事　務　連　絡
医療機器審査　No.３６
平成１５年３月１９日

各都道府県衛生主管部（局）
薬務主管課　御中

厚生労働省医薬局審査管理課

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

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は、平成１５年２月１３日医薬審発第０２１３００１号（以下「通知」という）により通知したところであるが、今般、通知にある基本的考え方に基づき行う試験について、厚生科学研究「医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究」研究班において、これまでの経験を踏まえ、感度がよく実施が容易な試験法の具体的な例が別添のとおりとりまとめられたので送付する。ついては、御了知のうえ、貴管下関係業者への周知徹底方よろしくお願いする。

なお、本報告書にある試験法は例示であり、この試験法以外の試験法による試験についても、基本的考え方に基づき、妥当性が説明できる試験法であれば差し支えないものであるので、念のため申し添える。

また、本通知の写しを財団法人医療機器センター理事長、日本医療機器関係団体協議会会長、在日米国商工会議所医療機器小委員会委員長及び欧州ビジネス協議会医療機器委員会委員長あて送付することとしていることを申し添える。

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する

国際ハーモナイゼーション研究

研究班報告書

# 医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する

国際ハーモナイゼーション研究

分担研究者　　土屋　利江

# 医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について

目次


| | | ページ |
|---|---|---|
| はじめに | | 1 |
| 第1部 | 細胞毒性試験 | 2 |
| 第2部 | 感作性試験 | 15 |
| 第3部 | 遺伝毒性試験 | 32 |
| 第4部 | 埋植試験 | 39 |
| 第5部 | 刺激性試験 | 48 |
| 第6部 | 全身毒性試験 | 62 |
| 第7部 | 発熱性試験 | 68 |
| 第8部 | 血液適合性試験 | 78 |
| 付録 | | 84 |

# 医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について

## はじめに

医療用具の生物学的安全性評価については、平成7年6月27日に、そのガイドラインとして「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」が発出されていたところであるが、その後の科学技術および急速な進歩に伴い、その見直しが求められてきた。これを受け、厚生労働省では平成13年度に厚生科学研究「医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究」で、生物学的安全性評価に関して基礎的な課題から、ガイドラインの在り方まで広く検討を行ってきた。さらに、平成14年2月には、同研究班の中に「医療用具及び医療材料の基礎的生物学的試験ガイドライン改訂版作成検討会」を設け、生物学的安全性評価の基本的な考え方について検討を重ね、「医療用具の生物学的安全性評価の基本的な考え方」を取りまとめた。この基本的な考え方については、その後、所定の手続をふまえ平成15年2月13日医薬局審査管理課長通知として発出されている。

基本的考え方においては、国際基準であるISO 10993「医療用具の生物学的評価」シリーズに準拠して生物学的安全性評価を行うことを基本としている。ISO 10993シリーズの各パートには、多くの試験方法が列記されているが、それらの方法からどれを選択するかは、記述されていない。その選択は、①試験の原理、②医療用具の使用方法や使用目的、③材料の特性等を考慮して行われるべきである。そこで、本報告書では実際に試験を行う際の便宜のために、市販前の安全性評価として、感度がよく実施が容易な試験方法の具体的な例を示すこととした。しかし、化学の進歩に伴い、今後優れた方法が開発されてくる可能性もあり、継続して、随時検討していくことが必要であると考える。また、用具の使用方法、使用目的、材料の特性等によっては、ここに示した方法が必ずしも適当ではない場合もあり、本報告書に示した方法を強要するものではない。生物学的安全性評価を行う際には、本報告書の各論部分を参考にしつつ、「生物学的安全性評価の基本的考え方」に従って、評価対象の医療用具に最も適切な試験方法を選択し、適切に試験を実施することが求められる。試験試料や試験液の抽出・調製方法によっては、偽陽性または偽陰性の結果となるおそれも考えられるので、常に感度や精度等の各試験方法の持つ特性を考慮して、試験方法の選択の妥当性を説明できることが必要であり、対照となる標準材料がある場合には、標準材料による比較試験を行うことが有用である。

# 第１部　細胞毒性試験

## １.適用範囲

本試験は、医療機器又は原材料の細胞毒性をインビトロで評価するためのものである。

ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices Part 5:Tests for in vitro cytotoxicityには、抽出法（コロニー法及びサブコンフルエント法（MEM Elution法など））、間接接触法（寒天重層法、フィルター拡散法）、直接接触法が含まれている。ここでは、ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices Part5:Tests for in vitro cytotoxicity を参考として適切な試験方法を選定して安全性評価を行う際に有効に活用できるように、過去のデータの蓄積から感度の高い試験方法である抽出法及び直接接触法によるコロニー法について紹介した。

当該機器の接触組織を勘案した時、適切な感度及び再現性が確認されれば、ISO 10993-5に採用されている他の方法で試験を行ってもよい（5.2参照）。ただし、コンタクトレンズ及び眼内レンズの細胞毒性評価で、コロニー法以外の試験法を用いた場合においては、陽性対照材料を用いて、コロニー法と同等以上の感度であることを適切な試験結果により提示することが必要である。

## ２．引用規格

2.1 ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices Part5:Tests for in vitro cytotoxicity

2.2 USP XXIV <87> Biological reactivity tests、 in vitro

## ３．抽出法によるコロニー法

### 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。）の細胞毒性を細胞を用いて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。

### 3.3 試験液の調製

#### 3.3.1 試験試料

1)試験試料は、生化学的又は物理化学的特性等を考慮し、適切な滅菌処理を行う。なお、無菌製品については、この操作を必要としない。

2)エチレンオキサイド滅菌をした時は、エチレンオキサイドが残留しないように、十分ばっ気した後、試験する。エタノール浸漬による滅菌を用いてはならない。

3)試験試料が液体や抽出液の場合は、適切な溶媒や培養液で希釈して試験する。必要な場合、溶媒のみを培養液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 対照材料

1)陰性対照材料

陰性対照材料は、4.4.3に記載され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。

抽出法の場合：高密度ポリエチレンシート（検定済みのもの。入手先は5.5参照）

直接接触法の場合：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.164-08891）

2)陽性対照材料及び陽性対照物質

陽性対照材料は、4.4.3に記載され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（入手先は5.5参照）。検定済みのものを使用する。

陽性対照材料Ａ：0.1%zinc diethyldithiocarbamate(ZDEC)含有ポリウレタン・フィルム

陽性対照材料Ｂ：0.25%zinc dibutyldithiocarbamate(ZDBC)含有ポリウレタン・フィルム

陽性対照物質は、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）

3.3.3 試験液の調製

1)試験試料の1ｇを切断し、出来るだけ細切（約2ｘ15ｍｍ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も試験を行う。

2)細切された試料は、スクリュ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、1ｇに対して、培地（3.4.3の4）10mLの割合で加え、軽く栓をする。

3)培地のｐH7.2～7.4を確認後、37°Cの炭酸ガス培養器内に入れ、合計24時間静置する。

4)抽出容器から、抽出液のみを取り出す。この溶液を100%抽出液とする。

5)100%抽出液を、更に培地で、3倍以下の割合で段階希釈し、試験液とする。

6)表面積を一定にして試料を調製しても良い。その時、いずれの試験材料及び対照材料も厚みを考慮した実表面積は、６ｃｍ$^2$／ｍＬ に

なるべく近い条件で試験を行う。

7)本試験法にない抽出条件での試験を行う時は、試験試料の使用状態を十分に考慮し、細胞毒性に関する安全性を評価する上で適切な抽出条件で実施する。ただし、4.4.3項に規定する条件を満たすことを確認する必要がある。

3.4 試験法

3.4.1 細胞株

細胞株は、次の中から一つ以上を使用する。他の細胞株及び初代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及び陽性対照材料によって判断し、一定レベルの検出感度及び精度があることを確認する必要がある（4.4.3参照）。

①ＣＣＬ１（ＮＣＴＣ　clone929）（以下「L929細胞」と記す。）

②ＣＣＬ163（Balb/3T3　clone A31）（以下「Balb/3T3細胞」と記す。）

③ＪＣＲＢ0603（V79）（以下「V79細胞」と記す。）

試験に用いる細胞については、マイコプラズマ汚染がないこと、細胞の種類や培養条件によってコロニー形成能が異なるので、良好なコロニー形成能を有することを確認すること。

3.4.2 器具及び装置

①炭酸ｶﾞｽ培養器（温度　３７±２°Ｃ、炭酸ガス濃度　５±１％）

②位相差倒立顕微鏡

③実体顕微鏡

④低速遠心分離機

⑤組織培養用フラスコ

⑥組織培養用シャーレ及び各種プレート

⑦滅菌遠沈管

⑧滅菌試験管

⑨血球計算盤

⑩クリーンベンチ等

3.4.3 試薬及び培地

1)細胞培養に適した試薬を使用する。

2)培地は無菌であること。

3)培地及び試薬はメーカーの指示に従った方法で調製し、保存すること。

4)Balb/3T3細胞及びL929細胞を用いる場合には①MEM10培地を使用し、V79細胞を用いた抽出液による試験には②MO5培地を、直接接触法による試験には①MEM10培地を使用すること。他の培地や他の培地成分を加えて試験に使用する場合は、その試験での毒性検出を陽性対照物質及び陽性対照材料によって判断し、一定レベルの検出感度及び精度があることを確認する必要がある（4.4.3参照）

①MEM10培地

EagleのMinimum Essential Medium(MEM)でEarleの平衡塩類溶液を含む培地に、Ｌ－グルタミン（0.292g/L)、炭酸水素ナトリウム(2.2g/L)、及び、牛胎児血清（10%v/v)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良い。

②MO5培地

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（0.11g/L)、Ｌ－グルタミン(0.292g/L)、炭酸水素ナトリウム(2.2g/L)及び牛胎児血清(5%v/v)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良い。

5)平衡塩類溶液は、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝液［ＰＢＳ（－）］を使用する。

6)トリプシン溶液は、5)の平衡塩類溶液に、更に0～0.02%EDTAと0.05～0.25%トリプシン（結晶）を加えて調製する。

7)固定液は、メタノール又は10%ホルマリン液等を使用する。

8)ギムザ染色液（市販）は、使用直前にリン酸緩衝液（M/15、pH6.4）で約20 倍に希釈して使用する。

9)蒸留水は、脱イオン化され、更に蒸留された純度の高いものを使用する。

3.4.4 一般的な操作上の注意

1)微生物による汚染を防ぐため、全て、無菌操作による実験を行う。口でピペットを吸って、細胞、培地、及び、試験溶液等を移してはならない。

2)溶液及び試験試料等は、細胞と接触させる前に、予め37℃付近に温めておく。

3)全てのガラス容器は、組織培養用洗剤で汚れを落とした後、蒸留水で十分に洗う。

4)使用する前に、試験する場所を清潔にする。

5)細胞の履歴を記録する。

6)保存している細胞は、定期的にマイコプラズマ汚染の有無をチェックする。

3.4.5 細胞の継代培養

1)培養フラスコ内で、細胞が単層で増殖し、飽和に近い状態の時、培地を捨てる。

2)細胞を平衡塩類溶液（3.4.3参照）で一回洗う。

3)フラスコ内の平衡塩類溶液を捨てる。

4)トリプシン溶液(3.4.3参照)を加える。(25ｃｍ$^2$フラスコでは、1～2 mL程度。)

5)炭酸ガス培養器にいれ、37° Ｃで1～2分インキュベートする。

6)血清を含む培地を加え、トリプシンの反応を止める。

7)細胞懸濁液を遠沈管に移す。

8)1000rpmで2分遠心する。

9)遠心した上清を捨てる。
10)細胞に2mLの新鮮培地を加えて、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、新しいフラスコに植え込む。
11)新鮮培地を加える。（25ｃｍ$^2$フラスコでは10mL程度）
12)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。
13)細胞株は、凍結保護剤である5～10%ジメチルスルフォキサイド（DMSO）またはグリセリンと血清を含む増殖培地中で保存する。短期間（1年間程度）保存は、-80℃以下の超低温槽で可能であるが、長期間保存は、液体窒素保存とする。

3.4.6 試験操作

1)継代した細胞を、トリプシン処理（3.4.5参照）して、単離細胞を調製し、培地（3.4.3参照）に懸濁する。
2)希釈した細胞懸濁液を60ｍｍシャーレには、100～200個（培地4～8mL）、35ｍｍシャーレには、50～100個（1～3mL）、12穴又は24穴プレートには、40～50個（0.5～2mL）の出現コロニー数になるように細胞を播種する。
3)シャーレ（又はプレート）を37°Cの炭酸ガス培養器内に入れ、4～24時間静置し、細胞をシャーレの底面に接着させる。
4)培地を捨て、10.1項に従って調製した100%抽出液及び種々の濃度の試験液を、60ｍｍシャーレには4～8mL、35ｍｍシャーレには1～3mL、12穴プレートには1～2mL、24穴プレートには0.5～1mLを加える。
5)陰性対照材料及び陽性対照材料の抽出液についても同様に加える。
6)各同一濃度の試験液について、3～8穴あるいは3～8枚ずつのシャーレを使用する。
7)試験液を加えたシャーレ（又はプレート）は、直ちに、炭酸ガス培養器内に入れ、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。Balb/3T3細胞は9～11日間、L929細胞は7～9日間、V79細胞は6～7日間培養を行う。
9)培養終了後、培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後、メタノール又は10%ホルマリン溶液等を加えて固定する。
10)固定後、ギムザ染色液（3.4.3参照）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のを確認後、染色液を捨て、各シャーレ（又は各穴）のコロニー数を数える。
12)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、機械での測定精度等結果の信頼性が確保されていることを確認する。
13)本試験法と異なる固定、染色法やマイクロプレートリーダー等を使用した試験法も可能である。その場合は、陰性対照材料、陽性対照材料Ａ及び陽性対照材料Ｂでの評価は4.4.3の内容を満たす

ことを確認する必要がある。

3.4.7 観察

1)各シャーレ（又は各穴）内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは、実体顕微鏡で観察し、細胞が50個以上集まっている集落について数える。

2)新鮮培地のみで培養したシャーレ（又は穴）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、100%抽出液及び種々の濃度に希釈された抽出液(3.3.3参照)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(%)とする。

4)統計理論式から得られるIC50を、コンピュータを利用して計算することもできる。

5)IC50(%)の値を、試験試料からの抽出液による細胞毒性強度の指標とする。

3.4.8 評価

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良好なコロニー形成能を確認する。

2)陰性対照材料での100%抽出液を試料として試験した時、各シャーレ（又は各穴）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結果、各シャーレ（又は各穴）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)必要に応じて、陽性対照物質（ZDBC）の細胞毒性強度（IC50）を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする（5.4参照）。

5)陽性対照材料Ａ及び陽性対照材料Ｂの抽出液を試験試料と同様に抽出して試験したとき、抽出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IC50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。(5.4参照)

陽性対照材料ＡのIC50：7%未満

陽性対照材料ＢのIC50：80 %未満

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含めること。

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、原材料名等）
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、滅菌方法等）
6)試験液の調製
7)使用した樹立細胞株
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)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)]
11)抽出液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。
12)結果の評価と考察
13)参考文献

## 4．直接接触法によるコロニー法

### 4.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）を播種した細胞に直接接触させ、細胞毒性を確認するための試験である。

### 4.2 試験の要約

試験試料をシャーレの底に密着させ、その上に細胞を播種し、培養後にコロニー形成能を評価する。

### 4.3 試験試料

1)3.3に準じて、試験試料を滅菌する。
2)60ｍｍ、35ｍｍのシャーレ、又は、12穴、24穴プレートのいずれかの大きさに合うように試験試料を切断し、円板又は半円板の試料を最低４枚ずつ作製し、重量及び表面積を測定する。
3)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。
4)試験試料の使用目的に適切な滅菌処理を施す。
5)試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料Ｂは、シャーレ（又は穴）によく密着させる

### 4.4 試験法

#### 4.4.1 試験操作

1)細胞株はV79細胞を、培地はMEM10培地（3.4.3参照）を用いる。
2)60ｍｍシャーレには100～200cells　（培地4-8mL）、35ｍｍシャ

ーレには50～100cells（培地2～3mL）、12穴プレートには40～50cells（培地1～2mL）、又は、24穴プレートには40～50cells（培地0.5～1.0mL）を加える。

3)シャーレ（又はプレート）を37°Cの炭酸ガス培養器内に入れ、6～7日間静置して培養する。

4)培養終了後、培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後、試験試料に適した固定液で固定する。

5)固定後、4.3項に従って調製されたギムザ染色液を加え、コロニーを染色する。

6)コロニーが良く染色されているのを確認後、染色液を捨て、各シャーレ（又は穴）のコロニー数を数える。

7)学会等で公的に認められ、安全性評価のための細胞毒性試験として適切な方法であれば、固定、染色法については本試験法と異なる方法で行うことができる。

4.4.2 観察

1)培養用シャーレ（又は穴）に直接細胞をまいた時に形成した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)試験試料に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数を数え、コントロール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。

4.4.3 評価

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）を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする。

3)試験試料に直接細胞を撒いた時のコロニー形成率が＜30%で、抽出液でのIC50が＞100%であった時、試験試料の抽出を72時間行い、4.4.1項に従って、再度、抽出液の試験を行う。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時間抽出液での試験を行う必要はない。

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含めること。

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、原材料名等）

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資）

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)使用した樹立細胞株
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)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)]
11)直接接触法での試験結果：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）
12)結果の評価と考察
13)参考文献

## 5.参考情報

### 5.1 細胞毒性試験の位置づけ

細胞毒性試験は、全てのカテゴリーの製品について評価する事が義務づけられており、生物学的毒性評価の中でも重要な位置をしめている。

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。

しかし、近年、細胞培養を用いた試験は、感度、経済性、効率の点で、in vivo実験より優れていることから、粘膜刺激試験等の動物実験代替法として期待されている。バイオマテリアルの分野においても、従来の伝統ある方法のみにとらわれることなく、科学的な根拠に基づいた精度の高いデータを得るための試験法を取り入れることが重要である。

