価項目の選択理由を説明する必要がある。

表1 標準的な評価項目

試験項目	評価項目
血栓形成	付着物／付着状態
血液凝固	トロンビン-抗トロンビン複合体 (TAT)、フィブリノペプチドA (FPA)、部分トロンボプラスチン時間 (PTT)
血小板	血小板数、血小板放出因子 (β -トロンボグロブリン(β -TG)又は血小板第4因子 (PF4))
血液学的項目	全血算 (CBC)、溶血
補体系	補体活性化産物 (C3a、C5a、SC5b-9)

5. 一般的注意事項

5.1 試験試料

最終製品又は最終製品の一部を試験試料に用いる。最終製品の血液適合性について評価可能と判断される場合は、原材料や最終製品を模擬した試料を用いることができる。また、既に適用部位で臨床実績のある医療機器を対照物質として用い、リスク評価を行うことが望ましい。

5.2 試験法

医療機器や原材料の特性、使用方法、使用条件及び以下の各試験項目の情報に基づいて、適切な試験法・試験条件を設定する。設定に際しては、ISO 10993-4 及びその他のガイドラインに記載又は引用されている試験法を推奨するが、試験法としての妥当性が示されれば、文献などで報告されている試験法を選択してもよい。

5.3 試験項目

5.3.1 血栓形成

体内で循環血液に接触する医療機器では *in vivo* 試験を、体外で血液に接触する医療機器の場合は、*in vitro* もしくは *ex vivo* 試験の実施が考慮されるべきである。なお、使用方法・使用条件を考慮した機能性（性能確認）試験が実施され、その試験において血栓症のリスク評価が適切に行われている場合には、本項の評価をあらためて実施する必要はない。

また、血栓形成の評価においては、医療機器の表面や周囲血管の付着物の状態を観察することが重要である。肉眼による観察、光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡などを用いた観察が主な観察方法である。血管内に長期間留置される医療機器では、形成した血栓が血流によって末梢側に移動してしまう可能性も考慮する必要があり、留置部位に加えて、より末梢側血管の閉塞又はそれに伴う組織変化の有無を観察することも重要になる。

血栓形成は血液凝固システムと血小板の活性化が関与していると考えられている。適切に血栓形成を評価可能と判断される場合には、これらの評価項目を用いて医療機器又は原材料の血栓形成を評価することもできる。

5.3.2 血液凝固

標準的な血液凝固の測定方法は、凝固の遅延や過剰な出血につながる血液凝固障害を検出するように考えられている。したがって、医療機器によって誘発される凝固の加速を評価するためには、試験方法や試験条件を適切に変更することが望ましい。

PTT は、動物血液を用いて評価することができ、試験試料に暴露した血液を採取し、その変化を調べる。

トロンビン-抗トロンビン複合体 (TAT)、フィブリノペプチド A (FPA) については、免疫検定法の使用が推奨される。市販のキットを使用することができるが、多くはヒト検査キットであるため、試験系や試験方法の設定に注意が必要である。

また、既に適用部位で臨床実績のある医療機器を用いた対照物質群を設ける

だけでなく、陰性対照物質群や陽性対照物質群を設けて評価系や各指標の感度を確認することが望ましい。

5.3.3 血小板

血小板数の減少は、過剰な出血を生じさせる可能性がある。医療機器に暴露した血液中の血小板数の減少は、血小板の破壊、血小板凝集、医療機器上の血液凝固又は血小板粘着によって引き起こされる。標準的な評価方法は、血小板数の測定であり、試験試料に暴露後の血液中の血小板数を測定する。

血小板の活性化の評価は、血栓形成の指標として重要である。血小板活性化の評価については、血液に接触した試験試料の表面に付着した血小板の付着状態を走査型電子顕微鏡などで観察する。この他、 β -TG や PF4 など血小板顆粒物質の放出量を測定する方法もある。これらの測定には、市販のキットを使用することができるが、通常、免疫検定法が用いられるため、使用できる動物種が限定される。このため、試験系や試験方法の設定に注意が必要である。また、既に適用部位で臨床実績のある医療機器を用いた対照物質群を設けるだけでなく、陰性対照物質群や陽性対照物質群を設けて評価系や各指標の感度を確認することが望ましい。

