

医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方

1. 目的

本文書は、医療機器の市販前の安全性評価の一環として、生物学的有害作用（毒性ハザード）のリスク評価を行うための生物学的安全性評価に関する基本的考え方を示すものである。

2. 定義

本文書において用いられる用語の定義は以下によるものとする。

1) 原材料

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

2) 最終製品

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

3) ハザード

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

4) リスク

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

3. 公的規格の活用

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

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

4. 生物学的安全性評価の原則

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

5. 評価項目の選択

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

①医療機器の接触部位による分類

ア) 非接触機器 : 患者の身体に直接的にも間接的にも触れない医療機器

イ) 表面接触機器

○皮膚 : 健常な皮膚にのみ接触する医療機器

○粘膜 : 健常な口腔、食道、尿道などの粘膜器官に接触する医療機器

○損傷表面 : 傷ついた皮膚あるいは粘膜器官に接触する医療機器

ウ) 体内と体外とを連結する機器

○血液流路間接的 : 血管と一点で接触し、血管に薬液などを注入する医療機器

○組織/骨/歯質 : 組織、骨、歯髄又は歯質と接触する医療機器

○循環血液 : 循環血液と接触する医療機器

エ) 体内植込み機器

○組織/骨 : 主として組織又は骨と接触する医療機器

○血液 : 主として血液と接触する医療機器

②接触期間による分類

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

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

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

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

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

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

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

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

ある。

6. 試験法

- 1) ISO 10993 シリーズ中の各試験法ガイダンスには、それぞれの評価項目ごとに多様な試験法が並列的に記述されており、その中のどの試験法を選択すべきかについては、明確に規定されていない。ある評価項目に関して複数の試験法の中からどれを選択すべきかについては、目的とする医療機器の生物学的安全性評価の意義との関連において、試験の原理、感度、選択性、定量性、再現性、試験試料の適用方法とその制限などを勘案して決めるべきである。なお、細胞毒性試験、感作性試験及び遺伝毒性試験については以下の点に留意すること。

ア) 細胞毒性試験に関しては、ISO 10993-5 細胞毒性試験に、抽出液による試験法、間接接触法（寒天重層法、フィルター拡散法）、直接接触法が示されている。これらの試験法は、感度、定量性などが異なるため、リスク評価のためのハザード検出に当たっては、感度が高く定量性のある方法（例えば、抽出液による試験法）を用いる必要がある。一般的に、抽出液による試験法は感度が高く、すべての医療機器に適用可能であることから、抽出液による試験法を第一選択とし、半定量的あるいは定性的試験法を選択する場合にはその妥当性を説明する必要がある。

イ) 感作性試験及び遺伝毒性試験のハザード検出に当たっては ISO 10993-12 の抽出溶媒に関する規定や ISO 10993-3 及び ISO 10993-10 に記載されている抽出法を参照し、各材料に適したものであって、かつ抽出率の高い抽出溶媒を選択して医療機器の安全性を評価することが必要である。その際、抽出溶媒の種類や抽出条件によって試料溶液中の溶出物の濃度や種類が異なることから、結果が偽陰性を示す可能性があることに留意する。

- 2) 全ての医療機器について一律の試験法を定めることは合理的ではなく、特定の試験法を固守するよう求めるものではないが、選定した試験法から得られた結果が臨床使用上の安全性を評価するに足るものであると判断した根拠と妥当性を明らかにする必要がある。

