

- III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）
  - ii. 審査のポイント
    - 3. 生物学的安全性評価試験について

**III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）**  
**ii. 審査のポイント**  
**3. 生物学的安全性評価試験について**  
（令和3年度 認証基準該当性の考え方等に関する説明会資料）

Slide 1

次に、生物学的安全性評価試験について、具体的に説明します。

Slide 2

主な生物学的安全性試験と関連情報について説明します。

まず、全体に関わる抽出媒体の選択方法について、続いてここに示した各試験の概略を説明します。

Slide 3

まず最初に、物理学的、化学的情報を入手し、その情報を整理した後、必要に応じて試験を実施することになります。

Slide 4

「抽出媒体の選択方法について」です。

原則は ISO 10993-12 です。重要な点は以下の4点です。

まず、医療機器の材料特性を考慮する。

例えば、化学物質、水に溶ける/溶けない、金属、低分子・樹脂などの高分子有機化合物の場合があります。

次、製品の使用条件を考慮する。

例えば、接触部位や期間を考慮します。

また、試験の目的を考慮する。

例えば、ハザードの検出や臨床使用時のリスク評価があります。

最後、各試験に必要な抽出時間の適切性を考慮する。

例えば、実臨床時間とワーストケースどちらを選ぶか？

これらを考慮しながら、抽出媒体を選択します。

Slide 5

### III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

#### ii. 審査のポイント

#### 3. 生物学的安全性評価試験について

遺伝毒性試験は、化学物質の遺伝毒性を検出するための試験です。

変異原性とは、生体の遺伝物質に作用し、突然変異を起こす力で、遺伝毒性のひとつです。

体細胞に作用する場合は癌化や老化に関係し、生殖細胞に作用する場合は次世代に影響します。

突然変異（mutation）には、以下の2種類があります。

遺伝子突然変異（gene mutation）は体細胞変化において発がん性に関係します。

染色体異常（chromosomal aberration）は、染色体の数や形態が変化します。

主な遺伝毒性試験法を表にまとめました。

遺伝子突然変異を指標としている試験には、*in vitro*では復帰突然変異試験、マウス・リンフォーマ TK 突然変異試験、*in vivo*ではスポットテスト、特定座位法があります。

染色体異常を指標としている試験には、*in vitro*では染色体異常試験、姉妹染色体交換、*in vivo*では小核試験、優性致死法、相互転座があります。

DNA 損傷を指標としている試験には、*in vitro*では Rec-assay、不定期 DNA 合成があります。

#### Slide 6

発がん性試験は、動物での催腫瘍性を検索することにより化学物質の発がん性を予測し、評価するための試験です。

発がん性とは、生体に作用し、癌を発生させる作用を言います。

発がん物質の種類には、遺伝子毒性型発がん物質と非遺伝子型発がん物質があります。

遺伝子毒性型発がん物質は、変異原性陽性化学物質、すなわち、遺伝子に直接的な影響を与える化学物質であることから、遺伝毒性試験でスクリーニングが可能です。

一方、非遺伝子型発がん物質は、遺伝子に直接的な障害を与えずに発がんを起こす物質なので、遺伝毒性試験ではスクリーニングができません。

そのため、動物への長期間投与などが必要になります。

発がん性が懸念される場合として、

- ① 遺伝毒性試験成績から、がん原性が懸念される。
- ② 同一原材料などでヒト関連、がん原性が知られている。
- ③ 構造活性相関から遺伝毒性または、がん原性が示唆される。
- ④ 亜急性毒性、亜慢性毒性などの長期試験から、前がん病変が認められる。
- ⑤ 未変化体あるいは代謝物が長期間組織に停滞し、局所の組織変化あるいは病的反応を引き起こす。

が挙げられます。

#### Slide 7

### III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

#### ii. 審査のポイント

##### 3. 生物学的安全性評価試験について

細胞毒性試験は、化学物質の細胞傷害性を検出するための試験です。

細胞傷害とは、低酸素症、物理的因子、化学的因子、感染因子、免疫反応、栄養因子による傷害で、直接的な傷害と環境変化による二次的な傷害があります。

細胞毒性試験の位置付けは、

- 動物レベルでの毒性試験結果を、より単純な試験系として、細胞レベルで明らかにしようとするもので、
- 全てのカテゴリーのデバイスに対して実施される試験であり、
- 材料からの抽出成分と細胞の接触後の反応により評価を行なう試験であり、
- 生物学的安全性試験の中では感度が高い試験、となります。

#### Slide 8

感作性試験は、未知の有害因子の生体リスクのスクリーニング試験であり、材料から遊離してくる化学物質のヒトでの接触アレルギーリスクを予知する試験であり、経口や吸入曝露による即時型のアレルギーを検出するものではありません。