5.3.4 血液学的項目

主に赤血球や白血球との相互作用について評価する。表1には、代表的な評価項目として、全血算(CBC)と溶血を示した。

CBC は、医療機器/血液の相互作用のインパクトについて基本的な情報を提供する。試験試料に暴露後の血液中の赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビン量を測定する。

溶血に影響する因子として、化学的因子と物理的因子が考えられる。血液ポンプを含む人工肺システムや血液透析器のように、物理的に血球に傷害を与える可能性のある医療機器では、血液循環法を用いるなど物理的影響も考慮した試験の実施が望ましい。

物理的影響がほとんど無視できる医療機器に関しては、既に確立されている *in vitro* 試験法を用いることができる。6.項に示した試験法の他に、ASTM F 756-08 も用いることができる。物理的に血球に傷害を与える可能性のある医療機器についても、これらの試験法を用いて溶血を引き起こす化学的因子の有無を評価してもよいが、その場合は、物理的影響について、別途リスク評価を行うことが望ましい。

5.3.5 補体系

補体の主な成分は C1~C9 で表され、C1 は3つのフラグメント (C1q, C1r, C1s)、その他は補体系が活性化される過程で2つ以上のフラグメントになるものがある (C3a, C3b など)。補体活性化の経路として、3種類 (古典経路、副経路、レクチン経路) が知られており、いずれの経路も C3 が C3a と C3b に分解される。更に、C3b は C5 の C5a と C5b の分解に寄与し、最終的に C5b6789 (C5b-9) が生成される。最終産物である C5b-9 は膜傷害 (溶血や細胞傷害) 作用を有することが知られており、その他 C5a のフラグメントなどにも生理活性があるとされている。生理作用や検出が容易なことから、可溶性のフラグメント (C3a, C5a, SC5b-9 など) の一つ又は複数を用いて補体活性の評価が行わ

れている。

C3a、C5a、SC5b-9 を評価項目とする場合、ヒト血液（全血、血漿、血清）を用いた *in vitro* 試験とする。試験の実施にあたっては、陰性対照、陽性対照を設定して、試験の感度を保証する。陰性対照物質（液）としては、高密度ポリエチレンや生理食塩液を用いることができる。陽性対照物質（液）としては、セルロース、ザイモサン A などを用いることができる。

6. 溶血毒性（溶血性）試験

6.1 試験液の調製法

同一ロットの3試験試料を、抽出溶媒（生理食塩液）を用いて別々に抽出し、試験液 E1、E2、E3 を得る。試験試料（医療機器又は原材料）の量と抽出溶媒（生理食塩液）の量の比及び抽出温度・時間については、付録の規定に従う。ただし、試験試料を細切する場合は操作による汚染に注意する。

6.2 使用血液の調製法

健康なウサギより脱線維血を調製し、次の確認を行って、試験に用いる。

調製した脱線維血 0.2 mL を生理食塩液 10 mL に添加し、約 750 × g で5分間遠沈し、上清の 576 nm における吸光度を測定し、溶血を起こしていないこと（吸光度 0.01 以下）を確認する（6.7.1 項参照）。

抗凝固剤を添加した血液を用いてもよいが、その旨を試験報告書に記載する。試験試料によっては（例：セラミックス）抗凝固剤が失活することがあるので注意が必要である。

6.3 対照

6.3.1 陰性対照液（非溶血対照液）

生理食塩液を陰性対照液とする。

6.3.2 陽性対照液（完全溶血液）

蒸留水（6.7.2 項参照）10 mL に脱線維血を 0.2 mL 添加し、完全溶血を起こした液を陽性対照液とする。

6.4 試験操作

試験液又は陰性対照液 10 mL に対して脱線維血 0.2 mL の割合で添加後、栓をして1回転倒混和した後、37 ± 2℃で1時間、2時間及び4時間のインキュベーションをする（6.7.3 項参照）。その後、約 750 × g で5分間遠沈し、上清を分取する。

