

厚生科学研究  
医薬安全総合研究事業

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する  
国際ハーモナイゼーション研究

平成13年度研究報告書

平成14年3月

主任研究者 桜井靖久

## 目次

総括研究報告書 桜井靖久	1
分担研究報告書	
生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究 土屋利江	9
医療用具の臨床試験に関する基準（GCP）に関する研究 上田慶二	43
細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究 岡野光夫	49
承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究 および海外調査 豊島 聡 吉田正人	175

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
平成 13 年度総括研究報告書

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究

主任研究者 桜井靖久 東京女子医科大学名誉教授、早稲田大学大学院客員教授

### 研究要旨

有効性・安全性に優れた新しい医療用具の研究開発を促進し、医療の向上のため、できるだけ速やかに世界中の多くの人々にそれが適用されるようにするために、医療用具承認申請などに関する国際協調が必要であり、その推進のための協議が ISO、GHTF などにおいて進められている。日本としても、これらの国際協調に対して、国益ということを中心に十分を考慮しつつ、科学的及び理論的裏づけのもとに、米欧に伍した討論を展開していくことが必要である。本研究においては、産官学が協力して以下の課題に実学的見地から取り組み、下記の如く初年度の成果を得た。

#### 1) 生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究

材料による感作性試験と細胞毒性試験について、国内外の現行法等について実験的評価を行ない、鋭敏にしてヒトへの外挿性に優れた評価法の選択を行った。

#### 2) 医療用具の臨床試験に関する基準（GCP）に関する研究

日本では医療用具 GCP は平成 4 年 7 月に通知されているが、現在 ISO において医療用具 GCP の国際協調が検討されている。また、医薬品については ICH GCP に基づく新しい基準が実施されている。これらの事実を踏まえて国際協調に配慮した新しい医療用具 GCP について、その適用範囲、医薬品との差異、不具合情報、取扱説明書、保守管理等について検討を加えた。

#### 3) 細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究

細胞・組織を利用した tissue engineering 等の今後の急速な進歩・普及に対応すべく、本年度はまず、国内外の細胞・組織利用医療用具技術の現状を把握し、日米欧における規制、ガイドライン等

について比較検討した。

#### 4) 承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究および海外調査

欧米の各種基準、数百種類の一覧表を作成した。GHTF で技術概要文書 (STED) の指針が作成されたことを踏まえて、わが国の承認申請時審査への導入検討を行ない、問題点を抽出した。

#### 分担研究者

土屋 利江	国立医薬品・食品衛生研究所	療品部長
上田 慶二	東京都多摩老人医療センター	名誉院長 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 顧問
岡野 光夫	東京女子医科大学先端生命医科学研究所	所長、教授
豊島 聡	国立医薬品・食品衛生研究所	医薬品医療機器審査センター センター長
吉田正人	日本医療機器関係団体協議会	国際部長

#### A. 研究目的

医療用具承認申請等についての国際ハーモナイゼーション推進のための協議が、ISO、GHTF 等において進行している。医療の向上のために、効果が高く安全な医療用具を、できるだけ迅速に実用普及させるためには、医療用具規制による不必要な障壁を取り除かなければならない。日本の経済的・技術的・文化的な国益という点も十分に考慮して、国際協調の場において、科学性・論理性に立脚した討議をするためには、産官学が協力して、これらの問題について十分な討議・検討をする必要がある。本研究においては、各分野の専門家の調査・研究を通して、国

際調和のための科学的・論理的根拠を構築することを目的とするものである。

#### B. 研究方法

一部において、実験的手法もまじえて、各分担研究者ごとに研究協力者組織 (別表) をつくり、数回づつの研究会において課題の討議と研究内容の分担を決めて議論を深めるとともに、文献調査、ヒアリング、国内外調査、実験等の手法によって研究を実施した。また本研究班の分担研究者が、平成 13 年 12 月 19 日、国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センターにおいて集合し、研究班全体の意見交換、調整等について総会を行った。

(倫理面への配慮)

医療用具承認申請資料の国際ハーモナイゼーションの推進により、不必要な動物実験の重複を避けることが可能となり、本研究によって適切な感度の生物安全性試験の選択が可能となり、安全な医療用具の迅速な患者への提供に資するものである。

