

薬生機審発 0106 第1号
令和 2年 1月 6日

各都道府県衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長
(公 印 省 略)

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

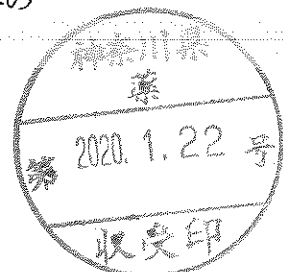
医療機器の製造販売承認申請等に際して添付すべき資料のうち、生物学的安全性評価に関する資料の取扱いについては、「医療機器の製造販売承認申請等に必要生物学的安全性評価の基本的考え方について」(平成 24 年3月 1 日付け薬食機審発 0301 第 20 号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知。以下「旧生安性通知」という。)に基づき取り扱ってきたところです。今般、医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方について別紙のとおり改正しましたので、下記に御留意の上、貴管内関係団体、関係業者等への周知方お願いします。

また、これに伴い、旧生安性通知は、下記3記載の経過措置期限日の翌日から廃止します。

なお、本通知の写しを独立行政法人医薬品医療機器総合機構理事長、一般財団法人日本医療機器産業連合会会長、一般社団法人米国医療機器・IVD 工業会会長、欧州ビジネス協会医療機器・IVD 委員会委員長及び医薬品医療機器等法登録認証機関協議会代表幹事宛て送付することを申し添えます。

記

1. 本通知は、医療機器の製造販売承認申請、認証申請及び届出(一部変更承認申請、一部変更認証申請及び届出事項変更届出を含む。以下「製造販売承認申請等」という。)に際しての生物学的安全性評価の基本的考え方を示したものであること。
2. 現時点において妥当とされる科学的知見に基づき作成されたものであり、科学の



進歩等を反映した合理的根拠に基づくものであるならば、本通知によらずに試験を行い、その結果を申請資料等として用いても差し支えないこと。また、既に実施された試験等について、合理的根拠をもって妥当性を明らかにした上であれば、申請資料等として用いても差し支えないこと。

3. 令和4年12月31日までにを行う製造販売承認申請等に係る資料については、なお従前の例によることができること。

また、既に実施された試験、現在実施中の試験、医療機器の製造販売承認申請等以外の目的で実施された試験又は外国での医療機器の承認申請その他の目的で実施された試験であって、本基本的考え方の意図する評価項目を満たし、得られた結果が品質、有効性評価又は、臨床上の安全性評価に足るものであると判断される試験については、個々の試験方法が改正後の基本的考え方に示された試験方法に合致しないものであっても、判断根拠を明らかにした上であれば、原則、改正後の基本的考え方に基づく試験と見なして差し支えないこと。

4. 化学的分析の結果に基づき生物学的安全性評価に係る試験の一部を省略しようとする場合には、製造販売承認申請等の前に独立行政法人医薬品医療機器総合機構が行う対面助言(医療機器評価相談(安全性)等)を利用することが望ましいこと。

医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方

1. 目的

医療機器の生物学的安全性評価は、医療機器の使用によって生じる潜在的な生物学的リスクからヒトを保護するために実施するものであり、JIS T 14971「医療機器－リスクマネジメントの医療機器への適用」（以下、JIS T 14971）又は国際規格である ISO 14971, Medical devices -- Application of risk management to medical devices（以下、ISO 14971）に規定されるリスクマネジメントプロセスの検証作業の一つとして位置づけられる（10項の1)項参照）。本文書は、医療機器の安全性評価の一環として、生物学的有害作用（毒性ハザード）のリスク評価を行うための生物学的安全性評価に関する基本的考え方を示すものである。

2. 定義

本文書において用いられる用語の定義は以下によるものとする。

1) 原材料

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

2) 最終製品

包装を含む全ての製造工程を終えた医療機器又は医療機器の構成部材をいう。該当する場合は滅菌処理も含む。ただし、出荷後、用時加工・調製され使用されるものにあつては、実際に使用される状態の製品をいう。

3) ハザード

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

4) リスク

ハザードにより引き起こされる、ヒトの健康に及ぼす不利益な影響の発生確率及びその重大さとの組合せをいう。

5) エンドポイント

医療機器の生物学的安全性を評価するために必要な項目をいう。

3. 公的規格の活用

医療機器の生物学的安全性評価は、原則として、JIS T 0993-1「医療機器の生物学的評価－第1部：リスクマネジメントプロセスにおける評価及び試験」（以下、JIS T 0993-1）あるいは国際規格である最新の ISO 10993 シリーズ（医療機器の生物学的評価関連の規格群）に準拠して行うこととする。すなわち、JIS T 0993-1 及び ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process（以下 ISO 10993-1）に準拠して、個々の医療機器の接触部位と接触期間に応じて必要な評価項目を選定する。各評価項目は ISO 10993 シリーズの各試験法ガイダンスを参考として適切な試験法を選定し安全性評価を行うこととする。各試験法については、医療機器の安全性評価を適切に実施できるのであれば、他の公的規格に準拠した試験法による評価で代替することができる。また ISO 10993 シリーズの各試験法ガイダンスとして、多くの場合、評価項目ごとに複数の

試験法が提示されているが、個々の医療機器についてどの試験法をいかに適用するか、また試験結果に基づいてそれぞれの医療機器をどのように評価すべきかについては明確に規定されていない。このため、試験実施に当たっては、4項以下を踏まえて適切な試験法を選択することが必要である。本文書及び別添の「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」では、生物学的安全性評価で留意すべき点を追記している。

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

表 本文書で引用する ISO 10993 シリーズ及び関連国際規格

ISO規格番号	表題
ISO 10993-1	Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
ISO 10993-2	Biological evaluation of medical devices -- Part 2: Animal welfare requirements
ISO 10993-3	Biological evaluation of medical devices -- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
ISO 10993-5	Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
ISO 10993-9	Biological evaluation of medical devices -- Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products
ISO 10993-10	Biological evaluation of medical devices -- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization
ISO 10993-11	Biological evaluation of medical devices -- Part 11: Tests for systemic toxicity
ISO 10993-12	Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials
ISO 10993-13	Biological evaluation of medical devices -- Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices
ISO 10993-14	Biological evaluation of medical devices -- Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics
ISO 10993-15	Biological evaluation of medical devices -- Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys
ISO 10993-17	Biological evaluation of medical devices -- Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances
ISO 10993-18	Biological evaluation of medical devices -- Part 18: Chemical characterization of materials
ISO/TS 10993-19	Biological evaluation of medical devices -- Part 19:

	Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials
ISO/TR 10993-22	Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials
ISO/TS 21726	Biological evaluation of medical devices -- Application of the threshold of toxicological concern (TTC) for assessing biocompatibility of medical device constituents
ISO 18562-1	Biocompatibility evaluation of breathing gas pathways in healthcare applications -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process

4. 生物学的安全性評価の原則

- 1) 医療機器及び原材料の生物学的安全性評価は、JIS T 14971 又は ISO 14971 に示されたリスク分析手法により実施されなければならない。すなわち、意図する使用又は意図する目的及び医療機器の安全性に関する特質を明確化し、既知又は予見できるハザードを特定し、各ハザードによる不利益のリスクを推定する必要がある。このようなリスク分析手法のアプローチにおいては、「陽性」の結果は、ハザードが検出・特定できたことを意味するものであって、それが直ちに医療機器としての不適格性を意味するものではなく、当該医療機器の安全性は、引き続き行われるリスク評価により判断される。上市後の医療機器も JIS T 14971 又は ISO 14971 により管理されるべきであり、本ガイダンス及び ISO 10993 シリーズの改訂ごとに、生物学的安全性の再評価を必ずしも求めるものではない。
- 2) 生物学的安全性評価は、次のア～クに示す情報及び本文書に準拠して実施された安全性試験結果、当該医療機器に特有の安全性評価項目の試験結果、関連の最新科学文献、非臨床試験、臨床使用経験（市販後調査を含む）などを踏まえて、リスク・ベネフィットを考慮しつつ、総合的に行う必要がある。
 - ア) 構成材料（直接的又は間接的に人体組織と接触する全ての材料）
 - イ) 添加物、製造工程での混入物及び残存物（残留エチレンオキシドについては JIS T 0993-7「医療機器の生物学的評価－第7部：エチレンオキシド滅菌残留物」を参照）
 - ウ) 包装材料（直接的又は間接的に医療機器と接触することにより化学物質が医療機器に移行し、結果的に患者や医療従事者に移行する可能性）
 - エ) 溶出物（ISO 10993-17 及び ISO 10993-18 参照）
 - オ) 分解生成物（一般原則は ISO 10993-9、高分子・セラミックス・金属の分解生成物はそれぞれ ISO 10993-13、ISO 10993-14、及び ISO 10993-15 を参照）
 - カ) 最終製品中のア)～オ)以外の成分及びそれらの相互作用
 - キ) 最終製品の性質、特徴
 - ク) 最終製品の物理学的特性（多孔率、粒径、形状、表面形態を含む）
- 3) 生物学的安全性評価は、教育・訓練が十分になされ、経験豊富な専門家によって行われなければならない。

4) 原材料及び医療機器において、以下の項目のいずれかに該当する変更や事象が確認された場合には、再度、生物学的リスクの評価を行わなければならない。

- ア) 製品の製造に使用される材料の供給元又は仕様の変更
- イ) 製品の成分・配合、加工、一次包装又は滅菌方法の変更
- ウ) 保管中、最終製品（用時加工・調整される前の製品を含む）に化学変化が認められた場合、有効期限、保管条件及び輸送条件の変更
- エ) 最終製品の使用目的に変更があった場合
- オ) 製品が人体に使用された際、何らかの有害な作用を生じる可能性を示す知見が得られた場合

上記条件に該当しても、例えば最終製品からの溶出化学物質とその溶出量を分析し、毒性学的情報に基づいた摂取許容値との対比により生物学的安全性が確保できる場合には、必ずしも生物学的安全性試験を再実施する必要はない。

5) 再使用可能な医療機器では、再使用に係る洗浄・滅菌などにおける原材料の材質に対する影響など、検証済みの再使用可能な最大サイクルを考慮した評価を実施する。

6) 医療機器の生物学的安全性について評価すべき項目の選択については、ISO 10993-1 に示されているとおり、医療機器あるいは構成部材ごとの接触部位及び接触期間によるカテゴリ分類に応じて、原則として、表 1 に示すエンドポイントを評価することが望ましい。カテゴリのいずれにも該当しない医療機器を評価する場合には、最も近いと考えられるカテゴリを選択すること（10 項の 3）参照）。医療機器が複数の接触期間のカテゴリに該当する場合は、より長期間のカテゴリに適用される項目について評価すること。また複数の接触部位のカテゴリに該当する場合は、それぞれのカテゴリに適用される項目について評価すること。

① 医療機器の接触部位によるカテゴリ分類

- ア) 非接触機器 : 直接/間接を問わず、患者の身体に接触しない医療機器
- イ) 表面接触機器
 - 皮膚 : 健全な皮膚の表面のみに接触する医療機器
 - 粘膜 : 健全な口腔、食道、尿道などの粘膜組織に接触する医療機器
 - 損傷表面 : 創傷皮膚あるいは粘膜組織に接触する医療機器
- ウ) 体内と体外とを連結する機器
 - 血液流路間接的 : 血管と一点で接触し、血管に薬液などを注入する医療機器
 - 組織/骨/歯質 : 軟組織、骨、歯髄又は歯質と接触する医療機器
 - 循環血液 : 循環血液と接触する医療機器
- エ) 体内植込み機器（インプラント）
 - 組織/骨 : 主として軟組織又は骨と接触する医療機器
 - 血液 : 主として血液と接触する医療機器

② 接触期間によるカテゴリ分類

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

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

5. 評価の進め方

生物学的安全性評価は、図 1 のフローチャートに従って行う。

- 1) 生物学的安全性評価を実施する上で、対象となる医療機器及びその構成成分の物理学的及び化学的情報を収集することが重要である。これらの情報は図 1 のフローチャートの材料、製造方法、滅菌方法、形状、物理学的特性、身体接触及び臨床使用に関する質問を充足できる内容であることが望まれる。また毒性学的リスク評価のために、少なくとも最終製品の化学的成分及び製造時に使用した残留する可能性のある加工助剤又は添加物を可能な限り明らかにしなければならない。材料の化学的特性評価を実施する場合には、ISO 10993-18 を参照する。医療機器から溶出し得る化学物質の種類と量を化学的特性評価によって把握することにより、毒性学的閾値、並びに摂取許容値に基づく安全性評価 (ISO 10993-17 参照) が可能となり、新たな生物学的安全性試験の実施の要否を判断することができる。インプラント又は血液と接触する医療機器の評価においては、物理学的特性評価に関する情報 (ISO/TS 10993-19 参照) が必要となるものがある。ナノマテリアル (nanomaterial) の特性評価には、ISO/TR 10993-22 を参照する。
- 2) 対象の医療機器と既承認／認証医療機器との生物学的安全性における同等性を判断する。ISO 10993-1 では、①原材料 (配合組成など)、②製造工程・滅菌の種類／工程、③幾何学的形状及び物理学的特性、④接触部位及び臨床適用における同等性の確認を要求している。
- 3) 2)において既承認／認証医療機器との同等性が確認できなかった場合、以下の 3 点を充足する情報又はデータにより、当該医療機器の臨床適用における生物学的安全性の担保が可能か否かを判断する。これらは、生物学的安全性におけるリスク評価の実施を正当化できる根拠及び当該医療機器の臨床適用に関連性のある化学的及び生物学的なデータとなる。
 - ① 原材料の化学物質毒性データ
 - ② ①は他の化学物質混合時にも適用可能なデータであること
 - ③ ①は当該医療機器の安全性評価可能な用量及びばく露経路を踏まえたデータであること
- 4) 2)及び3)を充足しない場合には、表 1 の評価すべき生物学的安全性評価項目及び参考情報 (10 項の 3)～6)参照) を検討して、試験を行う。
- 5) 1)～4)で得られた情報及びデータから毒性学的リスク評価を実施する (10 項の 7) 参照)。JIS T 0993-1 の B.2.1 (ISO 10993-1 Annex B の B.2.1) に記載されているとおり、生物学的ハザードを特定するために、当該医療機器を構成する原材料情報から、ハザードとなり得る化学物質を特定するとともに、臨床ばく露量の推定などにより評価を行う。これらの情報と表 1 に示す項目の評価を対比させて過不足を判断する。表 1 は、印を付したエンドポイントとなる全試験の実施を必ずしも要求するものではない。ただし、公表文献による評価を行う場合には、JIS T 0993-1 の附属書 C (ISO 10993-1 Annex C) を参考とし、客観性及び第三者による検証に耐え得るよう、その妥当性を明らかにする必要がある。

- 6) 表1に示されたエンドポイントのみでは、当該医療機器の生物学的安全性評価が不十分と考えられる場合、その特質を十分考慮して評価項目を検討する必要がある。例えば、歯科裏装用セメントに関する歯髄・象牙質使用模擬試験やコンタクトレンズに係る家兎眼装用試験のように医療機器固有の試験が必要となる場合の他、毒性試験結果などから免疫系への影響が疑われた場合に免疫毒性に関する評価が必要となる場合、あるいは細胞/組織を使用した医療機器の評価など、表1に示された試験を単純に適用するのが困難な場合もある。また生体内で経時的に吸収され性状が変化する医療機器では、その変化を考慮した試験条件などを設定することも必要である。

6. 試験法

- 1) ISO 10993 シリーズの各試験法ガイダンスには、それぞれの評価項目ごとに多様な試験法が並列的に記述されており、その中のどの試験法を選択すべきかについては、明確に規定されていない。ある評価項目に関して複数の試験法の中からどれを選択すべきかについては、目的とする医療機器の生物学的安全性評価の意義との関連において、試験の原理、感度、選択性、定量性、再現性、試験試料の適用方法とその制限などを勘案して決めるべきである。
- ア) 細胞毒性試験に関しては、ISO 10993-5に、抽出液による試験法、直接接触法、及び間接接触法（寒天重層法、フィルター拡散法）が示されている。これらの試験法は、感度、定量性などが異なるため、リスク評価のためのハザード検出に当たっては、感度が高く定量性のある方法を用いる必要がある。一般的に、抽出液による試験法は感度が高いため、この方法で試験するのが望ましいが、当該試験法以外を選択した場合にはその妥当性を説明する必要がある。
- イ) 感作性試験及び遺伝毒性試験のハザード検出に当たってはISO 10993-12の抽出溶媒に関する規定やISO 10993-3及びISO 10993-10に記載されている抽出法を参照し、各材料に適したものであって、かつ抽出率の高い溶媒を選択して医療機器の安全性を評価することが必要である。その際、抽出溶媒の種類や抽出条件によって試料溶液中の溶出物の濃度や種類が異なることから、結果が偽陰性を示す可能性があることに留意する。
- ウ) 亜急性全身毒性、亜慢性全身毒性、及び慢性全身毒性試験に関しては、埋植試験あるいは使用模擬試験が各毒性試験で必要とされる観察項目及び生化学データなどを含んでいる場合、これらの毒性試験に代えることができる。
- エ) インプラントのリスク評価では、全身的影響及び局所的影響を考慮しなければならない。
- 2) 全ての医療機器について一律の試験法を定めることは合理性に欠ける。また特定の試験法を固守するよう求めるものでもないが、選定した試験法から得られた結果が臨床適用上の安全性を評価するに足るものであると判断した根拠と妥当性を明らかにする必要がある。

7. 試験試料

- 1) 医療機器の生物学的安全性試験を実施する場合の試験試料としては、最終製品、最終製品の一部及び原材料などが考えられる。試験試料の選択においては、最終製品の安全性を十分に評価できるか否かを検討し、その選択の妥当性を明らかにする必要がある。

- 2) 医療機器は複数の材料を組合せて製造されることが多く、滅菌を含む製造工程において材料が化学的に変化する可能性がある。またそれら複数の材料は人体へ複合的に直接又は間接ばく露され得る。このため生物学的安全性試験を実施する際には、最終製品、最終製品が人体と接触する部分を切り出した試験試料、最終仕様の試作品あるいは同じ条件で製造した模擬試験試料を用いて実施することを基本とする。一方、製造工程において材料が化学的に変化しないことが確認できる場合には、原材料を試験試料として試験を実施しても差し支えない。
- 3) 原材料の一部の成分を新規の化学物質に変更し、かつ、それが材料中で化学的に変化しない場合、原材料又は最終製品を用いて試験を実施するよりも当該化学物質について試験を行った方が合理的なこともある。このような場合は、当該化学物質の試験をもって、原材料又は最終製品の試験に代えることができる。

8. Good Laboratory Practice の適用

5 項の 4) に規定する生物学的安全性試験は、「医薬品、医療機器及び再生医療等製品の製造販売承認申請等の際に添付すべき医薬品、医療機器及び再生医療等製品の安全性に関する非臨床試験に係る資料の取扱い等について（平成 26 年薬食審査発 1121 第 9 号・薬食機参発 1121 第 13 号）」に基づき、「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 17 年厚生労働省令第 37 号）」で定める基準（Good Laboratory Practice、「GLP」という）に従って実施すること。ただし当該製品に求められる機能性／有効性を評価する試験で安全性評価の目的が副次的である場合には、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則（昭和 36 年厚生省令第 1 号）」第 114 条の 22 を順守すること。

生物学的安全性評価を目的とした試験は GLP に準拠した実施が求められる。性能確認試験など、その他の目的で実施する場合は、必ずしも GLP 準拠が求められるものではないことに留意する必要がある。

9. 動物福祉

試験に動物を用いる際の動物の取扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 27 年科発 0220 第 1 号）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）」及び ISO 10993-2 などに従い、動物実験の代替法の 3R の原則 [1.Replacement（実験動物の置き換え）、2.Reduction（実験動物数の削減）、3.Refinement（実験方法の改善による動物の苦痛の軽減）] に則り動物の福祉¹⁾に努めつつ、適正な動物実験を実施すること。

10. 参考情報

1) リスクマネジメントプロセスにおける生物学的評価

医療機器のリスクマネジメントに係る規格である JIS T 14971 又は ISO 14971 には、医療機器のライフサイクル全体の安全性確保に不可欠な要求事項が示されている。生物学的安全性評価は、その要求事項に従い実施するリスクマネジメントプロセスの一環であり、検証上の重要なプロセスに位置している。リスクマネジメントプロセスの概要、及び評価全般の注意事項は、JIS T 0993-1 の附属書 B（ISO 10993-1 Annex B）を参照するとよい。

2) Transitory-contacting medical device

ISO 10993-1:2018 5.3.2 項及び対応する JIS T 0993-1 の 5.3.2 項では、使用時間が 1 分未満のランセットや皮下注射針など、人体との接触が非常に短時間又は一時的である医療機器として定義され、通常、生物学的安全性試験の実施を要求しないことが記載されている。しかし、これらの医療機器に使用されているコーティング材や潤滑材が組織に接触し残留する可能性もあるため、詳細な評価が必要となる場合のあることも考えておかねばならない。また累積的使用時のリスクも考慮する必要がある。

3) 考慮すべき評価項目（表 1）の改訂について

本文書は、ISO 10993-1:2018 及び対応する JIS T 0993-1 と整合させる目的で、考慮すべき評価項目（表 1）を改訂した。今回の ISO 改訂により米国 FDA 発出の生物学的安全性評価指針²⁾とも差異がほとんどなくなり、国際調和が図られたことになる。物理学的・化学的情報に関する項目は、医療機器及び構成成分の基本的情報を収集することを指す（5 項の 1)参照）。このプロセスは生物学的評価の最初のステップとして ISO 10993-1:2009 及び JIS T 0993-1:2012 においても規定されていたものであって、新たな要求事項ではない。

また JIS T 14971 又は ISO 14971 に基づくリスクマネジメントプロセスの下、より詳細に毒性学的影響を評価して、医療機器の生物学的安全性を確保することが目的であり、表 1 に記されたエンドポイント別に独立した試験を実施することを求めるものではない。例えば「埋植」がエンドポイントと記されたカテゴリで、当該医療機器の臨床適用部位での全身毒性試験又は刺激性試験が行われ、適用部位の病理組織学的検査が適切に実施されている場合には、その試験結果を評価することも可能と考えられる。

4) 生分解性評価

生分解性の材料が使用された医療機器など、臨床適用時に原材料が体内で分解することが予測される場合には、その過程で発生する化学物質及びその量を検討することが望ましい。ISO 10993-9、ISO 10993-13、ISO 10993-14 及び ISO 10993-15 を参考とし、それらの化学物質の安全性情報の収集に努め、生物学的安全性評価に利用すべきである。また実施された試験において試験系にそれらの化学物質がばく露されていることを検証することも重要になる。分解の過程でナノ粒子が発生するおそれがある場合には ISO/TR 10993-22 を考慮した評価を行うこと。

5) 生殖発生毒性の評価

ISO 10993-1:2018 及び対応する JIS T 0993-1 の発行に伴い、表 1 の評価項目に生殖発生毒性を追加した。この評価の推奨される医療機器のカテゴリは存在しないが、例えば評価対象となる医療機器の原材料に生殖発生毒性や内分泌かく乱作用を有すると考えられる化学物質が含まれる場合には、評価が必要となる。

6) がん原性の評価

ISO 10993-1:2018 及び対応する JIS T 0993-1 の発行に伴い、表 1 の評価項目にがん原性を追加した。人体に長期的に使用される医療機器においては、がん原性のリスク評価が必要となる。ISO 10993-3 では、医療機器及びその原材料の発がん性の評価方法に関する情報が記述されている。原材料の不純物及び医療機器からの溶出物の化学的同定と、これらの化学物質のばく露量などから、発がんリスクを評価することが基本となる。発がん性の情報³⁾から、当該医療機器の接触部位（経路）及び接触期間に対して適切なものを選択する。重大な発がんリスクが存在しない医療機器に対し、発が

ん性試験を実施する必要性は低いと考えられる。最終製品の発がん性試験が必要であると判断される場合には、遺伝子組み換えモデルや OECD 試験ガイドライン 453⁴⁾に記述されている慢性全身毒性と腫瘍形成性を評価する試験法が参考になる。

7) 毒性学的リスク評価について

毒性学的リスク評価には ISO 10993-17 が参照可能である。当該規格では、医療機器からの溶出が確認された化学物質の毒性学的閾値などの情報を用いてリスク評価する方法が説明されている。2018年11月現在、表題を「Establishment of allowable limits for leachable substances」から「Toxicological risk assessment of medical device constituents」へ変更して、ISO/TC 194/WG 11において改訂作業が進められている。

これに関連して、TTC (Threshold of Toxicological Concern : 毒性学的懸念の閾値) の概念が提唱された。TTCとは、製品の主体以外の化学物質で、意図する／しないに関わらず製品に存在する全ての化学物質を対象として、その閾値未満であればヒトへの健康に明らかなリスクを示さないとされるばく露閾値のことである。医薬品不純物の評価及び管理ガイドライン⁵⁾、食品における香料及び間接添加物の許容ばく露閾値⁶⁾の根拠に TTC が用いられている。一方で、医療機器分野では ISO/TS 21726 が発行された。

1.1. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

ISO 10993-1:2018 及び対応する JIS T 0993-1」との調和を考慮し、主として以下の改正を行った。

- 1) 医療機器の生物学的安全性評価が JIS T 14971 又は ISO 14971 のリスクマネジメントプロセスにおける検証作業の一環として行われるものであることを追記した (1 項、4 項の 1)、10 項の 1))。
- 2) ISO 10993-1 及び JIS T 0993-1 に規定された定義、用語及び評価の進め方との整合を図った (2 項の 2)、2 項の 5)、4 項の 2)、4 項の 3)、5 項、図 1、表 1))。
- 3) 再使用可能な医療機器 (2 項の 4))、ナノマテリアル (5 項の 1))、Transitory-contacting medical device (10 項の 2))、生分解性評価 (10 項の 4))、生殖発生毒性 (10 項の 5)) 及びがん原性 (10 項の 6)) の評価における注意事項を記載した。
- 4) 試験は原則 GLP に従って実施することを追記した (8 項)

1.2. 参考文献

- 1) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説 (2017年10月 環境省)
- 2) U.S. Food and Drug Administration (2016): Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process"
- 3) International Agency for Research on Cancer (IARC) monograph chemicals
- 4) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects Test No. 453 (2018): Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies
- 5) ICH M7 "Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk" (June 2014)
- 6) JECFA: Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants - Forty-fourth report of

the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Food Additives, 1995
7) FDA: Food Additives: Threshold of Regulation for Substances Used in Food Contact
Articles; Final Rule, 21 CFR Part 170.39

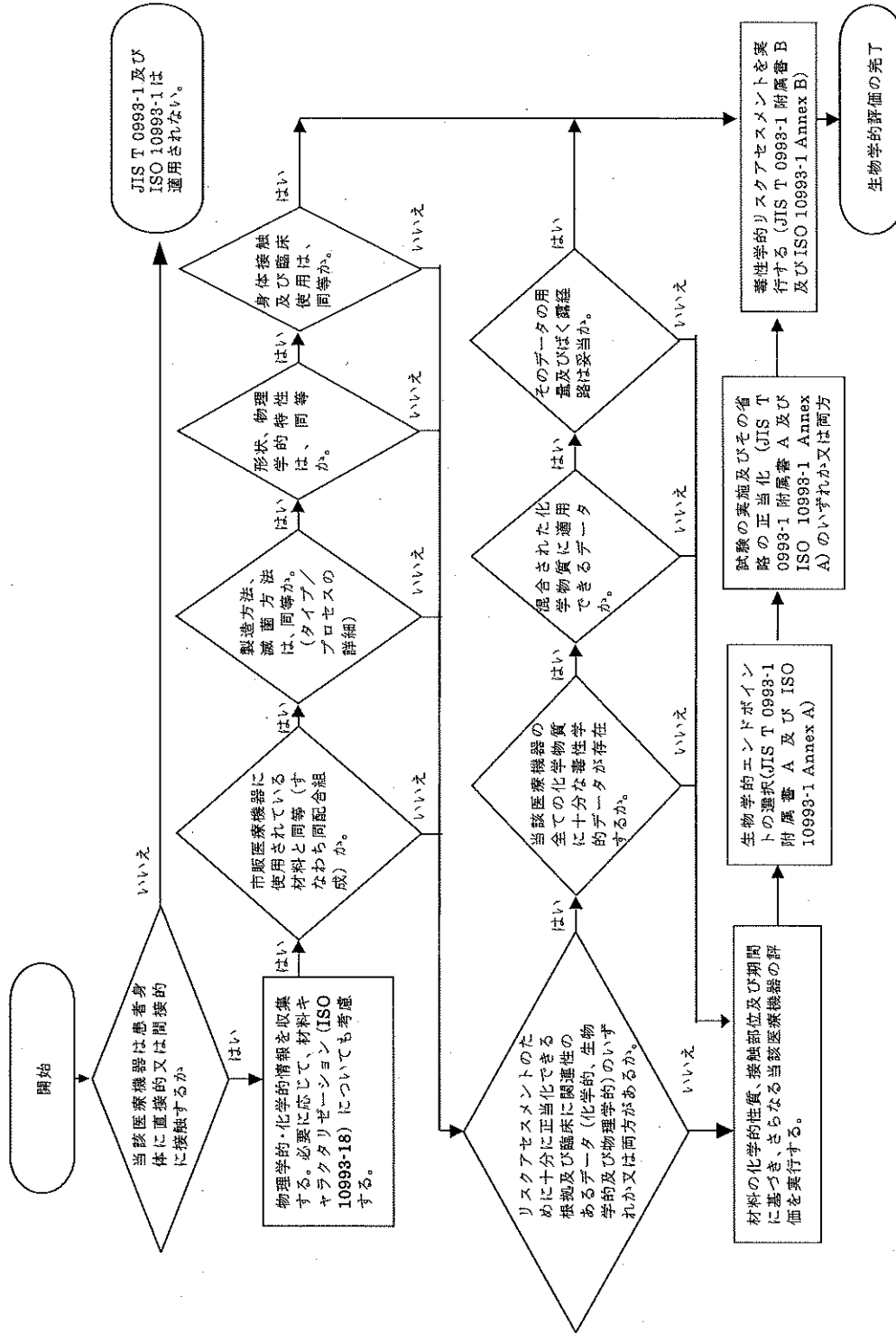


図 1-1 リスクマネジメントプロセスの一環として実施する医療機器の生物学的評価の体系的引き

表 1 考慮すべき評価項目

下表は評価が推奨される生物学的安全性評価項目を示したものであり、必ずしも試験実施を要求するものではない。既承認／認証の医療機器との同等性や既存化学物質の安全性情報からの評価など、適切にリスク評価を行い、評価不要と判断する場合その理由を明確にすることが必要である。逆に当該カテゴリの医療機器として印がない項目であっても、リスク評価に基づき必要と判断された場合には評価を実施すべきである。