上清の吸収スペクトルを測定し、酸素化ヘモグロビンの吸収波形を示す場合には第Ⅰ法によって、メトヘモグロビンなどの吸収を認めた場合には第Ⅱ法によって、溶血率を算出する。測定は、各試験液（E1、E2、E3）について1回ずつ行い、その平均値を算出して各時点における溶血率とする（6.7.4、6.7.5 項参照）。

〔第Ⅰ法〕得られた上清について、そのまま酸素化ヘモグロビンの極大吸収 540 nm 又は 576 nm における吸光度を測定する。別に陰性対照液上清及び陽性対照液各 3 例の吸光度を測定し、その平均値を用いて次式により溶血率を求める（6.7.7 項参照）。

$$\text{溶血率(\%)} = \frac{(\text{試験液上清の吸光度}) - (\text{陰性対照液上清の平均吸光度})}{(\text{陽性対照液の平均吸光度}) - (\text{陰性対照液上清の平均吸光度})} \times 100$$

〔第Ⅱ法〕上清の総ヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンに変換し、その吸光度から溶血率を算出する。

- 1) Drabkin 試薬：フェリシアン化カリウム ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 200 mg/L、シアン化カリウム (KCN) 50 mg/L、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 1.0 g/L（6.7.8 項参照）。市販品を用いてもよい。この場合、市販品の使用方法や保存条件に従う。
- 2) 操作：試験管に Drabkin 試薬 4.5 mL をとり、試験液と陰性対照液の上清及び陽性対照液をそれぞれ 0.5 mL 加え、混和後 15 分間室温放置し、生成したシアンメトヘモグロビンの吸光度を 540 nm で測定する。陽性対照液及び陰性対照液上清については、3 例の平均値を算出し、次の計算式より溶血率を求める。

$$\text{溶血率(\%)} = \frac{(\text{試験液上清の吸光度}) - (\text{陰性対照液上清の平均吸光度})}{(\text{陽性対照液の平均吸光度}) - (\text{陰性対照液上清の平均吸光度})} \times 100$$

6.5 評価

インキュベーション 1、2 及び 4 時間における溶血率を求める。表 2 を用いて、溶血性の程度をグレード分けしてもよい。医療機器の種類、血液との接触期間などを考慮して、リスクを考察することが望ましい（6.7.9 項参照）。

表 2 判定表

溶血率 (%)	グレード
溶血率 ≤ 2	非溶血性
$2 < \text{溶血率} \leq 10$	軽度の溶血性あり
$10 < \text{溶血率} \leq 20$	中等度の溶血性あり
$20 < \text{溶血率} \leq 40$	強い溶血性あり
$40 < \text{溶血率}$	非常に強い溶血性あり

6.6 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（医療機器又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 試験液の調製方法
- 5) 使用血液の調製方法
- 6) 試験操作
- 7) 試験結果（溶血率）
- 8) 結果の評価と考察
- 9) 参考文献

6.7 溶血毒性試験の参考情報

6.7.1 採血

脱線維血調製のための採血法は、頸動脈採血、耳介静脈採血、耳介動脈採血、心臓採血のいずれでもよい。いずれもインキュベーション時間が6時間までは溶血の可能性はほとんどない。したがって、必要血液量が少量の場合には頸動脈からの採血を必ずしも必要とはしない。生理食塩液に調製した脱線維血を浮遊させた後、その上清（6.4項の操作のうちインキュベーションのみ実施しないで得られた上清）の576 nmの吸光度が0.01以下であれば試験に充分耐える。

6.7.2 蒸留水

赤血球を完全溶血させることが主目的であるので、水の精製方法として蒸留のみを指定するものではない。

6.7.3 インキュベーション時間

最長時間（4時間）の1点でもよい。反応は経時的に進むのが一般的であるが、途中経過は評価の際の一助ともなり、1点のみのデータに比べデータの信頼性を高めることにつながることもあるため、6.4項ではインキュベーション時間を3点設定している。溶血反応には、早い時期に溶血するもの、時間に比例して溶血の増加するもの、後期にはじめて溶血するものなど様々なパターンが考えられ、そのパターンも評価の一要素となり、試験液との接触時間に伴う溶血性の経時変化を把握することもリスク評価に有用な場合がある。試験試料量が少ないために十分な量の抽出液が得られない場合は、インキュベーション時間を4時間のみとしてよい。