7. 試験試料

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

代えることができる。

8. 動物福祉

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

表1 考慮すべき評価項目

下表は生物学的安全性評価項目選択のための原則である。

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

医療機器の分類	接触期間（累積）	生物学的安全性評価項目								
		細胞毒性	感作性	刺激性 / 皮内反応	急性全身毒性	亜急性全身毒性	遺伝毒性	発熱性	埋植	血液適合性
接触部位	A：一時的接触 (24時間以内) B：短・中期的接触 (24時間を超え 30日以内) C：長期的接触 (30日を超える)									
非接触機器										
表面接触機器	皮膚	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○					
	粘膜	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○		○	○		
	損傷表面	A	○	○	○					
		B	○	○	○					
		C	○	○	○		○	○		
体内と体外とを連結する機器	血液流路間接的	A	○	○	○	○			○	○
		B	○	○	○	○			○	○
		C	○	○		○	○	○	○	
	組織/骨/歯質	A	○	○	○					
		B	○	○	○	○	○	○		○
		C	○	○	○	○	○	○		○
	循環血液	A	○	○	○	○			○	○
		B	○	○	○	○	○	○	○	○
		C	○	○	○	○	○	○	○	○
体内植込み機器	組織/骨	A	○	○	○					
		B	○	○	○	○	○	○		○
		C	○	○	○	○	○	○		○
	血液	A	○	○	○	○	○		○	○
		B	○	○	○	○	○	○	○	○
		C	○	○	○	○	○	○	○	○

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

医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス

目次

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

第1部 細胞毒性試験

1. 適用範囲

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

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

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

2. 引用規格

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

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

3. コロニー形成法による細胞毒性試験

3.1 目的

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

3.2 試験の要約

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

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

3.3.1 試験試料

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

明らかにする。

3.3.2 対照試料

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

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

抽出法用：高密度ポリエチレンシート（検定済みのもの。4.6項参照）

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

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

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

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

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

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

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

陽性対照物質：ZDBC（例えば和光純薬、1級）

3.4 滅菌

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

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

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

滅菌後の試料は、無菌的に取り扱う。

3.5 細胞株及びその取扱い

3.5.1 細胞株

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

①L929細胞：CCL 1 (NCTC clone 929)

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

③V79細胞：JCRB0603 (V79)

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

3.5.2 培地（培養液）

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

3.5.3 細胞の取扱い

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

3.6 抽出法によるコロニー形成法

3.6.1 抽出溶媒

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

3.6.2 抽出条件

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

3.6.3 抽出操作

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

割合で加える（4.7項参照）。

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

3.6.4 試験操作

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

3.6.5 観察

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

5) IC₅₀ 値を細胞毒性強度の指標とする。

3.6.6 試験成立条件

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

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

- 5) 必要に応じて、陽性対照物質 (ZBC) 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 (4.7 項参照)。

3.6.7 評価

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

3.7 直接接触法によるコロニー形成法 (4.4 項参照)

3.7.1 試料調製

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

3.7.2 試験操作

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

3.7.3 観察

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

3.7.4 試験成立条件

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

陰性対照材料でのコロニー形成率：80%以上

陽性対照材料Bでのコロニー形成率：10%以下

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

3.7.5 評価

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

3.8 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

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

4. 参考情報

4.1 細胞毒性試験の位置づけ

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

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

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

4.2 各種細胞毒性試験法の特徴

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

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

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

培地抽出液を用いる抽出法は最も一般的に行われている方法である。無血清

MEM 培地を用いて $6 \text{ cm}^2/\text{mL}$ 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 2 を示し、細胞毒性は合格判定となる。同材料を 5~10% 血清含有培地で抽出した溶液の場合には、スコア 4 を示し、細胞毒性は不合格となる。蒸留水を用いて $6 \text{ cm}^2/\text{mL}$ 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。更に、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出来なかった。蒸留水や無血清培地では、オリゴマーや添加剤のような物質は溶出されにくいこと、また、化合物によっては高温で分解されることが検知できない原因として考えられる。したがって、通常は、血清を 5~10% 含有する培地で抽出した溶液を細胞毒性試験用抽出液として試験する。また、抽出液を試験する時の細胞密度や判定方法により、検出感度や精度が異なるが、採用する試験法の妥当性を明らかにすることができれば、どの方法で試験を行ってもよい。