接触期間 (累積) A: 一時的接触 (24時間以内) B: 短・中期的接触 (24時間を超え30日以内) C: 長期的接触 (30日を超える)		生物学的安全性評価項目														
		物理学的・化学的情報	細胞毒性	感受性	刺激性／皮内反応	材料由来の発熱性 ^a	急性全身毒性 ^b	亜急性全身毒性 ^c	亜慢性全身毒性 ^d	慢性全身毒性 ^e	埋植 ^{a, b}	血液適合性	遺伝毒性 ^p	がん原性 ^p	生殖発毒性 ^{a, p}	生分解性 ^r
非接触医療機器																
表面接触医療機器	皮膚	A	要 ^b	E ^h	E	E										
		B	要	E	E	E										
		C	要	E	E	E										
	粘膜	A	要	E	E	E										
		B	要	E	E	E		E	E		E					
		C	要	E	E	E		E	E	E	E		E			
	損傷表面	A	要	E	E	E	E	E								
		B	要	E	E	E	E	E	E		E					
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E		
体内と体外とを連結する医療機器	血液流路 間接的	A	要	E	E	E	E	E				E				
		B	要	E	E	E	E	E	E			E				
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		
	組織／歯質／骨	A	要	E	E	E	E	E								
		B	要	E	E	E	E	E	E		E		E			
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E		
	循環血液	A	要	E	E	E	E	E				E	E ^j			
		B	要	E	E	E	E	E	E		E	E	E			
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
インプラント	組織／骨	A	要	E	E	E	E	E								
		B	要	E	E	E	E	E		E		E				
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E		
	血液	A	要	E	E	E	E	E			E	E	E			
		B	要	E	E	E	E	E			E	E	E			
		C	要	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		

注記

a ISO 10993-11 Annex F 参照

b 十分な動物数や評価項目が含まれるなど、適切な評価が行われている場合、埋植試験において得られた情報から急性全身毒性、亜急性全身毒性、亜慢性全身毒性及び慢性全身毒性を評価できることもある。それ故、急性全身毒性、亜急性全身毒性、亜慢性全身毒性及び慢性全身毒性を評価するための試験は必ずしも別の試験として行う必要はない。

c 適切な埋植部位を考慮する必要がある。例えば、正常な粘膜と接触する医療機器は、理想的には正常な粘膜と接触させた試験・評価を行うとよい。

d 医療機器が発がん性、変異原性、並びに生殖毒性を有することが知られている化学物質を含む場合には、リスクアセスメントにおいて検討する。

e 新規材料、生殖/発生毒性を有することが公知となっている材料、生殖/発生毒性と関係の深い患者集団（例えば妊婦）に適用する医療機器、並びに構成材料が生殖器官に局所的に使用する可能性のある医療機器については、生殖/発生毒性の評価を考慮することが望ましい。

f 構成部材や構成材料が患者の体内に残留し、生体内で分解する可能性がある医療機器については、生体内分解性に関する情報を示すことが望ましい。

g 「要」はリスクアセスメントに先立って必要となる情報を意味する。

h 「E」はリスクアセスメントにおいて評価すべきエンドポイントを意味する。リスクアセスメントには、既知の毒性情報を用いた評価、エンドポイントに示された生物学的安全性試験の実施、試験を省略する場合にはその妥当性を説明することが含まれる。医療用途として未使用の新規材料が使用されている場合で、かつ、文献などで毒性情報が得られない場合には、「E」と記されていないエンドポイントについても評価の対象に加える必要がある。医療機器の特性によっては、示されたエンドポイント以外も評価対象とすることが適切な場合があるとともに、それとは逆に示されたエンドポイントよりも少ない項目が適切なこともある。

i 組織液や皮下も組織に含める。間接的接触のみを伴うガス回路に用いる医療機器や部材については、その機器に固有の規格（ISO 18562-1）を参照すること。

j 体外循環装置に使用される全ての医療機器

医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス

目次

第1部	細胞毒性試験	15
第2部	感作性試験	29
第3部	遺伝毒性試験	46
第4部	埋植試験	53
第5部	刺激性試験	71
第6部	全身毒性試験	90
第7部	発熱性物質試験	99
第8部	血液適合性試験	112
付録		133

第1部 細胞毒性試験

1. 適用範囲

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

ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity には、抽出法（Test on extracts）、直接接触法（Test by direct contact）、間接接触法（Test by indirect contact）が含まれている（4.2項参照）。これらの試験法はさらに、試験に使用する細胞株の種類、試験条件、細胞毒性の指標及びその評価法などによって、多種多様となるが、ISO 10993-5 では定量的に評価可能な試験法を推奨している。またそのような試験法として4種類の試験法（ニュートラルレッド法、コロニー形成法、MTT法及びXTT法）がAnnex A～Dに記載されている（4.3項参照）。その他にも、ISO 10993-5 が引用する「Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500」では、MTT法、XTT法と並びMTS法が記載されている。ここでは、ISO 10993-5 に記載されている試験法の中から、感度の高い試験法であるコロニー形成法について、抽出法による場合と組織との直接接触による影響を評価できる直接接触法による場合について紹介する（4.4項参照）。

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

2. 引用規格

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

3. コロニー形成法による細胞毒性試験

3.1 目的

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

3.2 試験の要約

播種した細胞を試験試料の試験液（抽出液）で処理、又は、試験試料上に直接細胞を播種し、所定の期間培養後のコロニー形成能をコントロールと比較して評価する。

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

3.3.1 試験試料

試験試料が抽出液や液体（4.5項参照）の場合は、適切な溶媒や培養液で希釈して試験する。必要であれば、溶媒のみを培地で適切な濃度まで希釈して試験し、使用した溶媒の影響を明らかにする。

3.3.2 対照試料

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

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

抽出法用：高密度ポリエチレンシート（検定済みのもの、4.6項参照）

直接接触法用：接着細胞用プラスチック製カバースリップ又はシート（試験成立条件を満たす材料、4.6項参照）

2) 陽性対照材料 (positive reference material)

陽性対照材料は、ここで示した方法に従って試験した時、中程度の細胞毒性を示す陽性対照材料A及び弱い細胞毒性を示す陽性対照材料Bの2種類であり、以下のものが入手可能である（検定済みのもの、4.7項参照）。

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

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

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

細胞の感度及び精度を明らかにするために使用する物質である。以下のものが入手可能である。原料化学物質の細胞毒性試験を実施する場合には、陽性対照物質として用いる。

陽性対照物質：ZDBC

3.4 滅菌

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

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

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

滅菌後の試料は、無菌的に取り扱う。

3.5 細胞株及びその取扱い

3.5.1 細胞株

以下に示した細胞株を使用する。他の細胞株及び初代培養細胞を使用する場合は、その細胞での検出感度を陽性対照物質によって判断し、一定レベルの感度及び精度があることを確認する必要がある（4.8項参照）。

①L929細胞：ATCC CCL 1 (NCTC clone 929)

②Balb/3T3 clone A31細胞：JCRB9005 又は ATCC CCL 163

③V79細胞：JCRB0603

試験に用いる細胞については、コロニー形成能（3.6.6項参照）が良好であることを確認する。

3.5.2 培養液（培地）

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

3.5.3 細胞の取扱い

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

3.6 抽出法によるコロニー形成法

3.6.1 抽出溶媒

試験試料の化学的性状を考慮して抽出溶媒を選択することが原則であるが、ほ乳動物培養細胞を用いる細胞毒性試験では、5 ないし 10 vol% の血清を含む培養液を使用する（4.9 項参照）。なぜなら、血清含有培養液は極性物質と非極性物質の両方を抽出できると同時に細胞の増殖にも必須のためである。

試験試料によっては、極性物質（例えば、イオン性物質）を抽出する場合など血清を含まない培養液の選択も考慮する必要がある。その他、生理食塩液、精製水又はジメチルスルホキシド (DMSO) などがこの試験の適切な抽出溶媒に含まれるが、細胞へのばく露量を考慮して抽出溶媒を選択する（4.10 項参照）。血清含有培養液以外の抽出溶媒を選択した場合には、その理由を報告書に記載する。

3.6.2 抽出条件

医療機器の使用条件や性状を考慮して抽出条件を選択すべきであるが、抽出溶媒として培養液を使用する細胞毒性試験では、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の 24 ± 2 時間抽出が一般的な抽出条件である。

なお、正常皮膚あるいは粘膜の表面にのみ短時間しか接触しない医療機器（累積接触期間が 4 時間未満）については、4 時間以上 24 時間未満で抽出した試験液での試験も可能である。一般的な抽出条件以外での試験を選択する場合は、医療機器の使用状態を十分に考慮し、細胞毒性に関する安全性を適切に評価できる適切な抽出条件で試験を実施する。またその理由を報告書に記載する。

3.6.3 抽出操作

- 1) 可能であれば、試験試料を切断（約 2×15 mm 程度の大きさ）する。特別な表

- 面処理をした試験試料は、細切しないものについて試験を実施する。
- 2) 試験試料は、スクリーキャップ付き滅菌ガラス容器又はプラスチック管に入れ、1 g 又は厚みを考慮した細切前の実表面積 60 cm^2 に対して抽出溶媒を 10 mL の割合で加え、軽く栓をする。必要に応じて、付録 1 の規定を参照しても差し支えない。
 - 3) 培養液を用いる場合には、その pH が中性域（培地の色で判断）であることを確認後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、静置又は攪拌して抽出する（通常は 24 ± 2 時間）。なお、抽出液の pH が酸性又は塩基性を示し、かつ細胞毒性が認められた場合、緩衝作用の強い培養液などを用いた追加試験により pH の影響を確認し、評価の補助とすることが可能である。
 - 4) 対照材料については、1 g 又は表裏表面積 60 cm^2 に対して血清含有培養液を 10 mL の割合で加え、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、静置又は攪拌して 24 ± 2 時間抽出する（4.8 項参照）。
 - 5) 抽出容器から、抽出液のみを取り出す（100%抽出液）。100%抽出液をろ過、遠心、あるいは試験液を試験に適用する前に他の方法による何らかの処理を行った場合には、その詳細及び妥当性を報告書に記載する。

3.6.4 試験液調製

- 1) 抽出溶媒として血清含有培養液を用いた場合には、100%抽出液を 100%試験液とし、さらに培養液で、原則として 3 倍以下の割合で段階希釈し、試験系に適用する複数濃度の試験液を調製する。
- 2) 血清含有培養液以外の抽出溶媒を用いた場合には、100%抽出液を抽出溶媒で段階希釈してそれらを培養液に添加するか、又は、100%抽出液を培養液に添加して等量の抽出溶媒を含む培養液で段階希釈して、複数濃度の試験液を調製する。なお、希釈は、原則として 3 倍以下の割合とする。

3.6.5 試験操作

- 1) 継代した細胞からトリプシン処理などにより単離細胞を調製し、培養液に懸濁する。
- 2) 直径 60 mm シャーレには 100~200 個（培地 4~6 mL）、35 mm シャーレには 50~100 個（1~3 mL）、12 ウェル又は 24 ウェルプレートのウェルには 40~50 個（0.5~2 mL）の細胞を播種する。
- 3) 細胞を播種した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、細胞をシャーレ又はウェル底面に接着させる。
- 4) 培養液を除き、各試験液をシャーレ又はウェルに加える。加える液量は、細胞播種時の培養液量と同様とする。
- 5) 新鮮な培養液を加えたシャーレ又はウェルをコントロール群とする。
- 6) 抽出溶媒として血清含有培養液以外の溶媒を用いたときには、コントロール群とは別に、溶媒対照群として抽出液と等量となるよう抽出溶媒のみを培養液に加えたシャーレ又はウェルを設ける。
- 7) 陰性対照材料及び陽性対照材料の試験液についても同様に加える。
- 8) 各濃度の試験液について、少なくとも 3 つのシャーレ又はウェルを使用する。
- 9) 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に入れ、静置して培養する。

- 10) 培養期間は、使用する細胞株により異なるが、コントロール群における染色した個々のコロニー（50個以上の細胞集団）が明確に区別できるまで培養する（4.11項参照）。
- 11) 培養終了後、培養液を捨てる。適切な固定液を加えて固定する。必要があれば、固定前に平衡塩類溶液で洗う。
- 12) 固定後、ギムザ染色液など（4.12項参照）を加え、コロニーを染色する。
- 13) 染色後、染色液を捨て、水洗して乾燥させる。

3.6.6 観察

- 1) 各シャーレ又は各ウェル内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは、肉眼又は適切な顕微鏡で観察し、細胞が50個以上集まっている集団について数える。迅速な判定法として、コロニーカウンターを用いたコロニー数測定も可能である。その際は、機械での測定結果の精度など結果の信頼性が確保されていることを確認する。
- 2) 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（溶媒対照群がある場合には溶媒対照群）でのコロニー数の平均値を100%として、試験液で形成された平均コロニー数を百分率（%）、すなわちコロニー形成率で示す。
- 3) 実験結果は、縦軸がコロニー形成率（コントロール群又は溶媒対照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、コロニー形成率を50%阻害する試験液の濃度（%）を求めIC₅₀値とする。
- 4) 統計理論式から得られるIC₅₀値を、コンピュータで計算することもできる。
- 5) IC₅₀値を細胞毒性強度の指標とする。

3.6.7 試験成立条件

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

- 1) コントロール群及び溶媒対照群のいずれか又は両方でのコロニー形成能が良好である。
- 2) 陰性対照材料での100%抽出液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) 陽性対照材料A及び陽性対照材料Bをここで示した方法に従って試験した時、陽性対照材料の試験液の濃度とコロニー形成率との間に各々用量反応関係を認め、さらに、得られたIC₅₀値は陽性対照材料A及び陽性対照材料Bにおいて各々下記の値を満たす（4.8、4.13項参照）。

陽性対照材料AのIC₅₀値：7%未満

陽性対照材料BのIC₅₀値：80%未満

- 4) 必要に応じて、陽性対照物質（ZDBC）の細胞毒性強度（IC₅₀値）を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする（4.8項参照）。

3.6.8 評価

試験試料の100%抽出液処理群のコロニー形成率が70%未満の場合、細胞毒性作用有りと評価する（4.14項参照）。その他の基準値を採用した場合には、

その妥当性を報告書に記載する。

3.7 直接接触法によるコロニー形成法 (4.4 項参照)

3.7.1 試料調製

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

3.7.2 試験操作

- 1) 細胞株は V79 細胞を、培養液は MEM10 培地を用いる。
- 2) 試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料 B を、ウェルによく密着させる。
- 3) 12 ウェルプレートのウェルには 40~50 個（培地 1~2 mL）、24 ウェルプレートのウェルには 40~50 個（培地 0.5~1 mL）の細胞を播種する。
- 4) 細胞をウェルに直接播種した群をコントロール群とする。
- 5) 細胞を播種したプレートを 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。
- 6) 培養終了後、培地を捨てる。試験試料に適した固定液で固定する。必要があれば、固定前に平衡塩類溶液で洗う。
- 7) 固定後、ギムザ染色液など（4.12 項参照）を加え、コロニーを染色する。
- 8) コロニーが良く染色されていることを確認後、染色液を捨て、水洗・乾燥させる。
- 9) 各ウェルのコロニー数を数える。

3.7.3 観察

- 1) コントロール群のコロニー数の平均値を 100% とする。
- 2) 試験試料上に直接播種した細胞のコロニー数を数え、その平均値からコントロール群のコロニー数に対する割合（%）、すなわちコロニー形成率を求める。
- 3) 同様に、陰性対照材料及び陽性対照材料 B のコロニー形成率（%）を求める。

3.7.4 試験成立条件

- 1) コントロール群でのコロニー形成能が良好である。
- 2) 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

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

3.7.5 評価

試験試料上に直接播種した細胞のコロニー形成率が 30%未満でその試験試料の抽出法におけるコロニー形成率が 70%未満の場合には、細胞毒性作用有りと評価する（4.13 項参照）。ただし、試験試料上に直接播種した細胞のコロニー形成率が 30%未満で、抽出法におけるコロニー形成率が 70%を超える場合には、試験試料の抽出を 72 時間行った抽出液で試験を実施し、その結果も考慮して評価する。なお、コロニー形成率低下の原因を特定できれば、必ずしも

72時間抽出した試験液での試験を実施する必要はない。

3.8 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 使用した対照材料（陰性対照材料、陽性対照材料又は陽性対照物質）
- 5) 試験試料の試験への適用方法（滅菌した場合は、その方法を含む）
（例：採取重量又は面積、細切の方法、滅菌方法など）
- 6) 試験液の調製（抽出前後の100%抽出液の変化の有無を含む）
- 7) 使用した細胞株
- 8) 使用した培地（使用した抗生物質の種類及び含量）
- 9) 使用した細胞及び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) 試験結果
抽出法による場合：
試験試料、陰性対照材料及び陽性対照材料での個々のデータ及びその計算値（平均値、標準偏差）の表、データをプロットしたグラフ、IC₅₀値
直接接触法による場合：
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）
原料化学物質の場合：
試験試料、陽性対照物質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
- 11) 結果の評価と考察
- 12) 参考文献

4. 参考情報

4.1 細胞毒性試験の位置づけ

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

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

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

要である。

4.2 細胞毒性試験における試験試料の適用方法の違いとその特徴

医療機器又は原材料の細胞毒性試験には、材料の抽出液を用いる方法と、材料と細胞との直接接触及び間接接触による方法とがある。

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

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

血清含有培養液による抽出液を用いる抽出法は最も一般的に行われている方法である。抽出液を試験する時の細胞密度や判定方法により、検出感度や精度が異なるが、採用する試験法の妥当性を明らかにすることができれば、どの方法で試験を行ってもよい。

4.3 掲載試験法選択背景

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

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

4.4 直接接触法の実施とその注意点

直接接触法による細胞毒性試験は、抽出法による細胞毒性試験の実施に加えて、抽出時に失活することが予想される材料及び眼粘膜に接触する材料について実

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

4.5 原料化学物質の試験

試験試料から溶出する物質の細胞毒性を確認するために、原料化学物質の細胞毒性試験を実施することも想定される。また細胞の感度及び精度を明らかにするために標準物質の細胞毒性試験が行われる。その場合、このガイダンスの抽出溶媒を溶媒として化学物質の原液（溶液又は懸濁液）を調製し、この原液を100%抽出液と読み換えることによって同様の方法で試験が可能である。なお、化学物質の場合の最終処理濃度として OECD テストガイドライン 432 及び OECD ガイダンスドキュメント No.129 では 1 mg/mL、OECD テストガイドライン 473、476、487、490 では 10 mmol/L、2 mg/mL 又は 2 µl/mL のいずれかの最も低い濃度が採用されている。なお、混合物のような場合には 5 mg/mL が推奨されるかもしれない。

4.6 陰性対照材料及び陽性対照材料の入手先情報

直接接触法の陰性対照材料を除く対照材料については、下記の機関で検定された材料が頒布されている。

(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 対照材料担当
電話 0463-82-4751、FAX 0463-82-9627
e-mail : rm.office@fdsc.or.jp

24 ウェルプレート用のプラスチック製カバースリップ（セルデスク LF1）、これまで直接接触法用の陰性対照材料として推奨されていた組織培養用プラスチックシート及び陽性対照材料 B を用いて 3 機関による共同実験が 2019 年 4 月～2019 年 6 月に行われ、以下のような直接接触法の結果が得られている（試験条件：24 ウェルプレート、V79 細胞 50 個播種/ウェル、3 ウェル/試料、繰り返し数 n=3）。

なお、セルデスク LF1 は、陽性対照材料 B より小さく、ウェル内で動きやすい。固定・染色・カウントの際には、物理的影響によるコロニー損傷に注意する必要がある。

試験施設	コロニー形成率(%)±SD		
	セルデスクLF1	組織培養用プラスチックシート	陽性対照材料B
A	99.9±3.3	98.5±3.0	0.0±0.0
B	104.3±7.7	97.7±12.3	0.0±0.0
C	96.4±2.7	98.3±8.8	0.0±0.0

SD：標準偏差

4.7 陽性対照材料

実験系の適切性及び検出感度を判定する物差しとして、弱い細胞毒性を示す陽性対照材料 B と中程度の細胞毒性を示す陽性対照材料 A を採用した。2種の陽性対照材料を導入した目的は、①試験法や細胞の相違、実験室間の変動があっても、これらの陽性対照材料と比較することで試験試料の細胞毒性強度の相対的位置を知る、②その相対的位置から組織刺激性の程度を予測する、ことにある。

抽出条件が異なる試験試料の結果であっても、試験試料の細胞毒性強度を陽性対照材料の結果と比較することにより、試験試料の組織刺激性の程度の予測が可能となる。

4.8 陽性対照物質及び陽性対照材料の IC₅₀ 値

L929 細胞、Balb/3T3 clone A31 細胞 (MEM10 培地を使用)、及び V79 細胞 (M05 培地を使用：4.9 項参照) を用いた時の IC₅₀ 値の幅を参考のため記す。

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

* MEM10 培地使用時の V79 細胞における陽性対照物質 (ZDBC)、陽性対照材料 A 及び B の IC₅₀ 値は、M05 培地使用時に比べて、弱い細胞毒性を示す (例えば、ZDBC：4~8 µg/mL、陽性対照材料 A：3~8%、陽性対照材料 B：>100%)。

また ISO/TC 194/WG5 が 2005~2006 年に実施した国際 round-robin 試験で行われた試験法間の比較結果は以下のとおりであった。

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

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

4.9 抽出に用いる培養液

L929 細胞及び Balb/3T3 細胞については、MEM10 培地を抽出溶媒として使用する。V79 細胞を用いる抽出法による試験では、M05 培地を使用すると陽性対照物質及び陽性対照材料に対する感度が高くなる（4.8 項参照）。同等の感度を示すならば MEM10 培地も使用可能である。

M05 培地の調製法を以下に示した。

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

5~10%血清含有培養液を用いて 6 cm²/mL で、37°C、24 時間抽出した陽性対照材料 B の溶液を、USP 24 <87> Biological reactivity tests, *In vitro* (以下、Elution Test) に従って試験を実施すると、スコア 4 を示し、細胞毒性は不合格（細胞毒性有り）となるが、同材料を無血清 MEM 培地で抽出した場合には、スコア 2 を示し、細胞毒性は合格判定となる。

蒸留水を用いて 6 cm²/mL で、37°C、24 時間抽出した陽性対照材料の溶液を Elution Test で評価すると、陽性対照材料 A 及び B ともにスコア 0 を示し、材料中に含まれる細胞毒性を検知できない。さらに、蒸留水を用いて、50°C で 72 時間、70°C で 24 時間、121°C 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できなかった。

蒸留水や無血清培地では、オリゴマーや添加剤のような物質は溶出されにくいこと、また化合物によっては高温で分解されることが検知できない原因として考えられる。したがって、通常は、血清を 5~10%含有する培地で抽出した溶液を細胞毒性試験用抽出液として試験する。なお、血清又はタンパクがある種の溶出物に結合することがあることを認識しておく必要がある。

4.10 培養液以外の抽出溶媒

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

最終的なばく露量を考慮して決める必要がある。

4.11 コロニー形成までの培養期間

肉眼で判断できるコロニーを形成させるまでの培養期間は、細胞株の種類によって異なる。一般的には、Balb/3T3 clone A31 細胞は9~11日間、L929 細胞は7~9日間、V79 細胞は6~7日間が目安である。しかしながら、コロニーのサイズや形態は、細胞の増殖率に依存することから、試験条件、特に試験に使用する血清のロットによる影響が大きい。したがって、試験施設ごとに試験条件を検討し最適な培養期間を決定するとよい。

4.12 染色液

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

4.13 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 (%) 値と種々の生体組織での刺激性強度との関係を図1 (原典の参考文献3)の図を、参考文献4)及び5)を参考に一部改変)に示す。

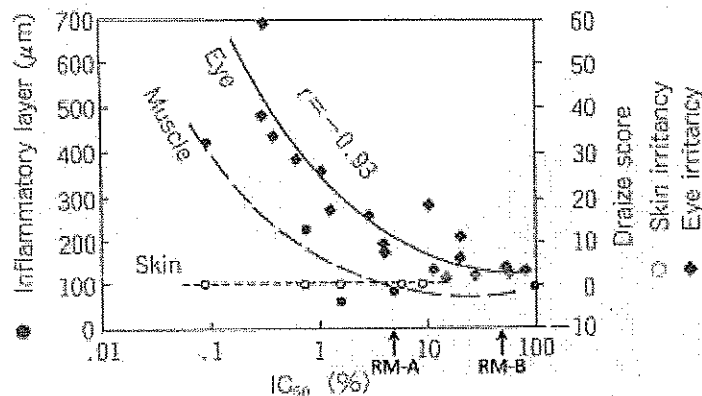


図1 材料の細胞毒性強度と異なる組織での刺激性との関係

ZDEC を種々の濃度で含む対照材料をこのガイドランスに従って抽出し、Balb/3T3 clone A31 細胞を用いたコロニー形成法で 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、対照材料のウサギ筋肉内埋植試験、及び健常皮膚へのパッチ試験を行い、IC₅₀ 値と *in vivo* 刺激性強度との関係を明らかにした。その結果、同じ細胞毒性強度を示す材料では、眼粘膜が最も感受性が高く、IC₅₀ 値 35% 近辺以下を示す材料を装用すると眼刺激性を生じた。筋肉組織に対しては、IC₅₀ 値が 5% 近辺以下の材料で炎症反応がおきた。一方、健常皮膚では、0.1% の IC₅₀ 値を示す強い対照材料でも皮膚刺激性は認められなかった。このように対照材料を用いると組織間の感受性の違いも明らかになる。

細胞毒性強度 (IC ₅₀ 値)	予測される生物学的反応
コロニー形成率の低下 (70%未満) が認められたが、100%以上	非常に弱い細胞毒性が示された [#] 。
陽性対照材料 B より弱い	弱い細胞毒性が示された。 弱い眼粘膜刺激が起こり得る。
陽性対照材料 A と B の中間	中程度の細胞毒性が示された。 粘膜組織に対しても炎症反応がおきる場合がある。
陽性対照材料 A より強い	強い細胞毒性が示された。 筋肉組織に対して炎症反応がおきる可能性が高い。

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

4.14 結果の評価

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

5. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

- 1) 記載内容の大きな変更は無いが、前回の改訂で ISO 10993-5 との整合性を考慮したことにより、不明確となっていた以下の点について明確にした。
 - ・ 抽出溶媒として血清含有培養液を用いること
 - ・ 対照材料の抽出溶媒は血清含有培養液を用い、原則、37±1℃で 24±2 時間抽出すること
 - ・ 血清含有培養液以外の抽出溶媒を用いる時はコントロール群とは別に溶媒対照群を設けること
- 2) 抽出操作について、ISO 10993-12 との整合性を考慮し、容易に攪拌抽出ができるように、炭酸ガス培養器での抽出に限定せず、抽出温度と抽出時間の記載とした。
- 3) 原料化学物質の試験法について、参考情報に加えた。それにともない以下の点も変更した。
 - ・ ZDBC を原料化学物質の細胞毒性試験を実施する場合の陽性対照物質として使用することを記載した。
 - ・ 試験報告書の陽性対照物質 (ZDBC) 関連の記載を変更した。

6. 参考文献

- 1) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法，朝倉書店 (1991)
- 2) 大野忠夫編著：動物実験代替法マニュアル，培養細胞を用いた理論と応用，共立

出版 (1994)

- 3) 中村晃忠: 医用材料の細胞毒性試験における標準材料, 組織培養 22:228-233 (1996)
- 4) 厚生省薬務局医療機器開発課監修: 医療用具及び医療材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン 1995 解説, 薬事日報社 (1996)
- 5) 日本薬剤師研修センター: 医薬品 GLP ガイドブック, 薬事日報社 (2008)
- 6) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi M.: Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials* 11, 92-94 (1990)
- 7) Ikarashi, Y., Toyoda, K., Ohsawa, N., Uchima, T., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Takahashi, M., Nakamura, A.: Comparative studies by cell culture and *in vivo* implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 339-356 (1992)
- 8) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T., Tanaka, N., Sasaki, K., Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J. Applied Biomaterials* 4, 153-156 (1993)
- 9) Tsuchiya, T., Arai, T., Ohhashi, J., Imai, K., Kojima, H., Miyamoto, S., Hata, H., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi M., Nakamura, A.: Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: *In vivo/in vitro* correlation study using standard reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 885-893 (1993)
- 10) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Arai, T., Ohhashi, J., Isama, K., Nakamura, A.: *In vivo* toxic tissue/biomaterials responses: Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment. *Clinical Materials* 16, 1-8 (1994)
- 11) Tsuchiya, T.: Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomaterials Applications* 9, 138-157 (1994)
- 12) Ohno, T. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-1. Overview of the study and analyses of validations of ED50 value. *Alternatives to Animal Testing & Experimentation (AATEX)* 5, 1-38 (1998)
- 13) Tanaka, N. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-IV. Details of colony formation assay. *AATEX* 5, 74-86 (1998)
- 14) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y., Tsuchiya, T.: Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.* 119, 61-64 (2001)

第2部 感作性試験

1. 適用範囲

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

なお、この試験は、即時型アレルギー（抗原性）を検出する目的のものではない。

2. 引用規格

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

3. 試験試料と試験法の選択

3.1 原則

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

新規原材料を使用している医療機器、使用方法や設計仕様が新規である機器、又は使用期間の変更（短期から長期）、用途の変更（表面接触からインプラント）の場合には、特に試験試料の作製及び試験法の選択には十分留意してリスク評価を行う必要がある。以下に代表的な試験法の特徴を示した。

1) GPMT : 感作性試験として確立された方法。試験試料（最終製品又は原材料）

あるいは試験試料からの抽出物が皮内投与可能な溶媒に溶解するか、又は均一に分散する場合（フロッキングなどを起こさず注射針を通過する場合）に用いられる。GPMT の特性として、偽陽性が多いこと、色素の評価が困難であることが知られている。