免疫毒性とは、免疫機構に起った組織学的変化及び諸応答の変容であり、

抗原性とは、化学物質自体が抗原となって起こる、生体にとって不利益なアレルギー反応を抗原抗体反応といい、化学物質の有する性質を抗原性といいます。有害物質が生体に作用し、諸応答の変化が起こり、組織学的変化となります。

アレルギー反応とは、必要ではない、好ましからざる免疫応答によって生体が障害されるなどの不利益がおこること、過敏反応とも言います。

アレルギー応答を起こすことになった抗原をアレルゲンといいます。

アレルギー反応は、I型からIV型に分類されます。感作性試験は、IV型を検出します。

感作性の要因とは

- 1) 化学物質の感作性の強さがあります。

これは動物で確認しますので、ヒト臨床使用前の確認です。

- 2) その物質の製品中の濃度と溶出性があります。

これは、化学分析ですので、ヒト臨床使用前の確認です。

- 3) そのような製品の使用形態、たとえば、頻度などがあります。

最後、4) 使用者の体質により毒性強度が変化することも考慮します。

#### Slide 9

刺激性試験は、原因物質によりダメージを受けた皮膚の細胞から放出された炎症メディエーターによって生じる可逆的な炎症反応を検出する試験です。

生物学的安全性試験の中では、刺激性は可逆的の反応、腐食性は不可逆的の反応として区別しています。現在試験で評価しているのは、可逆的の反応である刺激性です。

### III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

#### ii. 審査のポイント

##### 3. 生物学的安全性評価試験について

刺激性の要因とは、

- 1) 被験物質の毒性ポテンシャル、
- 2) 被験物質の皮膚透過性、
- 3) 炎症メディエーターの変動、
- 4) 被験物質の皮膚内代謝、

であることから、動物を用いない動物実験代替法には 1) から 4) のいずれかが含まれていることが必要です。

眼刺激試験とは、コンタクトレンズなど眼に接触する可能性のあるものを対象とし、結膜の充血、浮腫、角膜の混濁等を指標とする試験です。

光毒性試験とは、主に医薬品において、光が関与して初めて発生する刺激反応を調べる試験で、光感受性物質を含む製品、皮膚塗布剤などにおいて評価されます。

実際の動物試験では、動物に被験物質の抽出液を投与し、その部位が示す紅斑・浮腫などの炎症反応の有無を確認します。反応が認められた場合、刺激性ありと判定します。

#### Slide 10

埋植試験は、生体内に埋植/留置される物質の局所組織に与える影響を見る試験です。

動的な負荷を受けるような機械的/力学的影響をみるものではありません。

埋植試験の種類は、現在では、可能な限り実臨床使用実態に合わせた埋植部位を選択することとし、「皮下埋植試験」、「筋肉内埋植試験」、「骨内埋植試験」、及び「脳内埋植試験」があります。