4.3 掲載試験法選択背景

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

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

4.4 直接接触法の実施とその注意点

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

4.5 陽性対照材料

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

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

4.6 陰性対照材料及び陽性対照材料の入手先

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 総務部 対照材料担当

電話 0463-82-4751、 FAX 0463-82-9627

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

4.7 陽性対照物質及び陽性対照材料の IC₅₀ 値

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

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

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

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

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

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

4.8 抽出に用いる培地の種類

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

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

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

4.9 培地以外の抽出溶媒

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

4.10 細胞毒性強度と組織刺激性との相関

細胞毒性強度を示すIC₅₀(%)値と種々の生体組織での刺激性強度との関係を図1に示す。ZDECを種々の濃度で含む対照材料をこのガイドンスに従って抽出し、

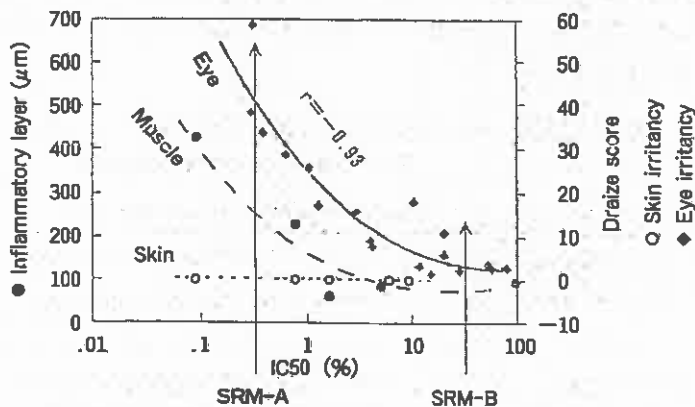


Figure Comparison of cytotoxic potentials with the potentials of *in vivo* responses of muscle inflammation, eye, and skin irritancy.

図1 材料の細胞毒性強度と異なる組織での刺激性との関係

値が5%近辺以下の材料で炎症反応がおきた。一方、健常皮膚では、0.1%の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。

Balb/3T3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

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

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

4.11 コロニー形成までの培養期間

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

4.12 染色液

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

4.13 結果の評価

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

5. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

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

6. 参考文献

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

第2部 感作性試験

1. 適用範囲

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

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

2. 引用規格

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

3. 試験試料と試験法の選択

3.1 原則

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

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

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

以上のとおり、各試験法にはメリット、デメリットが存在し、いずれの試験法

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

3.2 試験試料・試験液の調製と試験法の選択

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

3.2.1 金属又はセラミックス

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

3.2.2 水又はアルコールに溶解するもの

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

3.2.3 低分子有機化合物

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

3.2.4 ポリマー樹脂

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

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

有機溶媒としては、通例、メタノール又はアセトンを用いる。ただし、①溶媒

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

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

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

1) 第1法(抽出物【残留物】を用いる方法)

抽出液からロータリーエバポレーターを用いて可及的に低温下で溶媒を留去して残留物を得、これらの残留物を植物油、DMSO又は蒸留水に溶解又は均一分散させて試験液として感作性試験を実施する。これらに溶解せずアセトンに溶解する場合は、アセトンに溶解させた後、その溶液を植物油又はDMSOに混ぜながらアセトンを揮散させて分散させるのもよい方法である。局所適用濃度は、感作の成否の重要な因子であることから、投与濃度は結果に悪影響を与えない範囲で可能な限り高くすることが望ましい。したがって、抽出物の投与濃度は一般的に10%を目安とし、実際に試験に使用した濃度の設定理由を説明すること。

2) 第2法(抽出液を用いる方法)