2) A&P : 試験試料からの抽出物が皮内投与可能な溶媒に溶解あるいは分散しない場合（フロッキングなどを起こして注射針を通過しない場合）に用

いられる。また医療機器の臨床使用方法が貼付の場合には、GPMT に優先して実施されることがある。A&Pでは、貼付物の粒子サイズや形状による刺激性が結果に影響することがある。

3) LLNA : 単一化学物質を対象に、GPMTの代替法として国際的に認められてい

る。現在、化学物質に対しては動物愛護の観点も含め、優先される試験となりつつある。LLNAの特性として、偽陰性や偽陽性物質の存在、ある種の金属や高分子化合物といった皮膚に浸透しないものでは正確な評価は難しいことが知られている。同様に、水系媒体では評価が困難な場合がある。また刺激によりLLNAが陽性反応を示す可能性のあることも認識しておかなければならない。試験試料は溶液、懸濁液、ゲル若しくはペーストなど、マウスの耳に適用できる性状でなければならない。

以上のとおり、各試験法にはメリット、デメリットが存在し、いずれの試験法も万能でないことを理解し、適切な試験法を選択することが重要である。試験試料は、適切な媒体に溶解して適用することが原則であるが、生体に適用しても評価に影響するような刺激性あるいは感作性を示さない媒体を選択することが肝要である。必要に応じて事前に刺激性あるいは感作性を確認し、刺激性あるいは感作性を示す可能性がある溶媒を用いる場合には、判定時に陰性対照群の反応などを十分に考慮することが望ましい。適切な媒体が見つからない場合は、懸濁液での投与も考慮すべきである。また最終的に選択した媒体が全身毒性又は局所刺激性を示すものである場合は、その毒性を勘案して試験法を選択することが必要である。

3.2 試験試料・試験液の調製と試験法の選択

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

3.2.1 水又はアルコールに溶解するもの

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

3.2.2 金属又はセラミックス

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

沈殿する) 金属イオンと金属沈殿物微粒子から成る懸濁液を用いて、感作性の強さを評価することも可能である。

3.2.3 低分子有機化合物

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

3.2.4 高分子化合物

高分子化合物については、原則として抽出率の最も高い有機溶媒による抽出物の溶液を試験液としてGPMT若しくはLLNAにより評価する。この場合の抽出溶媒及び試験液の調製については、以下の点に留意すること。なお、新規原材料が用いられていない医療機器で、単回かつ一時的接触 (24時間以内) 医療機器あるいはクラス I や II など比較的生体への侵襲が小さくリスク管理が容易な医療機器については、有機溶媒以外の抽出液を用いた試験によるリスク評価も可能である。

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

有機溶媒としては、通例、メタノール又はアセトンを用いる。ただし、以下の場合は他の適切な有機溶媒を選ぶ。①溶媒中で試験試料が溶解したり、原形をとどめないほど変形・変質するような場合、又は、②メタノール、アセトンによる抽出では十分な量の抽出物が得られない場合。抽出溶媒の次候補としては、2-プロパノール/シクロヘキサン混液 (1:1)、n-ヘキサンが挙げられる。

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

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

1) 第1法 (抽出物【残留物】を用いる方法)

抽出液からロータリーエバポレーターを用いて30℃以下で溶媒を留去して残留物を得、この残留物を植物油、DMSO、蒸留水、アセトン又はエタノールに

溶解又は均一に分散させて試験液とする。有機溶媒分散液に植物油を添加して、抽出物を植物油に置換して均一に分散させる方法もある。局所適用濃度は、感作の成否の重要な因子であることから、投与濃度は結果に悪影響を与えない範囲で可能な限り高くすることが望ましい。したがって、抽出物の投与濃度は一般的に10%を目安とし、実際に試験に使用した濃度の設定理由を説明すること。

2) 第2法（抽出液を用いる方法）

ロータリーエバポレーターなどを用いて溶媒留去後、適切な他の溶媒を試験試料1g当たり1mLの割合で添加し、溶解又は均一に分散し100%試験液とする。100g以上の重量を有する大型の医療機器などの場合の最終濃度は、10gから100g当たり1mLに濃縮調製することも考慮する。

第1法、第2法とも抽出操作ごとに抽出率を求め、抽出量に大きなばらつきのないことを確認しておく。抽出率は、抽出物の重量を直接測定して求めるか、抽出後の試験試料の重量を測定して求める。

備考：「必要な量の抽出物が得られる場合」とは、通例試験試料から得られる抽出物量が試験試料の重量の0.5%以上を目安とする。ただし、1回に用いる医療機器（最終製品）の重量が0.5g未満の小さな医療機器の場合は1%以上を目安とする。また事前に検討して求めた抽出率は、試験液の調製方法を選択する際を目安である。実際の試験液調製時には、調製量の違いなどから、誤差を生じる場合のあることを考慮する。

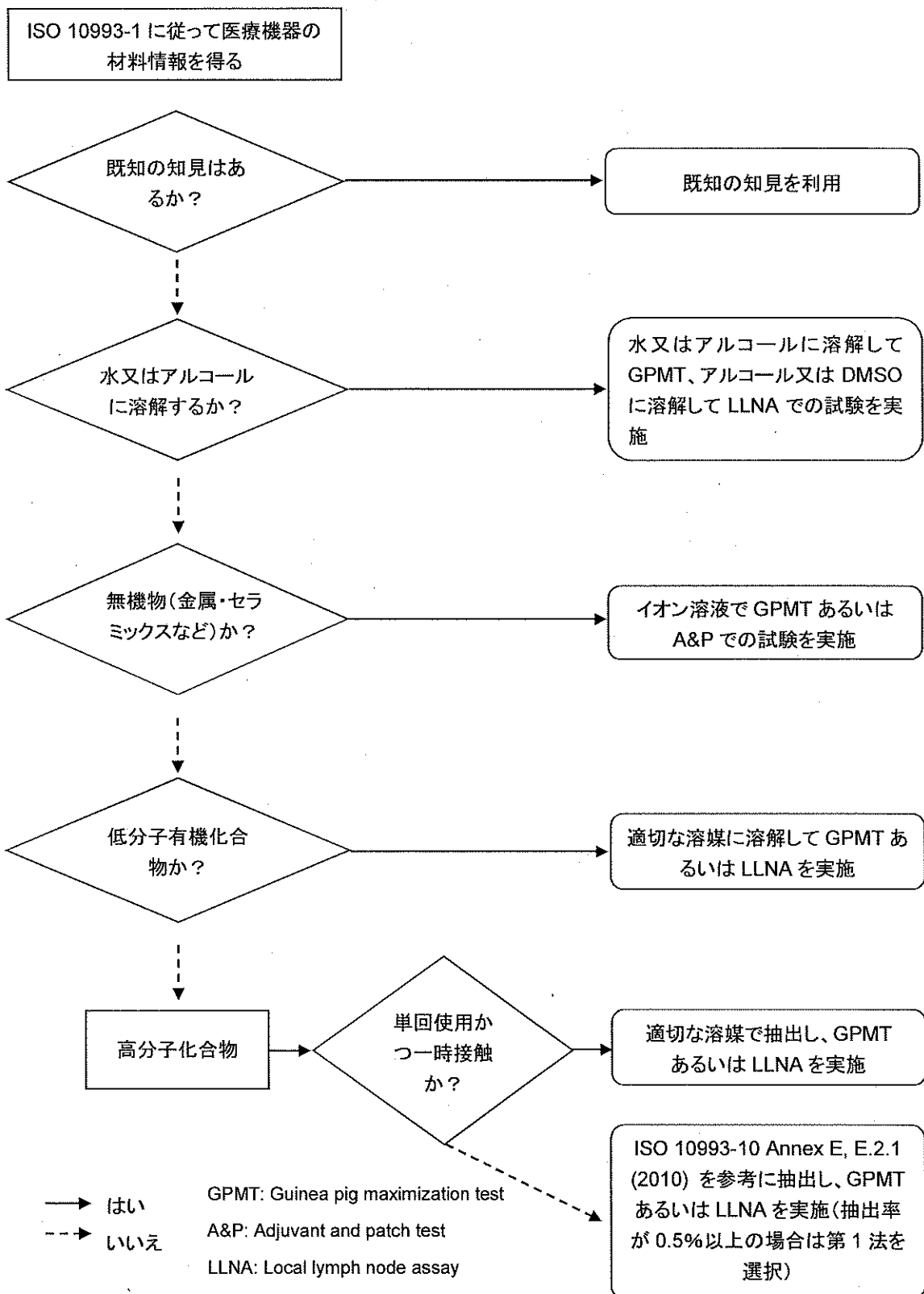


図1 試験試料と試験法選択のフローチャート

4. GPMT

4.1 試験法

4.1.1 試験動物と動物数

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

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

4.1.2 群構成及び陽性対照物質

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

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

4.1.3 感作

1) 一次感作

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

- (a) 生理食塩液あるいは蒸留水とFreund 完全アジュバント (FCA) の1:1の油中水型 (W/O)、乳化物 (E-FCA)
- (b) 各試料液（試験液、陽性対照液、陰性対照（溶媒）液）
- (c) (b)の試料液（有機溶媒などの濃縮可能な抽出溶媒を使用した場合は(b)の2倍濃度）とFCAとの等量混合物（乳化が難しい場合はあらかじめ媒体とFCAの乳化物を調製後、試料液と等量混合し乳化する方法、あるいは、FCAに被験物質を溶解あるいは懸濁後、生理食塩液あるいは蒸留水と等量混合し乳化する方法もある。）

2) 二次感作

皮内注射後7±1日目に、皮内注射部位（刈毛した肩甲骨上部皮膚部、図2）にラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）を塗布する。ただし、試料液に刺激性がある場合、この操作は不要である。翌日、ラウリル硫酸ナトリウム（ワセリン中10%）の残留が認められた場合はそれを拭き取った後、同一部位に試料液（b）0.2 mLを48±2時間閉塞貼付する。

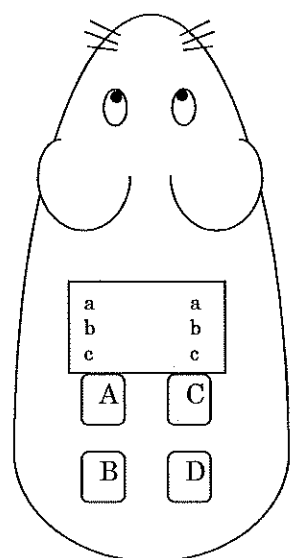


図2 皮内注射及び貼付による感作誘導部位と惹起貼付部位

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

4.1.4 惹起

閉塞貼付後14±1日目に、試料液を適切な溶媒に溶解あるいは混合したもの及びその段階希釈した試料液をあらかじめ刈毛した背部又は側腹部に適用する。試験群には、溶媒のみ（0%液）も適用し、判定の参考にする。

惹起に用いる濃度は、予備試験で刺激性を示さなかった最高濃度から段階的に希釈したもの各0.1 mLを個々のモルモットの皮膚に適用する（図2）。試料液が生理食塩液及び植物油抽出液では、段階希釈をせずに抽出原液のみで惹起することも可能である。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。

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

4.1.5 皮膚反応の判定

閉塞貼付の場合は、24±2時間後に貼付物を取り去り、その24±2及び48±2

時間後に皮膚反応を通常の判定基準に従って採点し、以下のように表示する。
通常の判定基準とは、表1に示した評点などをさす。

開放塗布の場合は、塗布後 24 ± 2 、 48 ± 2 、 72 ± 2 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。

表1 皮膚反応の評点付け (ISO 10993-10, 7 Magnusson and Kligman scale)

視認できる変化なし	0
非常に軽度なあるいはパッチ状紅斑	1
中程度で一体化した紅斑	2
高度紅斑及びあるいは浮腫	3

4.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

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

第1法の総括表の例 (抽出率 0.5%)

感作濃度	惹起濃度 %	観察時間 (hr) ^{*1}	評価	
			陽性率 ^{*2}	平均評価点 ^{*3}
10% ^{*4}	10	24	100	2.4
		48	100	3
	1	24	80	1.6
		48	90	2
	0.1	24	20	0.2
		48	20	0.2
	0.01	24	0	0
		48	0	0
	0	24	0	0
		48	0	0

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) × 100

*3 当該群におけるMagnusson and Kligman scaleなどによる反応評価点の総計/動物総数

*4 抽出物の重量を測定し、投与用媒体に希釈して調製

第2法の総括表の例 (抽出率 0.1%)

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

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) × 100

*3 当該群におけるMagnusson and Kligman scaleなどによる反応評価点の総計/動物総数

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

5. A&P

5.1 試験法

5.1.1 試験動物と動物数

4.1.1と同様に動物を選択し、準備する。

5.1.2 群構成及び陽性対照物質

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

陽性対照物質は、4.1.2に従って適切な物質を選択する。

5.1.3 感作

- 1) あらかじめ刈毛したモルモットの肩甲骨上部皮膚（約2×4 cm）の4隅に、4.1.3 (a) E-FCAを0.1 mLずつ皮内注射する。
- 2) E-FCA注射部位に注射針を用いて#型の傷をつける。その部位に試料約0.1 mLを24±2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。最終製品を直接適用する場合は、1.5×1.5 cm大の四角形あるいは直径1.5 cm大の円形に整形したものを貼付する。
- 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7±1日後に、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あるいは2×4 cm大の四角形に整形したものを48±2時間閉塞貼付する。

5.1.4 惹起

閉塞貼付後14±1日目に、試料液を適切な溶媒に溶解あるいは混合したもの及びその段階希釈した試料液、最終製品を直接適用する場合は、1.5×1.5 cm大の四角形あるいは直径1.5 cm大の円形に整形したものを貼付する。貼付部位は4.1.4項と同様とする。試験群には、溶媒のみ（0%液）も適用し、判定の参考にする。媒体を用いない場合は、無処置部位を確保する。

5.1.5 評価

惹起後、4.1.5に従って評価する。

5.2 試験報告書

4.2項参照。

6. LLNA

6.1 試験法

6.1.1 試験動物と動物数

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

6.1.2 群構成及び陽性対照物質

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

6.1.3 感作

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

6.1.4 放射性物質の投与

初回投与から 6 日後マウスの体重を個別に測定、記録した後、最後の感作投与から 72 \pm 2 時間後に、細胞増殖確認用のラベル化合物を静脈内に投与する。すべての群のマウスに 20 μ Ci (740 kBq) の 3 H-メチルチミジンを含有するリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) 250 μ L を尾静脈から投与する。

6.1.5 測定試料の調製

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

6.1.6 放射活性測定

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

6.1.7 反応性評価

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

陽性対照の SI は 3 以上でなければならない。

6.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

7. 参考情報

7.1 薬食機発0301第20号からの変更点

薬食機発0301第20号は、事務連絡医療機器審査No.36を踏襲して作成された。今回、薬食機発0301第20号を改訂するに当たり、原則は踏襲した。その上で今までより表現を明確化し、合わせてISO 10993-10との整合性を高め、主として以下の改訂を行った。

- 1) GPMTの試験方法の記載をISO 10993-10の記載に合わせ、原則として同じ操作手順・評価基準で試験が実施できることを示した。
- 2) フローチャートの流れを整理し、見やすくした。

7.2 試験法の選択

GPMTとA&Pについては多くの経験により、通常の試験試料では、GPMTの感度が高いものの、試験試料の形状によってはA&Pが適していることが示されている²⁾。LLNAは単一化学物質については、GPMT及び臨床試験との相関性が認められているが、医療機器の分野ではまだ十分なデータが得られていない。しかし、ISO 10993-10では、化学物質の試験結果を外挿して医療機器でも十分に感作性を評価できると判断しており、またモデル物質を作製し、その抽出液で試験を行った場合、LLNAでもGPMTと同様の結果が得られたという報告³⁾があり、抽出液に

よる試験でも同等性が示されている。LLNAで注意すべき点は、抽出媒体の選択である。特にLLNAは耳に塗布して感作する試験であるため、塗布による感作が十分に行われなければ感度は低下する。そのため、媒体としては生理食塩液などの水系は不適切であり、刺激性の少ないアセトンなどの有機溶媒が適切である。OECD Test Guideline No.429で投与媒体として多く利用されているアセトン/オリブ油混液(4:1)での抽出も可能である。他の媒体を選択することも可能であるが、媒体による刺激性について確認しておく必要がある。

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

7.3 抽出率による試験法の選択

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

7.4 試験液の調製溶媒について

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

GPMTでは、試験試料を溶解させて投与した方が、検出感度が高まることが知られている。通常、生理食塩液、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。

LLNAでは、一般的に原料化学物質の溶媒として、アセトン/オリブ油混液(4:1)が用いられている。親水性試料あるいは耳介の皮膚に十分に付着しない液体の試料などは耳介に十分付着するよう塗布方法を工夫すべきである。例えばカルボキシメチルセルロースや水酸化エチルセルロース(0.5w/v%)のような懸濁液を添加する方法もある。一部の水溶性の化学物質に対しては、DMSOやN,N-ジメチルホルムアミド、エタノールなどが界面活性剤Pluronic® L92より好ましい。他の溶媒も投与用媒体として使用できるが、抽出媒体への添加や溶媒成分の変更による影響を十分に検証し、記録しなければならない。この影響は陽性対照物質として一般的に用いられる弱若しくは中等度の感作性物質を使用した実験

によって検証可能である。さらに、陽性対照物質を試験試料に添加して行う試験によって、調製された抽出液が媒体などによる妨害を受けることなく十分に感作性物質の存在を検出できることを実証することが可能である。

7.5 試験動物について

試験動物の選択に当たっては感受性の高い動物を用いることが原則である。

GPMTやA&Pではいずれもモルモットが用いられている。モルモットが選ばれたのは、感作性反応の感度の良さに加えて、外観的に紅斑及び浮腫を形成し、種々の化学物質においてヒトに類似した反応を示すことが知られており、さらに、豊富な背景データの蓄積があることが主たる理由である。動物の体重は重要な要因であり、あまり小さい(200 g以下)と操作がやりにくく、あまり大きい(600 g以上)と反応性が鈍くなるため、実験開始時の体重が400 g前後の、健康な若齢白色モルモット(通常1~3カ月齢)を用いるのが望ましい。雄ないし雌の動物を使用することが可能であるが、雌を使用する場合は妊娠していない未経産の動物を使用する。

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

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

7.6 LLNAの試験方法について

7.6.1 感作について

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

7.6.2 放射性物質の投与

^{125}I -iododeoxyuridine の場合は、 $2\ \mu\text{Ci}$ (74 kBq) を含有する PBS を 250 μL 、fluorodeoxyuridine の場合は $10^{-5}\ \text{M}$ を含有する PBS を 250 μL 尾静脈から投与す

る。

7.6.3 測定試料の調製例

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

7.6.4 放射活性測定

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

7.6.5 反応性評価

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

7.6.6 他の LLNA

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

7.7 皮膚反応の採点基準について

モルモットの場合、血管拡張に基づく紅斑と、血管透過性亢進に基づく浮腫とが容易に区別できることから、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もある。ISO 10993-10では、総合的に4段階でスコアをつけており、本ガイダンスではMagnusson and Kligmanのスコアを例示した。LLNAでは評価に用いるものではないが、投与期間中の耳介の状態を観察することが重要である。刺激性が強い物質では、耳介の状態が悪化し、結果として感作性の反応が低下するおそれがあるため、試験結果の評価に重要な情報となる。

7.8 感作性の強さの評価について

GPMT及びA&Pにおける皮膚反応の平均評価点は、皮膚反応（紅斑及び浮腫）の程度をスコア化し、その総点を使用動物数で割った値であり、皮膚の炎症の程

度を表わす²⁾。最低感作濃度は感作性が認められる最も低い感作濃度を示し、実験的に求めることは可能であるが、試験規模が膨大となり、現実的でない側面がある。最低感作濃度は最高感作濃度群におけるMRI惹起濃度（皮膚の平均評価点がおおよそ1.0を示すところの最も低い惹起濃度）とほぼ同程度であることが明らかにされていることから、MRI惹起濃度からおおよそその最低感作濃度を類推することが可能である。ただし、Magnusson and Kligmanのスコアに従った最高スコアが3点の評価法と薬食機発0301第20号以前に掲載されていた8点の評価法では、計算値が異なる場合があるので、評価法の異なるものを比較する際には注意が必要である。LLNA では用量依存性が認められた場合、求められたSI を基にSI が3を示す濃度（EC3）を算出し、このEC3濃度を既存の感作性物質と比較することにより、感作性の強さを評価することが可能である³⁾。

7.9 *in vivo*感作性試験の代替法について

現在、OECDテストガイドラインには、複数の*in vitro*感作性試験法が収載されている。これらは、単純化学物質の評価においては、十分な科学的根拠のあることが示されている。ISO/TC 194のWGでは、医療機器の生物学的安全性評価に感作性試験代替法の導入を目指して、ISO 10993-10のAnnexに試験法の概要を記載した。

8. 引用文献

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

9. 参考文献

- 1) van Ketal, W.G., Tan-lim, K.N: Contact dermatitis from ethanol. *Contact Dermatitis* 1, 7-10 (1975)
- 2) Stotts, J., Ely, W.J.: Induction of human skin sensitization to ethanol. *J. Invest. Dermat.* 69, 219-222 (1977)

- 3) Kero, M., Hannuksela, M.: Guinea pig maximization test open epicutaneous test and chamber test in induction of delayed contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 6, 341-344 (1980)
- 4) Goodwin, B.F.J., Crevel, R.W.R., Johnson, A.W.: A comparison of three guinea-pig sensitization procedures for the detection of 19 reported human contact sensitizers. *Contact Dermatitis* 7, 248-258 (1981)
- 5) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay. *Toxicol. Lett.* 62, 53-61 (1992)
- 6) Ikarashi, Y., Momma, J., Tsuchiya T., Nakamura, A.: Evaluation of skin sensitization potential of nickel, chromium, titanium and zirconium salts using guinea-pigs and mice. *Biomaterials* 17, 2103-2108 (1996)
- 7) Ikarashi, Y., Kaniwa, M., Tsuchiya, T.: Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs. *Biomaterials* 23, 4907-4914 (2002)
- 8) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Toyoda, K., Kobayashi, E., Doi, H., Yoneyama, T., Hamanaka H.: Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater. Trans.* 43, 3065-3071 (2002)
- 9) Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H. *et al.*, A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48, 53-61 (2002)
- 10) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Uchima, T., Doi, H. Nakamura, A., Ohshima, Y., Fujimaki, M., Toyoda, K., Kobayashi, E., Yoneyama, T., Hamanaka, H.: A method to monitor corrosion of chromium-iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine. *Mater. Trans.* 43, 3058-3064 (2002)
- 11) Cockshott, A., Evns, P., Ryans, C.A. *et al.*, The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. *Human Exp. Toxicol.* 25, 387-394 (2006)
- 12) Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J., Kimber, I.: Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 41, 54-60 (2007)
- 13) ASTM Standard F 2148-07: Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)

第3部 遺伝毒性試験

1. 適用範囲

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

2. 引用規格

- 2.1 ISO 10993-3:2014, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- ISO/TR 10993-33:2015, Biological evaluation of medical devices – Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity – Supplement to ISO 10993-3
- 2.2 OECD 471, Bacterial Reverse Mutation Test
- OECD 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
- OECD 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- OECD 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test
- OECD 487, *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test
- OECD 490, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene
- 2.3 平成24年9月20日付け薬食審査発0920第2号「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」

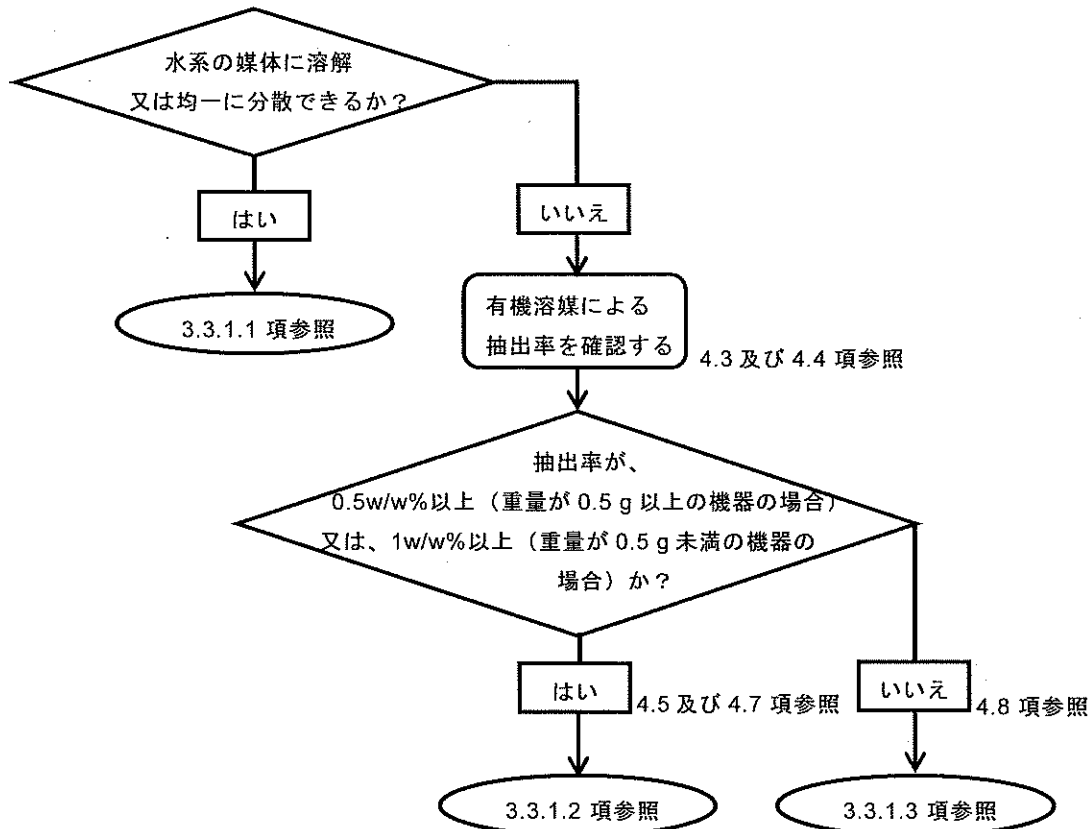
3. 試験の適用

- 3.1 試験試料は最終製品又は原材料である。ただし、試験試料に含まれる原料化学物質、添加剤などについて遺伝毒性に関する安全性が確認されており、含まれる原料化学物質の相互作用などにより未知物質が生成される可能性が低い場合は、これら試料の試験を実施する必要はない。その場合、その科学的妥当性を明らかにする必要がある。
- 3.2 文献又は既存データなどにより遺伝毒性に関する安全性が確認できない場合は、ISO 10993-3 及び OECD テストガイドラインを参照し、以下の試験の実施を基本とする（4.2項参照）。
 - 1) 細菌を用いる復帰突然変異試験
 - 2) 培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験、又はマウスリンフォーマ TK 試験

3.3 試験液の調製

3.3.1 有機材料の場合

試験試料（最終製品又は原材料）の材質、性状、溶解性などの物理化学的特性を考慮して、以下の手順により試験に適用するための試験液を調製する。



3.3.1.1 水系の媒体に溶解若しくは懸濁できる試験試料は、媒体（水・生理食塩液・血清含有培養液など）に溶解又は均一に分散して試験液とし、試験を実施する。

3.3.1.2 水系の媒体に溶解又は均一に分散できない試験試料は、有機溶媒（メタノール及びアセトン）による抽出率を確認する（4.3、4.4 項参照）。メタノール又はアセトンによって抽出物が得られる場合（4.5 項参照）は、より抽出率の高い溶媒を用い（4.6 項参照）、細切した試験試料にその重量の 10 倍容量の溶媒を添加し、室温で 24 時間攪拌して抽出する。得られた有機溶媒抽出液の溶媒を留去し、必要量の抽出物を得る。抽出物は試験系に適切な媒体に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する（4.7 項参照）。

3.3.1.3 水系の媒体に溶解又は均一に分散せず、有機溶媒でも抽出物が得られない試験試料は（4.8 項参照）、復帰突然変異試験においてはジメチルスルホキシド（DMSO）による抽出液を、染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーム TK 試験においては血清含有培養液による抽出液を用いて試験を実施する（4.3 項参照）。

1) 復帰突然変異試験

可能な場合は試験試料を細切し、その0.2 gに対してDMSO 1 mL（あるいは試験試料 6 cm²に対してDMSO 1 mL）の割合で添加し、37℃で振盪攪拌しながら48時間又は72時間抽出する。必要に応じて、付録1の規定を参照しても差し支えない。その抽出液を試験液として、プレート当たり最高100 µLを添加して試験を実施する。

2) 染色体異常試験、小核試験、マウスリンフォーマ TK 試験

可能な場合は試験試料を細切し、その0.2 gに対して試験に用いる血清含有培養液 1 mL（あるいは試験試料 6 cm²に対して培養液 1 mL）の割合で添加し、37℃で48時間又は72時間抽出する。必要に応じて、付録1の規定を参照しても差し支えない。その抽出液を100%抽出液とし、培養液で希釈して試験を実施する。

3.3.2 無機材料の場合

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

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

3.3.3 原材料化学物質の場合

適切な溶媒に溶解又は懸濁して試験に供する。

3.4 判定及び評価

本ガイダンスに従って実施した試験結果の判定は引用規格に示したガイドライン（2.項参照）に従う。陽性結果が得られた場合は、遺伝毒性のもつ重要性から、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、ヒトへのリスク評価の一助となる場合も考えられる（4.2項参照）。ただし、医療機器の安全性評価は、遺伝毒性の強さや濃度依存性、抽出に用いた溶媒の種類や抽出率、医療機器の接触部位や接触期間など、種々の条件を総合的に考慮して行う（4.9項参照）。

3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 対照物質（背景データ）

5) 試験液の調製方法

例：溶媒による抽出法と抽出率、滅菌方法、抽出後の抽出液（100%原液）の変化の有無など

6) 試験方法

例：菌株又は細胞

7) 試験結果

必要に応じて、表、図、写真を添付すること

8) 結果の評価と考察

9) 参考文献

4. 参考情報

4.1 背景

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

4.2 試験法の選択

一つの試験で、全ての遺伝毒性物質を検出することはできないため、通常、複数試験の組合せ（バッテリー）で実施される。

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

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

4.3 抽出溶媒

試験試料から抽出物を得るための有機溶媒として、主に水溶性物質を抽出するメタノールと脂溶性物質を抽出するアセトンの2種類をあげた。これは試験試料から可能な限り多くの抽出物を得ることを目的とした組合せであり、インプラントのように低濃度かつ長期にわたるばく露の影響が想定される場合をも考慮したものである。有機溶媒で抽出物が得られないと判断された試験試料で、さらにDMSOが使用不可能な場合には、生理食塩液やリン酸緩衝液、血清含有培養液などでの抽出が考えられる。どのような抽出媒体を選択する場合であってもその妥当性を説明すること。

