

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

#### 9. 引用文献

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

#### 10. 参考文献

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

## 第5部 刺激性試験

### 1. 適用範囲

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

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

### 2. 引用規格

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

### 3. 皮内反応試験

#### 3.1 目的

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

#### 3.2 試験の要約

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

#### 3.3 試験液の調製

##### 3.3.1 抽出溶媒

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

##### 3.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

##### 3.3.3 抽出条件

原則として、付録2の規定に従うものとする。抽出液の保存温度条件は付録

3の規定に従うものとする。

#### 3.3.4 操作方法

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

#### 3.3.5 対照液の調製

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

### 3.4 試験法

#### 3.4.1 試験動物

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

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

#### 3.4.2 投与液量

試験液及び対照液の投与液量は、原則として1ヶ所当たり0.2 mLとする。

#### 3.4.3 投与経路及び投与期間

背部皮内投与を1回行う。

#### 3.4.4 投与部位

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

#### 3.4.5 観察

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

#### 3.4.6 評価

観察結果より組織傷害性と炎症誘発性を評価する（6.5項参照）。

図1 投与部位 (例)

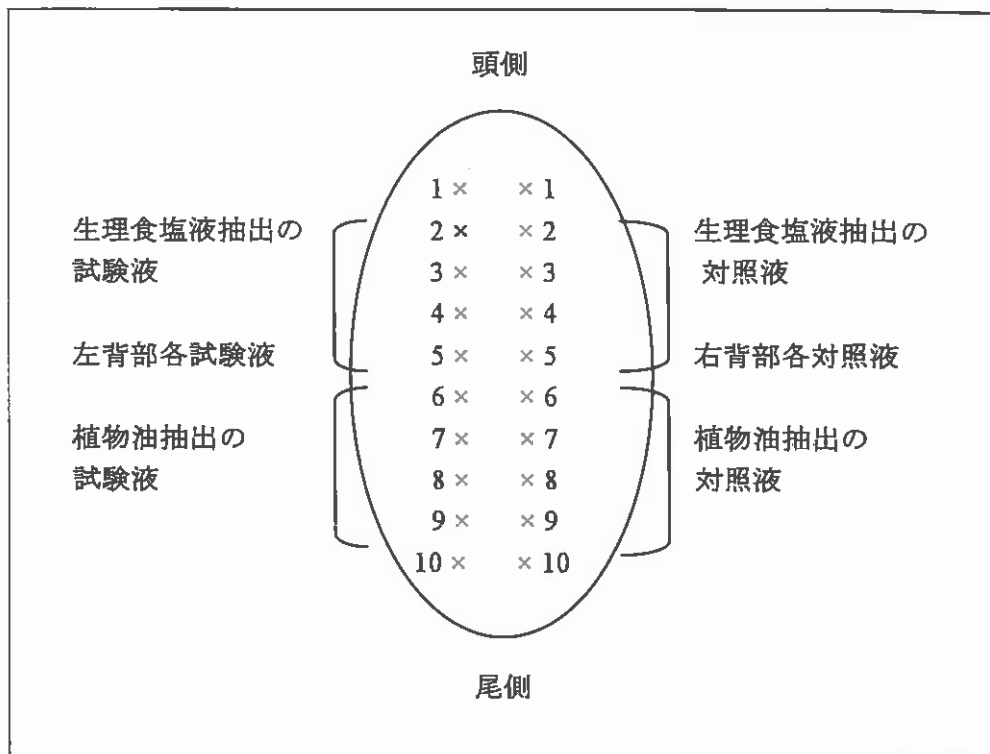


表1 皮膚 (皮内) 反応の評点付けシステム(ISO 10993-10, 6 Irritation tests)

紅斑及び痂皮の形成

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

[最高点 4 点]

浮腫の形成

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

[最高点 4 点]

[紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点 8 点]