### 5.2 各種細胞毒性試験方法の特徴

医用材料を用いた細胞毒性試験には、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、材料の物理的な重み等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時に反応するため、不安定な化合物例えば過酸化物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、寒天重層法やその改良型と

いわれているミリポアフィルター重層法がある。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い、フィルター法も寒天重曹法と同程度かそれ以下の検出感度である。判定法はスコアー表示に留まり、半定量的である。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用具へ適用するには不適切である。

培地抽出液を用いる方法は最も一般的に行われている方法である。陽性対照材料Bについて、無血清MEM培地を用いて6cm$^2$/mlで、37℃、24時間抽出した溶液について、 USP XXIV <87> Biological reactivity tests、 in vitro（以下、Elution Test）に従って試験を行うと、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、細胞毒性は不合格判定となる。陽性対照材料A及びBについて、蒸留水を用いて6cm2/mlで、37℃24時間抽出した溶液を Elution Testで評価すると、陽性対照材料A及びB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。従って、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。諸外国のガイドラインでは、サブコンフルエントな増殖段階の細胞を用いており、細胞毒性強度の表示に、生細胞による色素の取込み（ニュートラルレッド）の程度を吸光度で測定して評価する定量的な方法や細胞形態変化の肉眼観察による方法等を用いて、細胞毒性強度を３～５段階のスコアで表示する半定量的方法がある。試験試料の使用部位や接触期間等を考慮して、当該試験方法を適用することの妥当性を明らかにすることができれば、これらの方法で試験を行ってもよい。

本報告書では、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、コロニー法を採用した。

5.3 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、陽性対照材料と陽性対照物質を導入した。採用した陽性対照材料は、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である。このような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な位置を知る、②その相対的な位置から組織刺激性の程度を予測する、ことにある。

5.4 陽性対照物質及び陽性対照材料のIC50

L929細胞、Balb/3T3細胞及びV79細胞を用いた時のIC50の値の幅を参考のため記す。

陽性対照物質（ZDBC）のIC50（μg/mL）

| | L929細胞 | Balb/3T3細胞 | V79細胞 |
|---|---|---|---|
| ZDBC | 2.5-5.5 | 0.2-0.4 | 1.0-4.0* |

陽性対照材料A及びBのIC50（%）

| | L929細胞 | Balb/3T3細胞 | V79細胞 |
|---|---|---|---|
| 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はMEM10培地を使用したV79細胞の場合、MO5培地使用時に比べて、弱い細胞毒性を示す（例：ZDBCのIC50（μg/mL）4～8μg/mL、陽性対照材料AのIC50(%)：3～8%、陽性対照材料BのIC50(%)：＞100%）。

5.5 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　事務部　標準材料担当

電話 0463-82-4751、 FAX0463-82-9627、

e-mail: RM.Office@fdsc.or.jp

5.6 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IC50(%)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本報告書に従って抽出し、Balb 3T3細胞を用いたコロニー法でIC50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、標準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、IC50(%)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、IC50(%)が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、IC50(%)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IC50(%)を示す強い標準材料でも皮膚刺激性はみとめられなかった。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。

| 陽性対照材料との比較 | 細胞毒性強度と予測される生物学的反応 |
|---|---|

| | |
|---|---|
| 100%以上 | 細胞毒性は無か非常に弱い。（備考参照） |
| 陽性対照材料Ｂより弱い | 弱い細胞毒性が示された。<br>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。<br>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。<br>筋肉組織に対して炎症反応がおきる可能性が高い。 |

まれに、Draize　score４以下の眼粘膜刺激がおこりうる。例えば、コンタクトレンズ材料で、24時間抽出液を試験したコロニー法でのIC50は100%以上であったが、同材料での72時間抽出液を試験するとIC50は89%を示した。この材料のウサギ眼装用試験でのDraize　scoreの平均は3.2を示した。

## 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年）

2) A. Nakamura、 Y. Ikarashi、 T. Tsuchiya、 M.-A. Kaniwa、 M. Sato、 K. Toyoda、and M. Takahashi: Correlations among chemical constituents、 cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. Biomaterials 11:92-94 (1990)

3) Y. Ikarashi、 K. Toyoda、 N. Ohsawa、 T. Uchima、 T. Tsuchiya、 M.-A. Kaniwa、 M. Sato、 M. Takahashi and A. Nakamura: Comparative studies by cell culture and in vivo implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. J. Biomed. Master. Res. 26:339-356 (1992)

4) T. Tsuchiya、 Y. Ikarashi、 H. Hata、 K. Toyoda、 M. Takahashi、 T. Uchima、 N. Tanaka、K. Sasaki and A. Nakamura: 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)

5) T. Tsuchiya、 T. Arai、 J. Ohhashi、 K. Imai、 H. Kojima、 S. Miyamoto、 H. Hata、 Y. Ikarashi、 K. Toyoda、 M. Takahashi and A. Nakamura: 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)

6) T. Tsuchiya、 Y. Ikarashi、 T. Arai、 J. Ohhashi、 K. Isama and A. Nakamura: In vivo toxic tissue/biomaterials responses: Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment. Clinical Materials 16:1-8 (1994)

7) T. Tsuchiya、 Y. Ikarashi、 T. Arai、 J. Ohhashi and A. Nakamura: Improved sensitivity and decreased sample size in a cytotoxicity test for Biomaterials: A modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. J. Applied Biomaterials 5:361-367 (1994)

8) T. Tsuchiya、 Y. Ikarashi、 K. Toyoda、 T. Uchima、 T. Miyahara、

M. Takahashi and A. Nakamura: Toxicological evaluation for biomaterials: Examinations of radiation vulcanized natural rubber latex. Radiat. Phys. Chem. 39:541-545 (1992)
9) T. Tsuchiya: 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)
10) 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)
11) 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)
12) T. Ohno *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE - I. Overview of the study and analyses of validations of ED50 values、 Alternatives to Animal Testing & Experimentation (AATEX) 5、 1-38(1998)
13) N. Tanaka *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE - IV. Details of colony formation assay、 AATEX、 5、 74-86(1998)
14) K. Isama、 A. Matsuoka、 Y. Haishima and T. Tsuchiya: 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を引き起こす可能性（感作性）を評価するためのものである。ここでは、ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices Part 10:Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity 及び ISO10993-12 Biological evaluation of medical devices Part12:Sample preparation and reference materials を参考として適切な試験方法と抽出方法を選定し、安全性評価を行う際に有効に活用できるように、過去のデータの蓄積から検出力の高い試験法として、アジュバントを用いる Maximization Test 及び Adjuvant and Patch Test（別名：Scratched skin method）を記述した。

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

2.1　ISO 10993-10 (1995) Biological evaluation of medical devices　Part 10: Tests for irritation and sensitization

2.2　ISO 10993-10(2002) Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity

2.3　ISO 10993-12 (2002) Biological evaluation of medical devices—Part 10: Sample preparation and reference materials

## ３．試験試料と試験方法の選択

3.1 原則

Maximization Test は最も高感度な方法とされており、試験試料（最終製品又は原材料）からの抽出物が皮内投与可能な適当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）には、原則として皮内投与による Maximization Test によって試験を行うことが望ましい。試験試料からの抽出物が皮内投与可能な適当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おこして注射針を通過しない場合）は Adjuvant and Patch Test によって試験を行う。

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方法を選択することが必要である。

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影響を与える。試験試料と試験の選択の関係に関しては図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 試験試料と試験液の調製

3.2.1 金属又はセラミックス

金属又はセラミックスについては、まず、既知の知見を利用する (6.3 参照)。

すなわち、試験試料を構成する金属のイオンとしての感作性が Maximization Test あるいは Adjuvant and Patch Test などによる試験によって既に確認されている場合は、あらためて試験を行う必要はない。

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、通常の Maximization Test あるいは Adjuvant and Patch Test などによって感作性の強さを評価する(6.2.3 参照)。

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、蒸留水又は適切なアルコールに溶解して Maximization test により感作性試験を実施する。

3.2.3 低分子有機化合物

低分子有機化合物については、試験の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 Maximization test により感作性試験を実施する。溶媒としては、植物油、dimethylsulfoxide (DMSO)又は蒸留水が適当であるが、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。

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溶媒による抽出物の溶液を試験液として Maximization test 又は Adjuvant and patch test により感作性試験を実施する (6.4 参照)。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、単回かつ一時接触 (24 時間以内) 医療機器については、有機溶媒以外の溶媒による試験結果がすでにある場合には、それによるリスク評価も可能と考えられる。

抽出溶媒は、ISO 10993-10 (1995) Annex B.2.10 に記載されているものから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(6.5 参照)。ただし、①溶媒中で試験試料が溶解したり、原型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、他の適当なものを選ぶ。クロロホルム等の有機塩素系溶剤は環境に対する負荷が大きいので、代替抽出溶媒としてシクロヘキサン：2－プロパノール=1:1 混液を使用してもよい。

抽出は、細切した試験試料にその重量の 10 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 時間以上とする。

有機溶媒抽出液からの試験液の調製方法には、以下の二通りが考えられる (6.6 参照)。

第 1 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、dimethylsulfoxide (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行う。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。局所適用濃度が感作の成否における重要な因子であり、ハザードの検出のためには被験物質の濃度を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ので、抽出物濃度は一般的に10%を目安とし、試験に使用した濃度について、その設定理由を説明する。

第2法

クデルナ・ダニッシュ濃縮器(目盛り付き)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、溶媒留去後適切な溶媒に溶解して1mLに調製し、それを試験液として感作性試験を行う（6.8参照)。

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、又は第3部　遺伝毒性試験　6.5を参照して算出する。

## 4. Maximization Test

### 4.1 試験法

#### 4.1.1 試験動物と動物数

体重400g前後の健康な若齢白色モルモット(通常1～3カ月齢)(6.10参照)。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、対照群とも最低5ないし10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 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 2x4 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(6.11参照)。

(a) 蒸留水と Freund's Complete Adjuvant (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

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-phenylenediamine(CAS No.106-50-3)、1-chloro-2、4-dinitrobenzene (CAS No.97-00-7)、 potassium dichromate (CAS No.7778-50-9)、neomycin sulfate (CAS No.1405-10-3)、nickel sulfate (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。

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）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%）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。

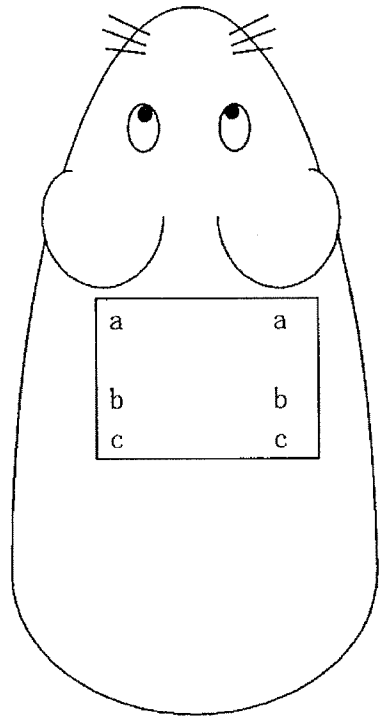



図-2　皮内注射及び貼付による感作誘導部位
a、b及びcは皮内注射部位、□は貼付部位(2 cm×4 cm)を示す。

4.1.3 惹起

閉塞貼付後 2 週間目に、試料液を適当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。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 0.1mL を個々のモルモットの皮膚に適用する。

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(6.12 参照)。

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。

4.1.4 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、Draize の評点などをさす(6.13 参照)。

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(6.14 参照)。

表-1　Draizeによる皮膚反応の評点

| | |
|---|---|
| 紅斑及び痂皮の形成 | |
| 紅斑なし | 0 |
| 非常に軽度な紅斑(かろうじて識別できる) | 1 |
| はっきりした紅斑 | 2 |
| 中等度ないし高度紅斑 | 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] |
| 浮腫の形成 | |
| 浮腫なし | 0 |
| 非常に軽度な浮腫(かろうじて識別できる) | 1 |
| 軽度浮腫(はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる) | 2 |
| 中等度浮腫(約1 mmの膨隆) | 3 |
| 高度浮腫(1 mm以上の膨隆と曝露範囲を超えた広がり) | 4 |
| | [最高点4] |
| | [紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点　8] |

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含めること。

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、原材料名等)
4) 使用した対照物質（陽性対照物質）
   (例：対照物質名、入手先、製造番号等)
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
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。

(試験結果の総括表の例)

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 |
| 5% | 5 | 24 | 100 | 3.1 |
| | | 48 | 100 | 4.0 |
| | 0.5 | 24 | 80 | 1.5 |
| | | 48 | 90 | 2.0 |
| | 0.05 | 24 | 20 | 0.2 |
| | | 48 | 20 | 0.2 |
| | 0.005 | 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時間後

*2 (陽性動物数／当該群の動物総数) x100

*3 当該群における Draize 基準等による反応評価点の総計／動物総数

第2法の総括表の例 (抽出率：0.15%)

| 感作濃度 | 惹起試料液希釈率 | 観察時間 (hr)*1 | 評価 | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 陽性率*2 | 平均評価点*3 |
| 1 (0.15%) | 1 | 24 | 100 | 3.6 |
| | | 48 | 100 | 3.2 |
| | 1/2 | 24 | 100 | 2.2 |
| | | 48 | 100 | 2.0 |
| | 1/4 | 24 | 100 | 1.2 |
| | | 48 | 100 | 1.0 |
| | 1/8 | 24 | 100 | 1.0 |
| | | 48 | 0 | 0 |
| | 1/16 | 24 | 0 | 0 |
| | | 48 | 0 | 0 |

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間後

*2 (陽性動物数／当該群の動物総数) x100

*3 当該群における Draize 基準等による反応評価点の総計／動物総数

## 5. Adjuvant and Patch Test

### 5.1 試験法

#### 5.1.1 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 x4 cm)の 4 隅に、4.1.1(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 0.1mL 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。5.1.2 惹起

上記適用後2週間目に、4.1.2 と同様に適用する。

5.1.3 評価

惹起後、4.1.3 に従って評価する。

5.2 試験報告書

4.2 に従って報告書を作成する。

## 6．参考情報

6.1 背景

新しい医療機器及び医用材料に対して感作性試験を行う目的は、それから遊離してくる化学物質のヒトでの接触アレルギーのリスクを前臨床段階で予知することである。適切な試験を行い、感作性が認められた場合には、感作性物質の強さを事前に評価して適切な対策をとることにより、ヒトでの接触アレルギーのリスクを減らすことが必要である。

接触アレルギーの発現に影響を及ぼす因子としては、1)化学物質の感作性の強さ、2)その物質の製品中の濃度と溶出性、3)製品の使用形態（使用頻度や接触時間）、及び 4)使用者の体質等が挙げられる。この中で 1)は動物を用いた感作性試験、2)は化学分析で明らかにすることによりヒトへ適用する前に検出可能である。

ここでは MR1 惹起濃度を求めることが出来るような、モルモットによるアジュバントを用いた皮膚感作性試験デザインを紹介した。本法を用いることにより感作性の有無のみならず、陽性結果が得られた場合には MR1 惹起濃度から最低感作濃度を推測することができ、ヒトでの暴露量をコントロールする目安を得ることが出来る。さらに、試験試料中に含まれる感作性物質の含有量を抽出物量から推定することにより、ヒトでのリスクを推測することが可能となる。

今回、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」（平成7年6月27日付薬機第99号）（以下、前ガイドラインとする）に対して主として以下のような改訂を加えることで、感作性のハザード検出及びリスク評価を適切に行うための参考になると考える。

1)試験の選択に関してフローを示した。

2)水又はアルコールに溶解する材料・製品は、溶解して試験するとした。

3)有機溶媒による抽出物は、従来2種類であったものを、一番効率よく抽出物が得られるものを一つ選択するとした。

4)Adjuvant and Patch test については、粉砕物での試験は削除し、抽出した試験液での試験方法を記載した。

5)有機溶媒抽出での2試験法を紹介した。

6.2 試験法

皮膚感作性試験は体系的に2つに区分することができる。1つは免疫賦活剤であるフロイント完全アジュバント(FCA)を併用してアレルギー状態を引き起こしやすくするアジュバント法であり、他の1つはアジュバントを用いない非アジュバント法である。アジュバント法は、感作性に対する動物での感受性を高め、低感作性物質の検出を可能にし、ヒトでの潜在的リスクの予測を高感度で検出する目的で行われている。佐藤らは、アジュバント法(Maximization Test 及び Adjuvant and Patch Test)と非アジュバント法(Buehler Test 及び Open Epicutaneous Test)で試験法の比較を行い、アジュバント法は非アジュバント法よりも感度が高く、さらに、感作濃度を固定して、惹起濃度を変えて皮膚反応の程度を評点づけした場合、惹起濃度依存的に感作陽性反応を捉えることが出来ると報告している（文献 2 参照)。他にも FCA を用いる試験法の感度が高いとする報告は数多くあるが、それらの中でも Maximization Test が最良とする報告が多い（文献 3-8 参照)。また、ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices - Part 10：Tests for irritation and sensitization でも、Maximization Test を最も高感度な方法として推奨している。

Maximization Test の優秀性は多くの研究者の認めるところであるが、感作誘導過程で試料を皮内注射して感作誘導を行うため、水あるいは FCA に不溶の結晶性粉末や金属材料、あるいはポリマー樹脂などへの直接の適用は困難であり、さらには試料を油中水型（W/O）のエマルジョンにする操作も必要であるため、試料の感作濃度も制限される等の問題がある。Adjuvant and Patch Test は、Maximization Test における感作性物質の皮内注射操作を全て経皮塗布に置き換えた改良法で、検出感度も高い試験法とされている（文献 2 参照）が、「材料の同一溶出液について比較した結果、Adjuvant and Patch Test は、Maximization Test より低い評価点を示した」。

このようなことから、ここでは試験方法の選択順位としては、Maximization Test を第一選択とし、若干の工夫によっても本法を適用できない場合は、Adjuvant and Patch Test を推奨している。