大動物を用いる使用模擬試験の位置づけとし、上記試験部位以外、臨床使用部位での埋植評価が行われる場合もあります。

埋植試験の評価は、埋植した周辺の組織評価がメインとなります。

全身性の毒性が確認できる検査項目や対照群を入れれば、合わせて全身毒性の評価も可能となる場合があります。

注意事項として、吸収性材料の観察期間は、埋植試験を実施する前に、製品の分解挙動や吸収・代謝の状況を確認してから設定してください。

#### Slide 11

全身毒性試験は、哺乳類動物により医療機器の全身の毒性を評価する試験で、曝露時間により試験を分けています。

投与経路は静脈内か腹腔内、経口が多いです。

急性全身毒性試験とは最終製品または原材料から抽出した溶液中に急性の全身毒性を有する物質が存在しないことを確認する試験です。

注意点として、医薬品の「単回投与試験」では、他の試験で用いられないような高用量の被験物質を曝露させ、毒性の推移や傾向を解明することを目的としており、医療機器

### III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

#### ii. 審査のポイント

##### 3. 生物学的安全性評価試験について

の急性全身毒性試験とは評価する目的が異なります。また、投与量は以下に示した反復投与毒性試験とは異なります。

亜急性全身毒性試験とは、試験検体の反復又は継続的曝露後 24 時間以降から 28 日までの時期に生じる毒性を調べる試験です。

反復投与期間は 14 から 28 日間で、静脈内投与は 14 日間未満、その他は 14 から 28 日間となっています。

亜慢性全身毒性試験とは、寿命の一部の期間、試験検体を反復又は継続的に曝露することにより生じる毒性を調べる試験です。

反復投与期間は齧歯類で 90 日間、他の動物種では寿命の 10%を越えない期間、静脈内投与の場合は 14 から 28 日間となっています。

慢性全身毒性試験とは、寿命の過半の期間、通常寿命の 10%を越える期間にわたり、試験検体を反復又は継続的に曝露することにより生じる毒性を調べる試験です。

試験期間は、通常、6 から 12 か月の期間で実施されます。

#### Slide 12

発熱性試験は、新しい材料中の発熱性物質の存在の有無を製品設計段階で調べる試験です。

工程管理や最終製品を患者に使用する際に体内に入って発熱するかどうかを確認する際にも実施します。

発熱性物質とは、ポリマー合成時に添加された化学物質や天然由来の生物材料である、コラーゲン、ゼラチンなどのエンドトキシンなどがあります。

【エンドトキシン】は、グラム陰性菌由来のポリ多糖類で、

【非エンドトキシン】は、製品由来の物質、グラム陽性菌、病原性真菌、ウイルス由来の物質で発生するとされています。

※別途製造工程中の「エンドトキシン」管理については、「エンドトキシン試験」で確認することになっています。

実際の動物試験では、ウサギの耳介静脈から検体を投与し、その後経時的に体温を測定し、体温上昇が一定以上の場合、発熱性ありと判定します。

#### Slide 13

生物学的安全性評価としてのエンドトキシン試験は、新しい材料中の天然由来エンドトキシンの製造工程中汚染の有無を調べる試験です。

天然由来の医用材料とは、キチン、キトサン、植物ガム、ペクチン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン などが挙げられます。

エンドトキシン試験方法は、第十八改正日本薬局方エンドトキシン試験、または JIS K 8008 4.3 で規定されています。

### III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

#### ii. 審査のポイント

##### 3. 生物学的安全性評価試験について

抽出物に特殊な試薬、ライセート試薬を反応させます。

その他、様々な医療機器の承認基準や認証基準にも要求事項として立てられています。

エンドトキシン汚染リスクの高いと考えられる医療機器は、

- 天然由来原料から構成されている医療機器
- 分解産物が循環血液に取り込まれ排出される生体吸収材料の医療機器
- 製造工程以外で混入するなど、原材料由来のエンドトキシン混入リスクが高い場合が考えられます。

※現在日本では、循環血液に接触する医療機器は一律リスクが高いものと位置付け、エンドトキシンの混入がないことを示すことが求められています。

#### Slide 14

血液適合性試験は、血液と接触する、医療機器や原材料の相互作用による血液適合性を評価する試験です。

血液適合性試験の種類は、溶血性と血栓性に大きく分けられます。

溶血性試験のうち、材料起因の試験は、ASTM や NIH で規定している遊離ヘモグロビン測定が行われます。

機械的因子起因の試験は、機器の特徴に合わせた動的環境での溶血性を評価します。

血栓性では、*in vitro* の試験系として、血液凝固評価にはトロンビン-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)、血小板活性化評価には血小板数及び活性化マーカー〔血小板放出因子及び活性化マーカー( $\beta$ -トロンボグロブリン( $\beta$ -TG)、血小板第 4 因子(PF4)、トロンボキサン B2(TxB2)]、または走査型電子顕微鏡検査による血小板形態観察、補体評価には SC5b-9、C3a を追加してもかまいません、血液学評価では全血算 CBC、白血球活性化因子を測定します。

*In vivo* あるいは *ex vivo* の試験系として、肉眼的観察、閉塞率、解剖学的検査、病理組織学的検査、走査型電子顕微鏡検査が総合的に行われます。

#### Slide 15

生殖発生毒性試験は、化学物質の生殖および発生に対する悪影響を検出するスクリーニング試験です。

種差があるので、ヒトへの外挿性を考慮する必要があります。

発生毒性とは、環境要因が生殖細胞の形成から受精、子宮内発育、出生、成熟から死に至る発生過程のいずれかの時期に作用して、早期死亡、発育遅延、形態異常、機能異常を惹起する能力をいいます。

したがって着床前期、器官形成期、胎児発育期への時期特異性の毒性を確認します。

生殖毒性とは、主に親世代からみた環境要因による不妊や次世代の発育異常を惹起する

III. 生物学的安全性評価（JIS T 0993-1 改正に伴う内容）

ii. 審査のポイント

3. 生物学的安全性評価試験について

能力をいいます。

雄では精子形成や性行動、生殖器等への毒性、雌では、性周期、性行動、受精、着床、妊娠、分娩、哺育行動等への毒性を評価します。

試験は下記3種類ですが、実際の医薬品の毒性評価では、いくつかの試験を組合せて行い、柔軟な選択による評価が行なわれています。

まず、「初期胚発生」に関する試験、これは受胎能から着床までの試験です。

次、「出生から母動物の機能」に関する試験、これは出生前から出生後までの試験です。

最後、「胚・胎児発生」に関する試験です。

以上