4.4 抽出率（試験試料の重量に対する試験試料から得られる抽出物量の割合）

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

4.5 「抽出物が得られる場合」の判断

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

4.6 抽出物が得られる場合のISO 10993-3 Annex Aとの違い

有機溶媒抽出の溶媒の種類と数については、国内では以下の経緯がある。

薬機第99号では、メタノール及びアセトンの2種の溶媒による抽出物の試験を実施することとしていたが、事務連絡医療機器審査No.36では、メタノール及びアセトンの2種の溶媒のうち、抽出率が高い1溶媒からの抽出物を用いて試験を実施することに変更された。これは、薬機第99号発出以降に実施された2種の溶媒からの抽出物での試験結果において、両方とも陽性になるか、両方とも陰性になる場合がほとんどであったことから、より抽出率が高い溶媒1種からの抽出物の試験で現実的には問題ないであろう、と判断されたものである。

一方、ISO 10993-3 Annex Aでは、日本の有機溶媒抽出の考え方を採用したが、抽出溶媒については、基本的にはISO 10993-12の考え方を採用した。すなわち、有機材料及びそれらの製造工程で使用される添加物などは多種多様であり、原理的に、溶媒によって抽出される化学物質は異なり、生体内における溶出物のすべてを1種の溶媒で抽出できない可能性を否定できないことから、抽出できない溶出物に強い遺伝毒性物質が含まれる可能性を考慮し、ISO 10993-12では、極性溶

媒及び非極性溶媒の2種の溶媒による抽出物の試験を要求事項としている。この考えに基づき、ISO 10993-3 Annex Aにおいても、2種の有機溶媒で抽出物が得られる場合には、2種の有機溶媒抽出物による試験が求められる。

4.7 抽出物量

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

4.8 「抽出物が得られない場合」の判断

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

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

4.9 毒性学的懸念の閾値（TTC）による評価

低濃度で存在する潜在的な毒性物質について、その許容される摂取量（Tolerable Intake: TI）を文献などで参照することができない場合、遺伝毒性のリスク評価においてTTCの考え方（ISO/TS 21726:2019）は参考となり得る。

5. 薬食機発 0301 第20号からの変更点

- 1) マウスリンフォーマTK試験に係わるOECDテストガイドラインがOECD 476から分離され、新たなガイドラインとして発行された（OECD 490, 2015.7.28）ため、引用規格においてOECD 476をOECD 490と置き換えた。
- 2) 引用規格を現在有効で、直接参考となるものに更新した。
- 3) ISO 10993-3及びISO 10993-12との整合性を図るために、抽出時間を旧ガイドラインより長い72時間も適切な抽出時間として追加した。
- 4) ISO 10993-3:2014と整合性がとれていない内容や有用と考えられる内容を参考情報として追加した。

6. 参考文献

- 1) 石館基監修：微生物を用いる変異原性試験データ集，エル・アイ・シー，東京（1991）
- 2) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法，朝倉書店，東京（1991）
- 3) 林真：小核試験－実験法からデータの評価まで－，サイエンティスト社，東京（1999）
- 4) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集－改訂1998年版－，エル・アイ・シー，東京（1999）
- 5) Wever, D.J., Veldhuizen, A.G., Sanders, M.M., Schakenraad, J.M., van Horn J.R.: Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18, 1115-1120 (1997)

- 6) Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K.I., Kodani, N.U., Nishi, Y., Nakadate, M., Sofuni, T.: Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutagenesis* 14, 5-22 (1999)
- 7) Chauvel-Lebret, D.J., Auroy, P., Tricot-Doleux, S., Bonnaure-Mallet, M.: Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. *Biomaterials* 22, 1795-1801 (2001)
- 8) Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Ono, H., Tanaka, N.: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals. *Mutat. Res.* 517, 187-198 (2002)
- 9) Müller, B.P., Ensslen, S., Dott, W., Hollender, J.: Improved sample preparation of biomaterials for *in vitro* genotoxicity testing using reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 61, 83-90 (2002)
- 10) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Ardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A.: Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540, 153-163 (2003)
- 11) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Ardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A.: Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group" [*Mutat. Res.* 540 (2003) 153-163]. *Mutat. Res.* 564, 97-100 (2004)
- 12) Muramatsu, K., Nakajima, M., Kikuchi, M., Shimada, S., Sasaki, K., Masuda, S., Yoshihara, Y.: *In vitro* cytocompatibility assessment of β -tricalcium phosphate/ carboxymethyl-chitin composite. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 71, 635-643 (2004)
- 13) Matsuoka, A., Isama, K., Tsuchiya, T.: *In vitro* induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 75, 439-444 (2005)
- 14) Matsuoka, A., Haishima, Y., Hasegawa, C., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the *in vitro* chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 86, 13-22 (2008)
- 15) 薬機第99号：平成7年6月27日付け厚生省薬務局医療機器開発課長通知 薬機第99号「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的試験のガイドラインについて」（平成15年2月13日廃止）
- 16) 事務連絡医療機器審査No.36：平成15年3月19日付け厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡 医療機器審査No.36「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（平成24年3月1日廃止）

第4部 埋植試験

1. 適用範囲

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

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

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

埋植試験の中で全身毒性を評価する場合の注意事項についても、本パートにおいて言及する。その場合は全身毒性の要求事項を満たすよう留意する。

なお、脳内埋植試験においては、使用方法・使用条件を考慮した機能性（性能確認）試験が設定され、適切なリスク評価が実施されている場合には、改めて実施する必要はない。

2. 引用規格

ISO 10993-6:2016, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation

3. 一般的注意事項

3.1 試験法

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

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

3.1.3 動物試験を実施する場合には、ISO 10993-2 及び動物福祉に関する国内規制の要求事項に従わなければならない。

3.2 試験試料及び対照材料

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

3.2.2 埋植用試験試料を調製する場合には、その形状、断端の形状、大きさ、表面

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

- 3.2.3 滅菌は最終製品と同じ方法を用いる。試験試料を調製する場合は、無菌的に加工するか、滅菌前の製品を加工した後最終製品と同じ滅菌工程を経たものを用いることが望ましい。再滅菌する場合は、試料が変質などの影響を受けない方法を採用する。
- 3.2.4 評価は、臨床的許容性及び生体適合性が立証された同形状の材料に対する組織反応と比較する。具体的には、陰性対照材料としては、高密度ポリエチレンや純チタン、既承認／認証品として使用実績のある材料などを用いる。陽性対照材料は必須ではないが、試験法や動物の感度を比較したい場合などにおいて設定してもよい（8.4項参照）。滅菌は、必ずしも試験試料と同じ方法にする必要はなく、材料が変質などの影響を受けない方法を採用する。
- 3.2.5 骨セメントや歯科材料など、生体内で硬化する医療機器を評価する場合は、臨床適用を模擬して非硬化物を局所に埋植する。埋植が技術的に困難な材料に対しては、すでに硬化したものを整形して埋植する場合がある。後者の場合は、硬化中の生体反応について、別の生物学的安全性試験を実施することにより評価することが望ましい。
- 3.2.6 非固形（例：粉末）を評価する場合は、①ペレット化する、②粉末状態で臨床適用されるものであれば、臨床適用される形状で一定の面積、容積を埋植する、③シリコンやポリプロピレン製などの刺激性の低いことが知られている開口チューブに充填して埋植するなどの設計とする。③の充填時にはコンタミネーションがないよう注意し、対照材料の一つとしてチューブのみを埋植する。
- 3.2.7 組織工学により製造される医療機器を試験する場合、生体由来材料は埋植する動物種に対して免疫反応を引き起こす可能性があることに留意する。
- 3.2.8 複数の部材からなる医療機器を埋植する場合、それぞれの部材による局所影響が明確に解析できる設計とする。最終製品そのものを埋植した時、それぞれの部材の組織反応が組織標本において特定できないと想定される場合は部材を単離して埋植する、表裏などが異なる材料ではそれが明確に区別できる方法で埋植するなどである。ただし、部材間の相互作用が予測される場合や、血管内埋植などにおいて臨床模擬試験として埋植試験を実施する場合は、最終製品そのものを埋植することにより評価する。
- 3.2.9 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、動物への埋植試料の総量とヒトの埋植量を比較して一定のばく露マージンを担保できる設計とすべきである。ただし、人工関節材料など、ヒトへの埋植量が大きいものについては、一定のばく露マージンを担保する設計は困難である。このような場合は、できる限りヒトの適用量を下回らない設計として、合わせて抽出液などによる全身毒性試験を検討する。また生体内分解材料の場合は、*in vitro* における分解動態が生体内と同程度であることが判明していない限り、抽出液を用いるべきではなく、埋植によって全身毒性を検索すべきである。

3.3 埋植部位

- 3.3.1 埋植部位は臨床適用部位に近い組織とする。本試験法では、例として筋肉内、皮下、骨内及び脳内埋植試験法について記載しているが、これ以外の組織・器官に臨床適用される場合は、その組織・器官の起原、構成組織、細胞種などを総合的に勘案して、例として挙げた組織のいずれか又は複数を選択する。また新たな組織への標準的な試験法が ISO 10993-6 などで明らかとなった場合は、それを示した上で、採用することができる。文献などで明らかとなった方法を採用する場合は、その妥当性を示した上で、十分なサンプル数（1埋植期間について10箇所以上）の観察を行う設計とする。
- 3.3.2 吸収・分解性材料の場合は、消失した後に埋植部位を特定することが困難になるおそれがあるため、①埋植時に写真を撮影するなどして埋植位置を特定しておき、その位置に試験試料がない場合は吸収されたものとみなす、②陰性対照材料や局所への影響がないことが知られている物質をマーカーとして同時に埋植してその付近を観察する、③X線撮影などを経時的に行って埋植部位を特定するなど、消失した後の取扱いを明確にしておく、あるいは消失した場合でも観察位置が特定できるよう工夫する。入墨又は試料の配置を示す模式図を利用してもよいが、短期の埋植期間のみとする。
- 3.3.3 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、あらかじめ試験計画立案の際に全身毒性を評価できるよう、血液学的、血液生化学的、病理組織学的検査などを計画する。対照材料と試験試料を同一の動物に埋植すると全身毒性の評価が困難となることから、試験試料埋植群と対照群は別々に設定する。また複数の材料を同一動物に埋植しても、全身毒性の評価は困難となる。ただし、複数の部材から構成される医療機器の埋植試験を設計する場合は、複数の部材を同一動物に埋植することで、臨床適用を模擬することが可能となる。

3.4 埋植期間

- 3.4.1 埋植期間は、臨床適用期間を超える必要はないが、ヒトにおける埋植反応を予測し得る期間、若しくは、生体反応が安定した状態となるまでとする。
- 3.4.2 吸収・分解性材料でない場合
- 3.4.2.1 埋植初期の反応、埋植中期の埋植試料と生体界面の組織反応、そして安定化（すれば）した場合の反応を評価することが望ましい。複数の期間を観察して安定化することが明らかであった場合は、それ以上の期間の埋植群を省略することを検討する。ただし、試験計画を立案する際には、短中期の試験をあらかじめ行った上で長期埋植を計画するなど、動物愛護の観点から動物数を減らすことを検討する。
- 3.4.2.2 短期の埋植を1週から4週とし、長期埋植は12週を超える期間とする。またその間を中期埋植とする。生体適合性の高い材料の場合、短期において、埋植後2週間程度は埋植手術の影響が残るが、対照材料と比較することにより、試料に起因する炎症反応を区別して観察することができる。また器質化や新生骨の形成は埋植後2週間程度でも開始されており、生体適合性に関する

る情報が多く得られる。埋植後4週には、すでに安定化する場合が多い。中期では、周囲組織の多くは埋植前の状態に近づいており、界面や周囲はおおむね安定化し、その後の長期における反応を推測するための時期である。長期では、周囲組織は正常組織と同様となり、界面は非常に薄い被膜や新生骨で覆われ安定化する。

3.4.3 吸収・分解性材料の場合

3.4.3.1 吸収・分解過程で様々な物質が細粒化又は溶出するなどして、埋植局所は初期とは異なる環境となるため、分解過程を評価し得る埋植期間を設定する。具体的には、少なくとも以下の埋植期間を含むこと。

- 1) 短期（分解がない又は最低限の期間）：初期の組織反応を評価するため、通常1～2週の埋植期間を設ける。
- 2) 中期（分解が進行中の期間）：崩壊／断片化などの組織学的変化が最も大きいと予測される時期を評価する。長期間の分解特性を有する場合には、予想される分解様式に応じた複数の埋植期間が必要な場合がある。異なる分解速度を有する複数の材料から構成される場合は、全ての材料の分解特性を評価可能な埋植期間を設定すべきである。
- 3) 長期（埋植試料がほぼ分解された期間）：埋植部位にごく少量しか残存していない時点の組織反応を評価する。なお、埋植試料が完全に吸収された後の評価が望ましいが、組織反応が安定化しており吸収性材料がごく少量しか残存していない場合でも、十分に局所への影響を評価し得ると思われる。可能な場合、試料の推定残存率を算出する。また加速分解した材料を埋植することにより、迅速に長期埋植の結果を確認することができるものの、実際の埋植期間のデータの代替にはならない。

3.4.3.2 埋植期間中に試料が完全に吸収されない場合、又は完全に分解されて試料が組織学的にも確認できない場合に備え、埋植期間を決めるためのサテライト群を設定することが有用な場合がある。また1年以上の分解期間が必要な場合では、サテライト群の動物を長期間にわたって観察することで有用な情報が得られることがある。

3.4.3.3 吸収・分解性材料の全身毒性を埋植試験により評価する場合、材料及びその分解物による毒性の両方を評価し得る適切な埋植期間を設定する。

3.5 試験動物

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

3.5.2 吸収・分解性材料を試験する場合、げっ歯類を用いた事前のパイロット試験を行い、吸収・分解挙動について *in vitro* で得られた結果と比較しておくことよい。

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

試験により全身毒性を合わせて評価する場合、対照材料と試験試料を同じ個体に埋植することは適切ではない。

3.5.4 動物数は複数を用いることとするが、ISO 10993-6:2016に記載された動物数以上とする（4.2、5.2、6.2、7.2項参照）。

表1 長期埋植における動物種の選択

種	埋植期間（週）				
	13	26	52	78	(104)
マウス	○	○	○		
ラット	○	○	○		
モルモット	○	○	○		
ウサギ	○	○	○	○	○
イヌ	○	○	○	○	○
ヒツジ	○	○	○	○	○
ヤギ	○	○	○	○	○
ブタ	○	○	○	○	○

注: ISO 10993-6:2016 Table 1 を引用した。医療機器の臨床適用に応じた試験期間とする。全ての期間を実施する必要はない。ラットの場合、26週を超える皮下埋植は異物発がんの可能性を考慮する。また104週は特定の場合のみに設計する。

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

3.5.6 各埋植期間終了後、動物を適切な方法で安楽死させる。

3.6 埋植方法

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

3.6.2 術野は刈毛後、適切な消毒薬を用いて清拭する。熟練した術者により滅菌した清浄な器具を用いて切開し、出血は最小限になるよう埋植を行う。埋植後は、刺激性の低い縫合糸やステープラで切開創を閉じ、消毒する。また動物が縫合部位を舐めないよう、げっ歯類、ウサギやイヌの場合は埋植初期には首にカラーを装着するとよい。抗菌剤や抗生物質などの医薬品の投与は、知見や予備検討などにより当該医薬品が埋植部位の組織反応に影響しないことをあらかじめ確認する必要がある。例えば、ミノサイクリンなどの抗生物質は脳ミクログリア及びマクロファージの反応に影響を与えることが報告されている。

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

3.6.4 埋植期間中は、動物の一般状態を定期的に観察し、体重測定を行う。鎮痛剤を使用する場合には、ISO 10993-2の規定に従う。

- 3.6.5 埋植期間中に動物の状態が悪化し、回復の見込みがない場合は、動物を安楽死させる。その場合、埋植局所の観察は通常どおり行い、全てのデータを記録する。この場合、状態の変化が試料の埋植に起因するか否かを十分検討する。評価の対象としない例としては、骨内埋植した直後に離断骨折し、治療を行わない限り苦痛を与え続けるなどの理由で安楽死させ、観察の結果埋植部位以外の骨折が原因であった場合など、原因が試料の埋植による影響ではないことが明らかな場合がある。
- 3.6.6 埋植部位の皮膚が哆開するなど、再手術の必要がある場合は、直ちに麻酔下で縫合するなどの処置を行う。化膿が見られる場合はできるだけ除去し、多量の生理食塩液や緩衝液を用いて洗浄する。抗菌剤や抗生物質を使用する際は、3.6.2項を参考にして妥当性を確認しておく。これらの処置を行った場合は、全て記録する。
- 3.6.7 埋植期間終了後は、動物を全身麻酔下で安楽死させる。原則として放血処置を行う。

3.7 観察

3.7.1 肉眼的観察

- 3.7.1.1 埋植試験試料周囲組織及び試料を肉眼又は拡大鏡を用いて、出血、浮腫、被包形成などの正常な構造からの変化について観察し、それらの範囲と合わせて記録する。なお、埋植周囲リンパ節²⁾の腫脹なども観察する。試験動物に何らかの異常がある場合や全身毒性試験を兼ねる場合は、埋植部位以外の臓器を観察し、組織学的観察のための採材を行う。
- 3.7.1.2 埋植部位を破壊しないと観察できない場合は、組織観察標本用の組織を固定した後、埋植試料を引き抜く際などに埋植部位の肉眼観察を行い、組織観察用の標本と兼ねてもよい。この場合、あらかじめ試料が固定液により変色するか否かなどを確認しておく。
- 3.7.1.3 吸収性材料の場合、分解の程度、摘出時の状態を埋植部位ごとに記録する。

3.7.2 組織学的観察

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

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

- 3.7.2.5 作製した標本は、顕微鏡下で観察する。埋植周囲に認められた炎症性細胞の種類や出現の程度及びその他の異常所見を記録する。例えば、被膜を構成する成分とその状態、線維芽細胞の増生、好中球（ウサギ及びモルモットの場合、偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、マクロファージ、巨細胞などの浸潤、変性・壊死、出血、脂肪化、新生骨形成などについて観察し、グレード分けして記録する。筋肉内埋植の場合、炎症性細胞の浸潤や炎症反応は筋線維間に延びる線維性結合組織の方向に拡大しやすく、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。観察に当たっては、そのようなことに留意して所見を記録する。
- 3.7.2.6 筋肉内埋植の場合は、炎症領域の幅を測定するなど、組織形態計測を行うことにより、局所への傷害を定量的に評価することが可能である。この際、標本中における試料の薄切面を一定にするなど、組織形態計測におけるばらつきを少なくすることに留意する。吸収・分解性の試料では貪食などにより形状が維持されないため、また多孔性や繊維状のものでは、内部に線維組織が侵入するため、炎症領域の幅を測定することはできない。また皮下や骨内埋植では、炎症領域の幅の計測が困難又は必ずしも炎症を定量化するための指標とはならないため、他に適切なパラメータがある場合はその根拠を示した上で組織形態計測を行ってもよい。
- 3.7.2.7 吸収性材料の場合、臓器のリモデリングを観察することが目的の一つであるため、埋植部位に正常な組織が形成されるかも考慮して評価する。
- 3.7.2.8 骨内埋植の場合、組織と埋植試料の界面は特に注意して観察する。埋植試料と骨が接触する程度、埋植試料近傍の骨組織の状況や非石灰化組織の介在、並びに骨吸収や骨新生の有無について記録する。
- 3.7.2.9 ヘマトキシリン・エオジン染色での病理組織学的評価で異常が認められた場合、評価方法を追加してもよい。

3.8 評価

- 3.8.1 各観察項目について、程度とともにその現象を観察する（評価基準を設けて観察し、表に示す）。表2に評価のために着目すべきポイントを示した。スコアリングの後、統計学的検定を行ってもよいが、その場合は観察項目ごとに比較する。全てのスコアの合計値を指標とする場合、それぞれの観察項目が評価において同等の重みとなるよう適切な係数を乗じるなどの処理を行うことを原則とする。なお、ISO 10993-6:2016 Annex Eなどのスコア表を用いてもよい。

- 3.8.2 組織形態計測を行った場合は、その数値を表にして示す。
- 3.8.3 ある観察期間において、試験試料の反応が陰性対照材料と比較して有意（8.7項参照）に強い場合、陽性反応を認めたと判定する。
- 3.8.4 肉眼的観察では、反応の広がり全体として捉えることが可能であり、組織学的観察では肉眼的観察で見られた反応がどのような細胞が主体になって起きているのかがわかる。反応が微弱であれば、組織学的観察でのみ見られるにとどまり、局所的反応は肉眼的観察においてしか見られない可能性もある。したがって、組織学的観察を評価するに当たっても、肉眼的観察結果も考慮すべきである。
- 3.8.5 まれに動物個体の感受性が異常に高い（陰性対照でも細胞浸潤などの反応が見られる）場合があり、評価が困難となることがある。このような場合には、その動物を評価の対象から外し、新たに動物を追加、補充する。ただし、評価の対象外とした動物のデータも試験の報告に含めるべきである。

表2 埋植局所の組織学的観察ポイント

埋植組織	観察ポイント
筋肉内	線維性被膜の状態（被膜、被包の成熟度合いと線維芽細胞の増生程度）及びその厚み、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球など）、変性・壊死、出血、血管新生、脂肪化など
皮下	筋肉内と同様
骨内	組織と埋植試料の界面の状態（軟組織又は骨の介在の程度）、新生骨の形成（埋植試料周囲の骨新生の程度と石灰化骨／類骨の割合など）、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球など）、変性・壊死、出血など
脳内	筋肉内の観察ポイント及び神経病理学的評価。上衣層及びくも膜顆粒についても調査する。

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

3.9 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する情報
（例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 対照材料
（例：対照材料名、入手先、入手年月日、製造番号など）
- 5) 試験試料及び対照材料の調製方法
（例：切断、滅菌、サイズなど）
- 6) 試験動物（種、系統、性、週齢、体重、入手元。動物の収容方法及び飼育方法）

- 7) 試験方法（麻酔方法及び術後処置を含む試料の埋植方法、回収方法、病理組織標本の作製方法）
- 8) 試験結果
 - 試料、試料周囲組織及び埋植周囲リンパ節の肉眼的観察結果
 - 試料周囲組織（加えて、吸収性材料の場合は採取できた埋植周囲リンパ節）の組織学的観察結果（組織形態計測結果を含む）
 - 統計学的検定結果（実施した場合）
- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

4. 筋肉内埋植試験法

4.1 試験試料の大きさ

- 4.1.1 埋植する動物によって適切な大きさを設定する。なお、ウサギの場合は、幅（又は直径）1～3 mm、長さ約 10 mm の棒状とし、断端の角をできるだけ滑らかにする。より大きい試料は筋肉を切開して埋植するが、15 ゲージ程度の穿刺針を用いて埋植する方が、動物の全身状態と周囲組織へのダメージが少ない。
- 4.1.2 製品の材質や形状、サイズなどにより、試験試料が整形不可能な場合、あるいは最終製品が試験試料の規定サイズよりも細かい若しくは薄い場合で、それらを規定サイズに整形した場合に、臨床適用の場合とはかけ離れた組織反応が生じると推定される場合は、その旨を示した上で規定サイズとは異なるサイズの試験試料を埋植しても差し支えない。その場合は、できる限り陰性対照材料も同じ形状に整形する。

4.2 試験動物と埋植部位

- 4.2.1 ウサギの脊柱傍筋肉内への埋植が推奨される。ウサギであれば左右の脊柱傍筋肉内へ各 4 箇所程度の埋植が可能である。試験試料が小さい場合、ラット臀部及びウサギ大腿部筋肉へも埋植可能である。
- 4.2.2 一つの埋植期間につき、3 匹以上の動物を用い、試験試料及び対照材料ともに、10 箇所以上の埋植部位を観察する。なお、肉眼的観察用と組織学的観察用は、兼ねることができる。
- 4.2.3 既承認／認証品などの対照材料を用いる場合で、ある程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため陰性対照材料を埋植する。
- 4.2.4 全ての埋植期間において非吸収性の陰性対照材料を埋植、観察すべきであるが、やむを得ず 1 埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

4.3 埋植方法

- 4.3.1 埋植時は全身麻酔下で、皮膚を切開し、埋植は 15 ゲージ程度の穿刺針か、トロッカーを用いて埋植する。
- 4.3.2 穿刺針などに試料が装填できない場合は、筋肉を外科的に切開して埋植する。この場合は、陰性対照材料などの対照材料も同様の方法で埋植する。

- 4.3.3 筋線維方向に並行するよう各試料を埋植する。
- 4.3.4 埋植箇所は 25 mm 程度の間隔を開ける。
- 4.3.5 必要に応じて、切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラで閉じる。

4.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

4.5 評価方法

3.8 項参照。

4.6 試験報告書

3.9 項参照。

5. 皮下埋植試験法

5.1 試験試料の大きさ

- 5.1.1 シート状の場合は、厚み 0.3~1.0 mm、直径約 10~12 mm の円板状とする。
- 5.1.2 直径約 1.5~2 mm、長さ約 5~10 mm の棒状として、断端を丸く加工したものでよい。
- 5.1.3 非固形試料の場合は、直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm のチューブに充填する。チューブに充填した量を記録すること。可能な場合、非固形試料を直接埋植してもよいが、吸収される場合には埋植位置を特定する工夫を施す。
- 5.1.4 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

5.2 試験動物と埋植部位

- 5.2.1 成熟したマウス、ラット、モルモット、ウサギのうち 1 種を用いる。
- 5.2.2 埋植期間につき、少なくとも 3 匹の動物を用いて、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計 10 箇所以上の埋植部位を観察する。
- 5.2.3 既承認/認証品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測される時は、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。
- 5.2.4 全ての埋植期間において非吸収性の陰性対照材料を埋植、観察すべきであるが、やむを得ず 1 埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

5.3 埋植方法

5.3.1 背部皮下に埋植する場合

- 5.3.1.1 全身麻酔下で、皮膚を切開して切開部位から約 1 cm 以上の深さで鈍性剥離して皮下ポケットを作製し、1 個の試料を埋植する。複数の試料を埋植する場合は、それぞれを 1 cm 程度離す。
- 5.3.1.2 穿刺針などを用いて埋植してもよい。
- 5.3.1.3 切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラで閉じる。

5.3.2 頸部皮下に埋植する場合

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

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

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

5.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を3.4項に従って設定する。

5.5 評価方法

3.8項参照。

5.6 試験報告書

3.9項参照。

6. 骨内埋植試験法

6.1 試験試料の大きさ

6.1.1 円柱状に加工したものとする。スクリー状に加工したものの方が骨への初期密着性に優れるが、標本作製時は試料の長軸に沿って切断しないと骨と試料の界面の観察がしづらい。

6.1.2 ペースト状のものは、そのまま骨に充填するが、あらかじめ骨に埋植腔を作製して充填する。埋植前後の容器込み重量を差し引きするなどして埋植量を記録しておく。

6.1.3 ラットなどの小動物の場合は、直径約1mm、長さ約5mmの円柱状とする。

6.1.4 ウサギなどの中型動物の場合は、直径約2mm、長さ約6mmの円柱状とする。

6.1.5 イヌ、ヒツジ、ヤギなどの大型動物の場合は、直径約4mm、長さ約12mmの円柱状とする。

6.1.6 スクリュータイプのインプラントをウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタに埋植する場合は、2~4.5mmの径とする。

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

6.2 試験動物と埋植部位

6.2.1 成熟したげっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギのうち1種を用いる。若齢の動物を用いる場合、骨端及び骨が未熟な部位は避ける。

6.2.2 埋植部位はできるだけ臨床適用部位に近い部位とする。大腿骨や脛骨が用いられることが多いが、いずれにおいても、骨体部の緻密骨に埋植する場合と、骨端部の海綿骨部に埋植する場合には、組織反応は異なるため、注意を要する。

- 6.2.3 埋植期間につき、少なくとも3匹の動物を用い、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計10箇所以上の埋植部位を観察する。
- 6.2.4 既承認／認証品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測される場合は、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。
- 6.2.5 1個体に複数の試料を埋植してもよいが、ウサギでは骨が比較的薄く、骨折する可能性があるため、左右の大腿骨と脛骨にそれぞれ1箇所ずつ、計4箇所の埋植が現実的である。
- 6.2.6 全ての埋植期間において非吸収性の陰性対照材料を埋植、観察すべきであるが、やむを得ず1埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

6.3 埋植方法

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

6.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を3.4項に従って設定する。

6.5 評価方法

3.8項参照。

6.6 試験報告書

3.9項参照。

7. 脳内埋植試験法

7.1 試験試料の大きさ

- 7.1.1 埋植する動物によって適切な大きさを設定する。
- 7.1.2 ラット及びウサギの脳実質内に埋植する場合、幅1mm×1mm又は直径1mm以下、長さ2~6mmの棒又は楔状とする。
- 7.1.3 主に脳実質表面に接するよう意図された医療機器の場合、脳表面に埋植する。ラット及びウサギの脳表面に埋植する場合、直径8mm以下のディスク状とし、その厚さは医療機器の用途に応じて決定する。
- 7.1.4 陰性対照材料は全ての埋植期間において埋植、観察すべきであるが、やむを得ず1埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

7.2 試験動物と埋植部位

- 7.2.1 ラット又はウサギを用いた試験法を示したが、医療機器の特性を考慮して他の動物種を使用する場合、試験法を変更してもよい。
- 7.2.2 性差が報告されているため、雌雄動物を同数使用する。片性のみを用いる十分な正当性がある場合はこの限りではない。
- 7.2.3 健康で過去に実験に用いられていない動物を用いる。動物種及び週齢は神経生理学及び生物学的反応において重要な要素であるため十分に考慮する。
- 7.2.4 試験試料及び陰性対照材料ともに、各埋植期間で8箇所以上（両性を用いる場合は、各性4箇所以上）に埋植する。試験試料及び対照材料ともに、解剖学的に同等な部位に埋植する。機械的外傷を最小限にするために、埋植部位及び外科的処置法は慎重に選択する。
- 7.2.5 1個体につき片側の脳半球にのみ埋植し、1個体につき試験試料又は対照材料の1種類のみを埋植する。その理由は、筋肉内、皮下及び骨内埋植試験と異なり、神経系器官の埋植試料に対する反応は必ずしも局所的ではなく、他側の脳半球まで広範囲に波及し得るためである。ラットの場合は脳半球に1箇所、ウサギの場合は2箇所埋植可能である。