研究協力者

1)「生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究」

分担研究者：土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
五十嵐良明

国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
配島由二

国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
松岡厚子

国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
大庭耕輔

(財)食品農医薬品安全性評価  
センター

中田和彦

(株)メニコン 総合研究所

林 達也

(株)メニコン 総合研究所

今安正樹

(株)メニコン 総合研究所

坂口圭介

テルモ(株)生物評価センター

池田博之

宇部興産(株)高分子研究所

坂井正宗

宇部興産(株)高分子研究所

2)「医療用具の臨床試験に関する基準(GCP)に関する研究」

分担研究者：上田 慶二

医薬品機構顧問

桜井靖久

東京女子医科大学名誉教授

赤松功也

みつわ台総合病院整形外科

伊藤公一

日本大学歯学部保存(歯周)学

打田日出夫

大雄会病院IVRセンター室長

金井 淳

順天堂大医学部眼科

川田志明

慶応大医学部心臓血管外科

鈴木博昭

東京慈恵会医科大学内視鏡科

妙中義之

国立循環器病センター人工臓器部

外 須美夫

北里大学医学部麻酔科

上野紘機

東レ医薬・医療開発センター理事

小野 清

ボストンサイエンティフィックジャ

パン薬事部臨床開発マネージャー

中崎知道

ジンマー株式会社品質保証・薬事

開発部長代行

野田義寛

テルモ研究開発センター

山本芳子

スリーエムヘルスケア薬事部

3)「細胞組織利用医療用具評価手法に関する研究」

分担研究者：岡野光夫

東京女子医科大学

麻坂美智子

日本メドトロニック(株)薬事総括部

石川 烈

東京医科歯科大学歯学部

上田 実

名古屋大学医学部

大串 始

ティッシュエンジニアリング

センター

大野邦夫

旭メディカル株式会社

片倉健男

テルモ株式会社研究開発センター

久保木芳秀

(株)デビュー・ジャパン

熊谷憲夫

聖マリアンナ医科大学形成外科

澤 芳樹

大阪大学医学部外科学第一講座

篠崎尚史

東京歯科大学角膜センター

清水達也

東京女子医科大学

先端生命医科学研究所

高村健太郎

(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

アリング

土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所療品部

堤 定美

京都大学再生医科学研究所

寺岡 慧

東京女子医科大学腎センター

大和雅之

東京女子医科大学

先端生命医科学研究所

4)「承認申請時に用いる基準、資料の要求範囲に関する研究」

分担研究者：豊島聰

医薬品医療機器審査センター

俵木登美子

医薬品医療機器審査センター

審査第4部審査管理官

田村敦史

医薬品医療機器審査センター

審査第4部

中井 清人

医薬品医療機器審査センター

審査第4部

5)「承認申請時に用いる基準、資料の要求範囲に関する海外調査」

分担研究者：吉田正人

日本医療機器関係団体協議会

三浦重孝

GE横河メディカルシステム(株)

内藤正章

日本光電工業(株)

浅井英規

(株)日立ハイテクノロジーズ

川口 広

旭メディカル(株)

黒岩隆広

川澄化学工業(株)

麻坂美智子

日本メドトロニック(株)

## C. 研究結果

本研究においては、分担する研究項目ごとに独自性があるので、それぞれの項目別に以下にその概要を記す。

### 1) 生物安全性試験その他前臨床試験一般 (分担研究者・土屋利江)

材料の安全性を確かめるための感作性試験と細胞毒性試験について、国内外の現行法等について、その感度や妥当性とヒトへの外挿性の優劣について実験的評価を行ない、得られた科学的根拠に基づいて、国内ガイドライン改訂や国際的基準に際して、安全性と実用性の高い方法を提案していくものである。

感作性評価に関しては、モルモット・マキシミゼーション・テスト (GPMT) において、生食抽出法、植物抽出法よりも有機溶媒抽出法のほうが、ヒトにおける感作性を予測するのに適切であった。また細胞毒性試験については、血清含有培地を用いたコロニー法が Elution test 法よりも鋭敏で優れていることがわかった。