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

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

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

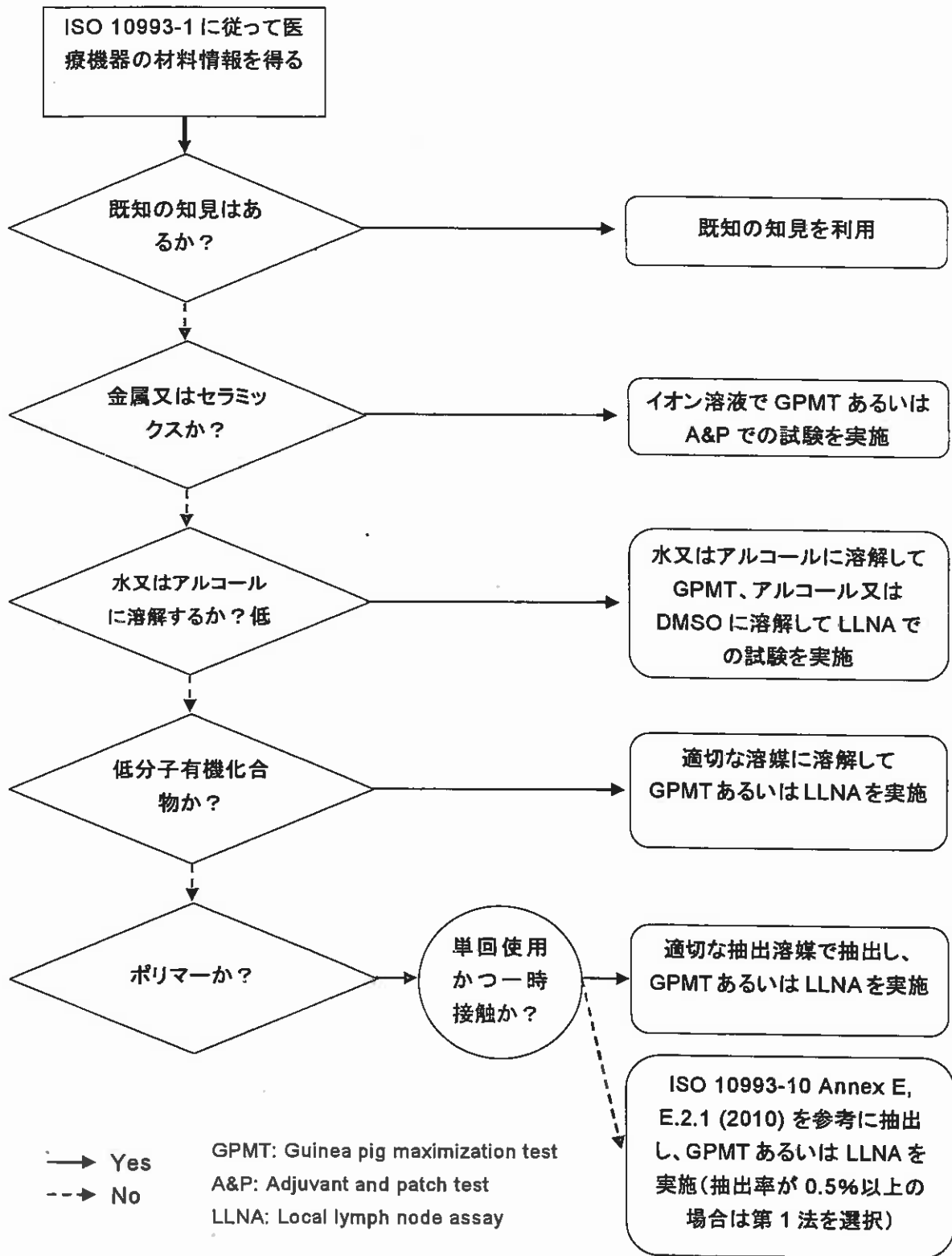


図1 試験試料と試験法選択のフローチャート

4. GPMT

4.1 試験法

4.1.1 試験動物と動物数

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

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

4.1.2 群構成及び陽性対照物質

試験群と陰性対照群、陽性対照群を設定する。惹起濃度を複数設定できる場合には試験群を1群とし、陰性、陽性対照群の3群を設定する。また、試験液を希釈あるいは濃縮して濃度を複数設定できる場合には最低3群を設定し、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) 蒸留水と Freund 完全アジュバント (FCA) の1:1の油中水型 (W/O) 乳化物 (E-FCA)
- (b) 各試料液（試験液、陽性対照液、陰性対照（溶媒）液）
- (c) (b)の試料液（(b)の2倍濃度）とFCAとの等量乳化混合物

2) 二次感作

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

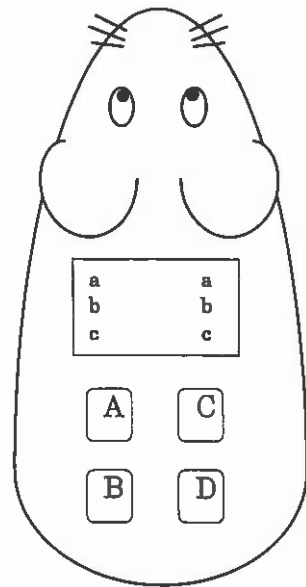




図2 皮内注射及び貼付による感作誘導部位と惹起貼付部位

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

4.1.4 惹起

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

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

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

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

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

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

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

4.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

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

第1法の総括表の例 (抽出率 0.5%)