投与部位に見られた他の有害作用も記録及び報告すること。

### 3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

## 4. 皮膚刺激性試験

### 4.1 目的

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

### 4.2 試験の要約

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

### 4.3 試験液の調製

3.3 項に従う。

### 4.4 試験法

#### 4.4.1 試験動物

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

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

#### 4.4.2 投与液量

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

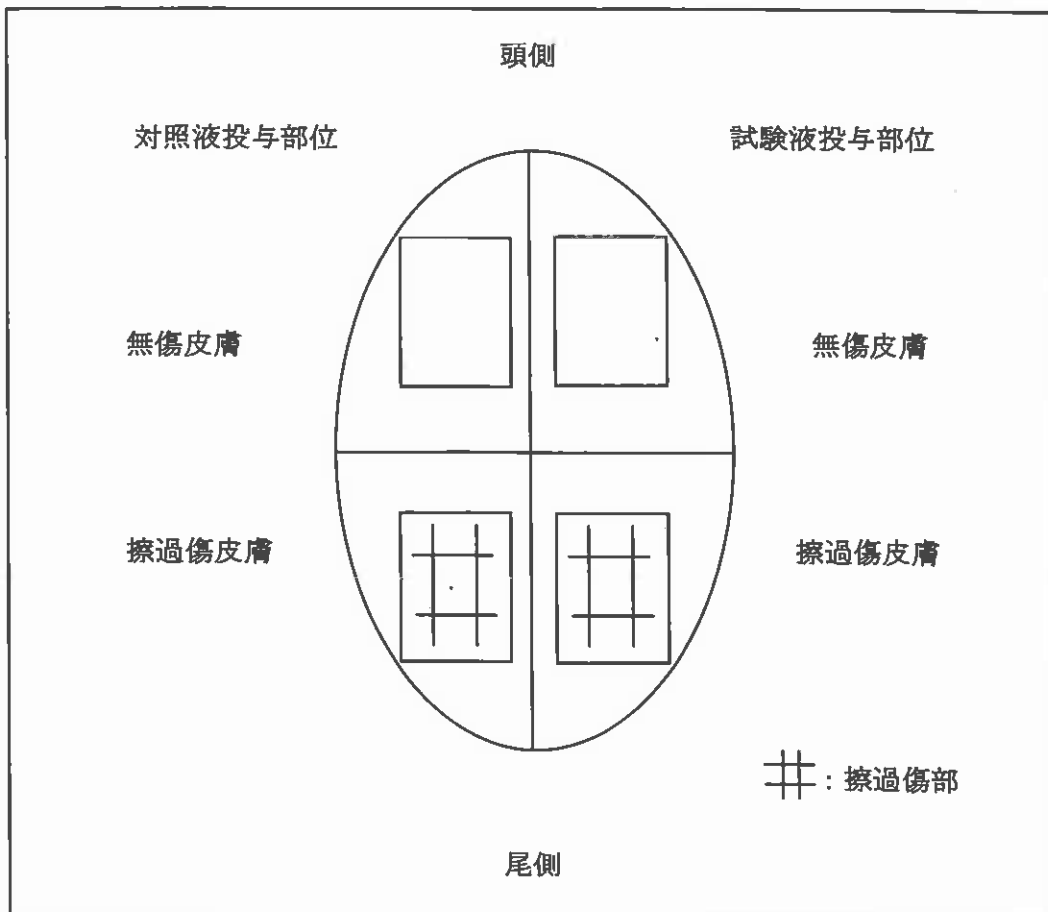
4.4.3 投与経路及び投与期間

塗布による投与を1回行う。

4.4.4 投与部位

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

図2 皮膚刺激性試験(例)ウサギ背部図



4.4.5 観察

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

体重は、投与日及び観察終了日に測定し、記録する。

#### 4.4.6 評価

観察結果より組織傷害性と刺激性を評価する（6.5項参照）。  
 擦過傷皮膚の部位は感染を受けやすいことから、感染により一次刺激性と同様の発赤や浮腫を起こす可能性がある。感染が疑われる場合には、新たな動物で試験を実施すると共に、試験試料の無菌試験を実施する。

#### 4.5 試験報告書

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

### 5. 眼刺激試験

#### 5.1 目的

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

#### 5.2 試験の要約

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

#### 5.3 試験液の調製

3.3項に従う。

#### 5.4 試験法

##### 5.4.1 試験動物

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

##### 5.4.2 試験方法

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

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

### 5.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

表：投与日及び観察終了日の個別体重  
個々の動物の眼反応結果（評点のスコア）  
個々の動物の結果は、表 2 の様な表形式にした全データを添付することが望ましい。