6.7.4 メトヘモグロビンなど

メトヘモグロビンなどとは、メトヘモグロビン、カルボキシヘモグロビンなどの酸素化ヘモグロビン以外のものをさす。

6.7.5 第I法と第II法の選択

本ガイダンスでは、シアン化合物の不必要な使用を避ける目的から、吸収波形を確認して、メトヘモグロビンなどの吸収が認められない場合にはシアンを用いない第I法で測定する方法を提示した。酸素化ヘモグロビンの吸収波形を示す場合に、シアンメトヘモグロビンに変換して測定を行っても結果に影響しないことから、第II法で統一して実施してもよい。

6.7.6 酸素化ヘモグロビンの吸収波形及び吸収ピーク

酸素化ヘモグロビンの吸収波形を確認する方法としては、分光光度計を用いて波長 500～700 nm の吸収波形を、陽性対照の波形と比較するのもよい。場合によっては、酸素化ヘモグロビンの一部がメトヘモグロビン化し、540 nm と 576 nm の酸素化ヘモグロビンの明瞭な吸収ピークとともに、メトヘモグロビンのピークが混在することもあるので、引用文献^{1,2)}を参考に、波形を注意深く観察する。液の pH により、メトヘモグロビンの吸収波形が異なることにも、注意が必要である。

6.7.7 酸素化ヘモグロビンの吸光度測定

酸素化ヘモグロビンの吸収は 540 nm 付近、並びに 576 nm 付近に明確なピークを示すが、よりシャープなピークの 576 nm での測定が望ましい。

6.7.8 Drabkin 試薬の使用期限

調製した Drabkin 試薬は遮光して、冷暗所に保存する。使用期限の目安は約 1 ヶ月である。

6.7.9 評価

得られた溶血率が許容できるかどうかの判断は、医療機器の生体接触期間、使用頻度、表面積など、個々の条件を考慮に入れて行うことが望ましい。通常の高分子医用材料での溶血率は 0.5%未満であったとの情報が寄せられている。一方、ある種のガラスセラミックスを高温抽出した時には、イオン濃度の上昇に伴う明らかな溶血が認められた例があった。この溶血率は抽出温度に依存しており、37℃では全く溶血が認められなかった。このように、原材料によっては抽出温度との関係も評価の一要素となる。

7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

- 1) 事務連絡 医療機器審査 No.36 の血液適合性試験では、溶血毒性試験が中心に記載されている。しかし、医療機器と血液の相互作用の結果生じる血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系も重要な試験項目である。ISO 10993-4 でもこれらの内容は言及されている。したがって、本ガイダンスでは、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体活性を明記し、情報を加えて整備した。溶血毒性試験は血液適合性試験の試験項目の一つとした。
- 2) 個々の試験条件は、使用方法・使用条件を考慮して設定することになっているため、試験方法は多様である。したがって、本ガイダンスでは溶血毒性試験を除き試験法の詳細を記載していない。詳細な試験方法は、ステントや人工血管など各機器のガイドラインに記載されている場合もある。また、その他の医療機

器でも、実績のある評価系があり、試験実施にあたっては、文献などを調査し、適切な試験系を設定することが望ましい。ここでは、試験を設定していく上で、共通の考え方もしくは必要となる情報を中心に記載した。溶血毒性試験については、事務連絡 医療機器審査 No.36 で記載されていた溶血毒性試験法を記載しているが、ASTM で記載されている試験法や、妥当性が示されればその他の試験法を用いることができる。