6.3 無機材料の感作性試験

金属材料あるいはセラミックスなどの無機材料によるヒトでの感作は、材料の腐食、摩耗、あるいは溶出などによって体内に取り込まれた金属イオンによるものである。Ni、 Cr、 Cu、 Hg、 Co などによるヒトでの感作例はよく知られており、他方、Fe、 Al、 Ti、 Zn、 Pt などの感作例はまれである。このように、金属イオンの種類によって感作性の強さは異なるが、材料としての感作性（文献 9 参照）を決定するもう一つの要因は材料からの金属イオンの溶出性（摩耗や腐食による結果も含む）（文献 10 参照）である。しかし、このような生体内の長期間の材料の運命を予測したり、溶出や腐食、摩耗をシミュレートすることは現段階では難しい。単に、生理食塩液あるいは緩衝液で抽出して感作性試験を行っても、生体反応のシミュレーションとはかけ離れていて意味がない。それは、Ni-Cr 合金をこのような操作によって試験しても陽性結果を得ることはできないが、ヒトでの感作例は数多く報告されていることから容易に理解されよう。

以上のことを前提として、無機材料の感作性試験は、金属イオン溶液を 10～25%（又は可溶最高濃度あるいは最大無刺激濃度）の水溶液で出来るだけ中性に近いものを用いて行うのが妥当であると考えられる。

6.4 ポリマー用具に有機溶媒抽出を選択する理由

ヒトでアレルギー性接触皮膚炎事故を引き起こした製品と、それら製品中における原因物質の残留量を下の表に示した（文献 1 参照）。仮にこれらの事故製品を、ISO 10993-10 (1995) B.2.10、 a) 及び b)に従って試験し、材料 1g に対して、生理食塩水又は植物油 10mL の比で抽出したときの抽出率が 100%と仮定すると、セーターから抽出された PCPHs の溶媒中の濃度は 0.6～0.8ppm となり、感作性試験（Maximization Test）の皮内注射時（感作段階）の PCPHs 乳化物（FCA:試験試料＝1:1）の濃度は 0.3～0.4ppm ということになる。さらに、他の化合物についても同様に計算してみると、IPPD を除くすべての化合物で、感作濃度が文献 1 で求められた最低感作濃度以下の値を示した。このことは、ISO 10993-10 (1995) B.2.10、 a) 及び b)に従って試験した場合、試験液中の感作性物質の濃度が最低感作濃度以下のために動物実験で感作が成立せず、その結果、陰性と判断される可能性が高いことを示唆している。従って、試験試料中に含まれる未知の微量な感作性物質を動物実験で検出するには、抽出効率が高く、濃縮可能な有機溶媒で抽出して、その濃縮物について実験するのが有効な手段である。一方、有機溶媒抽出では、有機溶媒を除去する操作を伴うことから、モノマー類などの揮発性の成分は濃縮過程で失われてしまう可能性があるため、感作性が検出されないことがある場合が考えられるので留意が必要である。

事故例における製品中の残留量と最低感作濃度を比べると、Naphthol-AS を除き製品中の残留量は最低感作濃度を上回っている。このことは、有機溶媒での抽出液を元のサンプル量に戻したとしても感作性を検出できることを示している。つまり、1g のサンプルを 10mL の有機溶媒で抽出し、濃縮して 1mL とした場合、抽出効率を 100%と仮定すると、試験液中の感作性物質の濃度は製品中の濃度に等しくなる。この方法では抽出率（抽出物量）に関わらず、少量の試験試料で Maximization Test を実施することが可能である。

これらの事例（高頻度・長期接触製品）とは異なり、単回かつ一時的接触（24 時間以内）医療機器は、感作性リスクは低いと考えられること、仮に遅延型アレルギーが惹起されたとしても、リスクマネージメントは容易であると考えられる。したがって、生食及び綿実油試験液での感作性試験がすでに実施されており、その結果が陰性の場合には、強い感作性はないと考えられることから、当該医療機器の感作性に関する評価も可能であると考えられる。

| 原因物質 | 製品中の残留量 (ppm) | 事故製品 | 乳化物中の化合物の含有量 (ppm) | 最低感作濃度 (ppm) |
|---|---|---|---|---|
| 1) PCPHs | 6－8 | セーター | 0.3・0.4 | 1 |
| 2) DPTU | 100-200 | テープ | 5-10 | 20 |
| 3) MBT | 678 | ゴム長靴 | 33.9 | 500 |
| 4) IPPD | 5、000-6、000 | ゴムパッド | 250-300 | 10 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 5) MBTS | 285 | ゴム長靴 | 14.3 | 100 |
| 6) Naphthol-AS | 4、600 | 寝間着 | 230 | 10、000 |

6.5 試験試料の抽出溶媒の選択について

本報告書では、抽出溶媒としてメタノール又はアセトンを推奨している。前ガイドライン当初案では、水、メタノール、アセトン、クロロホルム及びヘキサンの中から3種類選択するようになっていた。その理由として、感作性物質と、それが含まれる材料の組み合わせで至適溶媒は変わることが経験上分かっていたからである。しかし、それでは手順が不明確で煩雑になること、また、水溶性感作性物質の抽出にもメタノールは有用であり、他方、無極性感作性物質の抽出にはアセトンで大抵用が足りるとの理由から、前ガイドラインではこの2種類を推奨した。その後、種々の事例が蓄積された結果、適切な1種の溶媒で抽出し評価することで材料の感作性強度を評価可能であることが明らかになってきた。そこで、ここでは溶媒の種類を最も抽出効率の高い溶媒（混液を含む）1種類とした。

6.6 有機溶媒抽出液からの試験液調製法選択の留意点について

ポリマー樹脂における有機溶媒抽出液からの試験液調製法については、第1法、第2法があるが、各法のリスク評価とハザード検出における特性を理解のうえ、調製法を選択することが必要である。

第1法は、試験液中の抽出物濃度を調整でき、高濃度曝露によるハザードの検出が可能である点でリスク評価にとってより望ましい試験法であり、埋植医療機器で生物学的安全性に関する情報のない新規の原材料を使用する場合など、ハザードの検出が必要な場合に優れた方法である。しかしながら、ある程度の抽出物が得られないと試験が実施できない。

第2法は、抽出物の量に関わりなく試験を実施することが可能であり、第一法では抽出物が十分に得られない場合や小さい機器の場合のリスク評価に有用である。この方法で感作性がなかった場合には臨床使用において少なくとも大きな感作性リスクはないと考えられるが、ハザードの検出は必ずしもできない点、弱いながらも感作性が検出された場合には感作性の程度を評価することはできないのでリスク評価が難しくなることが考えられる。この場合、試験試料からの抽出液の濃縮率を高める（例えば、試験試料1g当たりの試験液量を0.1mLに調製する）等の工夫を加えることで、定量的なリスク評価が可能になると考えられる。特に、大型で頻回使用品については、このような工夫も考える必要がある。

6.7 試験液の調製溶媒について

試験液の調製溶媒は、抽出物を可溶化し、透過性を高めることなどを考慮して選択すべきである。

感作性試験については、試験試料を溶解させて投与した方が検出感度が高いことが知られている。通常、水、植物油（オリブ油、綿実油及びゴマ油など）、DMSO、アセトンなどが一般的に汎用されている。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ことが多い。

6.8 試験液の調製について

多くの事故例は、製品中の感作性物質含有量Y（重量/重量%）の値が動物実験で得られた最低感作濃度LD（重量/容量%）の値よりも大きい場合に起こっている。いいかえれば、製品中の感作性物質を100%抽出できると仮定した時、感作性のリスクのある製品においては、感作性物質含有量 Y(重量/重量%)≧ 最低感作濃度LD(重量/容量%)の時に動物実験結果は陽性となるはずである。すなわち、最終的な試験溶液の容量(例：VmL)は採取試料量(例：W g)と同じか小さくなければ、陽性結果は得られないことになる。通常は、試料の10倍容量の溶媒を使って抽出を行うのが通例であるので、そのままの抽出液を試験液とした場合は、上の条件を満たさないことになる。そこで、このような場合は少なくとも 1/10量まで濃縮する必要がある。第2法に記載した材料Agから試験液を調製する方法について以下に例示する。材料Agから得られた抽出物重量を測定し、抽出率を記録する。この試料を10mLの溶媒を用いて数回抽出を繰り返し、抽出液を合わせ、クデルナ・ダニッシュ濃縮器を用いて最終AmLにまで濃縮したものを試験液として感作誘導を行う。投与部位(c)においては、最終濃度を試験液の2倍とする必要があるために、材料2xAgからの抽出物を最A1mLに調製する。

6.9 試験に必要な試験試料量について

試験に必要な試験試料量は、第1法による従来の抽出物で試験する場合には、極端な事例では5 kgの試験試料を必要とする場合もあり、使用実態とは大きくかけ離れるケースもあるとの批判も大きかった。これまでの事例の蓄積により、第2法でもリスク評価が可能であると判断され、今回の改訂ではこの試験も採用することとした。第2法においては、試験試料7gから得られる抽出物で、計算上は、試験群、対照群各10匹の動物について試験可能である。操作過程でのロス等も考慮した具体的試験法を図3に示した。

6.10 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。

Maximization Test や Adjuvant and Patch Test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、さらに、豊富なバックグランドデータの蓄積があることなどが主たる理由である。動物の体重は重要な要因であり、余り小さいと操作がやりにくいし、あまり大きい（600g 以上）と反応性が鈍くなるので、実験開始時の体重は 400g 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、しかも未経産の動物を使用する。

日本では1群最低5匹の動物数を使用して、適切な結果が得られた場合は可とするが、欧米では、1群につき最低10匹が必須とされる場合がある。

6.11 感作誘導について

Magnusson and Kligman の Maximization Test では、一ケ所の皮内投与量は 0.05mL であるが、OECD ガイドライン及び ISO、 BS、医薬品毒性試験ガイドラインなど、いずれも 0.1mL を採用している。皮内投与量を決定する肝心な点は、投与局所に潰瘍を生じるかどうかではなく、感作性物質が十分に投与され、検出されるべき感作性物質が正しく検出できるかどうかである。2.2.2 に述べたことを参考に皮内投与量を決定することが望ましい。

投与濃度は感作成立の重要な因子である。投与部位(c)において、 最終濃度を「(b)試験液」と同濃度にするためには(b)の 2 倍濃度液を作る必要があるが、これを得るのが難しい場合には、(b)試験液を用いることもやむをえない。また、(c) 試験液の溶媒が植物油又は DMSO の場合、FCA との等量混合物では乳化できない場合には、適量の蒸留水又は生理食塩液を加えて乳化して差しつかえない。

なお、エタノールは接触アレルギーを引き起こす可能性があるため、感作誘導段階で用いるのは避けた方が良い（文献 11-12 参照)。

感作性試験における重要な点は、十分な量の被験物質を感作誘導期間に接触させることである。余りにも少ない量ではその物質のアレルギー性に関する情報を得ることができない。つまり、フロッキングや局所の刺激性などにより皮内投与量が著しく少ない場合には、十分な誘導処置が行われたとは言えないので、これを補完するような処置を追加する。例えば、皮内投与部位に Adjuvant and Patch Test と同様の処置を行うなどである。

惹起の際には適切な陰性対照群を設定して、皮膚反応の結果を比較することは重要である。これは、アジュバントを用いる方法では、刺激に対する閾値が下がることが知られているからである。

6.12 被験物質の適用方法について

惹起反応を引き起こしやすくするためには、試料は完全に溶解した状態で塗布するのが望ましいことから、試料が水系のものでしか溶解しない場合には水系を使用せざるを得ない。しかしながら、水溶液は皮膚との親和性が低いことから、ワセリンなどの皮膚親和性の高い溶媒に溶解する方が望ましい。例えば、一般的に水溶性と考えられている金属塩の惹起反応において、金属塩の水溶液よりもエタノール含有金属塩溶液の方が皮膚での浸透性が高いため惹起反応を検出しやすいことが知られている（文献 13、14)。試験物質の溶解性と試験液の皮膚透過性は異なる現象であることを認識し、適切な溶媒の選択を行う必要がある。なお、まれにワセリン中に刺激性あるいは感作性物質が混在していることがあるので、いろいろなワセリンで試し、皮膚に反応が出ないものを選択する必要がある。

惹起は、ヒトパッチテストと同様に、試料を閉塞貼付することにより実施するが、実際にヒトの皮膚で接触アレルギー性反応が惹起されるのは、開放で接触する場合が多いことを考えると、惹起段階で閉塞貼付にする必要はないと考えられる。さらに、閉塞貼付ではモルモットの胴体を伸縮包帯等で巻きつけて固定する必要があるため、直径 0.8cm のような小型リント布を用いても、背中

に適用出来るのはせいぜい４点が限界であるのに対し、開放適用では、正中線を対称として左右の背中に６点以上の惹起塗布が出来る利点がある。また、閉塞貼付では絆創膏などの影響で皮膚反応の判定が難しい場合もある。なお、開放塗布に適する溶媒としては、塗布部位の広がりを防ぐ意味で揮発性のものが良く、かつ一次刺激性のないものが望ましい。この条件を満たす溶媒としては、エタノール及びアセトン等が挙げられる。

惹起時には複数の濃度の試料液を１匹の感作動物に適用するのがよい。どの希釈率まで陽性になるかを一度に判定できるので、一度に沢山の情報が得られ、感作の状態を正しく把握することができる。複数回に分けて惹起する場合には、動物の感作状態が一定状態で続いていることが前提になるが、それを保証することは難しいので、可能な限り一度に実施するのが良いと考えられる。

6.13 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。本報告書ではDraizeの判定基準を例示した。

6.14 感作性の強さの評価について

本報告書では、感作性の強さを３つのパラメーター、すなわち、1)皮膚反応の平均評価点、2)最低感作濃度、及び 3)MR1 惹起濃度を求めて、総合的に評価することを推奨している。

皮膚反応の平均評価点は、皮膚反応（紅斑及び浮腫）の程度をスコアー化し、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（文献 2 参照）。

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 MR1 惹起濃度（皮膚の平均評価点がおよそ 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（文献 1 参照）ことから、MR1 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。すなわち、適切な公比で希釈した複数の溶液をモルモットの背中に惹起塗布し、48 時間目における塗布部位の皮膚反応を観察し、陽性反応が認められる MR1 惹起濃度を求める。惹起濃度と皮膚の平均評価点とに用量相関性が認められた場合、その MR1 惹起濃度からおおよその最低感作濃度を予測できる。なお、化学物質の物理化学的性質（皮膚透過性、表皮の蛋白との結合性）によっては最低感作濃度を予測できない場合もあるので注意を要する。

なお、MR1 惹起濃度において“皮膚の平均評価点がおよそ 1.0 を示すところ”とした根拠は、1)皮膚の平均評価点 1.0 は、ほぼ全例の動物で陽性反応が認められること、2)陽性率（感作率）60%までは皮膚の平均評価点と陽性率はほぼ等しいが、それを越えると、皮膚の平均評価点は陽性率（感作率）を上回り、皮膚の平均評価点の方が、感作の強さをより良く表現している（文献 1 参

照）などの理由からである。

## 7．参考文献


1) A. Nakamura、 J. Momma、 H. Sekiguchi、 T. Noda、 T. Yamano、 M.-A. Kaniwa、 S. Kojima、 M. Tsuda、 and Y. Kurokawa: 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) Y. Sato、 Y. Katsumura、 H. Ichikawa、 T. Kobayashi、 T. Kozuka、 F. Morikawa、 and S. Ohta: A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. Contact Dermatitis、 7、 225-237 (1981)

3) D. W. Roberts: Structure-activity relationships for skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates. Contact Dermatitis、 17、 281-289 (1987)

4) Maurer、 T.、 Thoman、 P.、 Weirich、 E. G. & Hess、 R.: Predictive evaluation in animals of the contact allergenic potential of medically important substances. Ⅰ. Comparison of different methods of inducing and measuring cutaneous sensitization. Contact Dermatitis、 5、 1-10 (1979)

5) 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)

6) Magnusson、 B. & Kligman、 A. M: Usefulness of guinea pig tests for detection of contact sensitizers. In advances in Modern Toxicology. vol. 4、 Dermatotoxicology and Pharmacology. eds. F. N. Marzulli & H. I. Maibach、 pp. 551-560、 Hemisphere publishing Co.、 Washington & London (1977)

7) The rose sheet: Guinea pig maximization test performs "best overall" of five methods of identifying weak contact allergens. FDA-contracted comparative study findings. 1(September 8)、 3-5 (1980)

8) 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)

Ikarashi、 Y.、 Tsuchiya、 T.、 Toyoda、 K.、 Kobayasshi、 E.、 Doi、 H.、 Yoneyama、 T. & Hamanaka H.: Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. Mater. Trans. Accepted .

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. Accepted.