写真：前眼部の状態（刺激性陽性反応がみられた場合）

- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

## 6. 参考情報

### 6.1 コンタクトレンズの眼装用試験

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



## 6.2 試験液の調製

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

## 6.3 動物種

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

## 6.4 動物の毛刈り

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

## 6.5 判定方法

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

## 6.6 試験液の接触時間

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

## 6.7 フルオレセインナトリウム溶液の点眼

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

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

#### 6.8 眼刺激の評価基準

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

#### 6.9 試験動物の福祉

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

#### 7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

#### 8. 参考文献

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

表2 眼の刺激性反応結果の記載例

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

付表1 ISO 10993-10の眼病変の評点付けシステム

<b>I 角膜</b>	
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
<b>II 虹彩</b>	
正常	0
皺襞形成亢進、充血、腫脹、角膜周囲の充血 (いずれか1つ、あるいは全て、若しくは組み合わせ) が見られるが、対光反射は認められる (緩徐反応陽性)	1*
対光反射消失、出血、広範囲の破壊 (いずれか1つ、あるいは全て) が見られる	2*
<b>III 結膜</b>	
<b>A 発赤 (角膜及び虹彩を除く眼瞼、眼球結膜)</b>	
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>B 結膜浮腫</b>	
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*
<b>C 分泌物</b>	
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 2mm 又はそれ以上にあらゆる方向から角膜内に侵入する。

角膜染色

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

前房

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

#### 虹彩

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

#### 結膜充血

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

#### 結膜浮腫

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

#### 分泌物

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

## 第6部 全身毒性試験

### 1. 適用範囲

本ガイダンスは、医療機器又は原材料の全身毒性を評価するためのものである。

### 2. 引用規格

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

### 3. 用語及び定義

引用規格に記載されている以下の定義を用いる。

#### 3.1 急性全身毒性

試験検体の単回、又は継続的暴露後 24 時間以内に生じる毒性作用。

#### 3.2 亜急性全身毒性

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

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

#### 3.3 亜慢性全身毒性

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

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

#### 3.4 慢性全身毒性

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

注：慢性全身毒性試験は、通常、6～12 ヶ月間の期間で実施される。

### 4. 急性全身毒性試験

#### 4.1 目的

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

#### 4.2 試験の要約

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

#### 4.3 試験液の調製

##### 4.3.1 抽出溶媒

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

##### 4.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

##### 4.3.3 抽出条件

原則として、付録2の規定に従うものとする。

##### 4.3.4 操作方法

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

##### 4.3.5 対照液の調製

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

#### 4.4 試験法

##### 4.4.1 試験動物

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

##### 4.4.2 投与液量

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

##### 4.4.3 投与経路

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

##### 4.4.4 観察及び測定項目

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



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

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

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

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

#### 4.4.5 判定方法

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

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

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

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

#### 4.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

表：一般状態、死亡率（必要に応じて）、体重集計、病理検査集計

写真：病理解剖学的検査（毒性学上問題と考えられる所見が認められた場合のみ）

## 8) 結果の評価と考察

## 9) 参考文献

## 5. 反復投与による全身毒性試験（亜急性・亜慢性・慢性全身毒性試験）

## 5.1 目的

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

## 5.2 試験の要約

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

## 5.3 試験液の調製

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

## 5.4 試験法

## 5.4.1 試験動物

原則としてラットを用いるが、全身毒性試験の動物として適切であるならば、他の動物種を用いてもよい。また、基本的に雌雄の動物について試験を行い、片性で行う場合は一用量当たりの動物数を増やす。動物数は表 1 を参考とする。投与開始時の体重の幅は平均体重の±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 <sup>a</sup>	5	3
亜急性全身毒性試験	10（雌雄各5） <sup>a</sup>	6（雌雄各3） <sup>a</sup>
亜慢性全身毒性試験	20（雌雄各10） <sup>a</sup>	8（雌雄各4） <sup>a</sup>
慢性全身毒性試験	40（雌雄各20） <sup>b, c</sup>	<sup>c</sup>

a 雌雄いずれかの性で試験を実施してもよい。その医療機器がいずれかの性に臨床使用されるものならば、試験はその性の動物で実施するのがよい。

b 一つの用量群で構成される試験において推奨される動物数。過剰投与の用量群を追加する場合には、各用量群当たり雌雄各10匹まで減らしてもよい。

c 試験動物数は、その試験が意義あるデータを提供するための必要最低限の数とする。動物評価期間の終了時に、試験結果の統計学的評価に十分な数の動物が残るよう設定しなければならない。