7.3 埋植方法

- 7.3.1 全ての試験動物に対し、埋植前及び埋植後（定期的）に体重を測定する。適切な鎮痛及び麻酔処置を埋植時及び埋植後の適切な期間行う。
- 7.3.2 手術中に動物が動かないよう適切に固定する。頭部固定装置を用いると試料を正確に配置でき、物理的損傷を最小限とすることができる。動物の固定に関しては、他の方法を考慮してもよい。
- 7.3.3 無菌的に頭蓋骨を露出させ、そこに埋植試料を挿入するのに十分な大きさの孔を開ける。さらに、硬膜に小さな穴を開け、埋植試料を脳の適切な部分に慎重に挿入する。

7.4 埋植期間

- 7.4.1 細胞死は埋植後数日で起こり、神経変性過程は迅速で一過性となり得るため、1週間の埋植期間が必要である。加えて、埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を3.4項に従って設定する。
- 7.4.2 長期の埋植期間は、医療機器の臨床適用を考慮して設定する。

7.5 埋植期間中の観察方法

- 7.5.1 神経系組織の損傷は異常行動を引き起こすため、埋植試料の評価には一般状態観察結果を加味する。
- 7.5.2 埋植後初期には、試験動物を個別収容して1日2回観察することで埋植部位が適切に治癒しているか、飲食行動が正常に回復しているか、外科的処置による異常な臨床症状が認められるかなどを確認する。
- 7.5.3 毎週、各動物に対して詳細な観察を行う。観察項目には、埋植試料に起因する全ての異常な臨床兆候、異常行動又は全身性／中枢神経性の臨床兆候を含める。臨床兆候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物、排泄物の変化又は他

の自律神経活動の存在（流涙、立毛、瞳孔の大きさ、異常な呼吸パターン）が含まれるが、これらに限定されるものではない。加えて、歩様、姿勢及びハンドリングに対する応答の変化、並びに間代性又は強直性痙攣の存在、常同行動（過度のグルーミング、旋回行動）、異常行動（自傷行動、後ろ向き歩行）について記録する。

- 7.5.4 中枢神経系の障害を評価する際に、functional observation battery (FOB) 又は modified Irwin test を用いることができる。
- 7.5.5 行動学的及び神経学的兆候については、いつ最初に観察されたか、その後、いつ進行度合いが変化又は解消したかを記録する。異常行動、神経学的兆候、歩行、姿勢、又は反射の所見を発見した場合、関連する兆候を毎日観察することとする。
- 7.5.6 脳内埋植試験法は処置後に重度のストレスや痛みを伴う可能性があるため、試験動物をできる限り早期に除外するためのエンドポイントを試験に先立って設定しておき、重篤な臨床作用を認めた場合、動物愛護の観点から動物を安楽死処置する。安楽死動物のデータの採否は 3.6.5 項を参照する。

7.6 評価方法

- 7.6.1 3.7 項及び 3.8 項参照。脳内埋植に固有の注意点を以下に記載する。
- 7.6.2 浸漬固定でアーティファクトを生じる可能性がある場合、還流固定を用いる。
- 7.6.3 適切な組織学的染色、傷害の生化学的指標又はそれら両者を用いて、神経病理学的评价を実施する（表 3）。使用した特殊染色／傷害指標は、それら手法について記述された参考文献を明示する。評価項目には神経変性（変性ニューロン及び神経突起の切断）、グリオシス、アストロサイトーシス、ミクログリア活性化が含まれる。アストロサイト及びミクログリアに関しては、その形態学的反応の特徴を同定する。
- 7.6.4 試料周囲組織に加え、埋植部位近傍（～3mm、同側の脳半球）及びさらに離れた部位の評価が有用な場合がある。埋植部位近傍を評価する際は、炎症細胞／浸潤細胞、出血、壊死、グリオシス（灰白質及び白質）などを観察し、さらに離れた部位を評価する際は、これらに加えて他の非局所的影響も含める。

7.7 評価方法

3.9 項参照。ただし、一般状態観察結果も加味して埋植試料の評価を行う。

表 3 脳組織のバイオマーカー及び染色法の例

染色法及びバイオマーカー	細胞種及び細胞構成成分
ヘマトキシリン・エオジン	全ての中中枢神経系及びリンパ節
Fluoro-Jade	変性ニューロン
自家蛍光	神経変性
抗Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 抗体	アストロサイトマーカー

抗Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) 抗体	ミクログリアなどのマーカー
Luxol fast blue	ミエリン
Amino Cupric Silver Stain	変性ニューロン

注：特異的抗体は全ての動物種とは交差しない可能性がある。

8. 参考情報

8.1 試験法の選択

埋植試験法としては、ISO 10993-6:2016, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation があり、インプラントの原材料を試験する際には、ISO 規格に従うことで基本的には十分である。一方、Nakamura らの報告^{3,4)}にあるように、筋肉内埋植試験では炎症領域の幅が細胞毒性などとの相関性がよいことも事実であるため、組織学的評価のみならず、炎症領域の幅のような定量的指標を利用することが望ましい。また骨内埋植試験では、標準仕様書⁹⁾において新生骨形成におけるいくつかの形態計測パラメータが示されており、これを利用することで生体適合性評価の一助となる。

8.2 滅菌法

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

8.3 動物数

ISO 10993-6:2016 においては、肉眼観察用の動物と組織学的観察用の動物の区別について言及されていない。一方で、過去の国内試験法においては、短期筋肉内埋植試験で双方を別に設定するよう規定されてきた。本ガイドンスにおいては、筋肉内埋植試験法においても ISO 10993-6:2016 に調和させる目的で肉眼観察用と組織学的観察用の動物を兼ねることができるよう変更した。

8.4 陽性対照材料

陽性対照材料としては、天然ゴム製品の毒性原因物質の一つであるジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (ZDEC) を種々の濃度で含有させたポリウレタンシート/ロッドが代表的である。これは、ZDEC の含有量と、ウサギ筋肉内埋植試験における「炎症領域の幅」及び *in vitro* 細胞毒性試験との相関性を調べた結果をもとに設定されたものである⁷⁾。陰性対照材料（検定済み高密度ポリエチレンシート/ロッド）とともに、陽性対照材料も一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所（第1部細胞毒性試験 4.6項参照）から入手可能である。

また骨内埋植試験の場合は、純ニッケルを用いることができる。

8.5 埋植期間による組織像の変化

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

8.6 埋植周囲リンパ節の変化

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

8.7 組織反応について

「有意に強い組織反応」とは、単に統計学的手法を用いた判定のみを意味するものではなく、対照材料の観察結果と比較して、試験試料の炎症性あるいは組織傷害性が強く認められた場合や質的に異なる反応が生じる場合を指すと考える。ただし、組織形態計測を実施した場合は、対照材料と試験試料との微妙な差の判定根拠について苦慮することが想定され、判定に客観性を持たせる方法として統計学的手法を用いることも一つの対応策と思われる。なお、炎症とは、静的な反応ではなく、時間の経過とともに循環障害や浸潤細胞の種類と、

反応の強さが変化する動的な反応であるため、組織像の評価に際しては炎症反応の時間的経過を十分に考慮しておく必要がある。複数の観察期間を設けているのは、このような動的な反応の変化を検索するためであり、いずれかの埋植期間の情報が重要というわけではなく、全ての情報から総合的に組織反応を評価すべきである。

8.8 脳内埋植試験について

適用を検討する医療機器としては、脳の電極や水頭症のドレインとなるシャントなど、脳組織に埋植されるものが対象となる。脳血管に留置されるような血管内壁と接触する医療機器は、神経組織に直接ばく露されないため、脳内埋植試験は適用されない。

8.9 肉眼及び組織の代表例の写真について

試験報告書に記載すべき事項から肉眼及び組織の代表例の写真を除外した。その目的は ISO 10993-6:2016 に調和させることであり、写真の撮影、試験への使用及び試験報告書への掲載を妨げるものではない。

8.10 安楽死処置について

実験動物医学専門医 (qualified laboratory animal veterinarian) や選任獣医師 (attending veterinarian) が設置されている施設では、安楽死の要否などについてこれらの専門家に相談できる。なお、前者については、国際実験動物医学専門医協会 (IACLAM: International Association of Colleges of Laboratory Animal Medicine) のもとで認定される専門医制度があり、国内では日本実験動物医学専門医協会のもとに実験動物医学専門医制度がある。

9. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

- 1) 吸収分解性材料を試験する際の注意事項を追記した。
- 2) 脳内埋植試験法を追加した。
- 3) その他 ISO 10993-6:2016 で改訂された詳細な事項を反映した。

10. 引用文献

- 1) Maekawa, A., Ogiu, T., Onodera, H., Furuta, K., Matsuoka, C., Ohno, Y., Tanigawa, H., Salmo, G.S., Matsuyama, M., Hayashi, Y.: Malignant fibrous histiocytomas induced in rats by polymers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108, 364-365 (1984)
- 2) Tilney, N.: Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J. Anat.* 109, 369-383 (1971)
- 3) Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi, M., Ohsawa, N., Uchima, T.: Correlation among chemical constituents, cytotoxicities and tissue: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials* 11, 92-94 (1990)
- 4) Ikarashi, Y., Toyoda, K., Ohsawa, N., Uchima, T., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Takahashi, M., Nakamura, A.: Comparative studies by cell culture and

- implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 339-356 (1992)
- 5) TS T 0011:2008 骨組織の薄切標本の作製方法
- 6) Bouet, T., Toyoda, K., Ikarashi, Y., Uchima, T., Nakamura, A., Tsuchiya, T., Takahashi, M., Eloy, R.: Evaluation of biocompatibility, based on quantitative determination of the vascular response induced by material implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 1507-1521 (1991)
- 7) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T., Tanaka, N., Sasaki, T., Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in vivo* implantation tests. *J. Appl. Biomat.* 4, 153-156 (1993)
- 8) 菊池浩吉, 吉木敬編: 新病理学各論, pp. 109-113, 南山堂 (1992)
- 9) Stefanski, S.A., Elwell, M.R., Strongberg, P.C.: Spleen, lymph nodes, and thymus. *In: Pathology of the Fischer Rat.* Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., MacKenzie, W.F. (eds.) pp. 369-393, Acad. Press, San Diego (1990)
11. 参考文献
- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 74 Surgical Implants and Other Foreign Bodies. IARC, Lyon (1999)

第5部 刺激性試験

1. 適用範囲

本試験は、試験試料（最終製品又は原材料）の抽出液による、刺激性を評価するものである。ここでは、皮膚刺激性試験、皮内反応試験及び眼刺激試験の標準的な方法を記載した。刺激性試験の項目は、当該医療機器の臨床適用部位に応じて選択する。なお、ISO 10993-10には、口腔粘膜刺激試験や膣粘膜刺激試験などの記載もあることから、これらを利用してもよい。また試験試料の臨床適用方法あるいは性状により、動物への投与物質は必ずしも抽出液でなく、最終製品など、より適切なリスク評価ができるものを用いるべきである。近年、医療機器の抽出物の皮膚刺激性評価のための *in vitro* 皮膚刺激性試験の有用性が実証されたことから、本ガイドンスにも *in vitro* 皮膚刺激性試験法の概要を記載した。

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

2. 引用規格

- 2.1 ISO 10993-10:2010, Biological evaluation of medical devices - Part10: Tests for irritation and skin sensitization
- 2.2 ASTM Standard F 719-81(2012): Standard Practice for Testing Biomaterials in Rabbits for Primary Skin Irritation
- 2.3 ASTM Standard F 749-13: Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit
- 2.4 USP General Chapters: <88> Biological Reactivity Tests, *In vivo* - Intracutaneous Test

3. 皮膚刺激性試験

3.1 *in vitro* 皮膚刺激性試験（再構築ヒト表皮試験法）（6.1項参照）

3.1.1 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 *in vitro* 試験である。

3.1.2 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、正常ヒト由来表皮角化細胞からなる再構築ヒト表皮モデル（以下「RhEモデル」とする。）に添加して、細胞生存率を指標として、炎症カスケードの起因現象である細胞の損傷を測定することで、刺激性の有無を判定する。

3.1.3 試験液の調製

3.1.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局又は同等品）、植物油（綿実油又はゴマ油、

日局又は同等品)を用いる。

3.1.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

3.1.3.3 抽出条件

原則として、付録2の規定に従うものとする。

3.1.3.4 操作方法

抽出後、直ちに室温(25℃以下にならないよう)に冷却する。次いで、容器の内容液を別の乾燥した滅菌容器に集め、付録3に従い、25℃前後で保存し、これを試験液として24時間以内に試験を実施する。滅菌品に関しては一連の操作を無菌的に行うこと。

3.1.3.5 対照液の調製

陰性対照液は Phosphate Buffered Saline (PBS) とする。陽性対照液は生理食塩液で1%に調製したラウリル硫酸ナトリウム (SDS) とする。溶媒対照液は抽出溶媒単独(試験試料を加えない)で、試験液調製と同条件で操作を行ったものとする。陽性対照材料としては Y-4 が推奨される。Y-4 の抽出条件は 37℃若しくは 50℃で 72±2 時間抽出とする(6.4 項参照)。

3.1.4 試験法

3.1.4.1 三次元 RhE モデル

適切に評価された RhE モデルを使用する。1 試料ごとに 3 ウェル使用する(6.3 項参照)。

3.1.4.2 試験操作

RhE モデルを使用した試験法の概要を下記に示すが、各段階の操作の詳細は、使用する RhE モデルの手順書に従って行うこと。

- 1) RhE モデルは適切な培養条件下で、37℃の5%炭酸ガス培養器内にいれて、静置して前培養する。
- 2) 試験液、対照液、溶媒対照液をそれぞれ RhE モデルに添加する。
- 3) 37℃の5%炭酸ガス培養器内に静置して、一晚培養する。
- 4) PBS を用いて洗浄する。
- 5) MTT 溶液をウェルに添加し、37℃の5%炭酸ガス培養器内で約3時間浸漬させる。
- 6) RhE モデルを適切な量のイソプロパノールに室温で約2時間若しくは一晚(容器の周りをシールする)浸漬して、ブルーホルマザンを抽出する。
- 7) イソプロパノール抽出溶液を96ウェルプレートへ移して適切な OD を測定し(例: 図1, 6.5 項参照)、生存率(%)を算出する(6.6 項参照)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク	ブランク	ブランク	ブランク	ブランク	ブランク						
B	陰性対照1	陽性対照1-1	溶媒対照1-1	溶媒対照2-1	試験液1-1	試験液2-1						
C	陰性対照1	陽性対照1-1	溶媒対照1-1	溶媒対照2-1	試験液1-1	試験液2-1						
D	陰性対照2	陽性対照1-2	溶媒対照1-2	溶媒対照2-2	試験液1-2	試験液2-2						
E	陰性対照2	陽性対照1-2	溶媒対照1-2	溶媒対照2-2	試験液1-2	試験液2-2						
F	陰性対照3	陽性対照1-3	溶媒対照1-3	溶媒対照2-3	試験液1-3	試験液2-3						
G	陰性対照3	陽性対照1-3	溶媒対照1-3	溶媒対照2-3	試験液1-3	試験液2-3						
H												

図1 96ウェルプレートへの配置例

3.1.4.3 試験成立条件

下記3条件を全て満たした場合に試験成立とみなす。

- 1) 陰性対照の平均 OD 測定値の範囲は、使用する各 RhE モデルの手順書に記載されている範囲に従う。
- 2) 陰性対照液の生存率に対する陽性対照液平均生存率の範囲は、生存率が < 40% である。
- 3) 全ての対照液及び全ての試験液において、生存率の標準偏差 (N=3) SD が ≤ 20% である。

3.1.4.4 評価

陰性対照液に対する生存率が ≤ 50% の場合を刺激性、陰性対照に対する生存率が > 50% の場合を非刺激性と判定する。

3.1.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 対照液を特定する要素
(例：対照液名、入手先、製造番号など)
- 5) 試験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) 試験液の調製方法
(例：抽出方法など)
- 7) 使用した RhE モデル
- 8) 試験方法
- 9) 試験結果
- 10) 結果の評価と考察
- 11) 参考文献

3.2 *in vivo* 皮膚一次刺激性試験

3.2.1 目的

本試験は試験液中に、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 *in vivo* 試験である。

3.2.2 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、1 溶媒当たりウサギ3匹を用い、背部の無傷皮膚区画に塗布し、刺激性を観察する（6.2項参照）。なお、3匹の動物を用いた試験の反応が疑わしい場合は、さらに3匹を追加して試験を実施する。

3.2.3 試験液の調製

3.1.3項に従う。ただし、対照液の調製については、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。

3.2.4 試験法

3.2.4.1 試験動物

健康で体重が2 kg以上のウサギ計6匹（1群3匹、2溶媒）を使用する。週齢及び性は特に規定しないが、試験の評価が可能な皮膚を有する動物を用いる（6.7項参照）。使用前1週間以上、馴化する。

投与前までに背部の毛を刈り（又は剃り）、投与及び皮膚観察が容易な状態にする（6.8項参照）。

3.2.4.2 投与液量

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

3.2.4.3 投与経路及び投与期間

塗布による投与を1回行う。

3.2.4.4 投与部位

背部を上下、左右計4区画に分け試験液及び対照液をそれぞれ2区画に投与する（例：図2参照）。投与液量は1区画につき0.5 mLとし、これを1枚の不織布（リント布）など（2.5 cm角）にしみ込ませてテープで貼りつける。その上をポリエチレンフィルムなどで覆い、固定する。

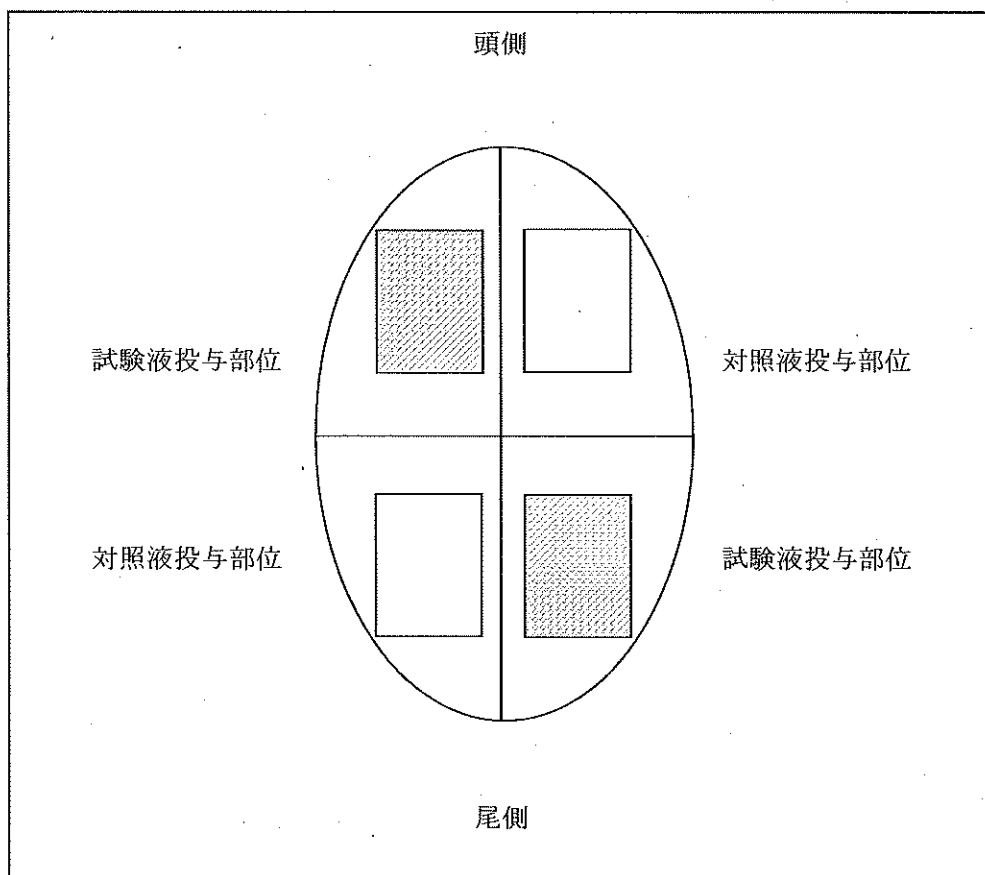


図2 皮膚一次刺激性試験 (例) ウサギ背部図

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

紅斑及び痂皮の形成	評点
紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑（認識下限レベル）	1
軽度な紅斑	2
中程度の紅斑	3
高度な紅斑（ビート赤）、紅斑の評点付けを妨げる痂皮の形成	4
	[最高点 4 点]
浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫（認識下限レベル）	1
軽度な浮腫（膨隆により縁が明確に識別可能なレベル）	2
中程度の浮腫（約 1 mm の膨隆）	3
高度な浮腫（1 mm 以上の膨隆とばく露範囲を超えた広がり）	4
	[最高点 4 点]
	[紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点 8 点]

投与部位に見られた他の有害作用も記録及び報告すること。

3.2.4.5 観察

投与直前に皮膚の状態を観察する。投与後 24 時間目に不織布を除去し、丁寧に塗布面を拭き取る（6.9 項参照）。不織布除去 1 ± 0.1 時間後、 24 ± 2 時間後、 48 ± 2 時間後及び 72 ± 2 時間後に皮膚の状態を観察し、表 1 に従って観察・記録する。不織布除去 72 時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて 14 日を超えない範囲で観察期間を延長する。

体重は、投与日及び観察終了日に測定し、記録する。

3.2.4.6 評価

観察結果より刺激性を評価する。例えば、個々の動物において試験液及び対照液ごとに、 24 ± 2 、 48 ± 2 及び 72 ± 2 時間の 2 投与部位の評点スコアを合計し、各合計を 6（3 時点 \times 2 試験液又は対照液投与部位）で除して、個別の平均一次刺激点数を求める。各試験液群及び対照液群の平均一次刺激点数を求めるため、各群 3 匹の動物の点数を合計し、3 で除す。試験液群の平均一次刺激点数から対照液群の平均一次刺激点数を差し引いて一次刺激指数 (PII) を求める。一次刺激指数を表 2 に規定する一次刺激指数カテゴリと比較し、適切な反応カテゴリを報告書に記載する。

表2 一次刺激指数カテゴリ

平均点数	反応カテゴリ
0~0.4	無視できる程度
0.5~1.9	多少
2.0~4.9	中程度
5.0~8.0	激しい

3.2.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など)
- 4) 対照液を特定する要素
(例：対照液名、入手先、製造番号など)
- 5) 試験液の調製方法
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別、個別体重
- 7) 試験方法
- 8) 試験結果 (6.10 参照)
表：個々の動物の皮膚反応結果 (評点スコア)
- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

4. 皮内反応試験

4.1 目的

本試験は試験液を皮内投与し、刺激性の有無を確認するための *in vivo* 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 ± 2 時間まで観察して、刺激性の有無を評価する (6.2 項参照)。なお、3匹の動物を用いた試験の反応が疑わしい場合は、さらに3匹を追加して試験を実施する。

4.3 試験液の調製

3.1.3 項に従う。ただし、対照液の調製については、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。

4.4 試験法

4.4.1 試験動物

栄養状態のよい健康なで体重が2 kg以上のウサギ3匹を使用する。週齢及び性は特に規定しないが、試験の評価が可能な皮膚を有する動物を用いる(6.7項参照)。使用前1週間以上、馴化する。

投与前までに背部の毛を刈り(又は剃り)、投与及び皮膚観察が容易な状態にする(6.8項参照)。

4.4.2 投与液量

試験液及び対照液の投与液量は、原則として1ヶ所当たり0.2 mLとする。

4.4.3 投与経路及び投与期間

背部皮内投与を1回行う。

4.4.4 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3参照)。

4.4.5 観察

全例について投与直前に皮膚の状態を観察する。全例について投与直後並びに投与後約 24 ± 2 、 48 ± 2 及び 72 ± 2 時間に、投与部位の皮内反応状態を、表2に従って観察・記録する。体重は、投与日及び観察終了日に測定し、記録する。

備考:オイルの皮内注射は炎症を誘発することがある。

4.4.6 評価

観察結果より刺激性を評価する。例えば、個々の動物において試験液及び対照液ごとに、 24 ± 2 、 48 ± 2 及び 72 ± 2 時間の5投与部位の評点スコアを合計し、各合計を15(3時点x5試験液又は対照液投与部位)で除して、個別動物の点数を求める。各試験液群及び対照液群の平均点を求めるため、各群3匹の動物の点数を合計し、3で除す。試験液の最終評価点は、試験液群の平均評価点から対照液群の平均評価点を差し引いて求める。試験液の最終評価点が1.0以下であれば試験の要求事項が満たされた(刺激性陰性)とする。

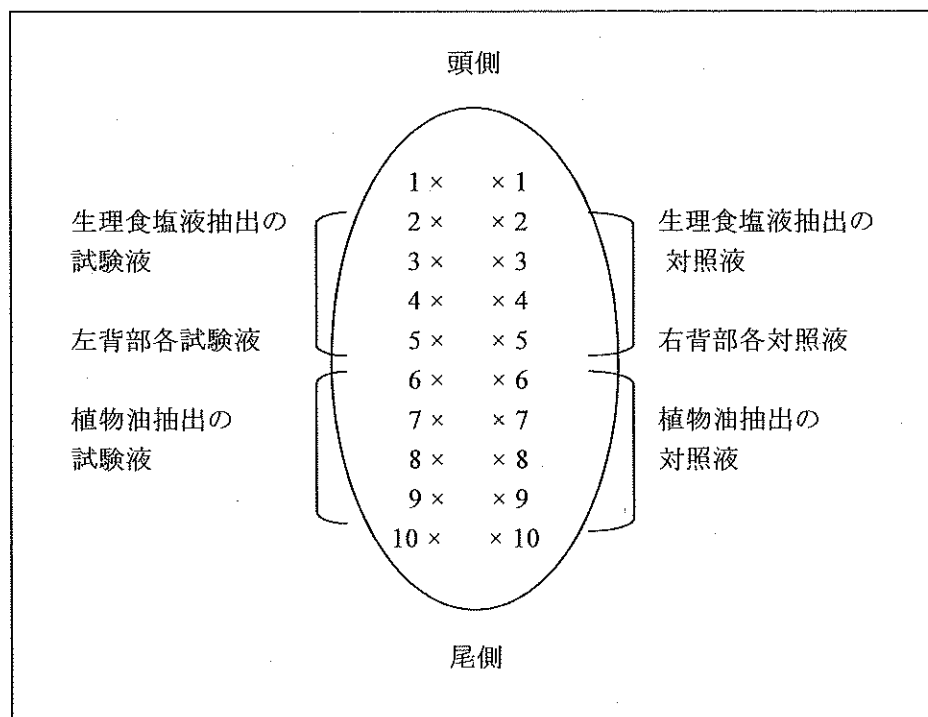


図3 皮内反応試験（例）投与部位

4.5 試験報告書

3.2.5 項参照すること。

5. 眼刺激試験

5.1 目的

本試験は、ウサギの眼に試験液を点眼することによって眼組織に及ぼす影響を評価するためのものである。

5.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液及び植物油を用いて抽出した試験液を、それぞれ3匹のウサギに点眼し、前眼部を点眼後 72 ± 2 時間まで観察して、眼組織への影響を評価する（6.2 項参照）。点眼 72 ± 2 時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて21日を超えない範囲で観察期間を延長する（6.11, 6.12 項参照）。

5.3 試験液の調製

3.1.3 項に従う。ただし、対照液の調製については、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。

5.4 試験法

5.4.1 試験動物

- 1) 健康で、前眼部に異常がなく体重が2~3 kgのウサギ計6匹（1群3匹、2溶媒）を使用する。週齢及び性は特に規定しないが、試験の評価が可能な眼を有する動物を用いる。
- 2) 使用前1週間以上、馴化する。角膜をスリットランプで観察する場合、瞬膜を切除した方が容易に観察できるため、瞬膜の切除は適宜とする。切除する場合は、試験に使用する2週間以上前に行う。
- 3) 投与前にウサギの前眼部を観察し、結膜充血、角膜混濁などの異常がないことを確認する。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などを用いて観察し、染色のないことを確認する（6.13項参照）。

5.4.2 試験方法

- 1) ウサギの片目の下眼瞼を引っ張り、袋状にし、その中に生理食塩液抽出の試験液を0.1 mL点眼し、眼を閉じて約30秒間そのままの状態にする。
- 2) 他眼には、生理食塩液抽出の対照液を同様に点眼する。
- 3) 1) から2) の操作を3匹のウサギに実施する。
- 4) 同様に、植物油抽出の試験液を残り3匹のウサギの片目に点眼し、他眼には、植物油抽出の対照液を点眼する。
- 5) 点眼 1 ± 0.1 、 24 ± 2 、 48 ± 2 及び 72 ± 2 時間後に、スリットランプを用いて両眼を観察し、ISO 10993-10の眼病変の評点付けシステム（付表1）又は McDonald-Shadduckの評価基準（付表2）に従い評価し、記録する。点眼 72 ± 2 時間後に持続性の病変が認められた場合、病変が可逆性か非可逆性かを評価するために、必要に応じて21日を超えない範囲で観察期間を延長する（6.11, 6.12項参照）。

5.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 対照液を用いた場合は、それを特定する要素
（例：対照液名、入手先、製造番号など）
- 5) 試験液の調製方法
- 6) 試験動物の種と系統、数、週齢、性別、個別体重
- 7) 試験方法
- 8) 試験結果（6.10参照）

表：個々の動物の眼反応結果（評点のスコア）

個々の動物の結果は、表3の様な表形式にした全データを添付することが望ましい。

- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

6. 参考情報

6.1 刺激性試験実施の基本的な考え方

医療機器の刺激性評価を行う場合、まずは被験物質の毒性情報などを収集し、試験実施の必要性について検討する。刺激性を判定できる十分な情報がなく、試験以外の方法で刺激性の有無を評価できない場合は、動物福祉の観点から、まず *in vitro* 試験の実施を考える方が望ましい。*in vitro* 試験の実施や評価が難しい場合、初めてウサギなどの動物での試験実施を考える。