11) van Ketal、 W. G & Tan-lim、 K. N: Contact dermatitis from ethanol. Contact Dermatitis、 1、 7-10 (1975)

12) Stotts、 J. & Ely、 W. J.: Induction of human skin sensitization to ethanol、 J. Invest. Dermat.、 69、 219-222 (1977)

13) 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)
14) 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)

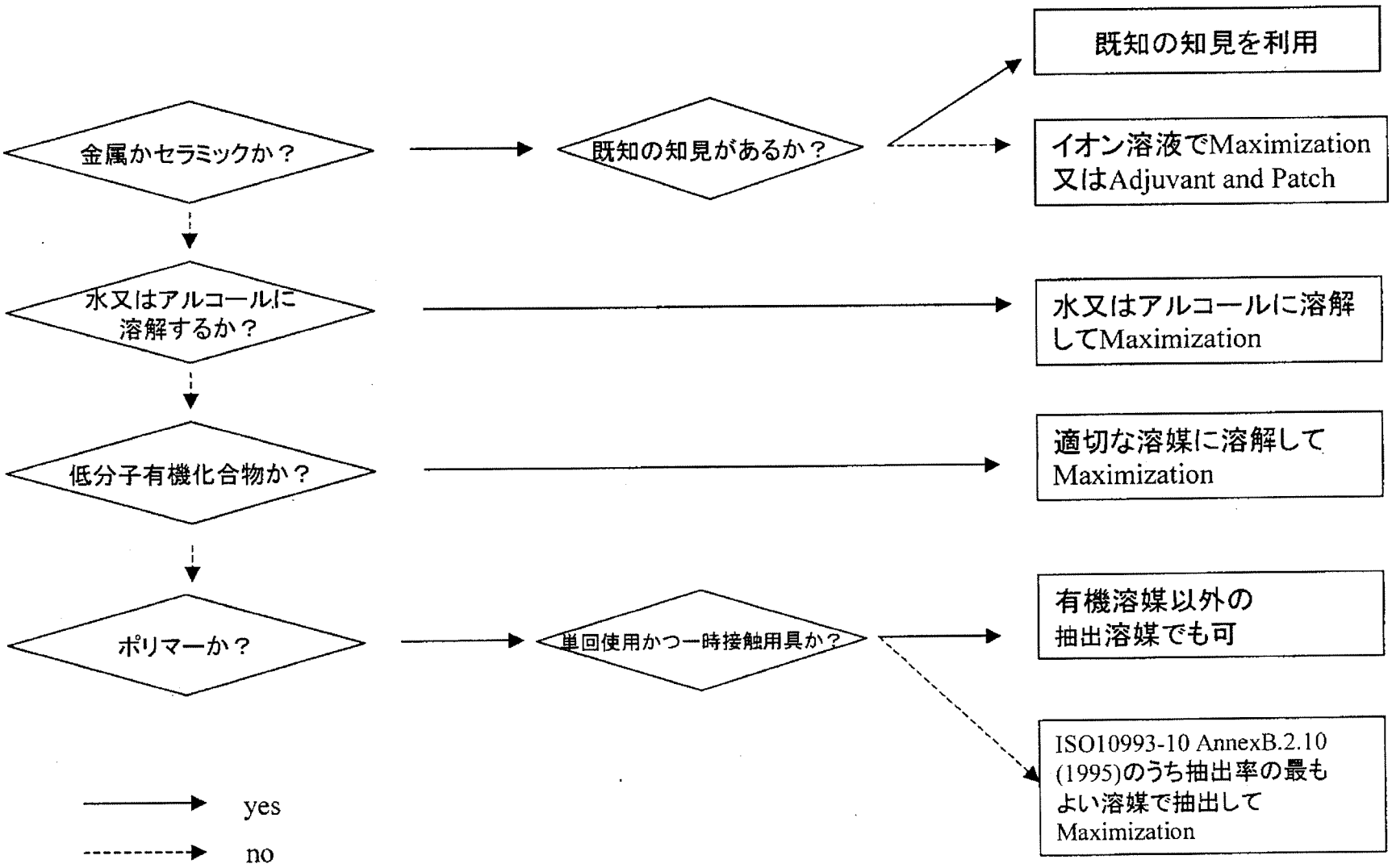
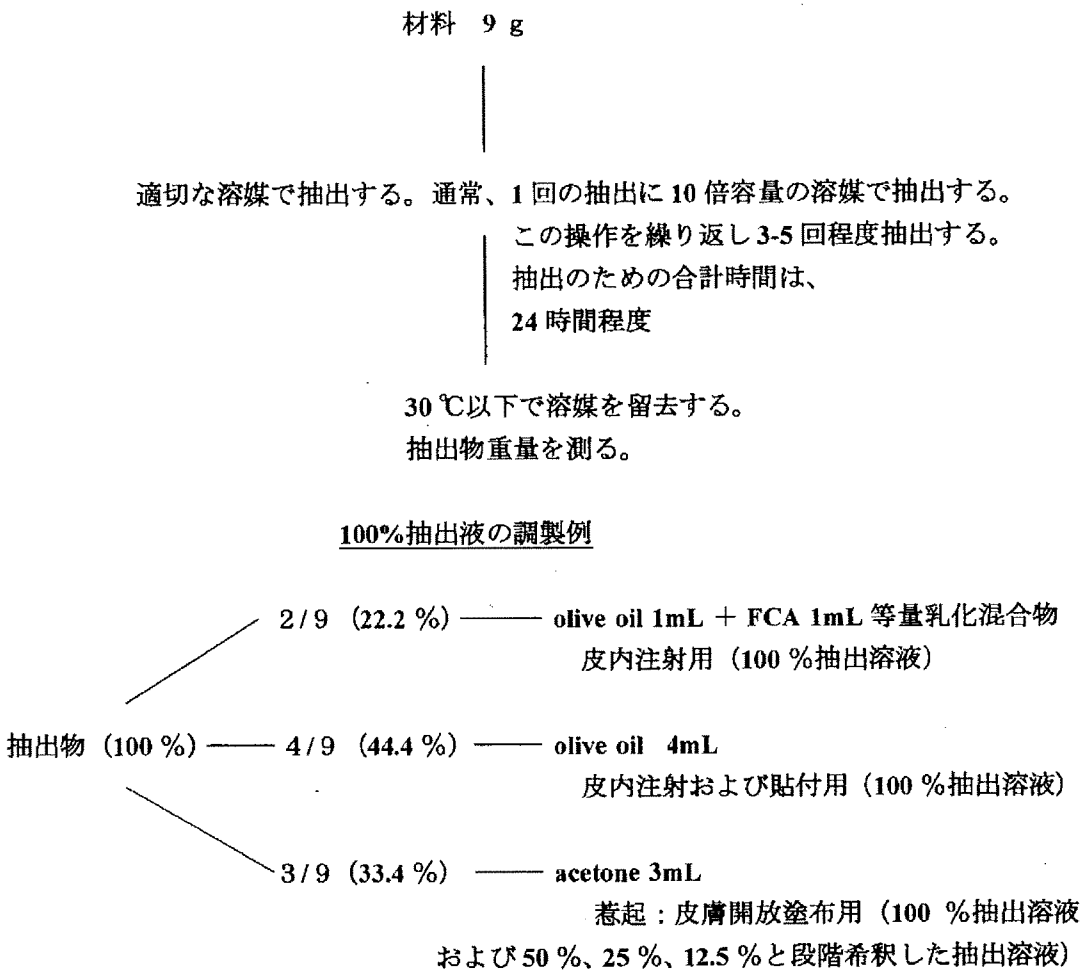



図1　試験試料と試験方法選択のフローチャート

図３　試験溶液調製法の一例

ここに示す方法は、例示であって、他の適切な抽出液調製法を拒むものではない。




材料９グラムから 100 %抽出液の調製法

抽出物をアセトン 9mL に溶かし、(a)2mL、(b)4mL、(c)3mL の三つに分けて、アセトンを留去後、各抽出物に

(a) olive oil　1mL を加えて溶解後、FCA 1mL を加えた等量乳化物、

(b) olive　oil を 4mL、

(c) acetone を 3mL

各抽出物に加えて溶かした溶液を 100 %抽出液とする。

抽出物の量や化学的性質により、完全に溶解しないことがある。

溶解しやすい溶媒等を選択するなどして、可及的に溶解させる。

# 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を評価するためのものである。、

ISO 10993-3 Biological evaluation of medical devices Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicityにおいては、遺伝子突然変異や染色体異常試験などに加え、DNA傷害への影響を調べる試験も含まれているが、ここでは、我が国の医薬品毒性試験法ガイドラインや化審法毒性試験法ガイドラインとの整合上、DNAレベルの試験を必須とせず、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又はマウスリンフォーマTK試験を行うことを基本とする。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、他の試験系を実施する事も考慮しなければならない（6.2参照）。

## 2．引用規格

2.1　医薬品毒性試験法ガイドライン

2.2　化審法毒性試験法ガイドライン

2.3　OECDガイドライン：471, 473(476)

2.4　ISO 10993-3 Biological evaluation of medical devices Part3 : Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity

## 3．試験の適用

3.1 試験試料（最終製品又は原材料）に含まれる原料化学物質、添加剤などの遺伝毒性についての安全性がすでに確認されており、含まれる原料化学物質などの相互作用で未知物質が生成される可能性が少ない場合は、最終製品や原材料での試験を行う必要はない。ただし、その正当性を明らかにする必要がある。

3.2 文献データがない場合には、引用規格に示したいずれかのガイドラインに従って、次の試験を行う(6.2参照)。

1）細菌を用いる復帰突然変異試験、

2）細胞を用いる染色体異常試験（またはマウスリンフォーマTK試験）（6.3参照）

## 4．試験液の調製

試験試料（最終製品又は原材料）の材質、性状、溶解性などの特性を考慮して、抽出物が得られるかどうかのデータをもとに、

①水に溶解せず有機溶媒で抽出物が得られるもの、

②水に溶解せず有機溶媒でも抽出物が得られないもの、

③水に溶解もしくは懸濁するもの、

にそれぞれ分けて、試験に適用する為の試験液を調製する。

4.1 有機材料の場合

4.1.1 水に溶解あるいは懸濁する試験試料の場合

水に溶解するあるいは懸濁する試験試料の場合には、溶媒（水又は培養液など）に溶解又は懸濁して試験を行う。

4.1.2 水に溶解あるいは懸濁しない試験試料の場合

水に溶解あるいは懸濁しない試験試料の場合は、まず、メタノール及びアセトンを用いて抽出率を確認する（6.4及び6.5参照）。

メタノール又はアセトンで抽出物が得られる場合(6.6参照)は、抽出率の高い方の溶媒を用い、細切した試験試料にその重量の10倍容量の溶媒を加え、室温で撹拌して２４時間抽出する(5.6参照)。 溶媒をエバポレーターで留去して試験に必要な量の抽出物を得る。試料から抽出物がどれだけ得られたかを記録する。得られた抽出物を用いて、それぞれ試験を行う。

メタノール又はアセトンでも抽出物が得られない場合（6.7参照）、次に示す１）又は2）により、復帰突然変異試験にあってはDMSO抽出液を、染色体異常試験又はマウスリンフォーマTK試験にあっては培地抽出液を用いて試験を行う。

1) 復帰変異試験を行う場合

試験試料を細切し、その0.2gに対してDMSO1mLを加え（あるいは、試験試料 6 $cm^2$に対して溶媒 1 mL の割合で加え）、37℃で振盪しながら48時間抽出し、その抽出液をプレート１枚当り最高100 $\mu$L 添加して復帰突然変異試験を行う。

2) 染色体異常試験(又はマウスリンフォーマTK試験)を行う場合

試験試料を細切し、その0.2gに対して試験に用いる培地（血清を含む。）1mLを加え（あるいは、試験試料 6 $cm^2$に対して培地 1 mL の割合で加え）、37℃、48時間抽出を行い、その抽出液を使って試験を行う。

4.2 無機材料の場合

金属材料あるいはセラミックスなどの無機材料においては、大方の場合、金属イオンによる遺伝毒性を考慮すればよい。このことを前提として、無機材料の遺伝毒性試験は以下のように行う。

1) 材料を構成する金属元素種のイオンの遺伝毒性が陰性であることが、文献あるいはすでに行われた実験で分かっている場合は、試験を行う必要はない。

2) 構成金属元素種に関して充分な遺伝毒性データのない場合は、その代表的な金属イオン溶液について試験を行う。

## 5．試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を含めること。

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、原材料名等）
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、製造番号等）
5) 試験液の調製方法
（例：溶媒による抽出法と抽出率、滅菌方法等）
6) 試験方法
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

## 6．参考情報

### 6.1 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)に派生して、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)を起こす遺伝毒性物質を検出する試験である。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障害の現われ方が異なってくる。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。したがって、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はたしている。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、妊娠中の母体が曝露を受け、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れる可能性もでてくる。

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、医療用具は短期的または長期的いずれの使用条件においても、生体に作用して遺伝毒性を示さないことが望まれる。

### 6.2 試験法の選択

本報告書では、医療機器又は原材料の遺伝毒性試験として、医薬品、化審法、およびOECD毒性試験法ガイドラインなどに準じて、微生物（サルモネラ菌と大腸菌）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染色体異常試験（またはマウスリンフォーマTK試験）の２試験を実施する事が望ましいとした。これらの試験は、遺伝毒性の主たる事象である突然変異と染色体異常の誘発を検出することができる。得られた試験結果が陽性になった場合や、医療機器の使用期間や使用条件によっては、下記に示すような他の試験系を実施することも考慮する必要がある。ISO 10993-3 "Biological evaluation of medical devices- Part 3:Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity "では、遺伝子突然変異、染色体異常に加えて、DNA への影響を調べる試験を必須としているが、本報告書においては、化審法および医薬品毒性試験法ガイドラインとの整合上、DNA レベルの試験を必須とはしていない。

1) DNA 傷害（DNA damage）性を検出する系
   * ほ乳動物肝細胞を用いる不定期 DNA 合成（UDS）試験（OECDガイドライン４８６）
   * 単一細胞ゲル電気泳動（Single Cell Gel Electrophoresis ; SCG、コメット）試験
2) 染色体異常を検出する系
   * 培養細胞を用いる in vitro小核試験
   * ほ乳動物を用いる小核試験（OECD ガイドライン 474）
   * ほ乳動物を用いる精原細胞染色体異常試験（OECD ガイドライン 483）
3) 細胞の悪性化（がん化）を検出する系
   * BALB 3T3 細胞を用いるトランスフォーメーション（形質転換）試験

6.3 染色体異常試験の概略

染色体異常試験は、医薬品ガイドライン、化審法ガイドライン、OECDガイドラインのいずれにおいても、以下の流れで試験が実施される。特に染色体異常の分析については、多くの細胞について分析が行われるため、時間を必要とする。

① 細胞はチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU 細胞やCHO 細胞、ヒトリンパ球などがよく用いられる。
② まず、本試験に適用する最高濃度を決定するため、代謝活性化法によるS9の有無や処理時間を変えて細胞増殖抑制試験を実施し、それぞれの条件下での被験物質の増殖抑制濃度を調べる。
③ １系列あたり３濃度段階の処理群に、陽性対照群と陰性対照群を設ける。
④ 短時間処理の条件では、S9 mix 存在下と非存在下の２系列設け、3～6時間処理後、さらに21-18時間培養する。短時間処理で陰性の結果が得られた場合、更に正常細胞周期の1.5倍以上の連続処理条件で試験を行う。

6.4 抽出溶媒

材料から抽出物を得るための抽出溶媒として、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２種類をあげた。これは医療機器等から、可能な限り多くの物質を得るための組み合わせである。ISO 10993-3 "Biological evaluation of medical devices - Part3:Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity " に示す試験試料の抽出では、生理的な溶媒と有機溶媒の２種類の溶媒系を用いることが推奨されている。

6.5 抽出率

試験試料から、メタノールおよびアセトンによる抽出物がどの程度得られるかについてのデータがない場合は、いずれかの方法で抽出率を求める。 抽出率が0.5%（または1%）以上と、 0.5%（または1%）未満の場合では、試験の適用が異なってくる。したがって、抽出率のデータをもとに試験計画書を作成するとよい。なお、抽出率を調べるにはいくつかの方法があるが、一例として以下のような手順で確認することができる （ISO10340, Optical and optical instruments - Contact lenses - Method for determining the extractable sub-

stances from contact lenses 1995)。

1) できれば減圧デシケータ中で、恒量になるまで、60±5° Cで試験試料を乾燥する。デシケータ中で室温に戻す。
2) 抽出用として、試験試料が２００ｍｇ以上であることを確認する。
3) 乾燥した試験試料の重量を±0．１ｍｇまで正確に秤量し、秤量値（ｍ１）を記録する。
4) 抽出用円筒濾紙に試験試料をいれ、必要に応じて沸騰石をソックスレーフラスコにいれ、フラスコ容量の約70%まで適当な溶媒を加える。ソックスレー抽出器に円筒濾紙をとりつけ、フラスコ、冷却器を組み立てて、加熱マントル上に据え付ける。
5) ４時間以上試験試料を抽出する。
6) 冷却後、円筒濾紙から試験試料を取り出す。1)に従って、恒量になるまで試験試料を乾燥させる。
7) 乾燥した試験試料の重量を±0．1ｍｇまで秤量し、秤量値（ｍ２）を記録する。
8) (m1－m2)/m1 X 100の値を算出し抽出率とする。

6.6 「抽出物が得られる場合」の判断

医療機器の重量0.５ｇ を基準として、抽出物を得る為の限界値を以下のように設ける。「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の量が、試験試料の重量の0.5%以上（医療機器の重量が0.５ｇ以上の場合）又は試験試料の重量の１% 以上の場合（医療機器の重量が0.５ｇ未満の場合）とする。

0.5%（医療機器の重量が0.５ｇ以上の場合）および1%（医療機器の重量が0.５ｇ未満の場合）の抽出率限界値に関しては、試験に必要な抽出物量を得る為の試験試料の量から設定したものである。

6.7 「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、試験試料から得られる抽出物の量が、試験試料の重量の0.5%未満(医療機器の重量が0.５ｇ以上の場合)又は試験試料の重量の1% 未満(医療機器の重量が0.５ｇ未満の場合）の場合とする。ただし、溶媒中で材料が溶解したり、原型をとどめないほどに変形するような場合は抽出物は得られないとする。

試験試料が高価な場合、試験に必要な量の抽出物を得ることが現実的には困難になることもある。その場合は、3.1.3 に従うことになるが、その判断の目安も同様である。また、3.1.3 に従うよりも、原材料に含まれている原料化学物質（モノマーや添加剤）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を行うことでも良い。

6.8 抽出物量

抽出物を用いて遺伝毒性試験を行う場合に必要な抽出残留物の量は、プロトコールにもよるが、およその目安として、少なくとも復帰突然変異試験では1ｇ、染色体異常試験では2g 程度必要である。抽出は材料に10倍容量の溶媒を加え、撹拌しながら行うが、抽出時間は
24時間を基本とする。場合によっては、それ以上の時間抽出を行う場合もある。

6.9 評価

遺伝毒性試験で陽性の結果が得られた場合には、その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、その安全性を評価する。遺伝毒性のもつ重要性から、さらに 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、ヒトへの安全性リスク評価の一助となる。

## 7．参考文献


1) 労働省化学物質調査課編、－がん原性のスクリーニング手法として－、新･微生物を用いる変異原性試験ガイドブック
2) 日本環境変異原学会･哺乳動物試験分科会編（JEMS・MMS分科会編）、－化学物質による染色体異常誘発アトラス－、朝倉書店
3) 石館基 監修、 祖父尼俊雄編、 －医薬品の変異原性･遺伝毒性－、続医薬品の開発 第１１巻、廣川書店
4) 日本製薬工業会編、 医薬品の為の遺伝毒性試験Q&A、 サイエンティスト社
5) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Surgical implants and other foreign bodies. Volume 74, 1999.
6) T. Tsuchiya, H. Hata & A. Nakamura: Studies on the tumor-promoting activity of biomaterials:Inhibition of metabolic cooperation by polyetherurethane and silicone. J. Biomed. Mater. Res. 1995, 29, 113-119.
7) T. Tsuchiya, K. Fukuhara, H. Hata, Y. Ikarashi, N. Miyata, F. Katoh, H. Yamasaki &A. Nakamura: Studies on the tumor-promoting activity of additives in biomaterials: Inhibition of metabolic cooperation by phenolic antioxidants involved in rubber materials. J. Biomed. Mater. Res. 1995, 29, 121-126.
8) T. Tsuchiya, R. Nakaoka, H. Degawa & A. Nakamura: Studies on the mechanisms of tu morigenesis induced by polyetherurethanes in rats: Leachable and biodegradableo ligomers involving the diphenylcarbamate structure acted as an initiator on the transformation of Balb 3T3cells. J. Biomed. Mater. Res. 1996, 31, 299-303.
9) R. Nakaoka, T. Tsuchiya & A. Nakaoka: The inhibitory mechanism of gap junctional intercellular communication induced by polyethylene and the restorative effects by surface modification with various proteins. J. Biomed. Mater. Res. 2001, 57, 567-574.
10) H. Kusakabe, K. Yamakage, S. Wakuri, K. Sasaki, Y. Nakagawa, M. Hayashi, T. Sofuni, H. Ono, and N. Tanaka: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals, Mutation Res. 2002, 517, 187-198)
11) Akira Ichikawa, & T. Tsuchiya: A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transformed phenotype of polyetherureth ane-induced tumor cell s by Cx43 transfection. Cytotechnology in press.
12) Akira Ichikawa & T. Tsuchiya: Studies on the tumor promoting mechanism of hard a

nd soft segment models of polyetherurethanes: Tyr265 phosphorylation of Connexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherur ethane. J. Biomed. Mater. Res. 2002, 62, 157-162.