## 5.4.2 投与液量

ラット静脈内反復投与による試験の場合、試験液の投与液量は、原則として、試験動物の体重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曝露量から十分に安全率を見込んだものである必要がある（6.6項参照）。

## 5.4.3 投与経路及び投与期間

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

## 5.4.4 観察及び測定項目

表2と、引用規格のAnnex C、D及びEなどを参考に設定する。

表2 全身毒性試験の観察項目

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

a 慢性全身毒性試験は、通常、亜慢性全身毒性試験の期間延長であり、その期間は臨床曝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つて、一群当たりの動物数が増えることもありうる。

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

### 5.5 試験報告書

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

## 6. 参考情報

### 6.1 急性全身毒性試験の観察期間

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

### 6.2 急性全身毒性試験の投与液量及び投与速度

急性全身毒性試験の投与液量は、十分な実績を持つ米国薬局方<sup>1)</sup>及び ASTM Standard F 750-87<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>。原則として、試験動物の体重 1 kg 当たり試験液、対照液とも、マウスの静脈内及び腹腔内投与にあつては 50 mL、ラットの場合は、静脈内投与 40 mL、腹腔内投与では 20 mL とする（引用規格 Annex B 参照）が、試験試料の臨床使用形態などにより、十分な安全係数を確保した投与液量を一回で投与する事が不可能な場合には、24 時間を超えない期間で分割して投与してもよい。投与経路や投与液量、投与の間隔を変更する場合、その科学的根拠を示すことが必要である。また急性全身毒性試験の投与速度は特に静脈内投与において試験成績に影響を与える因子の一つである。静脈内投与にあつては、投与速度は 1 分間につき 2 mL を下回るものとする。

### 6.3 急性全身毒性の評価について

体重変化は全身毒性評価の重要な目安となる。米国薬局方<sup>1)</sup>のマウスを用いた急性全身毒性試験の基準では、5 匹中 3 匹以上の個体に 2 g 以上の体重減少を認めた場合、不適合（全身毒性有り）と判定する規定がある。OLAW ガイダンス<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>の面から、これらの症状を最低限の humane endpoints と考え、該当する動物は安楽死させるなどの対応が望ましい。

### 6.4 埋植試験の利用

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

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

#### 6.5 急性全身毒性試験の試験動物及び代替

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

#### 6.6 反復投与における投与液量

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

#### 6.7 投与期間及び観察期間

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

#### 6.8 試験液の調製

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

### 7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

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

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

### 8. 引用文献

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

Test

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

## 第7部 発熱性物質試験

### 1. 適用範囲

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

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

### 2. 引用規格

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

### 3. 発熱性物質試験

#### 3.1 目的

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

#### 3.2 試験の要約

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

#### 3.3 試験液の調製

##### 3.3.1 抽出溶媒

抽出には、生理食塩液（日局）を用いる。

##### 3.3.2 抽出溶媒と試験試料量の比

原則として、付録1の規定に従うものとする。

##### 3.3.3 抽出条件

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

### 3.3.4 試験液の取り扱い

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

## 3.4 発熱性物質試験法（5.6項参照）

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

### 3.4.1 試験動物（5.8項参照）

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

### 3.4.2 装置及び器具（5.9項参照）

温度計は、測定精度 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 以内の直腸体温計又は体温測定装置を用いる。試験に用いるガラス器具、容器、注射筒、注射針などは、あらかじめ250℃で30分以上加熱して、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 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に加温し、試験動物の耳静脈に緩徐に注射する。ただし1匹への注射は10分以内に完了させる。低張な試験液には、発熱性物質を含まない塩化ナトリウムを加えて等張としてもよい。注射後3時間まで、30分以内の間隔で体温を測定する。対照体温と最高体温との差を体温上昇度とする。体温が対照体温より低下した場合、体温上昇度を0℃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、更に 3 匹による試験を追加する。計 9 匹の体温上昇度の合計が 5.0℃未満のとき発熱性物質陰性、5.0℃以上のとき発熱性物質陽性とする。発熱性物質陰性のとき、試験試料は発熱性物質試験に適合する。