- 3) 評価項目に関しては、ガイダンス使用者が使用し易いように、これまでの実績や感度などを基に標準的な評価項目と考えられるものを数個に絞って記載した。これらの指標は、現在改訂作業中の ISO 10993-4 ワーキンググループでも検討されている。評価項目はこれらに限定されるものではないが、ISO 10993-4 を参考に医療機器の使用方法や条件、文献や報告などを考慮して適切な評価項目を選択されたい。
- 4) 人工血管や冠動脈ステントなど心臓血管系の医療機器では、機能確認のため、臨床適用に即して動物での評価が行われる場合がある。このような試験（機能性試験）には、適用部位において安全に使用できることを確認することが含まれ、血栓症のリスク評価も重要な評価項目となっている場合が少なくない。医療機器の申請において、機能性試験は、必ずしも GLP 適用で実施する必要はないが、血栓症のリスク評価は適用部位での評価が最適な評価系であることを考慮し、試験の信頼性が確保され、適切な評価が行われていれば、機能性試験で実施された血栓症のリスク評価は本項の評価にも適用可能と考えられる。したがって、「使用方法・使用条件を考慮した機能性（性能確認）試験が設定され、適切な血栓症のリスク評価が実施されている場合には、本項の評価をあらためて実施する必要はない。」と記載した。
- 5) 医療機器材料の血栓性評価に、*in vitro* の試験系を用いた研究がある。ヒト血液を用いることや微量生体成分における高感度な定量的評価が可能で、材料のスクリーニングなどに有用とされている。しかし、最終製品、特に体内植込み機器の血栓症のリスク評価に *in vitro* の試験系を用いる場合は、血行動態の影響や血液との接触期間など、十分にリスク評価が可能であるかを検討した上で試験を実施する必要がある。

8. 引用文献

- 1) 日本分析化学会編：分析化学便覧，pp. 1357-1358，丸善，東京 (1966)
- 2) 新版日本血液学全書刊行委員会編：新版日本血液学全書 13 血液学的検査・正常値，pp. 1-11，丸善，東京 (1979)

9. 参考文献

- 1) 松原高賢：血色素の定量分析—分光測光法—，蛋白質 核酸 酵素 32, 6 (1987)

付録

医療機器又は原材料からの抽出液の調製における
試験試料／抽出溶媒比及び抽出温度・時間

1. 試験試料／抽出溶媒比

試験試料の形状又は厚さにより、以下に示した試料／溶媒比を用いる。

厚さ (mm)	抽出溶媒 1mL に対する試験試料の量 (許容範囲 $\pm 10\%$)	試験試料の形状の例
<0.5	6 cm ²	フィルム、シート、チューブ
0.5～1.0	3 cm ²	チューブ、平板、小型の成型物
>1.0	3 cm ²	大型の成型物
>1.0	1.25 cm ²	ゴム栓などの弾性材料
不規則な形状の硬質材料	0.2 g	粉末、ペレット、フォーム状、非吸収性成型物
不規則な形状の多孔性材料	0.1 g	メンブランフィルター
備考：吸収性材料やハイドロコロイドに適用可能な手順を参考として以下に示す。0.1 g あるいは 1 cm ² 当たりの材料が吸収する抽出溶媒量を求める。抽出を行う際、0.1 g あるいは 1 cm ² 当たりの抽出溶媒量に、先に求めた溶媒量を加える。		

2. 抽出温度・時間

- | | | |
|-----|----------------|----------------|
| (1) | 121 $\pm$ 2 °C | 1 $\pm$ 0.1 時間 |
| (2) | 70 $\pm$ 2 °C | 24 $\pm$ 2 時間 |
| (3) | 50 $\pm$ 2 °C | 72 $\pm$ 2 時間 |
| (4) | 37 $\pm$ 1 °C | 72 $\pm$ 2 時間 |

上記条件のうち、試験試料が耐えられる条件を選択する。試験試料が耐えられる条件とは、以下を満たすものである。

- 1) 抽出温度は材料の融点より低い。
- 2) 抽出条件で材料が著しく変形しない。
- 3) 溶出物質が揮発あるいは分解しない。

3. 保存温度・時間

抽出温度が高い場合、保存中に温度が低下すると抽出物が析出する可能性があるため、通常 25°C 前後で保存し、冷蔵保存は行わない。また、抽出液は通常 24 時間以内に使用する。