# 第４部　埋植試験

## １．適用範囲

本試験は、生体内に埋め込む医療機器又は原材料の局所的な影響を肉眼的及び組織学的に動物実験によって評価するためのものである。この試験は原材料に起因する不具合、例えば埋植材がどのような組織反応を惹起するか、その強さはどの程度かを予測するためのものであるので、製品デザインや機能に起因する不具合については、別途試験を行うことが必要である。(5.2.1 参照)。

ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices Part 6: Tests for local effects after implantation には、皮下、筋肉内、骨内埋植法が例示されており、医療機器の適用時間に応じて埋植時間も変えるよう指示されている。医療機器の適用部位が皮下や骨内である場合、また接触期間が１ケ月を超える医療機器に用いる原材料にあっては、ISO 10993-6 を参考にして埋植部位や接触期間に応じた試験を実施する。

## ２．引用規格

2.1 ISO 10993-6 (1994 年) : Biological evaluation of medical devices Part 6: Tests for local effects after implantation

2.2 USP25 : BIOLOGICAL REACTIVITY TESTS、 IN VIVO Implantation Test

## ３．短期筋肉内埋植試験

3.1 目的

本試験は、試験試料（医療機器又は原材料）を軟組織に埋め込んだ場合に、埋植初期に埋植物周囲組織に見られる組織反応を観察することにより、埋植材がどのような組織反応を惹起するか、その強さはどの程度かを評価するための試験である。

異物に対する生体反応の様式には、一般に吸収・貪食による排除、器質化、被包化がある。本試験の対象となる試験試料は主として固形試料であるが、生体内で吸収され易い原材料の場合はマクロファージによる貪食、吸収され難い原材料の場合は線維による被包化の様式をとるものと考えられる。いずれも初期の炎症性細胞浸潤に始まり肉芽形成、被包化などの過程をたどる一連の生体反応であり、これらの反応は埋植された原材料の種類により遅延・促進あるいは増強等の様々な修飾を受けるものと考えられる。本試験法はこれらの原材料による影響を組織学的に捉え、原材料の組織傷害性を評価することを目的とする。ペースト状のような非固形試料の試験は、ISO 10993-6 3.2.2 に従って試験を行い評価する。

3.2 試験材料

3.2.1 試験動物

体重 2.5kg 以上の雄ウサギを一観察期間について４匹以上用いる。

試験試料の埋植部位である傍脊柱筋肉の十分発達した動物で、既往症のない個体を用いること。また、以前に他の試験に使用され、なんらかの化学物質に感作されている可能性のある動物を用いてはならない。

最終評価のための有効動物数は、一観察期間につき肉眼的検索用に 2 匹以上、組織学的検索用に 2 匹以上とする。試験試料埋植の前に背部の毛を刈る。

3.2.2 試験試料の調製

3.2.2.1 試験試料のサイズ

15 ゲージ程度の注射針で埋植できるよう、長さ 10～12 mm、幅 1.0～1.5 mm の円柱に調製するのが望ましい。しかし、製品の材質や形状、サイズ等により試験試料のサイズを上記のサイズに整形不能の場合、あるいは最終製品が試験試料の規定サイズよりも細いもしくは薄い場合で、それらを規定サイズに成形した際に、臨床に適用した場合とかけ離れた組織反応が起こると推定されるような場合は、妥当な根拠を示した上で規定と異なるサイズの試験試料を採用してもよい。ただし、試験試料のサイズや形状が対照試料のそれと大きく異なる場合は、組織の反応様式や反応の広がりに影響がでることを十分に考慮する必要があり、評価には注意すること。

また、試験試料のサイズや形状により、注射針とスタイレットによる埋植が困難となる場合は、適当な埋植法を考案し対応する必要がある。例えば、眼内レンズのループなど糸のようなものは、より細い注射針で、大きなものは手術で埋め込むことを考える。このような場合、組織反応は陰性対照試料とは異なることを評価の際に考慮すべきである。

3.2.2.2 試験試料の形状

両端を丸めた円柱体が理想的である。

試験試料に角があると、角で組織が物理的に傷害され易く、また後に示す「炎症領域の幅」も角の部分で薄くなる傾向があるので、試験試料表面は滑らかに整形しておくことが望ましい。また、埋植された試験試料の形状が周囲の組織反応の大きさに影響を与えることが知られているので、同一の試験に用いる試験試料の形状は可能な限り近似した形に整形すべきである。最終製品が指定の形状に調製できない場合には、試験に支障のない範囲の適当な形状で試験してもよい。しかし、特に対照試料と試験試料の形状が大きく異なる場合は、最終評価に困難を極めることが想定され、形状を統一できない場合は、試験試料の形状に基づいた組織反応様式の相違や浸潤細胞の種類・数等を考慮した慎重な評価が望まれる(文献 5、6)。

3.2.2.3 滅菌方法

未滅菌試験試料は埋植用試料を調製後、試験試料の特性に応じた適当な方法で滅菌後に試験に使用する(4.3 参照)。別に同様の方法で陰性対照試料を調製する。また、必要に応じて陽性対照試料を同様の方法で調製する。

3.2.2.4 対照材料

陰性対照材料としては、高密度ポリエチレンまたはそれと同等品を用いる。試験試料が金属の場合などで、適当な対照材料（例えば SUS316 など）が入手可能であれば用いてもよい。

陽性対照材料としては Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 含有ポリ

ウレタンがある。陽性対照試料については、陽性反応を確認するため、必要に応じて用いるとよい(4.4 参照)。

3.3 試験方法

3.3.1 埋植方法

滅菌した 15 ゲージの注射針内に、試料を別々に挿入しておく。試料の埋植に際しては、動物が暴れたり、埋植部位の筋肉が攣縮したりして、埋植作業が困難となるほか、それに伴い周囲組織を必要以上に傷つける恐れがあるので、動物に麻酔をかける必要がある。試験動物 1 匹につき、片側の脊柱傍筋肉内に脊柱から約 3.5 cm 離して、約 2.5 cm 間隔で 4 個の試験試料をスタイレットを用いて埋植する。脊柱の他の側に陰性対照試料を同様の方法で 2 個埋植する。動物 1 匹当たりの試料埋植数は、片側の脊柱傍筋肉に 4 個を限度とする。なお、陰性対照試料を埋植する側に 2 個分の余裕があるので、陽性対照試料や出血等による埋植のやり直しのスペースとして利用することが可能であり、また、試験計画当初から埋植数を増やすこともできる。

試料埋植の方向、角度、深度は、摘出時の埋植部位の確認を容易にするだけでなく、「炎症領域の幅」の計測にも影響を与えるので、一定に保つよう心掛ける。埋植に当たっては、注射針を脊柱と平行に保ち、皮膚表面に一定の角度で刺入する。埋植の深度は、針の先端から一定の距離にマークを付けておくことにより一定に保つことができる。また、埋植部位が摘出時及び切り出し時に確認し易いように、針の刺入部位をマーキングしておくとよい。

出血や組織損傷を全くおこさずに埋植することは不可能であるが、局所に強い出血が見られた場合あるいは周囲組織を必要以上に損傷した場合には、試料周囲の炎症反応が大きくなり、組織学的検索結果の判定が困難となる。従って、この様な場合には、別の場所を選んで試料を埋植し直すとよい。

柔らかな原材料を試験試料とする場合、試験試料が筋肉内で折れ曲がり易く、「炎症領域の幅」の計測を困難とする。試験試料の折れ曲がりを防ぐためには、筋肉中に注射針を刺入後、試験試料を無理に押し込まず、慎重に針を引き抜くことが重要である。縫合糸のような極端に細く柔らかい試験試料では、注射針とスタイレットによる埋植法では筋肉組織内に一定の条件で埋植することは困難である。対応策として、手術用縫合針を用いて筋肉内に留置させる方法も考えられるが、縫合針による非特異的な組織傷害、特に出血や筋肉の壊死を生ずる危険性が高く、これらが試験試料の正確な評価の妨げとなるので、皮下組織等の別の場所へ埋植することも考える。

3.3.2 埋植期間

基本的に 1 及び 4 週間とする。ただし、当該医療機器の使用期間、及び ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices Part 6: Tests for local effects after implantation の推奨する埋植期間等、妥当性のある根拠があれば、別の埋植期間を設定しても良い。

3.3.3 動物の取扱い

試験期間中は、動物を個々に観察し、異常所見があれば記録しておく。屠殺予定日以前に動物が死亡した場合は、すみやかに剖検し死因を確認する。その死因が埋植した試験試料の影響によると思われる場合には、その動物を

評価の対象に加える。それ以外の死因による場合は、その動物を評価の対象から除外する。最終的に評価のための有効動物数が一観察期間について肉眼的検索用及び組織学的検索用として各々2匹以上である場合、その試験を有効とみなす。有効動物数を確保できなかった場合は、同様の試験を行い、不足匹数分を追加、補充する。

3.3.4 動物の屠殺及び試料の回収

動物は一観察期間につき、肉眼的検索用に 2 匹以上、組織学的検索用に 2 匹以上となるように任意に振り分ける。試料埋植後 1 及び 4 週間目にそれぞれの動物を麻酔下に瀉血、屠殺し、試料埋植部位の筋組織を試料と共に摘出する。

試料は周囲の筋組織に埋没させたままの状態で摘出するが、組織学的検索の妨げにならないように摘出時の組織の損傷を最小限に留めなくてはならない。

3.3.5 肉眼的検索

試料周囲組織及び試料自身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) 試料周囲組織における出血、被包形成、変色の有無
   所見が認められた時は、その程度、広がり、厚さ、など
2) 試料自身の変色及び変質の有無
   所見が認められた時は、色、ひび割れの有無、硬さ
3) その他に認められた異常所見の全て

下表に示した米国薬局方（USP25）の評価基準により判定するのも一つの方法である。

埋植試験における被膜の評価基準

| 被膜の厚さ | 評価点 |
|---|---|
| なし | 0 |
| 0.5mm まで | 1 |
| 0.6 - 1.0mm | 2 |
| 1.1 - 2.0mm | 3 |
| 2.0mm を超える | 4 |

3.3.6 組織学的検索

3.3.6.1 組織標本の作製

組織学的検索用に摘出した筋組織は、病理組織標本作製用に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にて固定し、固定完了後、試料の横断面が出るように組織を切り出す。パラフィン包埋後、ミクロトームにて薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して組織学的検索に用いる。ただし、必要に応じて後の評価に悪影響を与えない範囲

でその他の固定法や、包埋法、染色法を採用してもかまわない。

組織の切り出しは、固定後の組織を数ミリずつ切り出して行い、試料の横断面が組織標本上に出るようにする。また、切り出し面を、切り出し面上における試料の埋植方向が長径となるような長方形に整形しておくと、組織標本上で試料の埋植方向を確認でき、「炎症領域の幅」の計測部位の選択が容易になる。

薄切片の作製に際し、試料が有機溶媒に溶解する場合は、標本作製時に溶解するため障害にならない。また、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、試料と共に薄切してしまう方が周囲組織を損傷せずに済む。ただし、試料が硬い場合は、無理な薄切は逆に周囲組織を損傷する恐れがあるので、事前に試料を摘出する等の対応策が必要となる。いずれにしても、試料の性質を十分に考慮し、出来る限り良好な組織標本が得られるように努めなくてはならない。

試料がミクロトームによる薄切を困難とするような硬い試料であるときは、切り出し時に引き抜いておくと良い。但し、引き抜きの際、周囲組織を傷つけないよう十分に注意しなくてはならない。試料片を勢いよく引き抜くと、周囲の被膜ごと引き抜いてしまい、組織学的観察ができなくなる。また、生体内分解性の試料は埋入したまま標本を作製することで、体内での分解状態を知ることができる。セラミックスのようなものでは、線維成分が固着して引き抜くことが不可能となり、また硬いために通常のミクロトームでは薄切できない。このような場合には、樹脂包埋して研磨標本の作成を行う。

3.3.6.2 炎症領域の幅の測定

試料周囲の組織は陰性対照試料においても軽度の炎症性の変化を呈しており、この試料周囲の「炎症領域の幅」を計測することにより、試料の周囲組織に対する傷害性を定量的に評価することができる。しかし、試料によっては炎症領域の幅を計測できない場合があるので、その場合は妥当な根拠を示して割愛することも可能である。例えば、生体内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、また多孔性の試料では内部に線維や線維芽細胞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。

「炎症領域の幅」の計測は、埋植された試料の長軸に対し垂直方向の、試料と周囲筋組織との間の炎症領域の幅を顕微鏡下にミクロメーターを用いて複数箇所計測し、平均的な「炎症領域の幅」を求める。画像解析装置を用いてもよい。

炎症領域は通常、試料の周囲組織に及ぼす影響が均一であれば、試料周囲にほぼ均一の幅で観察される。しかし、炎症領域を取りまく筋線維間に試料に対して垂直方向に延びる線維性結合織が存在する場合は、その方向に炎症領域が拡大し易く、また、炎症領域は一般に筋肉の収縮方向に長くなり、紡錘形となる傾向がある。そのようなことを考慮し、実際の平均的な幅が得られるように、試料の形状に応じ適切な部位を選択して「炎症領域の幅」を計測する。

3.3.6.3 病理組織学的観察

試料周囲組織を光学顕微鏡にて観察し、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みられた異常所見を記録する(4.5参照)。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、偽好酸球(好中球)、リンパ球、形質細胞、マクロファージ、巨細胞などの浸潤、壊死、脂肪浸潤などについて観察し、評価を加える。炎症細胞の浸潤や炎症反応は、筋線維間に延びる線維性結合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、そのようなことを留意して所見をとる。

3.4 評価

肉眼的、組織学的検索の結果、1週間あるいは4週間のいずれかの観察期間で、全ての個体における試験試料の反応が陰性対照試料と比較して有意に強い組織反応(4.6参照)である場合、陽性と判定する。

肉眼的検索では、反応の広がりを全体として捉えることが可能であり、組織学的検索では肉眼的検索で見られた反応がどの様な細胞が主体となって起きているのかを知ることができる。反応が微弱であれば組織学的検索でのみ見られるであろうし、局所的な反応は肉眼的にしか捉えられない可能性がある。したがって、組織学的検索を評価するに当たっても肉眼的検索結果も考慮すべきである。

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加えなくてはならない。

組織学的検索のうち、試料周囲組織の炎症性細胞の種類や出現の程度等の所見と「炎症領域の幅」のどちらも重要な指標である。陰性対照試料と比較して組織の反応様式に明らかな相違が認められる場合には、組織所見も重要な判断材料となるので、これらについては病理専門家によって総合的な評価がなされることが望ましい。

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含めること。

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、原材料名等)
4) 使用した対照材料
   (例:対照試料名、入手先、入手年月日、製造番号等
5) 試験試料及び対照試料の調製方法
   (例:切断、抽出、滅菌、サイズ等)
6) 試験方法(試料の埋植方法、回収方法、試験動物の飼育条件、病理組織標本の作製方法)

7) 試験結果
試料及び試料周囲組織の肉眼的検索結果
試料周囲組織の組織学的検索結果
炎症領域の測定結果
肉眼及び組織の代表例の写真
8) 結果の評価と考察
9) 参考文献