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

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) ×100

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

*4 抽出物の重量を測定し、投与用媒体に希釈して調製

第2法の総括表の例 (抽出率 0.1%)

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

*1 観察時間は、貼付物除去後24時間と48時間

*2 (陽性動物数/当該群の動物数) ×100

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

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

5. A&P

5.1 試験法

5.1.1 試験動物と動物数

4.1.1と同様に動物を選択し、準備する。

5.1.2 群構成及び陽性対照物質

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

陽性対照物質は、4.1.2に従って適切な物質を選択する。

5.1.3 感作

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

5.1.4 惹起

上記適用後2週間目に、4.1.4と同様に適用する。

5.1.5 評価

惹起後、4.1.5に従って評価する。

5.2 試験報告書

4.2項参照。

6. LLNA

6.1 試験法

6.1.1 試験動物と動物数

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

6.1.2 群構成及び陽性対照物質

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

6.1.3 感作

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

6.1.4 放射性物質の投与

初回投与から6日後マウスの体重を個別に測定、記録した後、最後の感作

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

6.1.5 測定試料の調製

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

6.1.6 放射活性測定

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

6.1.7 反応性評価

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

陽性対照のSIは3以上でなければならない。

6.2 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

7. 参考情報

7.1 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

の改訂内容を盛り込み、主として以下の改正を行った。

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

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

7.2 試験法の選択

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

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

7.3 抽出率による試験法の選択

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

7.4 試験液の調製溶媒について

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

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

7.5 試験動物について

試験動物の選択に当たっては感受性の高い動物を用いることが原則である。

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

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

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

7.6 LLNA の試験方法について

7.6.1 感作について

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

7.6.2 放射性物質の投与

^{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} M を含有する PBS を 250 μ L 尾静脈から投与する。

7.6.3 測定試料の調製例

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

7.6.4 放射活性測定

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

7.6.5 反応性評価

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

7.6.6 他の LLNA

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

7.7 皮膚反応の採点基準について

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

7.8 感作性の強さの評価について

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

8. 引用文献

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

9. 参考文献

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

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

第3部 遺伝毒性試験

1. 適用範囲

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

2. 引用規格

- 2.1 ISO 10993-3:2003, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- 2.2 OECD 471, Bacterial Reverse Mutation Test
 - OECD 473, *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
 - OECD 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
 - OECD 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test
 - OECD 476, *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test
 - OECD 487, *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test
- 2.3 平成 11 年 11 月 1 日付け医薬審第 1604 号「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」