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

### 3.5 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

### 4. エンドトキシン試験（5.13 項参照）

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

### 5. 参考情報

#### 5.1 発熱性物質の分類と体温調節・発熱機序

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

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

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

Toll-like receptor (TLR) family は微生物感染に対する宿主の初期免疫応答を制御する生体防御蛋白質<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカン<sup>3)</sup>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<sup>3,4)</sup>。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- $\kappa$ -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 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、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 PGE<sub>2</sub> 合成を促進することにより発熱作用を誘導する。活性発現の強度はそれぞれ異なるが、TLR family に認識されるこれらの菌体成分はいずれも発熱性物質となる。

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

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

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

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

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<sup>5-9)</sup>。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 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  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食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、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<sup>10-12)</sup>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D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D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D部分の分解が起こり得ることから、エンドトキシンの抽出は室温で行うことを基本とする。最適な抽出時間は材料の種類によって異なる。また、エンドトキシン濃度が低い場合は、材料表面への非特異的吸着やイオン結合による回収損失も無視できない。引用文献<sup>10-12)</sup>及びその他の報告に見られた活性低下は、おそらくこれらの要因も関与しているものと思われる。

#### 5.5 抽出条件

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

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

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

### 5.6 発熱性物質試験法

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

### 5.7 化学物質による発熱事例

医療機器に関連した化学物質による発熱についての報告数は、決して多くはないが、例えば、下平らは、ゴムの老化防止剤として用いられていた *N*-フェニル-β-ナフチルアミン及びアルドール-α-ナフチルアミンは、いずれもウサギに対して発熱性がみられ、体温上昇のピークは注射後 1~2 時間であったと報告している<sup>13)</sup>。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<sup>14)</sup>。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何れかの性に統一して試験を実施することが望ましい。

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

USPでは20～23℃と規定している。飼育室及び試験室の間はドアで区切られていて、両室内の温度・湿度は同じ条件で一定に制御されていることが望ましい。試験時におけるウサギの保定は、首枷固定法により行う。数時間に及ぶ首枷固定での拘束を行うので、できるだけストレスを軽減させるために背中と脚は拘束されないような固定器を使用する。首枷固定時にウサギは騒音その他の刺激に対して動揺して暴れることがあり、このことが原因とな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℃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(±0.1℃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殆ど分解を受けないため、試験に使用する器具類の脱パイロジェンには強い加熱処理が必要である。エンドトキシン試験のための試験液を調製する際に用いるガラス製の器具・

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

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

#### 5.10 投与液量

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

#### 5.11 試験方法

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

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

JPとUSPは試験液の加温温度を $37\pm 2^\circ\text{C}$ 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更に3～3.5時間後に第2のピークがみられることが分かっている。このように、3時間の体温をできるだ

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

### 5.12 判定

本試験での判定が、極めて変動を受けやすいウサギの体温のわずかな上昇によるものなので、体温上昇の程度によっては、再試験を行って最終的に判定するという慎重な手段がとられている。本試験法は現行の第十六改正日本薬局方の方法である。基本的にEPも同様の判定方法を採用しているが、判定温度に若干の相違がある。また、JPは最終判定に至るまで必要に応じて3段階の試験を実施するように規定しているが、EPはこれが4段階である。一方、USPでは、3匹のウサギを使用した初回の試験において、0.5℃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、第十六改正日本薬局方・一般試験法のエンドトキシン試験法とJIS K 8008 4.3が参考となる。その他、JPの技術情報誌JPTI<sup>15)</sup>及びその他の資料<sup>16-18)</sup>には、測定手法、試験例、注意事項、分析法バリデーションなどが記載されている。

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

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



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

#### 5.14 エンドトキシン特異的ライセート試薬

従来、エンドトキシン試験に使用する試薬は、その起原から LAL 試薬と呼ばれていたが、*Tachypleus tridentatus* の追加により、ライセート試薬と改称された。真菌の細胞壁構成成分である  $\beta$ -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、 $\beta$ -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<sup>19)</sup>。また、 $\beta$ -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<sup>20)</sup>。