### 2) 臨床部門 医療用具の臨床試験に関する基準 (GCP) に関する研究 (分担研究者・上田慶二)

医療用具の治験についての基準 (医療用具 GCP) は平成 4 年 7 月に通知されているが、現在 ISO において国際ハーモナイゼーションが検討されつつある。また、医薬品の治験については、ICH GCP に基づく新しい基準が既に実施されている。これらを基礎として国際調和に適した医療用具の新しい GCP についてその案を検討する事が、本研究

の目標である。

医療用具は医薬品とは本質的な違いがあり、その差異をよく分析した上で、不具合、予想される有害事象、保守管理、耐用期限、リスクの軽重、取扱説明等による情報提供等をも視野に入れた安全性の確保が必要となる。医療用具についてはそのリスクの程度に応じて、クラス分類がなされることになっており (改正薬事法)、医療用具の臨床試験の適用範囲についても、このクラス分類を考慮に入れて、薬事法上の「高リスク医療機器」や「新規の機器」などをその対象と考えることが適当と思われる。

### 3) 細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究 (分担研究者・岡野光夫)

細胞・組織を利用した医療用具 tissue engineering は、今後急速に進歩・普及していくものと思われる。そこで、本研究ではまず国内外の現状を十分に調査把握し、ガイドラインづくりの推進を目標として、日米 EU 等における規制内容、基準、ガイドライン等の作成状況を比較検討した。皮膚、骨、軟骨、角膜、心臓弁、血管についてはすでに臨床応用がされており、また細胞移植治療も脳、心筋、閉塞性動脈硬化症等の虚血部位に対して臨床応用されている。ISO・TC150 においても組織工学についての国際標準化の WG 設置が進められつつある。基準等については、日欧米の対比により、共通点と相違点が指摘できた。本分野の開発・実用化は日進月歩であり、既に臨床応用されているものについては問題

点をさらに詳細に分析し、今後必要となる安全性・機能性の評価法の検討、不測の事態への柔軟・迅速な対応システム等についての国際標準化の可能性が必要とされる。

4) 承認申請時に用いる基準・資料の要求範囲に関する研究および海外調査  
(分担研究者・豊島聡)  
(分担研究者・吉田正人)

医療用具の審査にあたって、不要な動物実験と臨床試験の重複などを省き、効率的・迅速に進歩した最新の機器を国際的な規模で実地に供して医療の質の向上をはかるためには、合理性のある国際協調が不可欠である。本研究においては、まず、数百種類におよぶ欧米の各種基準の一覧表を整理・作成し、それらの間の重複や重要性などを検討するための便益とした。

GHTF において技術概要文書 (STED) のガイダンス・ドキュメントが作成されたことを踏まえて、わが国の医療用具承認審査への STED 導入方策を検討するため、現行資料概要との比較検討を行なった。STED 導入は国際的整合性の上からも重要ではあるが、一方で申請者側の作業負担も増大し、なお、決定までには試行錯誤の繰り返しが必要とされるものと思われた。

#### D. 考察

医薬品については ICH が中心となって国際的協調を進めつつあるが、医療用具については ICH とは別の系統の IEC、ISO、GHTF 等の複数の組織がからんでおり、また、国内における問

題点検討のための産学官が協力した仕組みも十分とはいえない。健康および医療の質の重視、安全性への配慮、市場流通の加速、医療におけるコンシューマー志向の増大という一連の流れから、国際協調は今後ますます重要な課題となる。その際に、日本として十分に科学性、論理性、合理性に立脚した素案や解釈を持つことが、国益の点からも大切である。本研究においては、市販前の基礎的テスト、臨床試験、承認申請のための手続き上の問題、さらに今後の大きな発展が見込める組織工学的問題等について、産学官が一つの場で問題点を調査、討論し、国内における基準づくりと国際ハーモナイゼーションにおける論理構築とに資する枠組みをつくり上げていくことを目標としており、初年度は実験的・文献資料的調査を実施して問題点を洗い出した。

次年度以降はさら調査研究を継続して、医療用具 GCP 等の一部の課題については素案の作成にまで踏み込む予定である。

#### E. 結論

医療用具の有効性、安全性についての基礎的および臨床的評価方法や GCP、承認申請手続き、細胞等を用いた組織工学的用具についての現状と必要とされる評価法等について、実験的および文献資料情報調査等の方法を用いて調査研究し、協力班員をも含めて討議を行なった。日本では 2002 年に薬事法が大幅改正される時期にも当たっており、また、国際ハーモナイゼーションの重要