3. 試験の適用

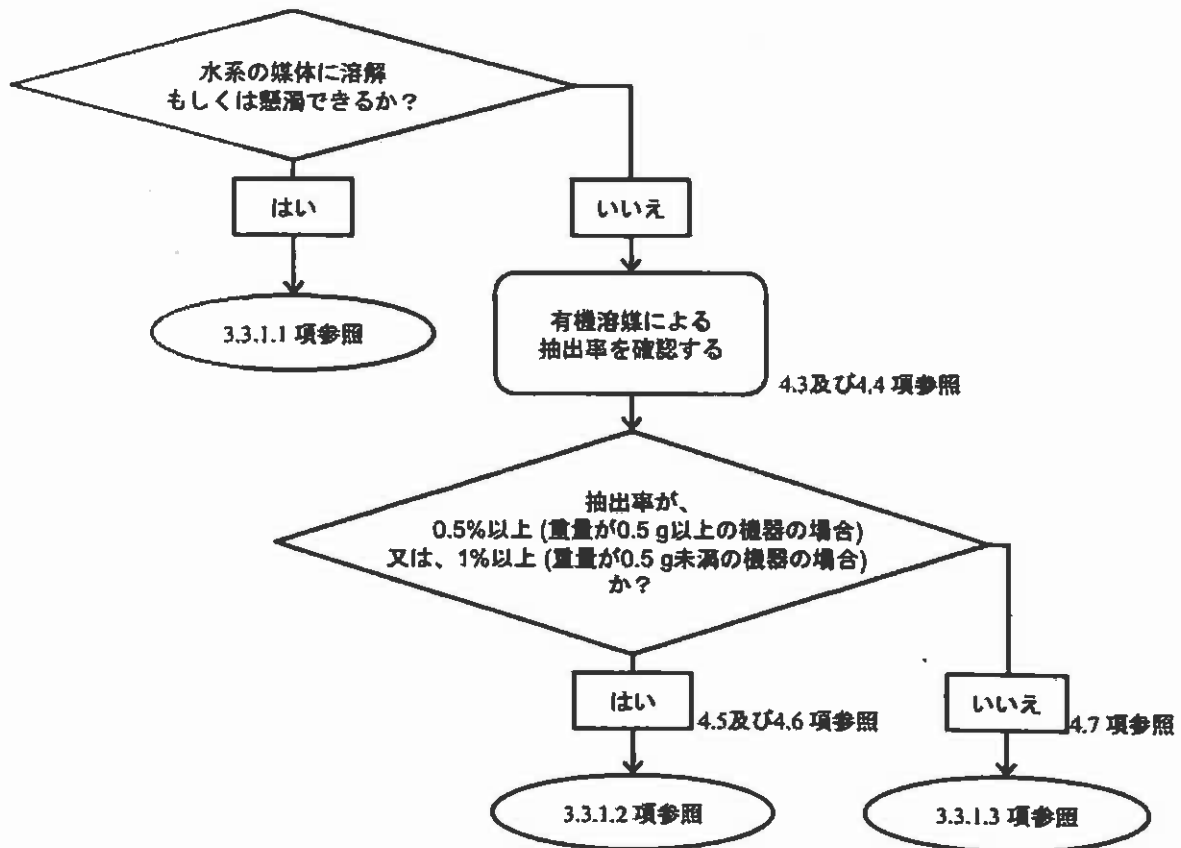
- 3.1 試験試料は最終製品又は原材料である。ただし、試験試料に含まれる原料化学物質、添加剤などについて遺伝毒性に関する安全性が確認されており、含まれる原料化学物質の相互作用などにより未知物質が生成される可能性が低い場合は、これら試料の試験を実施する必要はない。その場合、その科学的妥当性を明らかにする必要がある。
- 3.2 文献又は既存データなどにより遺伝毒性に関する安全性が確認できない場合は、引用規格に示したガイドラインなどを参照し、以下の試験の実施を基本とする（4.2項参照）。
 - 1) 細菌を用いる復帰突然変異試験
 - 2) 培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験、又はマウスリ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

3.3 試験液の調製

3.3.1 有機材料の場合

試験試料（最終製品又は原材料）の材質、性状、溶解性などの物理化学的特

性を考慮して、以下の手順により試験に適用するための試験液を調製する。



- 3.3.1.1 水系の媒体に溶解もしくは懸濁できる試験試料は、媒体（水・生理食塩液・血清含有培養液など）に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。
- 3.3.1.2 水系の媒体に溶解又は懸濁できないが、有機溶媒により抽出物が得られる試験試料は、メタノール及びアセトンによる抽出率を確認する（4.3、4.4 項参照）。メタノール又はアセトンによって抽出物が得られる場合（4.5、4.6 項参照）は、より抽出率の高い溶媒を用い、細切した試験試料にその重量の10倍容量の溶媒を添加し、室温で24時間攪拌して抽出液を調製する。溶媒を留去し、必要量の抽出物を得、抽出物は試験系に適切な媒体に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。
- 3.3.1.3 水系の媒体に溶解せず、有機溶媒でも抽出物が得られない試験試料は（4.7 項参照）、復帰突然変異試験においてはジメチルスルホキシド (DMSO) による抽出液を、染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験においては血清含有培養液による抽出液を用いて試験を実施する（4.3 項参照）。

1) 復帰突然変異試験

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

添加して試験を実施する。

2) 染色体異常試験、小核試験、マウスリンフォーマ TK 試験

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

3.3.2 無機材料の場合

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

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

3.3.3 原材料化学物質の場合

適切な溶媒に溶解又は懸濁して試験に供する。

3.4 判定及び評価

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

3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

9) 参考文献

4. 参考情報

4.1 背景

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

4.2 試験法の選択

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

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

4.3 抽出溶媒

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

4.4 抽出率（試験試料の重量に対する試験試料から得られる抽出物量の割合）

メタノール及びアセトンによって試験試料から得られる抽出物量に関する情報がない場合は、3.3.1.2に従って抽出率を求める。抽出率が0.5%以上（又は1%以上）と、0.5%未満（又は1%未満）の場合では、試験液の調製法が異なる。ここで、抽出率0.5%は最終製品重量が0.5g以上の医療機器に、抽出率1%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、又はソックスレーフラスコなどを用いて抽出残量を測定して求める。