#### 6. 事務連絡医療機器審査 No.36 からの変更点

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

#### 7. 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-Lecreux, 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 monocytoid cells. *J. Immunol. Methods* 298, 191-173 (2005)
- 6) Jahnke, M., Weigand, M., Sonntag, H.G.: Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit *in vivo* pyrogen

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

## 8. 参考文献

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

## 第8部 血液適合性試験

## 1. 適用範囲

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

## 2. 引用規格

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

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

## 3. 試験項目

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

## 4. 評価項目

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

表1 標準的な評価項目

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

## 5. 一般的注意事項

### 5.1 試験試料

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

### 5.2 試験法

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

### 5.3 試験項目

#### 5.3.1 血栓形成

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

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

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

#### 5.3.2 血液凝固

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

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

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

また、既に適用部位で臨床実績のある医療機器を用いた対照物質群を設ける

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

### 5.3.3 血小板

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

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

### 5.3.4 血液学的項目

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

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

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

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

### 5.3.5 補体系

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

れている。

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

## 6. 溶血毒性（溶血性）試験

### 6.1 試験液の調製法

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

### 6.2 使用血液の調製法

健康なウサギより脱線維血を調製し、次の確認を行って、試験に用いる。

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

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

### 6.3 対照

#### 6.3.1 陰性対照液（非溶血対照液）

生理食塩液を陰性対照液とする。

#### 6.3.2 陽性対照液（完全溶血液）

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

### 6.4 試験操作

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

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

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

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

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

- 1) Drabkin 試薬：フェリシアン化カリウム ( $K_3 [Fe(CN)_6]$ ) 200 mg/L、シアン化カリウム (KCN) 50 mg/L、炭酸水素ナトリウム ( $NaHCO_3$ ) 1.0 g/L (6.7.8 項参照)。市販品を用いてもよい。この場合、市販品の使用方法や保存条件に従う。
- 2) 操作：試験管に Drabkin 試薬 4.5 mL をとり、試験液と陰性対照液の上清及び陽性対照液をそれぞれ 0.5 mL 加え、混和後 15 分間室温放置し、生成したシアンメトヘモグロビンの吸光度を 540 nm で測定する。陽性対照液及び陰性対照液上清については、3 例の平均値を算出し、次の計算式より溶血率を求める。

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

## 6.5 評価

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

表 2 判定表

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

## 6.6 試験報告書

試験報告書には、少なくとも以下の事項を記載する。

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

## 6.7 溶血毒性試験の参考情報

### 6.7.1 採血

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

### 6.7.2 蒸留水

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

### 6.7.3 インキュベーション時間

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

### 6.7.4 メトヘモグロビンなど

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

### 6.7.5 第I法と第II法の選択



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

#### 6.7.6 酸素化ヘモグロビンの吸収波形及び吸収ピーク

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

#### 6.7.7 酸素化ヘモグロビンの吸光度測定

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

#### 6.7.8 Drabkin 試薬の使用期限

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

#### 6.7.9 評価

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

### 7. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

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

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

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

## 8. 引用文献

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

## 9. 参考文献

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

## 付録

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

## 1. 試験試料／抽出溶媒比

試験試料の形状又は厚さにより、以下に示した試料／溶媒比を用いる。

厚さ (mm)	抽出溶媒 1mL に対する試験試料の量 (許容範囲 $\pm 10\%$ )	試験試料の形状の例
<0.5	6 cm <sup>2</sup>	フィルム、シート、チューブ
0.5~1.0	3 cm <sup>2</sup>	チューブ、平板、小型の成型物
>1.0	3 cm <sup>2</sup>	大型の成型物
>1.0	1.25 cm <sup>2</sup>	ゴム栓などの弾性材料
不規則な形状の硬質材料	0.2 g	粉末、ペレット、フォーム状、非吸収性成型物
不規則な形状の多孔性材料	0.1 g	メンブランフィルター

備考：吸収性材料やハイドロコロイドに適用可能な手順を参考として以下に示す。0.1gあるいは1cm<sup>2</sup>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、0.1gあるいは1cm<sup>2</sup>当たりの抽出溶媒量に、先に求めた溶媒量を加える。

## 2. 抽出温度・時間

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

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

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

## 3. 保存温度・時間

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