性が急速に増大する時期でもあり、医療用具について、産官学が一体となって協力して、その有効性・安全性評価手法を検討することは、国内規制に対しても、国際ハーモナイゼーションに対しても極めて有用であり、従来に見られなかった重要な研究であると結論づけられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全研究事業）  
分担研究報告書

生物安全性試験その他前臨床試験一般に関する研究

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

研究要旨 国内ガイドライン改訂への提案を行うために、感作性試験では、感作性材料からの抽出溶媒の違いによるモルモットマキシミゼーションテスト（GPMT）での平均評価点を比較した。可及的に試験に必要な材料量を少なくすることが可能な試験プロトコールも立案した。また、溶出量の少ない材料の試験法とされている adjuvant & patch test については、同微細粉材料を用いて評価した。

細胞毒性試験では、in vivo での組織・眼刺激性が明らかな 2 種の日本標準材料用いて USP に記載されている水抽出、血清含有・不含培地、及び ISO に記載されている各種抽出条件で抽出した液について、USP の Elution Test Method による細胞毒性試験を行ない、わが国で採用しているコロニー試験法での結果と比較した。

得られた科学的データに基づいて、ガイドラインを改訂することにより、安全性の高い医療用具・材料の開発や実用化を適正に推進することができるものと期待される。

#### A. 研究目的

第一の研究目的は、医療材料および医療用具の感作性試験は、米国では、生食抽出と綿実油抽出で得られた試験溶液について、モルモットマキシミゼーションテスト（GPMT）を用いた方法が試験法として採用されている。一方、わが国のガイドラインでは、有機溶媒抽出物について、GPMT で試験することとなっている。両国での試験法の感度を比較するために、同一の感作性材料について、比較試験を行

うことを目的とした。

第二の研究目的は、医療材料および医療用具の細胞毒性試験は、米国では、培地や、蒸留水を抽出溶液として ISO に記載されている各種温度、時間で抽出し、semi-confluent の状態の細胞に抽出液を加えて細胞の傷害の程度に応じた 5 段階 grade(0-4)で判定する Elution test method を採用している。日本のガイドラインでは、血清含有培地で 37 度、24 時間抽出した液を段階希釈し、コロニー法で試験する。両国での試験法で得られた細胞

毒性評価の違いを明らかにするために、細胞毒性試験用標準材料を用いて比較試験を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

(被験試料) 強感作性物質であるメルカプトベンゾチアゾール (MBT) を含有するゴム材料 A およびゴム材料 A が含有する濃度の 1/10 量の MBT を含有するゴム材料 B と、弱い感作性物質である zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) を含有するゴム材料 C を用いた。シートの厚さは、1mm であった。

細胞毒性試験では、日本のガイドラインで採用されている標準材料 A (SRM-A: 中程度の細胞毒性を示す材料) および標準材料 B (SRM-B: 弱い細胞毒性を示す材料)、陰性対照材料を使用した。

### (抽出方法)

感作性試験: 生食および綿実油抽出は、ISO での厚さ 1mm の材料の抽出方法に従った。即ち、材料を細切し、全表面積 3cm<sup>2</sup>/ml の割合で抽出溶媒 (生理食塩液: (株)大塚製薬工場, 綿実油: ナカライテスク(株)) を全ての被験物質が接触するよう加え密栓後、恒温槽にて 37℃ の条件で 72 時間加温した。耐熱ガラス容器を緩やかに攪拌後、容器中の被験材料が移行しないように液体をフラスコに注ぎ移し、冷蔵・遮光・密閉して使用まで保管した。上述と同じ方法で被験材料を使用しない抽出溶媒対照 (生理食塩液および綿実油) を準備した。

有機溶媒抽出は、クロロホルムとアセトン等量混和液を抽出溶媒とした。被験材料を細切し、フラスコに入れて、抽出溶媒を 3 倍容加えた後、室温にて 30 分間振とうした。被験材料に変