ISO 10993-10 では 2019 年現在、刺激性試験と感作性試験を分離し、刺激性試験全般を ISO 10993-23 として改訂する作業が進められている。さらに皮膚刺激性試験では、*in vitro* 皮膚刺激性試験のラウンドロビン試験が ISO/TC 194/WG 8 主導で実施され、その有用性が実証されたことから、新たな評価法として改訂版への採用に向けた検討がなされている。

ただし、現時点では RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験では刺激性の有無のみが判定され、ウサギを用いた *in vivo* 試験のように刺激性の強弱の判定まではできない。一方、5つの刺激性物質（乳酸、ヘプタン酸、Y-4、Genapol X-80、SDS）の刺激性能を *in vivo* 試験であるウサギを用いた皮膚一次刺激性試験及び皮内反応試験、ヒトパッチテスト及び RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験で検証された報告があり、各試験とも同一被験物質濃度条件で実施された結果、RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験が他の試験法よりも低濃度の刺激性物質も陽性と判定できることが示されている²⁾。この結果から、RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験で陰性と判定された検体については、動物試験を新たに実施する必要はないと考えられる。一方、RhE モデルを用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験で陽性と判定された検体については、*in vivo* 試験を実施し、刺激性の強弱の情報を入手することも有用と考えられる。

6.2 試験液の調製

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

被験物質細切時の破片などが不溶性異物として抽出液に含まれる場合がある。このような抽出液の性状観察（色調変化や微粒子の有無）は投与前の確認として重要である。不溶性異物の物理的刺激により皮内に炎症を生じる可能性が予期される場合、不溶性異物ができる限り入り込まないような調製方法が推奨される。

6.3 RhE モデル

OECD No.439 で化学物質の刺激性評価について検証された RhE モデルとして、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、SkinEthic™ RHE、LabCyte EPI-MODEL 24 SIT、EpiSkin™ (SM)、epiCS® 及び Skin+® が記載されている。このうち、EpiDerm™ SIT と SkinEthic™ RHE は ISO TC194 WG8 で行われたラウンドロビンテストによって、医療機器の抽出液の刺激性評価への有用性が示されている。その他の RhE モデルについては、医療機器の抽出液の刺激性評価について

の適切な検証がなされた後に使用することを推奨する。

6.4 陽性対照材料

陽性対照材料としては、Y-4 (Genapol X-080 を 10 パーツ含有する PVC ペレット) がある。Y-4 の刺激性試験用陽性対照材料としての性能は、海外研究施設と共同で実施した予備検討において実証され、その再現性・頑健性も ISO /TC 194 WG 8 で行われたラウンドロビン試験により検証されている。一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (第 1 部細胞毒性試験 4.6 項参照) から入手可能である。

当該ラウンドロビン試験において、Y-4 の極性及び非極性抽出液はほとんどの RhE モデルにおいて明瞭な陽性反応を呈した。ただし、その他のモデルと比較してバリアー機能が高いと考えられる EpiDermTMSIT (EPI-200) を用いた試験では、付録に提示した抽出条件 (0.2 g/mL, 37°C, 72 時間) により非極性溶媒抽出液を調製すると生存率が 40% を越える施設が散見された。この状況に鑑みて、Y-4 の非極性溶媒抽出液を用いた試験を行う場合は各 RhE モデルの特性を考慮して、各試験施設で適切な条件を設定し、その刺激性を確認した上で試験に供することを推奨する。

6.5 OD 測定例

イソプロパノール抽出液 200 μ l を 96 ウェルプレートの各ウェルに入れる。1 検体につき測定するウェル数は、各 RhE モデルのマニュアルに従うこと。ブランクとしてイソプロパノールを 200 μ l 入れる (配置例: 図 1 参照)。570 nm でホルマザンの OD を測定する。必要に応じて波長基準を測定して差し引く場合もある。

6.6 生存率の算出法例

ブランク値として 6 ウェルのブランクの平均値を求める。検体の吸光度値からブランク値を引いたものを各検体の測定値とする。陰性対照の生存率は 3 ウェルの陰性対照の測定値の合計を 3 で除し、陰性対照の測定値平均を求め、これを生存率 100% とする。各検体の生存率は (各検体の測定値平均* / 陰性対照の測定値平均) \times 100 の式で算出できる。* N=3 の試験から算出した平均値

6.7 動物種

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

6.8 動物の毛刈り

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

6.9 試験液の接触時間

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

6.10 動物の投与日及び観察終了日の個別体重及び試験液投与部位の写真

試験報告書に記載すべき事項から投与日及び観察終了日の個別体重や試験液投与部位の写真を除外した。その目的はISO-10993-10:2010に調和させることであり、投与日及び観察終了日の個別体重の測定、試験液投与部位の写真撮影及び試験報告書への掲載を妨げるものではない。

6.11 眼刺激の評価基準

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

6.12 試験動物の福祉

ISO 10993-10には、非常に強い眼の損傷、出血性又は化膿性の分泌物、あるいは著しい角膜潰瘍が見られる動物は、直ちに安楽死させるように記載されている。さらに、点眼後24時間以内に回復の徴候が見られない対光反射消失又は角膜混濁、あるいは点眼後48時間以内に回復の徴候の見られない結膜炎が見られる動物も安楽死させるよう記載されている。眼刺激試験においては、必要に応じて局所麻酔及び鎮痛剤を使用してもよい。

6.13 フルオレセインナトリウム溶液の点眼

フルオレセインナトリウム（日局）溶液をウサギ眼に直接点眼し、染色をすることは避けることが望ましい。1～2%フルオレセインナトリウム溶液を涙液の分泌の少ないウサギ眼に直接点眼するとフルオレセインナトリウムの蛍光が強く、染色された組織を識別することが困難である。フルオレセインナトリウム溶液でウサギ眼を染色する場合、まずウサギ眼に生理食塩液を点眼しフルオレセインナトリウム溶液を眼科用の硝子棒に採り、上又は下眼瞼を引っ張り投与する。両眼瞼を指で軽く閉じ、角膜などを染色する。直接フルオレセインナトリウム溶液を点眼し染色する場合は2%フルオレセインナトリウム溶液を生理食塩液で5～

10 倍に希釈使用するとよい。なお、この場合、希釈したフルオレセインナトリウム溶液は防腐性を失うため、調製後長期間保存しないこと。

フルオレセインナトリウム溶液又は試験紙など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、記録を残すこと。

6.14 コンタクトレンズの眼装用試験

コンタクトレンズの生物学的安全性試験として、ウサギを用いる眼装用試験が要求される。眼装用試験は、通常“ISO 9394:2012, Ophthalmic optics - Contact lenses and contact lens care products - Determination of biocompatibility by ocular study with rabbit eyes”に従って実施され、眼組織への影響を、肉眼的及び病理組織学的観察結果をもとに評価されることから、対象試験試料がコンタクトレンズで、眼装用試験が実施されている場合には、抽出液による眼刺激試験を実施する必要はない。

7. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

- 1) 3.2.4.6 評価及び 4.4.6 評価について参考情報を参照となっていたが、現在ほぼ ISO 10993-10 の判定方法に従って評価されていることから、具体的な判定方法を記載し、現状と合わせた。
- 2) 再構築ヒト皮膚モデルを使用した医療機器の *in vitro* 皮膚刺激性試験を採用した。
- 3) *in vivo* 皮膚一次刺激性試験、皮内反応試験及び眼刺激試験で使用するウサギの体重を規定した。
- 4) *in vivo* 皮膚一次刺激性試験において、ISO 10993-10 では健常皮膚だけ試験するため、擦過傷処理部分を削除した。
- 5) 試験報告書に記載すべき事項から投与日及び観察終了日の個別体重や試験液投与部位の写真を除外した。
- 6) 参考情報に、刺激性試験実施の基本的な考え方を追加した。
- 7) 全体の構成について整合をとった。

8. 引用文献

- 1) De Jong W.H, Hoffmann S, Lee M, Kandárovád H, Pellevoisine C, Haishima Y, Rollins B, Zdawczyk A, Willoughby J, Bachelorj M, Schatzk T, Skoog S, Parker S, Sawyer A, Pescio P, Fant K, Kim K-M, Kwon J.S, Gehrke H, Hofma-Hutherr H, Meloni M, Julius C, Briotet D, Letasiova S, Kato R, Miyajima A, Fonteyne L. De L, Videau C, Tornier C, Turley A, Christiano N, Coleman K.P.: Toxicology In Vitro 50, 439-449 (2018)
- 2) Kabdarova H, Bendovoa H, Letasiova S, Coleman K.P, De Jong W.H.: Toxicology In Vitro 50, 433-438 (2018)

9. 参考文献

- 1) OECD No.439: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method 439 (2019)
- 2) Nomura Y, Lee M, Fukui C, Watanabe K, Olsen D, Turley A, Morishita Y, Kawakami T, Yuba T, Fujimaki H, Inoue K, Yoshida M, Ogawa K, Haishima Y.: J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106(8), 2807-2814 (2018)
- 3) Francis, N., Marzulli, H.L. edited: Dermatotoxicology, 4th ed., Eye irritation (Robert B. Hackett, T. O. McDonald), pp. 749-815, Hemisphere Publishing (1991)
- 4) McDonald, T.O., Shaddock, J.A.: Dermatotoxicology and Pharmacology, pp. 139, John Wiley & Sons, New York (1977)

表3 眼の刺激性反応結果の記載例

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

付表1 ISO 10993-10の眼病変の評点付けシステム

I 角膜	
不透明度：混濁の程度（最も混濁した領域を読み取る）	
不透明度なし	0
虹彩を明視できる程度の散在からび慢性の不透明化	1*
容易に識別できる半透明、虹彩の細部がわずかにぼやけて見える	2*
真珠様、虹彩の細部が観察できないが、瞳孔の大きさはかろうじて識別できる	3*
不透明、虹彩が透視できない	4*
角膜損傷域	
1/4 未満、0ではない	0
1/4 以上、1/2 未満	1
1/2 以上、3/4 未満	2
3/4 以上、全域に及ぶまで	3
II 虹彩	
正常	0
皺襞形成亢進、充血、腫脹、角膜周囲の充血（いずれか1つ、あるいは全て、若しくは組合せ）が見られるが、対光反射は認められる（緩徐反応陽性）	1*
対光反射消失、出血、広範囲の破壊（いずれか1つ、あるいは全て）が見られる	2*
III 結膜	
A 発赤（角膜及び虹彩を除く眼瞼、眼球結膜）	
正常	0
充血亢進	1
広範囲かつ深紅色となり、血管の識別困難	2*
全域の深紅色化	3*
B 結膜浮腫	
正常	0
腫脹亢進（瞬膜を含む）	1
眼瞼の部分的な外反を伴う明らかな腫脹	2*
1/2 程度の眼瞼閉鎖を伴う腫脹	3*
1/2 以上の眼瞼閉鎖を伴う腫脹	4*
C 分泌物	
正常	0
常量以上の分泌物（正常な動物の内眦に見られる少量は含まない）	1
眼瞼及び眼瞼に接する被毛を湿潤	2
眼瞼及び眼の周囲を相当範囲湿潤	3

*：刺激性陽性反応

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

角膜

- 0=正常。スリットランプでは、上皮及び内皮表面は明るいグレイに、実質は大理石様のグレイに見える。
- 1=わずかに透明性を失う。実質の前 1/2 程度が損傷している。下部構造は、わずかな曇りがあるが、散乱光ではっきりと見える。
- 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 2 mm 又はそれ以上にあらゆる方向から角膜内に侵入する。

角膜染色

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

前房

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

虹彩

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

結膜充血

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

結膜浮腫

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

分泌物

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

第6部 全身毒性試験

1. 適用範囲

本ガイダンスは、医療機器又は原材料の全身毒性を評価するためのものである。実施に当たっては動物福祉への配慮が必要である。試験液の刺激性、腐食性が強いことが推定され、投与により試験動物に著しい苦痛を与える可能性が考えられる場合などには、その旨を報告し、試験条件の変更あるいは全身毒性試験に代わる方法がないかを検討すべきである。また著しい苦痛に耐えている兆候が試験動物に確認された場合、直ちに安楽死を検討する必要がある。

2. 引用規格

ISO 10993-11:2017, Biological evaluation of medical devices – Part 11: Tests for systemic toxicity

3. 用語及び定義

引用規格に記載されている以下の定義を用いる。

3.1 急性全身毒性

試験検体の単回、又は継続的ばく露後 24 時間以内に生じる毒性作用。

3.2 亜急性全身毒性

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

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

3.3 亜慢性全身毒性

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

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

3.4 慢性全身毒性

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

注：慢性全身毒性試験は、通常、6～12 ヶ月間の期間で実施される。

4. 急性全身毒性試験

4.1 目的

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

4.2 試験の要約

本ガイダンスに示す試験法は、基本的に引用規格に基づくものである。試験試料から生理食塩液又は植物油を用いて抽出した試験液を、1群5匹のマウスに対し、それぞれ静脈内投与（生理食塩液抽出液）又は腹腔内投与（植物油抽出液）する。投与72時間経過後まで観察し（6.2項参照）、対照液投与群と比較して、急性全身毒性の有無を評価する。本試験法は、米国薬局方などで医薬品容器の毒性試験として古くから用いられてきた、いわゆる pharmacopoeia-type の試験である。

4.3 試験液の調製

4.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局又は同等品）、植物油（綿実油、ゴマ油など、日局又は同等品）を用いる。対象となる医療機器の臨床適用条件がこれらの溶媒の性質と大きく異なるなど、リスク評価のためにより適切な溶媒を選定する必要がある場合には ISO 10993-12 を参考にするとよい。

4.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録の1項又は ISO 10993-12 の規定に従うものとする。

4.3.3 抽出条件

原則として、付録の2項又は ISO 10993-12 の規定に従うものとする。

4.3.4 操作方法

抽出後、直ちに室温（25℃前後を下回らないよう）まで冷却し、振とうする。ISO 10993-12 に従い、抽出中に攪拌又は循環を実施した場合には、抽出後の振とう操作は行わなくてもよい。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、25℃前後で保存し、24時間以内に試験に用いる。

4.3.5 対照液の調製

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

4.4 試験法

4.4.1 試験動物

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

4.4.2 投与液量

試験液の投与量は、原則として、体重1kg当たり50mLとする（6.3項参照）。

4.4.3 投与経路

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

4.4.4 観察及び測定項目

一般状態観察：全例について投与直後、4時間後、その後は投与から24時間、48時間、72時間経過後に行う。一般状態は、引用規格のAnnex Cの指標などを参考に観察し記録する。死亡例が認められた場合、直ちに剖検する。毒性兆候が発現した場合に、この消長を確かめるため観察期間を延長したり、観察頻度を増やすことが推奨される。

体重測定：全例について投与前、投与から24時間、同48時間、同72時間経過後に測定する（6.4項参照）。

病理解剖：観察期間終了後、全例について、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臓器を肉眼的に観察する。

血液検査・尿検査・病理組織学的検査：血液学並びに血液生化学検査、病理組織学的検査は臓器・組織における毒性作用の内容、強さを精査するために実施される（6.6項参照）。病理解剖によって異常所見が認められた場合には、これらの検査の実施を考慮するとよい。また尿検査は、影響が予測される場合に実施を考慮するとよい（表2参照）。

4.4.5 判定方法

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

試験液投与群の動物が2匹以上死亡した場合、あるいは2匹以上の動物で痙攣や衰弱など著しい毒性症状を示した場合や、体重減少が認められ、最終体重が投与時体重の10%を超える減少動物が3匹以上の場合には急性全身毒性ありと判定する。

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

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

4.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

1) 試験実施機関及び試験責任者

- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料（最終製品又は原材料）を特定する要素
（例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、材料、滅菌方法、形状、物理学的特性など）
- 4) 用いた媒体（抽出溶媒）など、試験液の調製方法
- 5) 試験に用いた動物
- 6) 試験条件
- 7) 試験結果
表：一般状態、死亡率（必要に応じて）、体重集計、病理組織学的検査集計
写真：病理解剖学的検査（毒性学上問題と考えられる所見が認められた場合のみ）
- 8) 結果の評価と考察
- 9) 参考文献

5. 反復投与による全身毒性試験（亜急性・亜慢性・慢性全身毒性試験）

5.1 目的

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

5.2 試験の要約

試験試料から生理食塩液を用いて抽出した試験液を、雌雄のラットの静脈内に 14 日間（亜慢性全身毒性試験の場合は 14～28 日間、慢性毒性試験の場合はそれ以上の期間）反復投与し、対照液投与群との間で毒性を比較して評価を行う。1 群の動物数は亜急性全身毒性試験の場合は雌雄各 5 匹とし、亜慢性、慢性全身毒性試験の場合は試験期間中の動物の死亡の可能性などを考慮して動物数を増やす（表 1 参照）。技術的に可能であり、想定される医療機器の適用経路としても適切であるならば、埋植試験又は血液適合性試験と一体化させてもよい（6.5 項参照）。また医療機器として臨床で用いられる期間・形態に合わせた投与期間及び評価期間が求められるが、その必要性については、実施した全身毒性試験結果及び試験試料の構成材料・成分などに関する既知の成績などを検証し、科学的に判断すべきである。

5.3 試験液の調製

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

5.4 試験法

5.4.1 試験動物

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

表1 1群当たりの最小動物数（推奨）

	げっ歯類	非げっ歯類
急性全身毒性試験 ^a	5	3
亜急性全身毒性試験	10（雌雄各5） ^a	6（雌雄各3） ^a
亜慢性全身毒性試験	20（雌雄各10） ^a	8（雌雄各4） ^a
慢性全身毒性試験	30（雌雄各15） ^{b,c}	^c

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

5.4.2 投与液量

ラット静脈内反復投与による試験の場合、試験液の投与液量は、原則として、試験動物の体重1kg当たり20mLとする。他の動物及び他の投与経路を選択する場合は、引用規格のAnnex Bを参考にする。この場合、投与液量は、想定される医療機器によるばく露量から十分に安全率を見込んだものである必要がある（6.7項参照）。

5.4.3 投与経路及び投与期間

静脈内投与が汎用されるが、想定される医療機器の適用経路を勘案して決定することが望ましい。標準的投与期間は、亜急性全身毒性試験では3.2項に、亜慢性全身毒性試験では3.3項に、慢性全身毒性試験では3.4項にそれぞれ従うものとする（6.8項参照）。

5.4.4 観察及び測定項目

表2と、引用規格のAnnex C、D及びEなどを参考に設定する。尿検査及び眼科的検査は定型的に行う必要はないが、他の検査結果や文献情報などから毒性が示唆される場合には実施することが望ましい。

表2 全身毒性試験の観察項目

評価項目	急性全身毒性	亜急性全身毒性／ 亜慢性全身毒性	慢性全身毒性 ^a
------	--------	---------------------	---------------------

体重変化	要	要	要
一般症状観察	要	要	要
血液検査・尿検査	b	a, b	要
病理解剖学的検査	要	要	要
臓器重量	b	要	要
病理組織学的検査	b	a, b, c	要, c

a 慢性全身毒性試験は、通常、亜慢性全身毒性試験の期間延長であり、その期間は臨床ばく露期間を根拠に設定する。評価項目はできる限り共通化する。測定を行う目的のためにサテライト群を設けることが必要となって、一群当たりの動物数が増えることもあり得る。

b 臨床症状が認められた場合や、当該試験より長期の試験が予定されていない場合には、ここに挙げた項目の評価も考慮するとよい。推奨される測定項目は、引用規格 Annex D、E 及び F に示されている。

c 試験液を投与する群を複数設定した試験の場合、全臓器に関する病理組織学的検査は、まず対照群と最高用量群について実施し、より低い投与量群に対しては肺及び影響が認められた臓器についてのみの実施でもよい。

5.5 試験報告書

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

6. 参考情報

6.1 動物福祉

ISO 10993-2 及び動物福祉に関する国内規制を参照し、試験の開始から実験の終了まで動物福祉に配慮した全身毒性試験の実施が求められる。試験液の pH、浸透圧などの物理化学的性状は試験計画時に十分に考慮すべき要因である。試験液の刺激性、腐食性が強く、投与にあたり試験動物に著しい苦痛を与える可能性が考えられる場合などには、その試験液を用いて全身毒性試験を実施してはならない。6.9 項に示す試験液調製法の工夫や、ICCVAM や ECVAM による動物実験代替法（細胞毒性試験）の成績から全身毒性を評価する。

6.2 急性全身毒性試験の観察期間

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

6.3 急性全身毒性試験の投与液量及び投与速度

急性全身毒性試験の投与液量は、十分な実績を持つ米国薬局方¹⁾及び ASTM Standard F 750-87²⁾に採用されている量を標準とした。毒性検出の目的から判断すると、投与液量を大きくすることが望ましいが、一時的な循環血液量の増大と

血液希釈による試験動物への影響や動物福祉の観点から、十分に考慮すべき試験条件の一つである³⁾。原則として、試験動物の体重1 kg当たり試験液、対照液とも、マウスの静脈内及び腹腔内投与にあつては50 mL、ラットの場合は、静脈内投与40 mL、腹腔内投与では20 mLとする（引用規格 Annex B 参照）が、試験試料の臨床適用形態などにより、十分な安全係数を確保した投与液量を一回で投与する事が不可能な場合には、24時間を超えない期間で分割して投与してもよい。投与経路や投与液量、投与の間隔を変更する場合、その科学的根拠を示すことが必要である。また急性全身毒性試験の投与速度は特に静脈内投与において試験成績に影響を与える因子の一つである。引用規格 4.8.2 項に従い、静脈内投与に当たっては、投与速度は1分間につき2 mLを超えないものとする。なお、引用規格 Annex B に従い、投与速度は1分間につき1 mLを超えないことが望ましく、投与時には投与速度が速すぎることによる影響が表れないよう十分に注意して投与を行う。

6.4 急性全身毒性の評価について

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

6.5 埋植試験の利用

「5. 反復投与による全身毒性試験（亜急性・亜慢性・慢性全身毒性試験）」には試験液の投与による亜急性全身毒性試験の方法を示したが、適当な動物（ラット以外の試験動物でもよい）に試験試料の埋植が可能な場合で、かつ、本ガイダンスに挙げた評価項目が適切に評価された3.2~3.4 項記載の期間の埋植試験の結果を亜急性/亜慢性/慢性全身毒性試験の結果として用いることができる。吸収性の試験試料による亜急性、亜慢性、慢性全身毒性を埋植によって評価する場合で、極めて速やかな吸収が想定される場合には、埋植のための手術による局所の反応が終息し、試験試料による生体への影響が評価可能となった段階で速やかに剖検を行い、評価を実施する。試験試料全量が吸収されると想定される期間と、投与期間の関係については根拠を示して考察する必要がある。

6.6 急性全身毒性試験の試験動物及び代替

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

6.7 反復投与における投与液量

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

6.8 投与期間及び観察期間

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

6.9 試験液の調製

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

被験物質細切時の破片などが不溶性異物として抽出液に含まれる場合がある。このような抽出液の性状観察（色調変化や微粒子の有無）は投与前の確認として重要である。全身毒性試験の投与経路が静脈内の場合には、不溶性異物ができる限り入り込まないような調製方法が推奨される。一方、ナノマテリアルの含まれる医療機器の場合には、抽出液の濾過は避けた方がよい(ISO/TR 10993-22 参照)。

6.10 血液適合性評価との併用試験

血管内に留置する医療機器の全身毒性試験では、臨床適用部位に被験物質を留置して全身毒性及び血液適合性評価を行うことがある。例えば冠動脈ステントの評価では、ブタを実験動物として用い、被験物質を冠動脈に留置して、亜急性期以降の全身毒性評価を実施すると同時に、末梢臓器の病理組織学的検査で血栓症リスクを確認し血液適合性評価を行うことが可能となる。

6.11 ISO 10993-11:2017 に追加された参考情報

6.11.1 段階的病理組織学的検査

全身毒性試験では全身臓器を網羅的に病理組織学的検査して、総合的な毒性評価を行うのが基本である。ISO 10993-11:2017 Annex F (参考情報)には全身臓器を機能ごとに12に分類し、その代表臓器に異常があった場合にその所属の組織や臓器を評価する段階的な病理組織学的検査の提案がなされている。ただし、この方法は原材料や滅菌条件など軽微変更が実施された際のようにおおむね安全性の確認できている医療機器の全身毒性を再評価する場合など、限定的に活用すべき方法と考えられる。

6.11.2 二重投与経路による亜急性／亜慢性毒性試験

4項の急性全身毒性試験に示したように、極性と非極性の2種類の溶媒で抽出液を調製した場合、それぞれ異なる動物に投与して行う評価が一般的である。本ガイドンスでは反復投与全身毒性試験を、2種類の溶媒で抽出する必要性を求め

ていないが、ISO 10993-11:2017のAnnex H（参考情報）では同一動物に極性溶媒は静脈内投与を非極性溶媒は腹腔内投与を行う試験法が新しく追加された。被験物質からの極性／非極性抽出化学成分の複合的評価が可能になるなど二重投与のメリットを勘案してISO/TC 194/WG 7の賛成が得られたが、現状は一部の試験施設に限られた実施に留まっている。初めて実施する施設は、評価法を確立し基礎データを取得の上、評価を行うことが肝要である。

7. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

ISO 10993-11:2017との調和を考慮し、主として以下の改正を行った。

- 1) 急性毒性から慢性毒性までの全身毒性試験実施にあたり、動物福祉などの配慮事項を示した。
- 2) 慢性全身毒性試験に用いる推奨動物数を改訂した。
- 3) 亜慢性全身毒性試験における観察・検査項目を改訂した。
- 4) ISO 10993-11:2017に追加された参考情報を追記した。

以上により、全身毒性試験の実施指針及び参考情報が最新化され、指針が明確になったと考えられる。

8. 引用文献

- 1) USP General Chapters: <88> Biological Reactivity Tests, *In vivo* - Systemic Injection Test
- 2) ASTM Standard F 750-87 (Reapproved 2012): Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the Mouse
- 3) Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch C.: A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15-23(2001)
- 4) Office of Laboratory Animal Welfare, National Institutes of Health: Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook 2nd Edition, pp. 103 (2002)
- 5) ISO 10993-2: 2006, Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements
- 6) Derelanko, M.J., Hollinger, M.A.: *CRC Handbook of Toxicology*. CRC Press, New York, pp. 78 (1995)

第7部 発熱性物質試験

1. 適用範囲

本試験の目的は、医療機器又は原材料中に存在する発熱性物質（エンドトキシン及び非エンドトキシン性発熱性物質）の有無を調べることにある（5.1、5.2項参照）。ただし、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸塩などの天然由来材料から構成される医療機器の場合には、材料に由来するエンドトキシン汚染の可能性があることから、発熱性物質試験の一環としてエンドトキシン試験も実施して、エンドトキシン量を測定することが望ましい。

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

2. 引用規格

- 2.1 第十七改正日本薬局方 一般試験法 4.04 発熱性物質試験法
- 2.2 第十七改正日本薬局方 一般試験法 4.01 エンドトキシン試験法
- 2.3 JIS K 8008:1992 4.3 エンドトキシン試験
- 2.4 ISO 10993-11:2017, Biological evaluation of medical devices – Part 11: Tests for systemic toxicity

3. 発熱性物質試験

3.1 目的

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

3.2 試験の要約

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

3.3 試験液の調製

3.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局）を用いる。

3.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

3.3.3 抽出条件

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

3.3.4 試験液の取扱い

抽出後、直ちに室温（25℃以下にならないよう）に冷却する。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、付録3に従い、25℃前後で保存し、これを試験液として24時間以内に発熱性物質試験を実施する。なお、試験を実施する直前に、試験液を超音波処理することが望ましい（5.5項参照）。

3.4 発熱性物質試験法（5.6項参照）

3.3で調製した試験液を用いて、第十七改正日本薬局方・発熱性物質試験法に準拠して、試験を実施する（5.1、5.7項参照）。

3.4.1 試験動物（5.8項参照）

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

3.4.2 装置及び器具（5.9項参照）

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

3.4.3 投与液量（5.10項参照）

原則として、試験動物体重1 kg当たり試験液10 mLを投与する。

3.4.4 試験方法（5.11項参照）

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

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

3.4.5 判定（5.12項参照）

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

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

付録 2. (1)~(4) のいずれかの条件で得た試験液について陽性と判定された場合は、室温又は氷冷下、適切な抽出方法により調製した試験液を用いて、エンドトキシン特異的ライセート試薬を用いた試験（例：JIS K 8008 4.3）を実施し、エンドトキシンの有無を確認する（4、5.4、5.13、5.14 項参照）。これらの結果を総合して発熱性物質の由来を考察する。

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記載する。

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

4. エンドトキシン試験（5.13 項参照）

天然由来の医用材料（例：キチン、キトサン、植物ガム、ペクチン、アルギン酸塩、コラーゲン、ゼラチン）は、原材料に由来するエンドトキシン汚染の可能性が否定できないことから、室温下、可能なら連続振とう又は氷冷下で超音波処理を行って適切な時間抽出し、エンドトキシン特異的ライセート試薬によるエンドトキシン試験（第十七改正日本薬局方エンドトキシン試験又は JIS K 8008 4.3）を実施する（3.4.5、5.4、5.13、5.14 項参照）。

5. 参考情報

5.1 発熱性物質の分類と体温調節・発熱機序

発熱性物質は、最も強力な発熱性を示すエンドトキシンとその他の非エンドトキシン性発熱性物質に大別される。さらに後者は、化学物質に相当する Material-mediated pyrogen とエンドトキシンを除く各種の微生物由来成分に分類される。ウサギを用いた試験では、基本的に全ての発熱性物質の存在の有無を評価できるが、エンドトキシン試験により検出できる発熱性物質はエンドトキシンのみである。ただし、医療機器又はその材料に微生物汚染が生じる場合、通常、グラム陰

性細菌以外の微生物汚染も同時に起こるため、エンドトキシン試験の結果から、その他の微生物由来成分の混入の有無を推定することは可能である。

発熱性物質は、その作用機序から、(1) サイトカインネットワークを介して発熱を惹起する物質、(2) 体温調節に関与する中枢神経系に直接作用する物質、(3) 酸化リン酸の脱共役剤、(4) その他、作用機序の不明な物質に大別される。エンドトキシンをはじめとした各種微生物成分は(1)に該当する発熱性物質である。一方、化学物質である Material-mediated pyrogen は(2)～(4)に相当する発熱性物質である(5.7項参照)。