## 4．参考情報

### 4.1 背景

実験動物を用いた医療機器又は原材料の筋肉内埋植による評価法については、現在までにいくつかの組織学的検索法の試みがなされている。J.E. Turner らは、試験試料埋植によって認められる様々な組織反応所見の程度を検索し、それらを総合評価してその試験試料の毒性強度を判定している(文献 1)。また、M. Therin らは試験試料埋植によって試料周囲に出現する様々な細胞成分の情報をコンピュータ画像解析に持ち込み、細胞密度や分布の状態等から、その試料の生体適合性を読み取ろうと試みている(文献 2)。いずれの評価法もかなり手間のかかる作業で多くの指標についてのデータが得られているが、それらの個々の指標の多くが必ずしもその試料の組織傷害性の強さを反映しているとはいえないようで、評価に適した指標をその中から選りすぐる必要があると思われた。

A. Nakamura らはウサギを用い 7 日間の筋肉内埋植試験を実施し、様々な組織反応指標と in vitro の細胞毒性試験結果、及び試料中の毒性化合物の含有量との相関性について検討した(文献 3、4)。その結果、細胞毒性試験の結果と相関性が良かった指標は「試料周囲の炎症領域の幅」「炎症領域内変性・壊死筋線維細胞の残存の程度」及び「炎症性細胞の周辺部筋線維間への浸潤の程度」で、いずれも試料埋植による炎症反応の大きさを反映する所見であった。また、個々の組織反応の指標を得点化し、その総合得点と in vitro の細胞毒性試験結果との相関性について検索してみたが、あまり良い相関は得られなかった。以上の結果から、組織傷害性の評価法としては、細胞毒性試験との相関性が示された炎症反応の大きさを反映するような指標が、より有用であると結論された。中でも、「試料周囲の炎症領域の幅」は炎症反応の大きさを定量的に示した指標であり、簡便性、客観性、相関性ともに優れている点から、今回の短期筋肉内埋植試験における組織傷害性評価の指標として採用することとした。この「試料周囲の炎症領域の幅」は試料埋植によって起こる炎症反応を量的に捕らえるための指標であり、最終評価に際しては、マクロファージの有無やその他の炎症性浸潤細胞の種類や量等の炎症反応の質的な情報を示す組織所見を考慮した総合的な判断が求められる。

### 4.2 試験法の選択

埋植試験法としては、ISO 10993-6 (1994 年) : Biological evaluation of medical devices Part 6: Tests for local effects after implantation があ

り、埋込み医療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、中村らの報告にあるように、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良いことも事実であるので、組織学的な評価のみならず、炎症領域の幅のような計量的な指標を利用するのが望ましい。

ここに述べる短期筋肉内埋植試験は、ISO 10993-6の筋肉内埋植試験で短期間の局所的影響を調べる方法とほぼ同等である。ISO 10993-6においては、埋植材に適した埋植場所を選択することになっており、皮下、筋肉内、骨内埋植法が例示されており、医療機器の適用時間によって埋植時間も変えるように指示している。本邦においても同様な考え方を取っており、医療機器の使用部位と時間によって試験法を変えることになんら問題はない。

4.3 滅菌法

高圧蒸気滅菌、乾熱滅菌、煮沸滅菌等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。エチレンオキサイドガス等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滅菌を行う場合には、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場合が多いため、本試験の滅菌法としては不適当である(文献7)。

滅菌法には他にγ線や紫外線等を照射する方法があるが、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。他に示した滅菌法も含めいずれの方法においても長所と短所がある。いずれにしても試験に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・吸着等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試料に起こってはならず、原材料の性質や臨床適用時の滅菌法等を十分に考慮した上で適切な滅菌法を選択するべきである。

4.4 陽性試料

この陽性対照試料は、天然ゴム製品の毒性原因物質の1つであるZinc diethyldithiocarbamate (ZDEC)を種々の濃度で含有させたポリウレタンシートを作製し、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の細胞毒性試験との相関性を調べた結果を基に選択されたものである(文献 8)。陰性対照試料、陽性対照試料とも財団法人　食品薬品安全センター　秦野研究所から入手可能である。

4.5 埋植期間による組織像の変化

陽性対照試料等を用いて組織反応を経時的に検索したところ、「炎症領域の幅」が最大となるピークは偽好酸球等の炎症性細胞浸潤のピークの時期にほぼ一致しており、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、毒性強度等によって異なるものと考えられる。従って、幅の計測部位の名称を便宜上「炎

症領域の幅」としたが、実際には、組織傷害性の低い物質であれば、埋植から1週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、幅の計測も4週間後では主として線維性被膜の幅を測定することになる。

4.6 組織反応について

“有意に強い組織反応”とは、特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、対照試料の検索結果と比較して、試験試料の「炎症領域の幅」が広く認められた場合、あるいは組織所見として炎症性あるいは周囲筋組織の変性・壊死等の組織傷害性の変化が強く認められた場合を“有意に強い組織反応”と考える。ただし、「炎症領域の幅」については、対照試料と試験試料との微妙な差の判定の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1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、時間の経過と共に循環障害や浸潤細胞の種類、反応の強さが変化する動的な反応であるので、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。短期筋肉内埋植試験における1週間と4週間という2回の観察期間の設定は、試験試料埋植による生体反応への影響の経過を、幅広い視野で捕えるためのものであり、評価に際してどちらかの情報に重点を置くのではなく、両者の情報から総合的に組織反応を評価すべきである。

## 5．参考文献


1) J.E.Turner、W.H.Lawrence、and J.Autian、J. Biomed. Mater. Res.、7、39-58 (1973).
2) M.Therin、P.Christel、and A.Meunier、J. Biomed. Mater. Res.、28、1267-1276 (1994).
3) A.Nakamura、Y.Ikarashi、T.Tsuchiya、M.-A.Kaniwa、M.Sato、K.Toyoda、M.Takahashi、N.Ohsawa、and T.Uchima、Biomaterials、11、Biomat. 89、92-94 (1990).
4) Y.Ikarashi、K.Toyoda、N.Ohsawa、T.Uchima、T.Tsuchiya、M.-A.Kaniwa、M.Sato、M.Takahashi、and A.Nakamura、J. Biomed. Mater. Res.、26、339-356 (1992).
5) N.K.Wood、E.J.Kaminski、R.J.Oglesby、J. Biomed. Mater. Res.、4、1-12 (1970).
6) B.F.Matlaga、L.P.Yasenchak、T.N.Salthouse、J. Biomed. Mater. Res.、10、391-397 (1976).
7) T.Bouet、K.Toyoda、Y.Ikarashi、T.Uchima、A.Nakamura、T.Tsuchiya、M.Takahashi、and R.Eloy、J. Biomed. Mater. Res.、25、1507-1521 (1991).
8) T.Tsuchiya、Y.Ikarashi、H.Hata、K.Toyoda、M.Takahashi、T.Uchima、N.Tanaka、T.Sasaki、and A.Nakamura、J. Applied Biomat.、4、153-156 (1993).

# 第５部　刺激性試験

## １．適用範囲

本試験は、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。本報告書では、皮膚刺激性試験，皮内反応試験，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、ISO10993-10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良い。なお、引用規格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。

## ２．引用規格

2.1　ISO10993-10　Biological evaluation of medical devices Part10 - Tests for irritation and sensitization.

2.2　ASTM Standard F749-87　Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit

2.3　USP25　Biological Reactivity Tests, InVivo. - Intracutaneous Test

2.4　ASTM Standard F719-81 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（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。）を皮内投与し、組織傷害性や炎症誘起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起性の有無を評価する。

### 3.3 試験液の調製

#### 3.3.1 抽出溶媒

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

#### 3.3.1 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録、1.1の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

付録、1.2に示した温度・時間条件の中から、試験試料の耐えられる最高温度条件を選んで抽出する。

試験試料が耐えられる最高温度条件とは次の条件を満たすものである。

①抽出温度は試験試料の融点より低い。

②抽出条件で試験試料は分解しない。

③溶出物質が揮散あるいは分解しない。

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、20～30℃に保存し、24時間以内に試験に用いる。

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

栄養状態の良い健康なウサギ（6.2参照）。体重、週齢は特に規定しない。使用前1週間以上、一定の環境及び飼料で飼育する。

投与前日までに背部の毛を刈り（または剃り）、投与及び皮膚観察が容易な状態にする（6.3参照）。

3.4.2 試験用量

試験液の投与量は、原則として1投与区画当たり0.2mL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

全例について投与前，投与後約24、48、72時間に、投与部位の皮膚状態を、表1（Draizeによる皮膚反応の評点）に従って観察・記録する。

3.4.6 評価

観察結果より組織傷害性と刺激性を評価する（6.4参照）。

図１．投与部位（例）

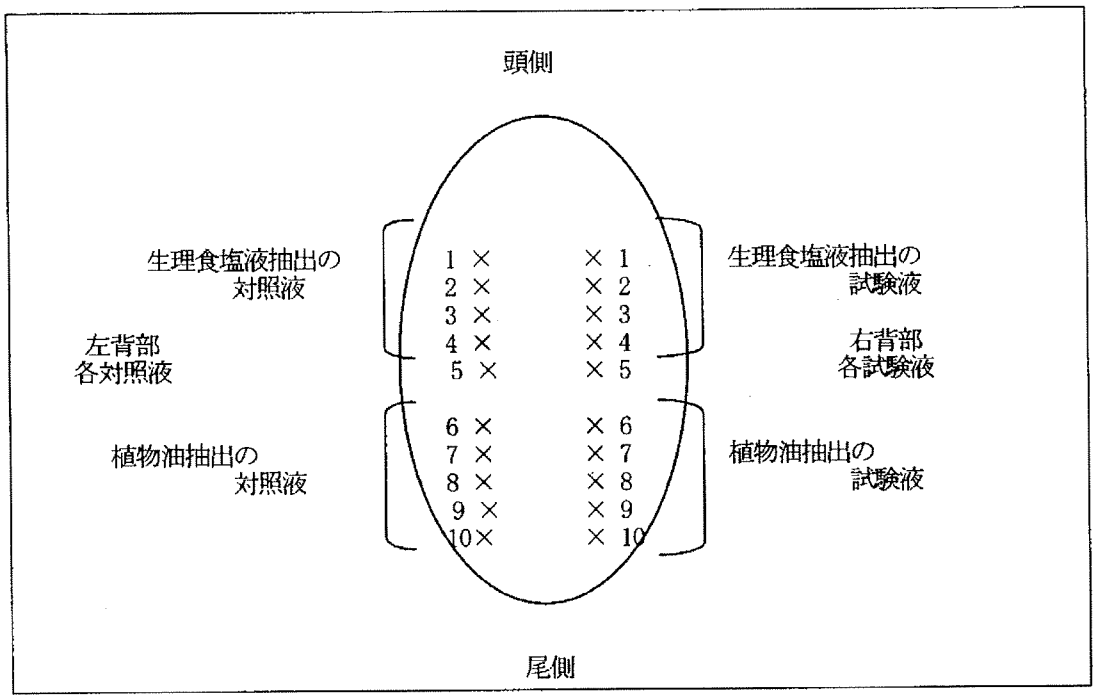



表１．Draizeによる皮膚反応の評点

| | |
|---|---|
| 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 |
| 中等度ないし高度紅斑 | 3 |
| 高度紅斑からわずかな痂皮の形成（深部損傷まで） | 4 |
| 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 |
| 軽度浮腫（はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる） | 2 |
| 中等度浮腫（約1mmの膨隆） | 3 |
| 高度浮腫（1mm以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり） | 4 |

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含めること。

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、原材料名等)
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、製造番号等)
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 ：試験開始時及び終了時の個別体重
個々の動物の皮膚反応結果（評点のスコア）
写真：投与部位の皮膚状態（代表例でも良い。）
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溶媒あたりウサギ6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。

### 4.3 試験の調製

3.3項に従う。

### 4.4 試験法

#### 4.4.1 実験動物

栄養状態の良い健康なウサギ（6.2参照）。体重、週齢は特に規定しない。使用前1週間以上、一定の環境及び飼料で飼育する。

投与前日までに背部の毛を刈り（または剃り）、投与及び皮膚観察が容易な状態にする（6.3参照）。

#### 4.4.2 試験用量

試験液の投与量は、原則として1投与区画当たり0.5mLとする。

#### 4.4.3 投与経路及び投与期間

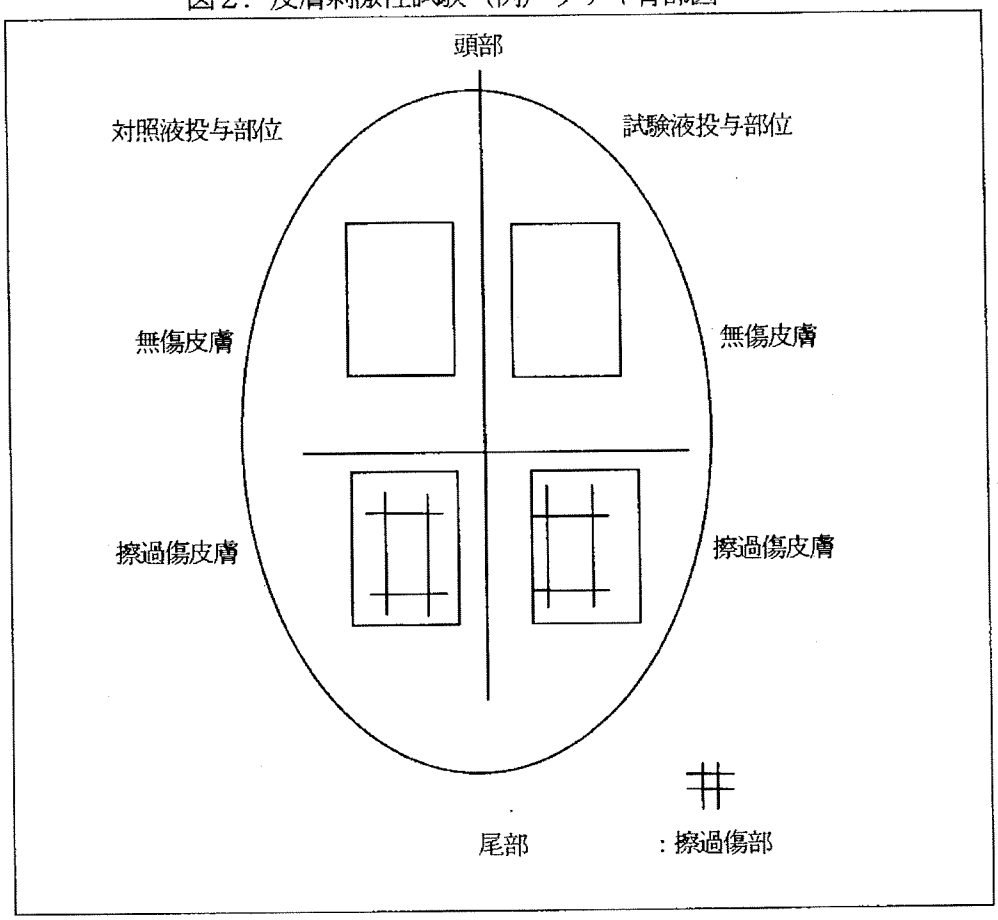
塗布による投与を1回行う。

#### 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2.5cm×2.5cm）を作る。上部2箇所は無傷皮膚とする。1区画

につき試験液0.5mLを投与し、４枚１組の滅菌ガーゼ（2.5cm角）をあてテープで貼りつける。その上をポリエチレンフィルム等で覆い、固定する。対照液も同様に処理する。

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、表１（Draizeによる皮膚反応の評点）に従って観察・記録する（6.5参照）。

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。（6.4参照）

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 最終報告書

試験報告書には少なくとも以下の事項を含めること。

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、原材料名等）
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、製造番号等）
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 ：試験開始時及び終了時の個別体重
個々の動物の皮膚反応結果（評点のスコア）
写真：投与部位の皮膚状態（代表例でも良い。）
9) 結果の評価と考察
10) 参考文献

## 5．眼刺激試験

5.1 目的

本試験は、眼組織と接触する可能性のある試験試料（医療機器又は原材料（眼内埋植材料は除く。））について、ウサギ眼に試験試料（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。

また、本試験前に試験液のpHを測定し、強酸性又は強アルカリ性(pH≦2又は≧11.5)を示す場合は試験を実施しない。

5.2 装置、器具及び試薬（又は同等品）

1) スリットランプ（×6）
2) 高圧蒸気滅菌器
3) 恒温器
4) pHメーター
5) 密封可能な耐熱性硬質ガラス容器
6) 生理食塩液(日局)
7) 植物油(オリブ油（日局）、ゴマ油(日局)等)
8) 注射用水(日局)
9) 2%程度のフルオレセインナトリウム(日局)溶液又は試験紙

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を使用する。

2) ウサギは、適切な方法で個体識別し、個別に適切な大きさの飼育ケージに収容し、使用前1週間以上、一定の環境、飼料で飼育する。

3) 試験開始前に、ウサギの前眼部を観察し、結膜充血、角膜混濁等の異常がないことを確認する(付表１、付表２参照)。さらに、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（6.6参照）。以上の基準を満たしたウサギを試験に使用する。

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、観察が容易であるため、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週間以上前に行なう。

4) 馴化期間中も含め、試験期間中のウサギは、適切な環境下で、ウサギ用飼料と適切な水質の水を与え、飼育する

5.4.2 試験方法

1) 試験開始前に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) ウサギの片眼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0.1mL点眼し、眼を閉じて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りの3匹のウサギの片眼に点眼し、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、Draize又はMc Donald-Shadduckの評価基準に従い評価し、記録する。

7) Draizeの評価基準における合計点数が6点以上の場合は、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

試験結果の報告書には、以下の事項を含めること。

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、原材料名等）

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、製造番号等）

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　：試験開始時及び終了時の個別体重

個々の動物の眼反応結果（評点のスコア）

写真：前眼部の状態（評点のスコアが6点以上の場合）

9) 結果の評価と考察

10) 参考文献

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

## ６．参考情報

### 6.1 改正点

前ガイドラインからの主な改正点は、以下のとおりである。

1) 従来はスタンダード名と番号を引用するにとどめていた皮膚刺激試験、皮内反応試験についても、具体的試験法を記したこと。
2) 眼刺激試験も含めて、刺激性試験としたこと。
3) 全体構成や報告書の内容について整合をとったこと。