4.5 「抽出物が得られる場合」の判断

医療機器（最終製品）の重量0.5g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0.5%以上（医療機器の重量が0.5g以上の場合）又は抽出率が1%以上（医療機器の重量が0.5g未満の場合）の場合とする。0.5%又は1%という抽出率の限界値は、試験に必要な抽出物量を得るための試験試料の量から設定したものである。

4.6 抽出物量

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

4.7 「抽出物が得られない場合」の判断

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

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

5. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

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

6. 参考文献

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

第4部 埋植試験

1. 適用範囲

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

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

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

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

2. 引用規格

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

3. 一般的注意事項

3.1 試験法

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

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

3.2 試験試料及び対照材料

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

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

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

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

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

3.3 埋植部位

- 3.3.1 埋植部位は臨床適用部位に近い組織とする。本試験法では、例として筋肉内、皮下及び骨内埋植試験法について記載しているが、これ以外の組織・器官に臨床適用される場合は、その組織・器官の起原、構成組織、細胞種などを総合的に勘案して、例として挙げた組織のいずれか又は複数を選択する。また、新たな組織への標準的な試験法が ISO 10993-6 などで明らかとなった場合は、それを示した上で、採用することができる。文献などで明らかとなった方法を採用する場合は、その妥当性を示した上で、十分なサンプル数（1埋植期間について10箇所以上）の観察を行う設計とする。
- 3.3.2 局所への影響を確認する場合、動物の個体差の指標とするため、原則として対照材料と試験試料は同じ個体に埋植する。
- 3.3.3 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、予め試験計画立案の際に全身毒性を評価できるよう、血液学的、血液生化学的、病理組織学的検査などを計画する。対照材料と試験試料を同一の動物に埋植すると全身毒性の評価が困難となることから、試験試料埋植群と対照群は別々に設定する。また、複数の材料を同一動物に埋植しても、全身毒性の評価は困難となる。ただし、複数の部材から構成される医療機器の埋植試験を設計する場合は、複数の部材を同一動物に埋植することで、臨床適用を模擬することが可能となる。

3.4 埋植期間

- 3.4.1 埋植期間は、臨床適用期間を超える必要はないが、ヒトにおける埋植反応を予測し得る期間とする。吸収・分解性の材料でない場合、埋植初期の反応、埋植中期の埋植試料と生体界面の組織反応、そして安定化（すれば）した場合の反応を評価することが望ましい。複数の期間を観察して安定化することが明らかであった場合は、それ以上の期間の埋植群を省略することを検討する。ただし、試験計画を立案する際には、短中期の試験を予め行った上で長期埋植を計画するなど、動物愛護の観点から動物数を減らすことを検討する。
- 3.4.2 短期の埋植を1週から4週とし、長期埋植は12週を超える期間とする。また、その間を中期埋植とする。生体適合性の高い材料の場合、短期において、埋植後2週間程度は埋植手術の影響が残るが、対照材料と比較することにより、試料に起因する炎症反応を区別して観察することができる。また、器質化や新生骨の形成は埋植後2週間程度でも開始されており、生体適合性に関する情報が多く得られる。埋植後4週には、すでに安定化する場合が多い。中期では、周囲組織の多くは埋植前の状態に近づいており、界面や周囲はおおむね安定化し、その後の長期における反応を推測するための時期である。長期では、周囲組織は正常組織と同様となり、界面は非常に薄い被膜や新生骨で覆われ安定化する。
- 3.4.3 吸収・分解性材料の場合は、その過程で様々な物質が細粒化又は溶出するなどして、埋植局所は初期とは異なる環境となるため、分解過程を評価し得る埋植期間を設定する。ただし、数年にわたって分解するなど動物試験では分解時間が長期間にわたるため評価できない材料の場合、材料の分解過程がその期間中同様に推移し、局所への影響が最小限であれば、代表的な期間を評価すること