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

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

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

発熱性物質試験について個別に協議するため、2007年に ISO/TC 194/WG 16 が新設された。近い将来、ISO 10993-11 とは独立した形として、発熱性物質試験に利用できる各手法の特徴などを概説したテクニカルレポートが取りまとめられ

る予定である。

同テクニカルレポートには、ウサギを用いた発熱性物質試験法及びエンドトキシン試験法のほか、ヒト細胞を使用した新規 *in vitro* 発熱性物質試験法 (Human-cell based pyrogen test, HCPT) に関する情報も記載されている。HCPT はヨーロッパを中心にウサギを用いた発熱性物質試験の代替として開発された試験法である。ヨーロッパにおいては、医薬品及び医療機器ともに検証実験が終了しており、動物試験代替法として既に利用されている^{5,6)}。国内における検証試験としては、平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金/創薬基盤推進研究事業 (16ak0101029j2603) において、可塑剤及び医用材料を検体とした 4 機関によるラウンドロビンテストが実施され、良好な成績が得られている。

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

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

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

5.3 試験の目的

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

いわゆる合成ポリマーなどの場合、非常にまれではあっても添加された化学物

質による発熱の可能性を否定できず、Material-mediated pyrogenの有無も調べるために、ウサギを用いた試験を実施する必要がある。

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

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

5.4 抽出温度

従来の試験液の調製は付録2.の「抽出温度・時間」のうち(1)~(3)のような高温かつ長時間の条件で行われていた。この場合、エンドトキシンが極めて強い耐熱性を有するリポ多糖であるという根拠に基づいて、試験液中に認められた発熱性物質は、「エンドトキシン」であるとの判定がなされてきた。しかし、引用文献¹⁰⁻¹²⁾及びその他の報告にもあるように、エンドトキシン溶液を加熱処理すると活性が失われることがあり、その現象はエンドトキシン濃度、加熱の温度並びに時間の3因子に依存することが示された。特に、低濃度のエンドトキシンであれば付録2.(1)~(3)のような条件下ではかなり活性が下がる可能性があることが明らかにされた。エンドトキシンの血清型(O-抗原性)を決定する多糖体部分は非常に強い耐熱性を示すが、エンドトキシンの生物活性を担うリポドA部分は弱酸性及びアルカリ性条件下では容易に加水分解(リポドA遊離による溶解度低下、活性低下に直接関係するグリコシド結合型リン酸又は脂肪酸残基の脱離)を受ける。またエンドトキシンの活性は緩衝液中で加温・加熱した場合でも低下することが確認されている。そのため、付録2.(1)~(3)に規定した加温条件で抽出した場合、材料表面に存在する活性基又は材料から遊離する化学物質の影響による抽出液のpH変動のほか、エンドトキシン自体の物性(酸性)により、リポドA部分の分解が起こり得る。エンドトキシン濃度が低い場合は、材料表面への非特異的吸着やイオン結合による回収損失も無視できない。引用文献¹⁰⁻¹²⁾及びその他の報告に見られた活性低下は、おそらくこれらの要因も関与しているものと思われる。またエンドトキシンのLAL活性は、水中下25℃又は37℃で24時間保存することにより、それぞれ40%又は80%程度低下するが、4℃下では保持されることが報告されている¹³⁾。エンドトキシン回収率は超音波処理により向上するが、同処理に伴い超音波浴槽の水温が顕著に上昇するため、超音波抽出を用いる場合は氷水中で行う必要がある。超音波処理を利用しない場合は、エンドトキシンの溶解性と失活度合を考慮して、室温下で抽出することを基本とする。最適な抽出時間は材料の種類によって異なるが、室温下8時間を越える場合、LAL活性が40%程度低下する可能性があることに留意する¹³⁾。なお、エンドトキシン標品のLAL活性は、5±3℃で72時間静置膨潤後、室温下、ボルテックスミキサーで10分間攪拌することにより向上することが報告されていることから¹⁴⁾、材料からの抽出についても、この知見が参考になる可能性がある。

エンドトキシンの抽出に当たっては、容器表面への非特異的吸着を回避するた

め、ガラス製器具を用いることが望ましい(5.13項参照)。また調製した試験液を保存する場合は、ガラス製容器中、期間に応じて4℃下又は凍結保存し、試験実施前に十分攪拌して再分散する必要がある。可能であれば、氷冷下で超音波処理することが望ましい。

5.5 抽出条件

抽出では、抽出溶媒とサンプル表面との接触、その時間と温度、冷却、振とう(例：超音波処理)、無菌的取扱い、保存が重要な要素である。高温で抽出する場合に、抽出時には溶解性が良くても、保存時の温度が低下すると溶解度が低下して不溶性物質が生成されてくる場合がある。抽出液は20℃以下にならないよう冷却した後、無菌的にエンドトキシンフリーの容器に移す必要がある。抽出液の採取はデカンテーション又はその他の適切な方法により行い、もし、肉眼観察により不溶性の物質が認められる場合は、遠心して、これを除去する。不溶性物質の除去の目的で、除菌用のメンブランフィルターなどを用いることは避けることが望ましい(エンドトキシンが存在する場合、エンドトキシンはメンブランに吸着される可能性があるため)。また無菌的取扱い(抽出及び保存)に可能な限り注意し、抽出後24時間以内に、発熱性物質試験を実施することと定めている。なお、容器壁に吸着したエンドトキシンを再溶解させるとともに、均一にミセル化するため、ウサギに投与する前に超音波処理することを推奨する。

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

5.6 発熱性物質試験法

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

5.7 化学物質による発熱事例

医療機器に関連した化学物質による発熱についての報告数は、決して多くはないが、例えば、下平らは、ゴムの老化防止剤として用いられていた *N*-フェニル-β-ナフチルアミン及びアルドール-α-ナフチルアミンは、いずれもウサギに対して発熱性がみられ、体温上昇のピークは注射後1~2時間であったと報告している¹⁵⁾。また実際に食道カテーテル用のゴムからは *N*-フェニル-β-ナフチルアミンが検出されたと報告されている。しかし、現在ではこれらのナフチルアミンは発がん性を有する疑いがあるために使用されていない。

体温上昇を起こすその他の化学物質として次のようなものがある¹⁶⁾。駆虫剤として使用される4,6-ジニトロ-*o*-クレゾールや黒色硫化染料中間体として使われているジニトロフェノールなどは、酸化的リン酸化の脱共役により、高エネルギーのリン酸化物を減少させて酸化的代謝を刺激し、生体の熱産生を促進させるた

めに体温が上昇する。*o*-ニトロフェノール、*m*-ニトロフェノール、*p*-ニトロフェノールなどは有機合成中間体、防黴剤、殺虫剤などに使用されるが、これらは実験的に高体温を起こすことが知られている。また殺菌剤や染料の製造などに使用されるピクリン酸もイヌの実験で体温の上昇がみられている。LSD、モルヒネなどの向神経性物質は、直接中枢系に作用して体温調節機構を攪乱することにより、体温の上昇をもたらすことが知られている。

5.8 試験動物

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

飼育室及び試験室内の温度変化は、各国薬局方ともに $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 以内の変動にとどめている。JP では、室温を $20\sim 27^{\circ}\text{C}$ の範囲内で一定に保つこととしているが、USP では $20\sim 23^{\circ}\text{C}$ と規定している。飼育室及び試験室の間はドアで区切られていて、両室内の温度・湿度は同じ条件で一定に制御されていることが望ましい。試験時におけるウサギの保定は、首枷固定法により行う。数時間に及ぶ首枷固定での拘束を行うので、できるだけストレスを軽減させるために背中と脚は拘束されないような固定器を使用する。首枷固定時にウサギは騒音その他の刺激に対して動揺して暴れることがあり、このことが原因とな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、初めて試験に用いるウサギは、試験前 1~3 日以内に注射を除く全操作を含む偽試験を行い、試験に馴化させる。USP では試験前 7 日以内に JP と同様の馴化を行うように規定している。EP では、2 週間以上使用していないウサギを用いて、本試験の 1~3 日前に実際に滅菌生理食塩液を注射する予備試験を行い、注射前 90 分から注射後 3 時間の間に体温上昇度が 0.6°C を超えないウサギを本試験に使用することになっている。

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

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

5.9 装置及び器具

温度計としては水銀温度計、熱電対温度計、電気抵抗温度計などが用いられる。しかし、今日では多くの施設でサーミスター温度測定装置 ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 以内の精度を

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

耐熱性のガラス器具、容器、注射筒及び注射針などは、環境中に存在するグラム陰性細菌によって汚染されている可能性があるため、あらかじめ250℃で30分間以上の乾熱滅菌により、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンの生物活性を不活化させる。EPでは、200℃、1時間の加熱処理も利用できることになっている。またリポ多糖体であるエンドトキシンは通常の滅菌法ではほとんど分解を受けないため、試験に使用する器具類の脱ピロジェンには強い加熱処理が必要である。エンドトキシン試験のための試験液を調製する際に用いるガラス製の器具・容器の乾熱滅菌は、エンドトキシンによるリムルス反応が発熱性物質試験よりも数百倍も感度が高いことより、250℃での30分間では充分でなく、250℃で少なくとも60分間の加熱処理を行う方が安全である。注射筒及び注射針は発熱性物質が検出されない(ピロジェンフリー)ことが保証された単回使用の市販製品を用いることもできる。

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

5.10 投与液量

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

5.11 試験方法

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

対照体温の規定は、従来(第七改正日本薬局方)38.9~39.8℃であった。ウサギを固定器に固定するときは38.9~39.8℃の範囲に収まるものは、通常使用ウサ

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

JPとUSPは試験液の加温温度を $37\pm 2^\circ\text{C}$ と定めているが、EPは38.5℃と規定している。以前、試験液投与後の体温の測定は、1時間間隔で3回行うことになっていたが、現在はUSP及びEPと同様、注射後3時間まで、30分以内の間隔で体温を測定するように改正されている。現在では、ほとんどの施設で電氣的連続測温記録計が用いられており、2~3分間隔で温度の記録が可能となっているので、発熱を観察する3時間の間で最も高い発熱度を検知する方法を採用してもよい。例えば、エンドトキシンによる発熱の場合は、エンドトキシン投与後ほぼ1.5時間後に発熱のピークがみられ、投与量が多い場合にはさらに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、本法に従い30分以内の間隔で測定した値を採用する場合であっても、試験液投与後3時間の体温変化に注意して、発熱性の判定を行うことが勧められる。

5.12 判定

本試験での判定が、極めて変動を受けやすいウサギの体温のわずかな上昇によるものなので、体温上昇の程度によっては、再試験を行って最終的に判定するという慎重な手段がとられている。本試験法は現行の第十七改正日本薬局方の方法である。基本的にEPも同様の判定方法を採用しているが、判定温度に若干の相違がある。またJPは最終判定に至るまで必要に応じて3段階の試験を実施するように規定しているが、EPはこれが4段階である。一方、USPでは、3匹のウサギを使用した初回の試験において、0.5℃以上の体温上昇が認められた場合、5匹のウサギを使用した再試験を実施することになっており、初回の試験を含めた8匹のウサギ中3匹の体温上昇度が0.5℃未満又は8匹のウサギの体温上昇度の合計が3.3℃未満のとき、試験に適合すると規定されている。

5.13 エンドトキシン試験法

エンドトキシン試験法に関しては、第十七改正日本薬局方・一般試験法のエンドトキシン試験法とJIS K 8008 4.3が参考となる。その他、JPの技術情報誌JPTI¹⁷⁾及びその他の資料¹⁸⁻²⁰⁾には、測定手法、試験例、注意事項、分析法バリデーションなどが記載されている。

エンドトキシン試験法は、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンがカプトガニ(*Limulus polyphemus* 又は *Tachypleus tridentatus* など)の血球抽出成分LAL(Limulus Amebocyte Lysate)を活性化し、ゲル化を引き起こす反応に基づき、エンドトキシンを検出又は定量する*in vitro*試験法である。試験法としては、ゲル形成を指標とするゲル化法、ゲル形成時の濁度変化を指標とする比濁法及び発色

合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。エンドトキシン試験法は、エンドトキシンに対する反応特異性が高く、またウサギによる発熱試験に比較して数百倍もの高感度であることより、エンドトキシンを対象とした発熱性物質試験法の代替法として製薬、臨床、医療機器の分野で汎用されている。

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

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

5.14 エンドトキシン特異的ライセート試薬

従来、エンドトキシン試験に使用する試薬は、その起原から LAL 試薬と呼ばれていたが、*Tachypleus tridentatus* の追加により、ライセート試薬と改称された。真菌の細胞壁構成成分である β -グルカンやセルロース系の物質（キュプロファン膜による人工腎臓抽出物など）などは発熱活性を示さないとされているが、LAL に対して強く反応することがわかり、現在では、 β -グルカン類によって活性化される LAL 成分である Factor G を除去又はその機能を飽和させることにより、エンドトキシンと特異的に反応するライセート試薬が開発・市販されている²¹⁾。また β -グルカンはエンドトキシンが示す生物活性やアレルギー反応を増強する可能性があることが知られている²²⁾。

数年前より、カプトガニの保護、試薬の安定供給、製品ロット間差の解消及び試験の安定性の向上を目的として、組換えタンパク質から構成されるエンドトキシン測定試薬（組換え試薬）が開発され、現時点で3種類の組換え試薬が上市されている。三薬局方（JP、USP、EP）の調和合意に基づいて規定されたエンドトキシン試験法では、カプトガニ血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いることとされているため、現時点では組換え試薬を代替品として使用することはできない。ただし、第十七改正日本薬局方通則 14 に記載されているように、規定の方法以上の真度及び精度が得られることを使用者が検証すれば組換え試薬を用いることができる。現在、組換え試薬の局方収載へ向けた検証実験として、各組換え試薬間並びに既存のライセート試薬との性能比較に係る国内ラウンドロビンテストが実施されている¹⁴⁾。

6. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

- 1) 引用規格の一つである日本薬局方と ISO 10993-11 をそれぞれの最新版に更新した。
- 2) エンドトキシンの抽出及び試験液の保存について、3.4.5 項、4 項、5.4 項の該当箇所を修正した。
- 3) HCPT に関する最新情報を参考情報 5.2 項に追加した。
- 4) 参考情報 5.14 項に組換えタンパク質から構成されるエンドトキシン測定試薬（組換え試薬）に関する情報を追記した。
- 5) これらに伴う変更として、引用文献 13 と 14 を追加し、番号を整理した。

7. 引用文献

- 1) 三宅健介：エンドトキシン (LPS) 認識分子機構，エンドトキシン研究 6，pp. 23-30，医学図書出版株式会社 (2003)
- 2) Hemmi, H., Kashiho, T., Takeuchi, O. *et al.*: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196-200 (2002)
- 3) Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J. *et al.*: Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5, 1000-1006 (2004)
- 4) Girardin, S.E., Jehanno, M., Mengin-Lecreulx, D. *et al.*: Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem.* 18, 38648-38656 (2005)
- 5) Hofmann, S., Peterbauer, A., Schindler, S. *et al.*: International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J. Immunol. Methods* 298, 191-173 (2005)
- 6) Jahnke, M., Weigand, M., Sonntag, H.G.: Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit *in vivo* pyrogen test and the LAL test. *Eur. J. Paren. Sci.* 5, 39-44 (2000)
- 7) Hasiwa, M., Kullmann, K., Aulock, V.S., Klein, C., Hartung, T.: An *in vitro* pyrogen test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials* 28, 1367-1375 (2007)
- 8) Nakagawa, Y., Maeda, H., Murai, T.: Evaluation of the *in vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 588-597 (2002)
- 9) Nakagawa, Y., Murai, T., Hasegawa, C., Hirata, M., Tsuchiya, T., Yagami, T., Haishima, Y.: Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 66, 347-355 (2003)
- 10) 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進：医療用具のエンドトキシン試験法ーリムルス試験と発熱試験の関係ー, 防菌防黴 19, 561-566 (1991)
- 11) Kanoh, S., Mochida, K, Ogawa, Y.: Studies on heat-inactivation of pyrogen from *Escherichia coli*. *Biken Journal* 13, 233-239 (1970)
- 12) Miyamoto, T., Okano, S., Kasai, N.: Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft

- hydrothermal processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5058-5063 (2009)
- 13) 藤原雄太, 福田誠, 明田川純, 益田多満喜: エンドトキシン低濃度溶液の測定値に与える保存環境の影響, *Clinical Engineering* 22(10), 983-990 (2011)
 - 14) 菊池 裕他: エンドトキシン試験法に用いる組換え試薬の評価に関する研究, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 48(4), 252-260 (2017)
 - 15) 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)
 - 16) 毒性試験講座: 産業化学物質, 環境化学物質, 和田攻編, pp. 129-151, 地人書館 (1993)
 - 17) 日本薬局方技術情報 1995: エンドトキシン試験法, pp. 46-53, 薬業時報社 (1995)
 - 18) 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)
 - 19) 田中重則: 血中エンドトキシンの微量定量法; エンドトキシンの試験法 (細菌学技術叢書 11 巻) 日本細菌学会教育委員会編, pp. 128-147, 菜根出版, 東京 (1990)
 - 20) Haishima, Y., Hasegawa, C., Yagami, T. *et al.*: Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32, 495-503 (2003)
 - 21) 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)
 - 22) Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T.: Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1-3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN) isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1554-1560 (1994)

8. 参考文献

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

第 8 部 血液適合性試験

1. 適用範囲

本試験は、医療機器の血液適合性を評価するためのものである。

ISO 10993-4 では、血液適合性を「医療機器が目的とする機能を発揮するうえで、血液に関連する有害事象（健康被害）を引き起こすことなく血液と接触できる能力」と定義している。医療機器と血液との相互作用の結果生じる健康被害は、以下に示す 2 つに大別される。本項ではこれらのリスク評価を実施するための試験項目、試験実施における一般的要求事項、試験法及びその参考情報を提示する。

- 1) 医療機器が血液に損傷や活性化の影響を与えることで生じる溶血、出血及び血栓などの健康被害
- 2) 血液が医療機器に血液成分の付着などの影響を与えることで医療機器に不具合が発生し、その結果生じる健康被害

2. 引用規格

ISO 10993-4:2017, Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood（以下、ISO 10993-4 と記載）

3. 試験項目

血液適合性の要求事項は、当該医療機器の使用方法、形状、大きさ及び接触形態（体内／体外、接触期間など）により異なるため、それらを考慮して、必要な試験項目を設定する（8.1 項参照）。

4. 評価項目

本ガイダンスでは、国際規格 ISO 10993-4 で記載されている一般的な評価方法（下表参照）を推奨する。これらの項目は、医療機器の血液適合性試験において、精度や汎用性の観点から提示されている。3 項で選択した試験項目に対して、これらの中から一つ以上の適切な評価項目を選択する。ISO 10993-4 には、一般的ではない評価方法（Less common laboratory tests）及び推奨されない評価方法（Test which are not recommended）が、それぞれ Annex F 及び Annex G に記載されている。これらの評価方法は、試験目的によって有用な評価項目となり得るため、妥当性を示したうえで使用する。

試験項目		評価項目
溶血	材料起因	遊離ヘモグロビン測定 (ASTM ¹⁾ 、NIH ²⁾)
	機械的因子起因	遊離ヘモグロビン測定
血栓形成 (<i>In vivo</i> / <i>Ex vivo</i>)		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
血栓形成 (<i>In vitro</i>)		
血液凝固		トロンビン-抗トロンビン複合体(TAT)、フィブリノペプチドA(FPA)、部分トロンボプラスチン時間(PTT)
血小板活性化		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(β -トロンボグロブリン(β -TG)、血小板第4因子(PF4)、トロンボキサンB2(TxB2))、 又は走査型電子顕微鏡検査による血小板形態観察
血液学		全血算(CBC)、白血球活性化因子
補体		SC5b-9 (C3aを追加してもよい)

5. 一般的要求事項

5.1 試験試料

最終製品又は最終製品の一部を試験試料に用いる。最終製品の血液適合性について評価可能と判断される場合は、最終製品を模擬した試料を用いることができるが、医療機器表面の材質、性状、形状が血液適合性に影響を与えることを考慮して試験試料を設定する必要がある。

必要に応じて、無処置対照、陰性対照、陽性対照又は試験試料のリスク評価を容易にするための比較対照（既承認／認証品など）を設定する。既承認／認証品を設定する場合は、国内で同じ用途で使用実績があり、安全性が確立されている材料を設定することが望ましい。

5.2 検体数

統計解析を可能とするなど、陽性と陰性を適切に判別することが可能な検体数を用いて実施する。ただし、*in vivo* 試験については、動物福祉を考慮しなければならない。このため、統計学的解析に必要な検体（動物）数は必須でなく、リスク評価が可能な動物数を設定する。

5.3 試験系

In vivo 試験において、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ及びイヌなどを使用することができる。動物モデルは、試験される医療機器の大きさや使用方法と、動物の解剖学的又は血液の特性を考慮して設定する。ヒトとの解剖学的な類似点から、ブタやヒツジが選択されることが多い。この他、イヌはヒトより血栓症が生じやすい傾向があることから、血栓症の試験に汎用されている。

In vitro 試験においては、ヒト血液を使用することが推奨される。その利点は、動物種差の影響を考慮しなくてよい外挿性の有利さに加え、臨床診断に用いられるマーカーが活用可能であることも挙げられる。ただし、溶血性試験のように動物血液を用いた試験法が確立されている試験もある。使用方法、試験目的、試験方法や評価方法を検討して適切な試験系を選択する。

5.4 試験方法

試験試料の使用方法、本ガイダンスに記載した試験法（6項参照）若しくは参考情報（8項参照）、ISO 10993-4 及びその他の関連 ISO 規格に記載又は引用されている試験方法に準じて実施する。妥当性が示されれば、文献など広く報告されている試験方法を選択してもよい。原則として、循環血液と直接接触する医療機器や材料については、血液又は血液成分と直接的に接触させて試験を実施する。間接的に血液と接触する医療機器については、抽出液を使用する。

6. 材料起因の溶血性試験

本項では、材料起因の溶血性試験の1つである ASTM F756 に記載されている試験法を提示する。

6.1 試験目的

材料起因の溶血は、医療機器又は材料表面の化学物質又はそれから溶出する化学物質が、赤血球膜に傷害を与えることで引き起こす溶血である。本試験は、この化学物質に起因する溶血リスクを評価する（8.2.1項参照）。

6.2 試験試料、陰性対照及び陽性対照

試験試料の他、陰性対照、陽性対照及び無処置対照を設定する。

補足：陰性及び陽性対照（8.2.1項参照）

陰性対照：ブランク補正溶血率が2%未満である材料を設定する

陽性対照：陰性対照補正溶血率（6.6.5項参照）が5%以上である材料を設定する。

6.3 試薬

- ・ カルシウム、マグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩液：PBS (-)
- ・ ヘモグロビン標準品
- ・ シアンメトヘモグロビン試薬（Drabkin's 試薬も使用可）

シアンメトヘモグロビン試薬		Drabkin's 試薬	
リン酸カリウム	0.14 g	重炭酸ナトリウム	1 g
シアン化カリウム	0.05 g	シアン化カリウム	0.05 g
フェリシアン化カリウム	0.2 g	フェリシアン化カリウム	0.2 g
非イオン性界面活性剤	0.5~1.0 mL	蒸留水	
蒸留水			
1 L		1 L	

補足：ASTM F756-17¹⁾では、シアンメトヘモグロビン試薬によるヘモグロビン

の検出が提示されているが、バリデートされていればその他の方法も可能である。シアン化物を必要とせずかつバリデートされたヘモグロビン測定法を参考文献³⁾に示す。

6.4 試料の準備と試験液の調製

- ・ 直接接触法：試験試料、陽性対照及び陰性対照をそれぞれ3試料準備する。
- ・ 抽出液法：試験試料、陽性対照及び陰性対照をそれぞれ3試料準備し、いずれもPBS (-)を用いて抽出する。抽出条件については付録の規定に従う。
- ・ 無処置対照：直接接触法及び抽出液法ともにPBS (-) 3試料を試験試料、陽性対照及び陰性対照と同じ条件で処理し、準備する。

6.5 血液の調製

3匹以上の健康なウサギから血液を採取し、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを添加する。プール血液は、各動物から得た血液を等量ずつ混合して調製する。ヘモグロビン標準品を用いて吸光度を測定して得られた検量線を基に、採取したプール血液の遊離ヘモグロビン濃度を測定し、2 mg/mL未満であれば試験に使用可能とする。

また採取したプール血液の総ヘモグロビン量を測定し、PBS (-)により、総ヘモグロビン濃度 10 ± 1 mg/mLとなるように希釈する(調製血液)。希釈後、再度吸光度を測定し、調製血液の総ヘモグロビン濃度 (10 ± 1 mg/mL)を確認する。

補足1：検量線の作成

ヘモグロビン標準品を用いて6濃度の希釈液を調製して、0.03~0.7 mg/mLの範囲を含む検量線を作成する。シアンメトヘモグロビン試薬希釈液をゼロ補正に使用する。

補足2：遊離ヘモグロビン濃度の測定

採取したプール血液3 mLを700~800 x gで約15分間遠心する。シアンメトヘモグロビン試薬で上清を1:1若しくは適切な比率で希釈し、15分後に吸光度 (λ 540 nm)を測定する。以下の計算式により、採取したプール血液の遊離ヘモグロビン濃度を算出する。

遊離ヘモグロビン濃度 = 吸光度 (λ 540 nm) \times F \times 2 (希釈比率)

F：吸光度をx軸に濃度をy軸にプロットして作成した検量線の傾き

補足3：採取したプール血液の総ヘモグロビン濃度

採取したプール血液20 μ Lとシアンメトヘモグロビン溶液5.0 mLを混合して5分間静置(Drabkin's 試薬; 15分間)後、吸光度 (λ 540 nm)を測定する。この操作を2回繰り返す行い、以下の計算式により、総ヘモグロビン濃度を算出する。

総ヘモグロビン濃度 = 吸光度 (λ 540 nm) \times F \times 251

補足 4：調製血液の総ヘモグロビン濃度の測定

希釈した血液 300 μL とシアンメトヘモグロビン溶液 4.5 mL を混合して 5 分間静置 (Drabkin's 試薬 ; 15 分間) 後、吸光度 (λ 540 nm) を測定する。この操作を 3 回繰り返す。以下の計算式により、総ヘモグロビン濃度を算出する。

$$\text{調製血液の総ヘモグロビン濃度} = \text{吸光度} (\lambda 540 \text{ nm}) \times F \times 16$$

6.6 試験方法

6.6.1 試料又は抽出液と血液の接触比

直接接触法：試料と PBS (-) 及び調製血液の添加比

試料	試料/PBS (-) ※	血液接触比
試験試料	PBS (-) を添加 付録の規定に合わせた試料/PBS (-) 比を用いて算出	調製血液を添加 ※で添加した PBS (-) / 調製血液比を 7:1 になるよう添加
陰性対照		
陽性対照		
無処置対照		

抽出液法：抽出液と調製血液の添加比

抽出液	血液接触比
試験試料抽出液	調製血液を添加 (抽出液 7 mL に対して調製血液 1 mL を添加)
陰性対照抽出液	
陽性対照抽出液	
無処置対照 (PBS (-)) (空抽出液)	

6.6.2 接触時間

6.6.1 項で作製した各試験液を 37±2℃ の水浴中で少なくとも 3 時間インキュベートする。30 分ごとに緩やかに攪拌又は転倒混和を 1 回 (反転を連続 2 回) する。

6.6.3 肉眼観察

インキュベート終了後、各試験液を試験管に回収し、各試験液を 700~800 xg で約 15 分間遠心する。上清を新しい試験管に回収して、上清の色調や沈殿物の有無を観察する。

6.6.4 溶血率の算出

6.6.3 項の上清 1.0 mL に対してシアンメトヘモグロビン溶液 1.0 mL を添加し、3~5 分間静置 (Drabkin's 試薬 ; 15~30 分間) 後、吸光度 (λ 540 nm) を測定する。測定した吸光度を基に以下の式から溶血率を算出する。

$$\text{溶血率} (\%) = \frac{\text{試験液上清のヘモグロビン濃度}}{\text{試験管中の総ヘモグロビン濃度}} \times 100$$

$$\text{ブランク補正溶血率 (\%)} = \frac{\text{試験液上清のヘモグロビン濃度} - \text{無処置対照の上清ヘモグロビン濃度の平均値}}{\text{調製血液の総ヘモグロビン濃度} - \text{無処置対照の上清ヘモグロビン濃度の平均値}} \times 100$$

又は

$$\text{ブランク補正溶血率 (\%)} = \frac{\text{試験液上清の吸光度} - \text{無処置対照上清の吸光度の平均値}}{\text{調製血液の吸光度} - \text{無処置対照上清の吸光度の平均値}} \times 100$$

6.6.5 結果の判定

下表を用いて試験試料の溶血グレード付けをする。陰性対照補正溶血率は、試験試料の平均ブランク補正溶血率から陰性対照の平均ブランク補正溶血率を差し引いた値とする。試験試料の陰性対照補正溶血率が5%以上の場合を溶血性ありと判断する。

また試験試料の平均溶血率が5%未満の場合でも、1例ないし2例に5%以上の溶血率が認められた場合には、新たに試験試料を6試料に増やして再試験を行う。

試験試料の陰性対照 補正溶血率 (%)	溶血グレード
0 以上 2 未満	非溶血
2 以上 5 未満	軽度の溶血
5 以上	溶血性あり

7. 試験報告書

血液適合性試験の試験報告書には、以下の事項を記載する。

- 1) 試験実施機関及び試験責任者
- 2) 試験実施期間
- 3) 試験試料を特定する要素
(例：医療機器の名称、製造販売業者名、製造番号、原材料、形状など)
- 4) 対照材料を特定する要素
(例：対照材料の名称、入手先、製造番号など)
- 5) 試験方法
(例：試験項目、評価方法、それらの妥当性説明など)
- 6) 試験結果
表：個体ごとの評価結果、必要に応じて統計学的解析結果
写真：外観写真（血栓の付着状態）、顕微鏡写真など
(必要に応じて)
- 7) 結果の評価及び考察