### 6.2 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。

### 6.3 動物の毛刈り

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良い。

### 6.4 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、ISO10993-10では、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。

### 6.5 試験液の接触時間

本報告書では、皮膚における一次刺激性を評価する方法を示した。このため、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時間により変更することも可能である（ISO10993-10参照）。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。

### 6.6 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(日局)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(日局)溶液にて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(日局)溶液を眼科用の硝子棒に採り、上または下眼瞼を引っ張り投与する。両眼瞼を指にて軽く閉じ、角膜等を染色する。直接フルオレセインナトリウム(日局)溶液を点眼し染色したい場合は2%フルオレセ

インナトリウム(日局)溶液を生理食塩液にて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(日局)溶液は防腐性を失うために調製後、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、ひっかき傷や毛が眼に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、記録にとどめること。

## 7．参考文献


1) T. O. McDonald, J. A. Shadduck, Dermatoxicology and Pharmacology, p139, John Wiley & Sons, New York, 1977

2) Francis N. Marzulli, H. L. Maibach edited, Dermatoxicology, 4th ed., Eye irritation (Robert B. Hackett, T. O. McDonald), pp749-815, Hemisphere Publishing, 1991

表2

| | | 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)Draize Scale for Scoring Ocular Lesions

I 角膜

A 不透明度:混濁の程度(もっとも混濁した領城を読み取る。)

| | |
|---|---|
| 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 |
| 虹彩の細部がわずかにぼやけて見える | 2 |
| 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 |
| 虹彩が透視できない | 4 |

B 角膜損傷域

| | |
|---|---|
| 正常 | 0 |
| 0<A<1/4 | 1 |
| 1/4≦A<1/2 | 2 |
| 1/2≦A<3/4 | 3 |
| 3/4≦A | 4 |

評点:A×B×5 (最大値:80)

II 虹彩(A)

| | |
|---|---|
| 正常 | 0 |
| 瞳孔形成亢進、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 |

評点:A×5 (最大値:10)・

III 結膜

A 発赤(角膜及び虹彩を除く瞼、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 |
| 眼瞼の部分的外反を伴う腫脹 | 2 |
| 腫脹を伴う1/2程度の眼瞼閉鎖 | 3 |
| 腫脹を伴う1/2以上の眼瞼閉鎖 | 4 |

C 分泌物

| | |
|---|---|
| 正常 | 0 |
| 常量以上の分泌物(正常な動物の内眥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 |

評点:(A+B+C)×2 (最大値:20)

判定基準

| 合計点数 | 評価 |
|---|---|
| 0～5 | 無刺激物 |
| 6～15 | 軽度刺激物 |
| 16～30 | 刺激物 |
| 31～60 | 中等度刺激物 |
| 61～80 | 中～強度刺激物 |
| 81～110 | 強度刺激物 |

付表2)Scale for Scoring Ocular Lesions-Slit Lamp(McDnald-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みえる。
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、本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瞼、　球結膜充血。

結膜浮腫
0=正常
1=瞼の外反のない腫脹
2=上眼瞼の部分的外反を伴った腫脹
3=上下眼瞼の同程度の部分的外反を伴った腫脹
4=下眼瞼の部分的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、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

本試験は、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

2.1　ISO10993-11（1993年）　Biological evaluation of medical devices. - Tests for systemic toxicity

2.2　ASTM Standard F750-87　Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the mouse

2.3　USP 25　Biological Reactivity Tests、 In-vivo.- Systemic Injection Test

2.4　BS5736-3（1981年）　Method of test for systemic toxicity; assessment of acute toxicity of extracts from medical devices.

2.5　化審法「新規化学物質に係る試験方法について」の一部改正等について　（スクリーニング毒性試験法の制定）（昭和61年12月5日）

## ３．急性毒性試験

3.1 目的

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）から抽出した抽出液（以下「試験液」とする。）中に、急性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。

3.2 試験の要約

ここに示す試験法は、基本的に引用規格2.2に基づいて作成したものである。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、1群5匹のマウスに対し、静脈内投与（生理食塩液試験液）又は腹腔内投与（植物油試験液）する。投与後72時間まで観察し（５．１参照）、対照液投与群と比較して、急性毒性の有無を評価する。

3.3 試験液の調製

3.3.1 抽出溶媒

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

3.3.2 抽出溶媒と試験試料の量の比

原則として、付録、1.1 の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

付録、1.2 に示した温度・時間条件の中から、試験試料の耐えられる最高温度条件を選んで抽出する。

試験試料が耐えられる最高温度条件とは次の条件を満たすものである。

①抽出温度は試験試料の融点より低い。

②抽出条件で試験試料は分解しない。

③溶出物質が揮散あるいは分解しない。

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)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℃に保存し、24時間以内に試験に用いる。

3.3.5 対照液の調製

試験試料を加えないで抽出溶媒単独で、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

体重17～23gの栄養状態のよい健康なアルビノマウス。使用前1週間程度、一定環境/飼料で飼育し、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。雄性動物を用いる。ただし、試験動物の性別は、女性に適用される医療機器の試験などの場合は雌を用いるなど、試験試料の用途やそれを構成する原料化学物質を考慮して決定することが望ましい。

3.4.2 試験用量

試験液の投与量は、原則として、試験動物の体重 1kg につき試験液 50mL とする（5.2参照）。

3.4.3 投与経路

生理食塩液抽出の試験液及び生理食塩液抽出の対照液は静脈内投与とし、植物油抽出の試験液及び植物油抽出の対照液は腹腔内投与とする。

3.4.4 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24時間、48時間、72時間経過後に行う。
一般状態は、基本的には表1に従って記録する。死亡例が認められた場合、発見後ただちに剖検する。

体重測定　：全例について投与前、投与後24時間、同48時間、同72時間経過後に測定する。（5.3参照）

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。

表1．一般状態の分類

| | |
|---|---|
| Normal、 no symptoms(正常) | 副作用は認められない |
| Slight(軽度な反応) | 軽度の運動機能低下、呼吸困難、腹腔刺激性の症状が認められる。 |
| Moderate(中等度の反応) | 腹腔刺激性、呼吸困難、運動機能低下、眼　まぶた下垂、下痢が明確に認められる。 |
| Marked(著しい反応) | 虚脱、チアノーゼ、振せんあるいは、重度の腹腔刺激性、下痢、眼瞼下垂、呼吸困難が認められる。 |
| Dead (死亡) | 死亡 |

3.4.5 判定方法

観察期間を通して、試験液投与群の全ての動物が、対照液投与群の動物と比較して強い毒性症状（一般状態、体重推移、病理解剖結果）が認められない場合に急性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、或いは2匹以上の動物で著しい毒性症状(表1.〝Marked〟の症状)を示した場合は急性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異常(表1.〝Slight〟の症状)を示した場合、或いは1匹の動物だけが重い症状(表1.〝Marked〟の症状)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。毒性症状は認められないが、1群全ての動物が有意な体重減少を示した場合（例えば対照液投与群と比較し、統計学的に有意な減少を示した場合）も同様に再試験(試験液投与群及び対照液投与群各々例数10匹)を行う。再試験の結果、試験液投与群のいずれの個体も、対照液投与群との比較において、強い毒性症状を示さなかった場合、急性毒性はないと判定する。

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含めること。

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、原材料名等)
4) 試験液の調製方法
5) 試験方法
6) 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)
7) 結果の評価と考察
8) 参考文献

## 4．亜急性毒性試験（亜慢性毒性試験）

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、亜急性（亜慢性）毒性を有する物質が存在しないことを確認するためのものである。ここに示す試験法は、引用規格2.5に基づいた評価方法であり、亜急性毒性試験の一例である。したがって、全身毒性を検出するための検査(観察)項目は、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、試験計画時ごとに充分検討すべきである。

4.2 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、雌雄各5匹のラットに対し、28日間(亜慢性毒性試験については90日間)連続静脈内投与し、対照液を投与した対照群との間で毒性を比較する。

4.3 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3.3項に従う。

4.4 試験法

4.4.1 試験動物

原則としてラット、雌雄、５或いは６週令とし、体重の幅は平均体重の±20%以内とする。

4.4.2 試験用量

試験液の投与量は、原則として、試験動物の体重 1kg につき試験液 20mLとする（5.5参照）。

4.4.3 投与経路及び投与期間

静脈内投与とする。亜急性毒性試験の場合、投与期間は28日間とする（5.6参照）。

4.4.4 観察及び測定項目

一般状態観察　：毎日少なくとも１回観察する。

体重測定　：週1回以上測定する。

摂餌量　：週１回以上測定する。

血液学検査　：白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、白血球百分比を計測する。また、プロトロンビン時間、活性部分トロンボプラスチン時間等の血液凝固検査を実施する。

血清生化学的検査：アルカリフォスファターゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、乳酸脱水素酵素、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、中性脂肪、リン脂質、血糖、尿素窒素、クレアチニン、無機リン、Ca、Na、K、Cl、アルブミン／グロブリン比を測定する。

病理解剖学的検査：全例実施する。以下に示す器官は、常法に従って保存する。
脳*、下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺*、肝臓*、腎臓*、脾臓*、副腎*、胃、膀胱、骨髄（大腿骨）、精巣*、精巣上体、精のう腺、前立腺又は卵巣*、子宮及び肉眼所見、その他解剖所見から標的器官と認められた器官・組織。
なお、*印を付した諸器官はその重量を測定する。

病理組織学的検査：心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎及び肉眼所見、その他解剖所見から標的器官と認められた器官・組織。

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含めること。

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、原材料名等）
4) 試験液の調製方法
5) 試験方法
6) 試験結果
表 ：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
写真：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）
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）
7) 結果の評価と考察
8) 参考文献

## 5．参考情報

### 5.1 急性毒性試験の観察期間

急性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、観察時間を延長しても良い。BS5736-3（1981年）では、最高14日間との規定があるので、これを目安とする。

### 5.2 急性毒性試験の投与用量

急性毒性試験の投与用量は、充分な実績を持つASTM Standard F750-87 及び USP 25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、投与用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、充分に考慮すべき試験条件の一つである[2)]。この指針と異なる用量を設定する場合には、その根拠を試験計画書及び最終報告書に明記すべきである。

### 5.3 試験動物の体重値

試験動物の体重値は、全身毒性の有無を知るための目安となる。USP25では、５匹中３匹以上の個体に2g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。

### 5.4 埋植試験の利用

「4. 亜急性毒性試験（亜慢性毒性試験）」には抽出液の投与による亜急性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良い）に試験試料の埋植が可能な場合で、かつ、この報告書に挙げた評価項目が適切に評価されていれば、亜急性毒性試験（亜慢性毒性試験）の結果としても用いることができる。

### 5.5 亜急性毒性試験における投与量

「4. 亜急性毒性試験（亜慢性毒性試験）」では、参考文献[1]に基づき、ラットにおける投与量を20mL/kgとした。当該医療機器の臨床での使用を考慮し、妥当性のある投与用量を設定し、根拠を説明することが重要である。

5.6 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。ISO10993-11では、亜急性毒性は試験試料投与後14～28日間の間に起こる毒性とし、亜慢性毒性は試験試料投与後　通常90日間（但し寿命の10%を超えない期間）に起こる毒性と定義している。

## 6．参考文献


1) Derelanko、 M. J. & Hollinger、 M. A. : CRC Handbook of Toxicology. CRC Press、 New York、 p78

2) Diehl、 K-H、 Hull、 R.、 Morton、 D.、 Pfister、 R.、 Rabemampianina、 Y.、 Smith、 D.、 Vidal、 J-M and van de Vorstenbosch C. : A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood、 Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 2001 21、 15–23

# 第７部　発熱性物質試験

## １．適用範囲

本試験は、ウサギを用いた発熱性物質試験とエンドトキシン試験の２法からなる。前者の試験の目的は、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。一方、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、前者の試験に加え後者の試験も実施して、エンドトキシン量を測定することが望ましい。

ISO10993 Biological evaluation of medical device では、発熱性物質試験は Part 11: Systemic toxicity に含まれ、米国薬局方(USP24)の発熱性物質試験とエンドトキシン試験を推奨している。これらの試験方法は、本報告書と試験感度的にほぼ同等と考えられることから、ISO10993-11 あるいは USP24 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無い。

## ２．引用規格

2.1 第十四改正日本薬局方、一般試験法　発熱性物質試験法

2.2 第十四改正日本薬局方、一般試験法　エンドトキシン試験法

2.3　JIS K8008-1992　4.3.1 - 4.3.3

2.4　USP 24　Biological Reactivity Tests、 In-vivo.

2.5 ISO10993-11: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。(5.1 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、日本薬局方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時間観察し、注射直前の体温より、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、1.1 の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

付録1、1.2 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（5.2 参照）。

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。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℃に保存し、これを試験液として 24 時間以内に発熱性物質試験を行う。

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（5.3 参照）。

3.4 発熱性物質試験法（5.4 参照）

3.3 に示した方法で調製した試験液を用いて、第十四改正日本薬局方・発熱性物質試験法を準用して、試験を行う（5.5 参照）。

3.4.1 試験動物（5.6 参照）

体重 1.5kg 以上の栄養状態のよい健康なウサギで、使用前1週間以上は一定飼料で飼育し、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。

試験に用いたウサギを再び使用するには、休養期間をできるだけ長くし、また、発熱性物質陽性と判定された試験に用いたウサギは、再び使用しない。試験動物は、固定器具及び体温測定に慣らすために、試験前1～3 日間に少なくとも1日は、固定して5-6時間体温を測定する。この期間、試験動物1匹ずつをおりに入れ、できるだけ興奮しないようにし、試験日には特に注意して取り扱う。

試験室の温度は、試験前 48 時間以上及び試験中 20～27℃で、なるべく恒温恒湿に保つ。

3.4.2 装置及び器具（5.7 参照）

温度計：直腸体温計又はこれと同一感度の記録計を用いる。ただし、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。

器具類の滅菌：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、発熱性物質を除く。エンドトキシンフリーのディスポーザブル製品を用いても良い。

3.4.3 試験用量（5.8 参照）

試験液の投与量は、原則として、試験動物の体重 1kg 当たり試験液 10mL とする。

3.4.4 操作（5.9 参照）

試験は、試験動物が入れられていた部屋と同一温度及び湿度の部屋で行う。

試験動物は、通例、適当な固定器に固定する。

直腸体温測定は、温度計を直腸内に 60～90mm の範囲内で一定の深さに十分な時間挿入した後、読みとる。

第１回体温測定の数時間前から、その日の最終体温測定まで飼料を与えない。

試験液の注射前、体温を１時間間隔で３回測定し、第２回及び第３回の測定体温がほとんど一致した時、第３回の値を対照体温とする。第２回及び第３回の測定体温が、一致しない場合、又は一致してもその値が 39.8℃を超える時は、その試験動物を試験から除外する。

試験液は 37℃に加温し、第３回の体温を測定した後 15 分間以内に、耳静脈に注射する。

注射後の体温測定は、注射後１時間間隔で３回行う。

対照体温と最高体温との差を体温上昇とする。

体温測定は、サーミスタ温度測定装置とパーソナルコンピュータなどによる自動測定も可能である。

3.4.5 判定（5.10 参照）

第１回の試験には、試験動物３匹を用いる。注射後の体温上昇 0.6℃以上の試験動物が２又は３匹の時は、発熱性物質陽性と判定する。

また、体温上昇 0.6℃以上の試験動物が１匹であるとき、又は３匹の体温上昇の合計が 1.4℃を超える時は、さらに試験を行う。

第２回の試験には試験動物５匹を用い、体温上昇 0.6℃以上の試験動物が２匹以上のときは、発熱性物質陽性と判定する。

付録１、1.2 (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、同じ試験液及び 1.2 (5)の条件で抽出して得た試験液を用いて、エンドトキシン特異的なリムルス(LAL)試薬による試験（例、JIS K8008 4.3.3)を実施して、エンドトキシンの有無を確認する必要がある。これらの結果を総合して発熱性物質の由来を考察すべきである。

エンドトキシン特異的リムルス(LAL) 試薬によるエンドトキシン試験については、６．参考文献に示す文献も参照されたい。(5.11 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含めること。

1) 試験実施機関及び験責任者
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、原材料名等）
4) 試験液の調製方法
5) 試験方法
6) 試験結果
   表 ：個体毎の体温値
7) 結果の評価と考察
9) 参考文献

## 4．エンドトキシン試験（5.11 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、ゼラチンなど）は、その材料から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、材料の性質、製品の使用目的などに応じた適切な条件を付録１の１．２(1) – (5)の中から選択し、又は可能なら連続振とう又は超音波処理を行って抽出し、エンドトキシン特異的 LAL 試薬によるエンドトキシン試験（第十四改正日本薬局方　エンドトキシン試験又は、JIS K8008 4.3.3）を実施する（5.12 参照）。

## 5．参考情報

### 5.1 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。ＧＭＰにおいて、原材料の受入れ時や製品製造過程中のエンドトキシン汚染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ＧＭＰ中や規格・基準中で定められるべきものである。次の二点が重要である。

いわゆる合成ポリマーの場合、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ないので、材料中の非エンドトキシン発熱性物質の有無も調べる必要があるために、ウサギを用いた試験で調べる必要がある。

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も、付録１、１．２(1)・(3) に規定したような条件で抽出すると、発熱活性が検出できないことがある。この現象は、エンドトキシンの熱による失活というより、おそらく材料（表面）への吸着・結合による回収損失や抽出液の pH 変化に伴うエンドトキシンの加水分解による活性低下などによるものと考えられる。

最終製品の品質管理試験としてのエンドトキシン試験は、本報告書の対象外である。製造工程におけるバイオバーデンにおけるグラム陰性菌由来のエンドトキシン（極めて強い発熱性物質）やグラム陽性菌並びに真菌（かび、酵母）に由来する発熱性物質汚染は、医療機器の GMP で対応すべき事項である