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

3.5 試験動物

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

表1 長期埋植における動物種の選択

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

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

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

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

3.5.4 各埋植期間終了後、動物を適切な方法で安楽死させる。

3.6 埋植方法

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

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

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

があると判断し、埋植法などを再検討する。

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

3.7 観察

3.7.1 肉眼的観察

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

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

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

3.7.2 組織学的観察

- 3.7.2.1 埋植組織及び埋植周囲リンパ節（肉眼的に異常が見られた場合）を、直ちに固定液に浸す。一般的には10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、固定完了後、切り出し、パラフィン包埋、薄切を行う。ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光学顕微鏡下で観察する。必要に応じて、その他の固定法、包埋法及び染色方法を採用してもよい。

- 3.7.2.2 薄切片の作製に際し、ミクロトームによる薄切が可能な柔らかい試料の場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷せず、界面の観察が可能となる。

- 3.7.2.3 試料が硬い場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷する恐れがあるため、固定（脱灰）後に引き抜く、適当な溶媒で溶解させるなど、試料を除去し、組織損傷がないことを確認した後、薄切することを検討する。

- 3.7.2.4 試料が硬く有機溶媒などにも不溶である、多孔性であるなど、引き抜く際に

界面の周囲組織を破壊してしまうおそれがある場合は、埋植部位全体を樹脂包埋し、研磨標本作製する。一般的にギムザ染色やトルイジンブルー染色が用いられる。骨内埋植の場合、在来骨又は新生骨と試料の界面が重要な観察ポイントであり、研磨標本作製により、界面の保存が容易となる。また、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、骨組織を脱灰後、試料を引き抜くなどしてパラフィン包埋し、薄切標本作製・観察する。

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

3.8 評価

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

である。

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

3.9 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

表2 埋植局所の組織学的観察ポイント

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

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

4. 筋肉内埋植試験法

4.1 試験試料の大きさ

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

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

4.2 試験動物と埋植部位

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

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

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

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

4.3 埋植方法

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

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

4.3.3 筋線維方向に並行するよう各試料を埋植する。

4.3.4 埋植箇所は 25 mm 程度の間隔を開ける。

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

4.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

4.5 評価方法

3.8 項参照。

4.6 試験報告書

3.9 項参照。

5. 皮下埋植試験法

5.1 試験試料の大きさ

- 5.1.1 シート状の場合は、厚み 0.3~1.0 mm、直径約 10~12 mm の円板状とする。
- 5.1.2 直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm として、断端を丸く加工したものでよい。
- 5.1.3 非固形試料の場合は、直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm のチューブに充填する。チューブに充填した量を記録すること。
- 5.1.4 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

5.2 試験動物と埋植部位

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

5.3 埋植方法

5.3.1 背部皮下に埋植する場合

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

5.3.2 頸部皮下に埋植する場合

- 5.3.2.1 マウスを用いる場合は、全身麻酔下で腰部を切開して、頸部までゾンデなどを用いて皮下を鈍性分離して皮下トンネルを作製し、1個の試料を頸部皮下に埋植する。
- 5.3.2.2 ラットの場合は、全身麻酔下で両側の頸部に皮下トンネルを作製して埋植する。体幹、後肢に埋植してもよい。
- 5.3.2.3 切開部位を非刺激性の縫合糸で縫合するとともに、皮下トンネルを通して試料が移動しないよう、縫合しておく。

5.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を3.4項に従って設定する。

5.5 評価方法

3.8項参照。

5.6 試験報告書

3.9項参照。

6. 骨内埋植試験法

6.1 試験試料の大きさ

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

6.2 試験動物と埋植部位

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

6.3 埋植方法

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

6.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

6.5 評価方法

3.8 項参照。

6.6 試験報告書

3.9 項参照。

7. 参考情報

7.1 試験法の選択

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

7.2 滅菌法

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

7.3 陽性対照材料

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

また、骨内埋植試験の場合は、純ニッケルを用いることができる。

7.4 埋植期間による組織像の変化

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

7.5 埋植周囲リンパ節の変化

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

7.6 組織反応について

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

8. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

構成及び内容を全面的に見直したが、要点は以下のとおり。

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