8) 参考文献

- a. 血栓症は *in vivo* 又は *ex vivo* の現象であるが、*in vitro* で模擬できることもある^註。臨床を適切に反映させた *in vitro* の血栓性試験が実施されれば、*in vivo* 又は *ex vivo* 試験は不要な場合がある。
- b. 直接又は間接的に血液と接触する部材のみ実施する。間接的に接触する部材については、*in vivo* 血栓症、力学的因子に起因した溶血や補体の評価は不要な場合がある。
- c. 血栓形成には主に血液凝固、血小板及び白血球の反応が関与すると考えられている。これらの項目で血栓症のリスク評価を行う場合は、血液凝固、血小板及び血液学的項目の各試験が *in vivo* 試験の代替法として適切かどうか判断したうえで評価に使用する。
- d. アナフィラキシーのような他のエンドポイントに対して評価を行う場合は、ISO/TS 10993-20 も参考にして評価する。

注記 血液と長時間接触する医療機器の血栓症リスクの評価に *in vitro* 試験法を用いることは不適切な場合があるため (8.3.2 項参照)、一般的には *in vivo* 試験が推奨される。

8.2 溶血

医療機器には、主に材料に起因する溶血の他、一部の医療機器では機械的因子に起因する溶血のリスクが考えられる。

8.2.1 材料起因の溶血

材料起因の溶血は、医療機器表面の化学物質又は溶出する化学物質との化学的相互作用による溶血リスクを評価する。材料の血球への化学的傷害作用は、医療機器と血液との相互作用の基本的な情報と考えられている。このため、材料起因の溶血性試験は、循環血液と接触するほとんどの医療機器で求められている。

(試験に関する情報)

本試験においては、使用条件に合わせて試験条件を設定するのではなく、4項「評価項目」に示す確立された試験法で実施するのが望ましい。

通常、材料と赤血球を直接接触させる方法（直接接触法）と、抽出液と赤血球を接触させる方法（抽出液法）の2つの方法を用いて高分子材料の溶血性を評価する。循環血液と直接接触しない医療機器（間接接触医療機器）については、血液と接触するのは溶出物と考えられるため、抽出液法のみで評価してもよい。

ASTM F756-17¹⁾では、溶血指数と溶血グレードを示す表が提示されている。これを用いて溶血性を判定する。その他の試験法を用いる場合は、判定基準とその妥当性を示す必要がある。

試験には、陰性及び陽性対照材料を用いて、試験系の感度や精度を確認する。陰性対照材料には、高密度ポリエチレンシートが用いられている。陽性対照材料についての情報を下表に示す。

参考表1 溶血性試験（材料起因の溶血）に使用可能な陽性対照材料リスト

材料	その他の情報				
0.91%非イオン界面活性剤含有軟質ポリ塩化ビニルペレット (Y-3)	<p>Y-3 は、ISO/TC 194/WG 9 が実施した溶血性試験に関する国際ラウンドロビンテストにおいて標準材料の一つとして使用され、溶血性を有することが確認されている。</p> <p>Y-3 に含まれる非イオン界面活性剤（Genapol X-080）は曇点が 74-76℃であり、当該温度を境にして溶解度が大きく低下するため、抽出液法による試験において抽出温度が曇点近く若しくは上回ると Y-3 の溶血性が低下することに留意する。参考情報として、試験施設で ASTM F756-17 に従って実施した時の各抽出温度における Y-3 のブランク補正溶血率が 20～80%となる溶媒抽出比を以下に示す。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>抽出温度（時間）</th> <th>試料／溶媒抽出比*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>37℃（72時間）</td> <td>0.08 g/mL</td> </tr> </tbody> </table>	抽出温度（時間）	試料／溶媒抽出比*	37℃（72時間）	0.08 g/mL
抽出温度（時間）	試料／溶媒抽出比*				
37℃（72時間）	0.08 g/mL				

	<p>50°C (72時間) 0.08 g/mL 70°C (24時間) 0.24 g/mL 121°C (1時間) 0.80 g/mL</p> <p>直接接触法においては、付録で提示された抽出条件 (0.2 g/mL) で実施したところ、Y-3のブランク補正溶血率が20~80%の範囲内であった。</p> <p>※抽出完了後、室温放冷した場合に中陽性が得られる試料/溶媒抽出比である。付録2/(1)項の特例に従い、冷却処理を施した場合は、中陽性を得るために抽出比を若干増加させる必要がある。50°C及び70°C抽出時の抽出比は、それぞれ0.5 g/mL、1.2 g/mL程度となる。</p> <p>これらの抽出比はあくまでも参考値である。各試験施設でY-3を使用する前に適切な条件を設定し、その溶血性を確認したうえで試験に使用する。</p>
Buna N rubber	Aero Rubber Company; ARC-45010, 0.031 inch thick sheet (ASTM F756-17 ¹⁾ で例示)
Vinyl plastisol	Plasti-Coat; 0.025~0.075 inch thick sheet (ASTM F756-17 ¹⁾ で例示)

Y-3 の入手先

(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 対照材料担当
電話 0463-82-4751、FAX 0463-82-9627
e-mail : rm.office@fdsc.or.jp

8.2.2 機械的因子起因の溶血

機械的因子に起因する溶血は、主に血流速度や乱流のような物理的因子により引き起こされる。血流自体も赤血球を変形させ赤血球膜を破壊させるリスク因子であるが、医療機器側の複雑な形状が関与することで重度の溶血を引き起こす可能性がある。本試験は、この物理的相互作用による溶血リスクを評価する。対象となる医療機器としては、血液アフェレーシス機器、血液フィルタ、血液ポンプ、人工肺システム、血液透析器、機械弁などがあげられる。

(試験に関する情報)

臨床使用時における血液との接触状態を模擬した試験モデルを設定する。遊離したヘモグロビン量又は医療機器との接触前後の赤血球数の変動により溶血の程度を評価する。

主に *in vitro* 試験が設定される。臨床使用時における血液との接触状態のうち最大流量の条件でリスク評価することが望ましい。例えば、国際規格では、ISO 7199⁴⁾ に、

人工肺の血球損傷試験が提示されており、人工肺システムについては、この規格を参考に試験を行う。

通常、機械的因子に起因する溶血リスクを評価する目的のみで *in vivo* 試験を実施する必要はない。ただし、その他の項目を含めた使用時の安全性又は機能評価として *in vivo* で使用模擬試験を行う場合、この試験で赤血球数や遊離ヘモグロビンを測定して機械的因子に起因した溶血リスクを評価することができる。例えば、ISO 5840-2⁹⁾ に人工弁の動物試験が提示されており、この試験で得られた血液学検査値を基に機械的因子に起因する溶血リスクを評価することができる。

臨床使用を模擬して実施される試験では、試験試料と同等の血液接触形態（時間・面積など）でその臨床実績から安全性が確立している類似製品の臨床情報や試験結果などの既知情報から許容値を設定することにより、人体に与える影響を評価することができる。またそのような製品を既承認／認証対照として同時に試験し、結果を比較することでリスクを評価してもよい。

8.3 血栓形成

医療機器に起因する血栓症のリスクを評価するために実施する。以下に考えられるリスクを示す。なお、医療機器の用途や使用方法により考慮すべきリスクは異なることに留意する。

- 1) 医療機器内の血栓狭窄又は閉塞及び医療機器の機能不良
- 2) 医療機器に起因して形成した血栓の遊離による末梢側血管の閉塞
- 3) 医療機器が血液又は血液成分に影響（活性化、傷害など）を与えることで体内の微小血管の各所で生じる血栓形成

補足：本項では、使用する血栓形成、血栓症及び血栓性を以下に定義している。

- ・ 血栓形成：血栓が形成される事象
- ・ 血栓症：血栓が形成されることによる健康被害。
血栓形成の項目では、血栓症の有無を直接観察する他、血栓形成や試験試料の血栓性を調べて、最終製品の血栓症リスクを評価する。
- ・ 血栓性：最終製品若しくは材料が血栓を形成させる能力又は性質。
試験試料の血栓形成やその程度を調べることにより試験試料の血栓性を評価する。

血栓形成に影響を与える因子を以下に示す。

- a. 血流（血流量、乱流、血圧）
- b. 血管径
- c. 血液の性状や取扱い（血液の粘度、凝固因子及び血小板の活性化程度など）
- d. 薬剤の使用の有無（薬剤の種類及び量）
- e. 血液との接触期間
- f. 血液との接触面積
- g. 試験試料やその取扱いによる周囲組織や血管損傷、感染症などの炎症の有無

上記因子と医療機器の使用方法や使用条件を考慮して試験方法を設定する。体内で循環血液に接触する医療機器では *in vivo* 又は *ex vivo* 試験を、体外で血液と接触する医療機器の場合は、*in vitro* 又は *ex vivo* 試験が推奨される。

8.3.1 *In vivo* / *ex vivo* 血栓症

医療機器表面における血栓形成程度、末梢側血管の血栓閉塞や狭窄の有無、又は全身的な微小血管血栓症発生の有無を検出して、血栓症リスクを評価する。対象となる医療機器としては、インプラント、血管用カテーテルなどがあげられる。

In vivo / *ex vivo* 血栓症のリスク評価のための基本的な試験デザインとして、以下の2つが考えられる。

- 1) 8.3 項の a~g の条件を使用環境に合わせて十分な試験検体数で試験を実施し、全身状態や末梢組織、臓器の詳細な肉眼観察、病理組織学的検査など様々な方法を用いて血栓症を検出する。使用環境での血栓症の有無を検査するのみでなく様々な検査手法を用いて血栓症を引き起こす可能性のある変化まで詳細に検査して血栓症のリスクを評価する。
- 2) 8.3 項の a~g の条件よりさらに血栓が形成しやすい条件で試験を実施して、血栓が生じにくいことを示すことで血栓症のリスクが低いことを確認する。

上記 1)、2)に対する代表的な試験モデルを以下に示す。

8.3.1.1 *In vivo* 使用模擬試験

8.3.1 項の 1)は、血栓症のリスク評価に最も好ましい評価方法と考えられている。例えば、ISO 5840-2⁵⁾ (人工弁)、ISO 7198⁶⁾ (人工血管)、ISO 25539-1⁷⁾ (血管内埋込み機器)、ISO 25539-2⁸⁾ (血管内ステント) など、循環血液と直接接触するインプラントの多くは、使用模擬試験による性能確認試験が国際規格で求められている。これらの国際規格には、試験の要求事項が記載されている。またいくつかの文献で、これらに合わせて実施された試験の結果も報告されており、参考にすることができる。適切な理由を基に、一部を省略又は変更して試験を実施することも可能である。

(試験に関する情報)

適切な動物を用いて、適用部位又は類似した部位に臨床使用時と同様の方法で試験試料を留置する。抗凝固薬の種類や投与量についても、臨床使用時を想定して設定する。留置期間は、医療機器や評価目的に合わせる。

補足 1: *In vivo* 使用模擬試験では、インプラントごとに一般的に使用されている動物種がある。これらの動物種は、解剖学的にヒトに近いインプラントに適切なサイズである、豊富な背景情報があるなど利点があり使用されている。したがって、各インプラントの国際規格に記載されている又は文献で頻繁に報告されている動物種を参考に選択する。

補足 2: 留置期間は、4 週間や 26 週間の中長期間が一般的である。また急性期 (数時間~3 日間) の評価も重要な情報となる場合がある。

主な観察項目と評価方法を以下に記載する。

- ① 試験試料留置部での顕著な狭窄や閉塞の有無
主に血管造影や病理組織学的検査などで十分な血流路が確保されているかを観察する。
- ② 試験試料から飛散した血栓による末梢血管の塞栓の有無
解剖学的検査や病理組織学的検査にて、末梢臓器・組織及び主要臓器に虚血による組織変化がないかを観察する。特に、腎臓は飛散した血栓を捕えやすく虚血による変化も生じやすいことから、腎動脈より中枢側に留置や処置を施した場合には、末梢臓器の観察には腎臓を含めて評価する。

8.3.1.2 NAVI 及び AVI モデル

8.3.1 項の 2)における代表的な試験方法は、ISO 10993-4 AnnexC で提示されている NAVI (Non-anticoagulated venous implant) 又は NAAI (Non-anticoagulated arterial implant) モデルとなる。NAVI や NAAI は、技術的な要因が試験結果に影響を与える可能性を有するが、最も血栓が形成しやすい条件で実施することで、試験試料の血栓性を明確にすることができると考えられている。

抗凝固薬が併用される医療機器については、AVI (Anticoagulated venous implant) 又は AAI (Anticoagulated arterial implant) モデルも使用できる。ただし、陽性と陰性を識別できる適切な抗凝固薬の種類や量を設定することが必須である。

血管内に一時的に使用されるカテーテルやガイドワイヤに本試験法を使用することができる。これらの医療機器では、操作中や使用後に体外へ取り出す際に、医療機器表面に付着した血栓が剥がれて飛散し、末梢血管を閉塞させるリスクが考えられる。このモデルで表面に付着した血栓の程度を評価して、使用時の血栓症リスクを評価することができる。

(試験に関する情報)

2~3 例の動物を用いる。左右の血管（頸静（動）脈や大腿静（動）脈など）を用いて、対側血管に対照材料を同時に留置する。一定時間留置後、過剰量のヘパリンを投与し、試験試料を摘出する。

付着した血栓が剥がれないように注意して、試験試料を摘出し、生理食塩液で緩やかにすすいだ後、試験試料に付着した血栓を肉眼観察する。

肉眼観察を基に、ISO 10993-4 AnnexC を参考にグレードを設定する。NAVI や NAAI は、その実績から、血栓形成がない又はわずかであれば血栓性は低く、血栓形成リスクは低いと判定する。AVI や AAI での適否判定では、既に市販され安全性が確立されている医療機器との結果比較だけでなく、血栓形成がないかわずかであることも求められる。これらの試験では、抗凝固薬の用量が、血液適合性の良否を識別できる適切な条件に設定されているかを判断できるよう、陽性対照材料を設定するか、事前に背景データを確認して実施する必要がある。

補足 1: 留置時間については、使用時間を考慮して設定してよい。30 分~4 時間が通常使用される。4 時間以外を設定する場合は、臨床での使用時間や文献情報から

その妥当性を示せる時間とする。

補足 2：操作過程で血栓が剥がれた場合は、記録に残してリスク評価に含める。また試験試料側のみでなく、血管側に血栓が残っていればこれも結果に含める。

補足 3：血栓付着状態の肉眼観察は、付着部位、血栓の大きさ（長さ、厚み）、色調の記録を残しておく。肉眼観察の他、写真撮影する。

8.3.2 *In vitro* モデル

医療機器と血液又は血液成分を *in vitro* で接触させて、それらの変化を確認することにより、血栓症リスクを評価する。医療機器局所における血栓形成リスクを評価するほか、凝固能の全身的な亢進、血小板活性化又は炎症反応により血栓が形成しやすい血液となり、微小血管など医療機器が直接影響しない部位で生じる血栓症リスク（全身的な微小血管血栓症誘発リスク）も評価する。

考慮すべき事項

- 1) 8.3 項の a~g の条件を可能な限り使用環境に合わせて設定することが望ましい。
- 2) 使用を模擬しない条件で実施する試験については、バリデーションデータや使用実績のある製品の背景情報などを収集し、設定した試験が陽性／陰性を識別できる妥当な条件であることを示す。
- 3) 使用を模擬しない条件で実施された試験結果については、使用方法を考慮した総合的なリスク評価が必要となる場合がある。使用方法や試験条件によって、各試験項目の血栓形成への寄与度が異なるため、試験項目によっては軽微な変化が使用時の血栓症リスクを鋭敏に反映する場合もあれば、逆にほとんど影響を与えない場合もある。
- 4) 血液成分は、様々な環境の影響を受けて変化するため、試験に使用するまで適切な管理を行うとともに、血液は採取後速やかに試験に使用する（通常 4 時間以内）。
- 5) *In vitro* 試験では、血液性状の変化が生じることや抗凝固薬が必要となるため、長期間血液と接触する医療機器や抗凝固薬を併用することなく使用される場合のある医療機器において、適切なリスク評価が行えない場合があることを考慮する。

8.3.2.1 循環モデル（体外で血液と接触する医療機器）

使用時に合わせた条件で血液を循環して、医療機器上又は回路内の血栓塞栓リスク及び全身的な血栓症誘発リスクを評価する。対象となる医療機器としては、人工肺システム、血液透析器、血液フィルタ、血液アフェレーシス機器などがあげられる。

補足：人工肺や血液透析器などの体外循環装置では、使用時において抗凝固薬の厳密な管理や回路にアラーム機能が設けられるなど、医療機器内又は回路内における血栓症リスクが管理されている。このため、上記の医療機器において、既に使用実績のある仕様から軽微な変更をする場合は、医療機器内や回路内の

血栓症の試験を必須としなくてもよい。新規性の高い医療機器については、医療機器内又は回路内で血栓症が生じるリスクを評価する。

またこれらの医療機器は、血液との接触面積が大きいため、血球や血液成分に影響を与え、微小血管などで血栓が生じやすくなることで全身性の健康被害を引き起こす可能性がある。循環後の血球や血液成分の変化を確認することで全身的な血栓症の誘発リスクも評価することができる。またこの目的では、8.3.2.2 項の静置モデルを利用することもできる。

(試験に関する情報)

臨床使用を模擬した回路を作製して血液を循環させる。

血液には、臨床で使用される範囲内の抗凝固薬を添加し、Activated Clotting Time (ACT) を測定して、使用時と同程度の ACT 条件で実施する。血流量は予定される平均的な条件又は最低流量を設定することが望ましい。医療機器内又は回路内における血栓の有無については、回路内圧の上昇や循環後の医療機器の肉眼観察によって評価する。血液凝固、血小板活性化、血液学及び補体のいずれか又は両方の評価を行うことで全身的な血栓症誘発リスクを評価してもよい。

8.3.2.2 静置モデル

静置下で医療機器と血液を接触させて、血液凝固能、血小板活性化、白血球及び補体への影響を調べて、全身的な凝固能亢進又は血小板活性化による全身的な血栓症誘発リスクを評価する。対象となる医療機器としては、人工肺システム、血液透析器、血液フィルタ、血液アフェレーシス機器、血液バッグ及び血液投与用具などがあげられる。

(試験に関する情報)

通常、ヒト血液を用いて、静置下で医療機器と血液又は血液成分を接触させた後、血液凝固能、血小板活性化、白血球、補体への影響を検出する。試験系の精度や感度、陽性/陰性を判定するためのバリデーションデータを取得して試験を実施する。

8.3.2.3 循環モデル (体内で血液と接触する医療機器)

医療機器と血液又は血液成分を *in vitro* 循環系で接触させて、血液凝固、血小板活性化、白血球の吸着・活性化、補体活性化の指標を基に、医療機器の血栓性を予測し、血栓症のリスクを評価する。対象となる医療機器としては、抗凝固薬の併用下で循環血液と短期接触する医療機器があげられる。

補足：製造方法の変更など、軽微な変更による血栓症リスクへの影響については、変更前の既の実績のある医療機器の結果と比較して評価する。

(試験に関する情報)

血栓形成には、材料表面の化学的特性の他、医療機器全体における幾何学的性状も大きな影響を与える。このため、血液又は血液成分の流れがある循環系に試験試料を留置する。

この際、血液に添加する抗凝固薬や流量、接触時間、回路材料などの条件設定は重要である。臨床使用時と同種の薬剤を使用し、陰性／陽性を識別することができる適切な量を設定しなければならない。これらの条件の適切性を提示するために *in vivo* で血栓性が既知の陽性対照材料を設定するか、事前に背景データにより適切性を示したうえで試験を行わなければならない。

一定時間後、得られた血液又は血液成分の凝固能、血小板及び白血球の活性化などの測定を行う。同時に試験試料側の影響を肉眼や走査型電子顕微鏡で確認しておく、血液と医療機器の相互作用をより詳細に評価できる。

補体活性のように医療機器の形状による物理的影響ではなく、材料表面の化学的性質によって活性化することが知られている試験項目については、8.3.2.2 項の静置モデルを用いた試験を実施することもできる。

8.4 補体

現在、医療機器の補体活性化試験については、標準的な試験方法の規格はない。以下に示す情報を基に、試験方法のバリデーションや測定精度を確認して試験方法を設定することが重要である。

8.4.1 評価方法

補体活性化の経路として、3種類（古典経路、第二経路、レクチン経路）が知られており、いずれの経路も C3 が C3a と C3b に分解される。さらに、C3b が C5 を C5a と C5b に分解し、最終的に膜貫通型タンパク (C5b6789 (C5b-9)) が生成される。この時、一定の割合で S プロテインが取り込まれて可溶型になった SC5b-9 が生成するため、この量を測定して補体活性化程度を評価するのが一般的である。C3a を追加して、補体活性化経路の途中の変化を調べてもよい。

8.4.2 試験系

種差がないことや市販の測定キットが適用可能であることから、ヒト血液が使用される。精度の高い測定が可能であれば、全血、血漿、血清のいずれも選択可能である。

補体活性化の過程において、カルシウムやマグネシウムイオンが関与することが知られている。またヘパリンは補体の活性化を抑制する可能性も知られている。このため、ヒト全血や血漿を選択する場合には、使用する抗凝固薬を明確化し、医療機器に起因して生じる補体活性化を検出できることを確認して使用する。ヒト血清を使用する場合にも、試験試料以外の要因で補体活性が上昇することもある。いずれの試験系を用いる場合も、陰性対照や陽性対照、使用実績のある医療機器及び背景情報も踏まえたうえで試験結果を考察するのが望ましい。

8.4.3 接触形態

医療機器の形状による物理的影響ではなく、材料表面の化学的性質によって補体活性化が引き起こされると考えられている。したがって、必ずしも血流は必須でない。*In vitro* 静置下で、血液と医療機器を接触させて試験を実施することができる。

8.4.4 接触面積

補体を活性化させる材料においては、接触面積が大きくなるほど補体活性化産物が増加する。試験系との接触比率は、臨床を模擬することが望ましいが、困難な場合は可能な限り接触比率を高くするよう配慮する。ISO 10993-12 の接触条件を基に設定してもよい。

8.4.5 接触時間

補体の活性化は、医療機器と血液の接触初期で生じる。また時間とともに、補体をはじめとした血液成分の変性や活性化が進行することにより、バックグラウンドが高くなり医療機器に起因した補体活性化が高精度に検出できなくなる可能性がある。このため、接触時間を臨床にあわせて長くする必要はない、通常、30～90 分の間で設定される。

8.4.6 対照材料

試験には、必ず陰性対照及び陽性対照を設定して試験系の感度を明確にする。また無処置対照を設けてバックグラウンドを明確にする。

陰性対照材料にはポリプロピレンなど、陽性対照材料には Latex やアセチルセルロースなど、陽性対照物質としてはコブラ毒素が使用されている。

8.4.7 評価

試験試料における補体活性化の程度が無処置対照や陰性対照材料と同等又はそれ以下の場合、補体活性はないと判断される。一方で、無処置対照や陰性対照材料を上回る場合でも、生物学的には影響を与えないことがある。その影響を考察するため、同じ用途で臨床実績のある医療機器を同時に試験して結果を比較してもよい。

8.5 その他の情報

平成 26-28 年度医療研究開発推進事業費補助金／創薬基盤推進研究事業「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」の分担課題「プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発」において、国内溶血性試験の代替法として開発された簡易溶血性試験法⁹⁾は ASTM 及び NIH 法と同等以上の感度を有しており、国内 9 機関が参画したラウンドロビンテストにより再現性・頑健性が検証されている。家兎の飼育、Drabkin's 試薬の使用が不要であり、小スケールで試験を実施できるため、材料開発などにおける一次スクリーニング法として利用できる。

平成 27-29 年度医療研究開発推進事業費補助金／医薬品等規制調査・評価研究事業「革新的医療機器で用いられる医療材料の生体への安全性等の評価方法等に関する研究」の分担課題「材料表面吸着蛋白質を指標とした血栓性評価法の開発に関する研究」では、ビトロネクチン (VTNC) を 1 次マーカー、C3a 及び C1s を 2 次マーカーとして材料表面への吸着挙動を総合的に評価することにより、高分子材料の血液適合性を判断する方法が検討されている¹⁰⁾。各マーカーの再現性・頑健性は国内ラウンドロビンテストにより検証されているが、本項で示す医療機器の血液適合性のリスク評価としての有用性は検証されていない。

8.6 その他の留意事項

本項に掲載されている各種試験は、生物学的安全性評価のみでなく、その他の目的にも実施できる。生物学的安全性評価を目的とした試験は GLP に準拠した実施が求められる。ただし、「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」の 8 項に記載されているとおり、性能確認試験など、その他の目的で実施する場合は、必ずしも GLP 準拠が求められるものではないことに留意する必要がある。

9. 薬食機発 0301 第 20 号からの変更点

ISO 10993-4 が改訂され新たな内容が加わったこと及び実的にすることを目的に、全内容について見直した。主な変更点を以下の 3 項に分けて記載する。

9.1 血液適合性試験法に関する情報の追加や整理

循環血液と直接接触する医療機器では、直接的に血液と接触させて相互作用を評価することが原則であり、試験法は使用環境を考慮して選択されなければならない。使用環境や接触形態は医療機器により様々であるため、抽出液を用いた試験とは異なり、一つの試験デザインで全ての医療機器の血液適合性評価を網羅できる試験はほとんどない。一方で、医療機器又は研究機関ごとに適切な試験法が工夫して開発されてきた経緯があり、医療機器又は血液適合性の評価内容ごとに適切と考えられる試験法は数多く存在する。

本項では全ての試験法を提示することができないため、血液適合性の定義（1 項）、試験目的を明確化又は試験方法の特徴を参考情報などで提示し、適切な試験方法を設計・選択できるよう配慮している。また注記や補足事項を追加して試験方法に関して参考となる情報を提供している。

9.2 ISO 10993-4 の改訂に伴う変更

試験項目を適切に選択できるように 8.1 項に ISO 10993-4 Table.1 を抜粋して収載した。同表では、機械的因子起因の溶血の試験項目が明記されたことから、8.2.2 項に必要な情報を記載した。

また ISO 10993-4 では、一般的な評価方法が記載された。これと一致させるため、4 項の評価項目を変更した。

9.3 溶血性試験法の記載変更

(1) ASTM 法の採用について

本項では、ASTM 法を採用した。これは、多施設で試験法を検証した結果、ASTM 法の抽出液法で強い溶血性が認められたニトリルグローブについて、従来の国内試験法では、溶血率が低く、施設によっては陰性となる場合があったためである。なお、その他検討された試験試料の溶血率は、ASTM 法の抽出液法と同程度の結果であった。本項では、従来の国内試験法を標準的な評価方法から削除したが、これまで医療機器のリスク評価に使用されてきた実績もあり、一概にリスク評価に使用できないことを示すものではない。

(2) 抽出液法と直接接触法について

材料起因の溶血については、循環血液と直接接触する医療機器においては、直接接触法と抽出液法の双方を実施することを記載した。ISO 10993-4 では、直接接触法と抽出液法の実施についてまで言及されていないが、材料の溶血特性は抽出液のみでなく、材料表面との直接接触の両面から評価されるのが一般的となっている。

引用規格

- 1) ASTM F756-17, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials

参考文献又は国際規格

- 2) NIH. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. Report of a study group for the Artificial Kidney-Chronic Uremia Program NIAMDD-1977. Chapter two. In vitro characterization of hemodialyzers. *Artifi. Organs.* 1977,1(2) pp.59-77.
- 3) N.M.M. Moharram, R.EI Aouad, S. AI Busaidy, A. Fabricius, S. Heller, W.G. Wood,H.U. Wolf and C.C. Heuck. International collaborative assessment study of the AHD₅₇₅ method for the measurement of blood haemoglobin. *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol.12, No.6, 2006.
- 4) ISO 7199, Cardiovascular implants and artificial organs-Blood-gas exchangers (oxygenators)
- 5) ISO 5840-2, Cardiovascular implants-C
- 6) ardiac valve prostheses—Part 2; Surgically implanted heart valve substitutes
- 7) ISO 7198, Cardiovascular implants and extracorporeal systems-Vascular prostheses-Tubular vascular grafts and vascular patches.
- 8) ISO 25539-1, Cardiovascular implants- Part 1: Endovascular devices- Endovascular prostheses
- 9) ISO 25539-2, Cardiovascular implants- Part 2: Endovascular devices- Vascular stents
- 10) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* 102:1809-1816 (2014).
- 11) 植松美幸, 宮島敦子, 野村祐介, 葎島由二, 伊佐間和郎, 岩崎清隆, 梅津光生. 血液適合性評価法の開発. 「医療用バイオマテリアルの研究開発」, シーエムシー出版, 東京, 2017, p. 26-40.

付録

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

1. 試験試料／抽出溶媒比

試験試料の形状又は厚さにより、以下に示した試料／溶媒比を用いる。

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

2. 抽出温度・時間

- | | |
|------------|----------|
| (1) 121±2℃ | 1±0.1 時間 |
| (2) 70±2℃ | 24±2 時間 |
| (3) 50±2℃ | 72±2 時間 |
| (4) 37±1℃ | 72±2 時間 |

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

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

(1)以外の条件で抽出液を調製する際には、原則、攪拌・循環抽出を行うものとし、抽出完了後、遠心分離、フィルター濾過など、得られた抽出液に影響を与え得る追加処理は行わない。ただし、抽出温度が高い場合には、抽出液を試験に使用できる温度

にすることが必要になるため、抽出液中に析出物などが生じないことが確認できる条件下に限り、冷却処理を認めるものとする。また必要に応じて、抽出液の色調変化などを確認・記載すること。なお、各々の試験法において、抽出条件が定められている場合にはその方法に従って抽出液を調製すること。

3. 保存温度・時間

過度な冷却及び冷却保存においても析出物などが生じる可能性があるため、通常、抽出液は 25℃前後で保存し、24 時間以内に使用する。なお、個別の試験方法において、具体的な保存条件が記載されている場合は、その条件に従うこと。

4. 有機溶媒抽出の基本的考え方

ISO 10993-12:2012 の Annex D には、リスクアセスメントの一環としてのハザード特定を目的に、高分子材料を対象にした過酷な条件下での抽出方法が例示されている。高分子材料においてハザードとなりうる各種低分子物質の分析を目的とした抽出には有機溶媒が用いられていることを考慮して、Annex D では様々な極性、あるいは非極性有機溶媒の使用が推奨されている。またこれらにより得られた抽出物を用いることが適切と考えられる試験として、遺伝毒性試験、感作性試験が挙げられていることなどに鑑み、本ガイドンスでは、これらの試験において、原則、有機溶媒抽出による試験試料調製を求めている。