### 5.2 抽出温度

従来から行われていた試験試料に対する発熱性物質試験法においては、その試験液の調製が付録１の1.2 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、参考文献1)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1.2(1)～1.2(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。エンドトキシンは弱酸性及びアルカリ性条件下では容易に加水分解(リピド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。そのため、付録1:1.2 (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り抽出液の pH が変動し、エンドトキシン自体の分解が起こり得る。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。おそらく、参考文献 1)及びその他の報告 に見られた活性低下は、これらの要因も関与しているものと思われる。

5.3 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により行い、もし、肉眼の観察により不溶性の物質が認められたら、遠心して、これを除去する。不溶性の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ため)。また、無菌的な取り扱い（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。

5.4 発熱性物質試験法

本報告書に記載されている発熱性物質試験法は、日本薬局方の方法に準じたものである。この発熱性物質試験法は、第六改正日本薬局方の一般試験法に収載されて以来、ウサギ体重の上限の撤廃がなされた他は、ほとんど改正されていない。したがって、細部に亘っては設備や機器などが進歩している現代とは若干そぐわない箇所（後述）も認められるので、現行の USP あるいは欧州薬局方(EP)の方法を参考に実施しても良い。

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。エンドトキシンによる発熱は、内因性の発熱性物質である数種のサイトカイン（インターロイキン－１、腫瘍壊死因子、インターフェロンなど）の合成遊離を伴って、最終的なメディエーターと考えられるプロスタグランジンが視床下部に作用する結果生じる神経伝達物質の代謝バランスの撹乱によるものと考えられている。エンドトキシン以外の化学的物質でも体温調節機構の撹乱をもたらして、体温の上昇をもたらす向神経性物質（例えば、LSD、モルヒネ）が知られている。

5.5　化学物質による発熱事例

医療機器などに関連した化学的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（参考文献 2)）は、ゴムの老化防止剤として用いられていたN-phenyl-β-naphthylamine及びaldol-α-naphthylamine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。また、実際に食道カテーテル用のゴムからは N-phenyl-β-naphthylamine 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 naphtylamine は発ガン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（参考文献 3)）。 駆虫剤として使用される 4、6-dinitro-o-cresol や黒色硫化染料中間体として使われている dinitrophenol などは、酸化的リン酸化の脱共軛により、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-nitrophenol、m-nitrophenol、p-nitrophenol 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。

5.6　試験動物

体重 1.5kg 以上の健康なウサギを用いて行うことになっており、現在では体重の上限規定は撤廃されている。4-5 週令の幼弱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 匹ずつ飼育するという規定は飼育の最初から守る方がよい。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行うことが望ましい。

飼育室及び試験室内の温度変化は、各国薬局方では±3℃以内の変動にとど

めている。飼育室及び試験室の間はドアーで区切られていて、両室内の温度・湿度条件は同じであることが望ましい。試験時におけるウサギの処置法に関しては、無固定の布巻き式体温測定法（試験者がウサギを膝と腕で静かに押さえて行う方法）は現在ではあまり行われておらず、首枷固定で試験が行われている。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で行われる。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っ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、飼育期間中に首枷固定の姿勢をとることに馴れるようにトレーニングを行う必要がある。

ウサギの使用頻度に関しては、日本薬局方では試験に使用したウサギの休養期間を特に具体的に規定していないが、USP では同一のウサギを試験に繰り返し使用する場合、少なくとも 48 時間の休養期間を置くと規定されている。EP ではこれが 3 日間と規定されている。したがって、少なくとも 2 日間の休養は与えるべきであろう。

発熱性物質陽性と判定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耐性を獲得し、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あることに基づいている。USP では 2 週間の経過、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。

5.7 温度計

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（±0.1℃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。直腸温測定にあたり、温度計の挿入は日本薬局方では 60～90 mm の範囲内としている。これは、USP や EP 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、これらの電気的連続測温の普及とともに挿入深度の幅を見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、あらかじめ 250℃で 30 分間以上の乾熱滅菌により、グラム陰性菌由来のエンドトキシンの発熱活性を不活化させる。これらの器具は環境中にあまねく存在するグラム陰性菌によって汚染されているため、グラム陰性菌の外膜の構成成分であるエンドトキシン（化学的には耐熱性のリポ多糖）を不活化させるには強い加熱処理条件を必要とする。

エンドトキシン試験のための試験液を調製するため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（パイロジェンフリー）であることが保証されたディスポーザブルのものが市販されているので、これらを用いることもできる。

抽出及び希釈液には生理食塩液を用いるが、日本薬局方の生理食塩液を用いればパイロジェンフリーであることが保証されている。用いた器具及び容器のパイロジェンフリーを確認するための陰性対照試験を用いた生理食塩液で処理して行う必要がある。

5.8 試験用量

試験用量は、通例　体重 1 kg につき試験液 10 mL としており、対照体温測定後 15 分間以内に耳静脈より投与する。EP での規定では、試験用量が 0.5mL/kg～10mL/kg の範囲内となっており、少量の投与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、無菌環境下で行う必要はないと考えられる。

5.9 操作方法

試験液投与前の体温を 1 時間間隔で 3 回測定し、第 2 回及び第 3 回の測定体温が、ほとんど一致したとき第 3 回の値を対照体温とすると定めている。対照体温の測定だけに 3 時間以上を要することになるが、USP ではこれが試験液を注射する 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（EP の場合は 90 分）。

対照体温の温度の規定は、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 は日本薬局方と同じ規定だが、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。

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る。1995 年に改訂された USPXXIII では測定間隔が 30 分に改められており、これは注射後 30 分以内の一定間隔で測定する EP の方法とほぼ整合している。現在では、ほとんどの施設で電気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、EP の方法を参考に、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良い。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さらに 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、本報告書に従い 1 時間間隔の測定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。

5.10　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っているので、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十四改正日本薬局方の方法でもある。

5.11 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、本文に揚げられている JIS K8008 4.3.3 のほか、第十四改正日本薬局方の一般試験法に収載される【エンドトキシン試験法】が参考となる。その他、日本薬局方の技術情報誌日本薬局方 TI（参考文献 4)）には、測定手法、試験例、注意事項などについて参考になる内容が記載されている。

エンドトキシン試験法は、グラム陰性菌由来のエンドトキシンがカブトガニ (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インビトロ試験法であり、試験方法としては、ゲル形成を指標とするゲル化法、ゲル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、発熱性物質試験法（エンドトキシンを対象とした）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。

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。

5.12 エンドトキシン特異的ＬＡＬ試薬

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）などは発熱活性を有し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、β－グルカンとは反応しないエンドトキシンに特異的な LAL 試薬が開発市販されている。また、β－グルカンはエンドトキシンが示す生物活性を増強する可能性があることが知られている[9]。

## 6．参考文献


1)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－リムルス試験と発熱試験の関係－、防菌防黴、19、561-566 (1991)

2)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)

3)毒性試験講座：産業化学物質、環境化学物質、和田攻編、p.129-151、地人書

館 (1993)
4) 日本薬局方技術情報 1995：エンドトキシン試験法、p.46-53、薬業時報社 (1995)
5) S.Kanoh、K.Mochida、and Y.Ogawa、 " Studies on heat-inactivation of pyrogen from Escherichia coli、" Biken Journal、 13、 233-239(1970)
6) 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)
7) 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、p128-147、菜根出版、東京 (1990)
8) 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)
9) Y. Adachi、 M. Okazaki、 N. Ohno、 and T. Yadomae. "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)

# 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又は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 (1992 年)：Biological evaluation of medical devices. Part 4: Selection of tests for interactions with blood

2.2　ISO/DIS 10993-4 (2000 年)：Biological evaluation of medical devices. Part 4: Selection of tests for interactions with blood

2.3　ASTM Standards：F756-93 Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials

## ３．試験項目の選択

血液適合性試験として、表１又は表２に示す項目の評価を実施することが望ましい（6.1 参照)。これらの試験は、当該医療機器の機能性試験の一環として実施しても良い。

本報告書では、溶血毒性試験の標準的な試験方法を第４項以降に示した。

表１．　血液適合性試験の評価項目 (1) 体内と体外を連結し、循環血液に接触する医療機器（又はその原材料）の評価項目

| 評価カテゴリー | 方法（例） | 備考 |
|---|---|---|
| 血栓性 | 光学顕微鏡下での観察<br>血小板，白血球，血球凝集物，赤血球，フィブリン等の粘着/付着状態 | 走査式電子顕微鏡での観察に置換えても良い |
| 血液凝固系 | PTT 測定 | |
| 血小板 | 血小板数測定 | |
| 血液学的項目 | 白血球数及び白血球百分率の測定<br>血漿ヘモグロビン濃度の測定，または溶血毒性試験の実施 | 本報告書における溶血毒性試験の標準的な試験方法は次項参照のこと。 |
| 補体系 | 補体活性化産物（C3a または C5a）の測定 | |

表２．血液適合性試験の評価項目（2）循環血液に接触する体内埋込み医療機器（またはその原材料）の評価項目

| 評価カテゴリー | 方法（例） | 備考 |
|---|---|---|
| 血栓性 | 埋込み試験等での血栓による閉塞率，血流量低下の測定<br>埋込み試験後の当該医療用具の観察結果（外観及び顕微鏡観察による血栓付着状況）<br>埋込み試験後の臓器観察（当該医療用具により形成された血栓の影響を観察する） | |
| 血液凝固系 | PTT，PT，TT 測定<br>血漿フィブリノーゲン濃度測定<br>ＦＤＰ定量 | |
| 血小板 | 血小板数測定<br>血小板凝集能測定 | |
| 血液学的項目 | 白血球数及び白血球百分率の測定<br>血漿ヘモグロビン濃度の測定，または溶血毒性試験の実施 | 本報告書における溶血毒性試験の標準的な試験方法は次項参照のこと。 |
| 補体系 | 補体活性化産物（C3a または C5a）の測定 | |

## ４．溶血毒性試験

### 4.1 試験液の調製法

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）の量の比については、付録、1.1 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。抽出条件は、付録、1.2 に示したものの中から試験試料が耐えられる最高温度条件を選び試験液を調製する。同一ロットの３試験試料を別々に１回抽出し、試験液 E1，E2，E3 を得る。

試験試料が耐えられる最高温度条件とは、次の条件を満たすものである。

①抽出温度は試験試料の融点より低い。

②抽出条件で試験試料は分解しない。

③溶出物質が揮散あるいは分解しない。

示した温度範囲で試験試料の分解が温度依存的である場合には、抽出温度を変えて試験を行い、実際の使用条件下での生物反応を類推すべきである。

### 4.2 脱線維血の調製法

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。

調製した血液 0.2mL を生理食塩液 10mL に添加し、750 x 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（0.01 以下）を確認する（6.2 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こと。試験試料によっては（例：セラミックス）、抗凝固剤が失効することがあるので注意が必要である。

4.3 対照液の調整

4.3.1 陰性対照（非溶血対照）液

試験液の代わりに生理食塩液を用いて、4.4項の操作を行う。

4.3.2 陽性対照（完全溶血液）液

蒸留水（6.3参照）10mLに脱線維血を0.2mL添加し、完全溶血を起こした液を陽性対照液とする。

4.4 試験操作

試験液10に対して脱線維血0.2の割合で添加後、栓をして1回転倒混和した後、37±1℃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。その後、750xg で5分間遠沈し、上清を分取する（6.4参照）。

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、メトヘモグロビン等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。試験は、各試験液（E1、E2、E3）それぞれについて1回ずつ行い、その平均値を算出して当該時間における溶血率とする（6.5、6.6、6.7参照）。

[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 540nm 又は 576nm における吸光度を測定する。別に陰性対照液並びに陽性対照液の吸光度を測定し、次式により溶血率を求める。

$$\text{溶血率（\%）} = \frac{\text{（試験液吸光度）} - \text{（陰性対照液吸光度）}}{\text{（陽性対照液吸光度）} - \text{（陰性対照液吸光度）}} \times 100$$

[第Ⅱ法]

上清の総ヘモグロビン量をシアンメトヘモグロビン法により測定し、この値から溶血率を算出する。

1) Drabkin 試液；$K_3[Fe(CN)_6]$ 200mg/L, KCN 50mg/L, $NaHCO_3$ 1.0g/L。（6.8参照）

2) 操 作；試験管に Drabkin 試液 4.5mL をとり試験液上清、陽性対照液及び陰性対照液をそれぞれ0.5mL加え、混和後20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540nmで測定する。次の計算式より溶血率を求める。

$$\text{溶血率（\%）} = \frac{\text{（試験液吸光度）} - \text{（陰性対照液吸光度）}}{\text{（陽性対照液吸光度）} - \text{（陰性対照液吸光度）}} \times 100$$

4.5 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3を用いて、溶血性の程度をグレード分けしても良い。当該原材料の用いられる医療機器の種類，血液との接触時間などを考慮して、リスクを考察することが望ましい（6.9参照）。

表3．判定表（ASTM F756-93に基づく）

| 溶血率（%） | グレード |
|---|---|
| 溶血率 ≦ 2 | 非溶血 |
| 2 ＜ 溶血率 ≦ 10 | 軽度の溶血性あり |
| 10 ＜ 溶血率 ≦ 20 | 中等度の溶血性あり |
| 20 ＜ 溶血率 ≦ 40 | 強い溶血性あり |
| 40 ＜ 溶血率 | 非常に強い溶血性あり |

## 5．試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を含めること。

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、原材料名等）
4) 試験液の調製方法
5) 試験方法
6) 試験結果（溶血率）
7) 結果の評価と考察
8) 参考文献

## 6．参考情報

### 6.1 評価項目の選択について

表1及び表2に挙げた評価項目は、医療機器又は原材料が血液と接触した際に起こり得る種々の反応を調べるためのもので、ISO 10993-4（1992年）及びISO/DIS 10993-4（2000年）で挙げられた5つの評価カテゴリー（thrombosis, coagulation, platelets, haematology, complement system*）より設定した。当該医療機器の臨床での使用形態（血液との接触時間や表面積等の条件）を考慮して、評価項目と評価方法、評価条件（in vitro、ex vivo、in vivo）を選択することが望ましい。なお、本報告書では、循環血液と間接的に接触する医療機器は対象から外しているが、例えば抽出液を用いた溶血毒性試験を実施して溶血性を評価するなど、これらの医療機器についても、想定される使用状況を勘案して、評価項目を判断すべきである。

*注 ISO 10993-4（1992年）ではimmunologyと記載されているが、ISO/DIS 10993-4（2000年）の記述に合わせ、本報告書ではcomplement system（補体系）とした。

### 6.2 脱繊維血調製

脱繊維血調製のための採血法は、頸動脈採血、耳静脈採血、耳動脈採血、心臓採血のいずれでもよい。いずれで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。従って、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。

生理食塩液中に浮遊させた後、上清（4.4 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 576nm の吸光度が 0.01 以下であれば試験に充分耐える。

6.3 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。

6.4 インキュベーション時間

ここでは、インキュベーション時間を１時間、２時間及び４時間の３点を採っているのは、最長時間の４時間のみ１点でもよいようにも思われるが、反応は経時的に進むのが一般的であり、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。また、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等さまざまなパターンがあり、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的な変化を把握することも重要である。

試験試料量が少ないために十分な量の試験液が得られない場合は、インキュベーション時間を４時間のみとしてもよい。

6.5 メトヘモグロビン等

メトヘモグロビン等とは、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。

6.6 溶血率の算出方法

第Ⅰ法、第Ⅱ法の選択に関して、本質的には第Ⅱ法のシアンメトヘモグロビンとして測定する方法に統一するのが理想である。しかし、シアン化合物の不必要な使用を避ける目的から、メトヘモグロビン等吸収が認められない場合にはシアンを用いない第Ⅰ法での測定を行うこととした。

6.7 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 500-700nm の吸収波形を、陽性対照液の波形と比較するのも良い。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、540nm と 576nm 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、参考文献２または３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。

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

6.8 Drabkin 試薬の使用期限

調製した Drabkin 試薬は褐色ビンに入れ、冷暗所に保存する。使用期限の目安は約１ヶ月である。

6.9 評価

得られた溶血率が許容できるかどうかの判断は、当該医療機器の生体との接触時間，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。表３は、インキュベーション時間等、試験条件が、ほぼ同等のASTM F756-93より引用した判定表である。
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。

## 7．参考文献

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
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, p1-11, 丸善，東京，(1979)
3)日本分析化学会編：　分析化学便覧，p1357-1358, 丸善, 東京, (1966)

# 付録

## 医療用具又は材料からの抽出液の調製における抽出溶媒／試料比及び抽出温度・時間

1.1 抽出溶媒／試料比

試験試料の形状や厚さなどの違いによって、表示した溶媒／試料比を用いる。

| 試験試料の形状 | 厚さ、材質 | 抽出溶媒１ｍｌに対する試験試料の量（許容範囲±10%以内） |
|---|---|---|
| フィルム又はシート | ≦0.5mm | ６ｃｍ² （表面積（両面）の合計） |
| | >0.5mm | ３ｃｍ² （表面積（両面）の合計） |
| 管材料 | 肉厚が<0.5mm | ６ｃｍ² （内外面の面積の合計） |
| | 肉厚が0.5～1mm | ３ｃｍ² （内外面の面積の合計） |
| スラブ、管材料モールド成形物 | >1mm | ３ｃｍ² （表面積の合計） |
| 表面積の測定が困難な試料 | エラストマー | ０．１ｇ |
| | プラスチック又は他のポリマー | ０．２ｇ |

1.2 抽出温度・時間

| | | | |
|---|---|---|---|
| (1) | 121 ± 2° | 1 ±0.2時間 | オートクレーブ |
| (2) | 70 ± 2° | 24 ±2 時間 | 恒温器 |
| (3) | 50 ± 2° | 72 ±2 時間 | 恒温器 |
| (4) | 37 ± 1° | 72 ±2 時間 | 恒温器 |
| (5) | 室温 | 72 ±2 時間 | |