性・溶解は認められなかった。フラスコ中の沈殿物を動かさないように上澄みを他のフラスコに静かに注ぎ移した。新たに 3 倍容のアセトン・クロロホルム等量混和液をフラスコに加え、同様の操作を行い、これを合計 5 回繰り返した。フラスコに貯めた 5 回分の抽出液を濾紙で濾過した後、減圧下で、30℃ に維持された水槽中でロータリー・エバポレーターを用い溶媒を留去した。少量のアセトン・クロロホルム等量混和液を留去物質に加えて溶解後、この溶液を茄子型フラスコに移した。減圧下で、30℃ に維持された水槽中でロータリー・エバポレーターを用い溶媒を留去した。一晚、真空乾燥機に立てた状態で入れておき、残っている留去物質の重量を 10 mg 単位まで量る。ガラス容器に入れ、冷蔵・遮光・密閉して使用まで保管した。上述と同じ方法で被験材料を使用しない抽出溶媒濃縮対照 (抽出溶媒濃縮物) を準備した。また、抽出溶媒対照としてアセトン・クロロホルム等量混合液 (いずれも吸光分析試薬) を準備した。ガラス容器に入れ、冷蔵・遮光・密閉して使用まで保管した。GPMT に使用するときには、1g の材料につき得られた抽出物は、1ml のオリーブ油を加えて溶解した (試料原液とする)。この時の試料原液 (A, B, C の 3 種のサンプルから調製) を感作群に使用した。惹起時には、倍々希釈した試料溶液 (A/2, A/4, A/8: B/2, B/4, B/8: C/2, C/4, C/8) を調製して使用し、閉鎖貼付と開放貼付による 2 種の貼付方法を用いた。各群 5 匹ずつの動物を使用して評価した。

細胞毒性試験: 米国の方法では、MEM 培地のみ、あるいは、5% 血清、

10%血清含有 MEM 培地による抽出は、ISO での標準的な材料の抽出方法に従って、6cm<sup>2</sup>/ml の割合で 37 度で 24 時間抽出して使用した。また、水を用いた材料からの抽出溶液は、10%血清含有培地で倍希釈し、細胞毒性試験に用いた。細胞毒性試験は、L929 細胞を用いた Elution test (USP) と、V79 細胞を用いたコロニー法を用いて試験した。

#### A. 研究結果

生理食塩液を抽出溶媒とした場合、3 種の方法 A、B、C の感作群において、パッチ除去後 24 時間および 48 時間後 (Fig. 1) において陽性反応は認められなかった。

綿実油を抽出液とした場合、感作群において、パッチ除去後 48 時間 (閉塞パッチ開始から 72 時間) では、材料 A の平均評価点は、1.2 (1 次刺激性は 0.2)、材料 B の平均評価点は、0.8 (1 次刺激性は)、材料 C の平均評価点は、0 であった (Fig. 2)。折線は、各材料での陽性反応が検出された動物の割合 (陽性率) を示している。材料 C では、0%、材料 B では、60%、材料 A では、80% であった (Fig. 2)。

Fig. 3 に、材料 7g を用いて適切な有機溶媒で抽出し、その抽出物を GPMT テスト用に最終 7ml の溶液に調製して試験する方法のプロトコールを示した。このプロトコールに従えば、7g の材料で各群 10 匹の動物を試験することが理論的に可能となる。ここで、7g を 7ml の溶液に溶かしているため、材料 1g 中の抽出物は、1ml の試験溶液に溶かしていることとなる。従って、材料の比重を 1 とすると、材料と同じ容積を溶出液で置き換えたこととなり、この抽出溶液は、材

料中の溶出物を濃縮した従来の試験法とは、考え方が異なる。一方、材料の比重はいつも 1 とは限らず、比重が 1 以下のときは、材料にくらべて、小さい容積を溶出液で置き換えた状態となる。逆に、比重が 1 以上のときは、材料に比べて大きい容積の溶出液で置き換えた状態となる。材料は、様々な形をしており、その体積を正確に全ての医療材料・医療用具で測定することは困難である。そこで、ここでは、単純化して、材料重量をサンプリングの指標とすることとした。最終的にリスク評価を行う場合には、材料の比重が 1 よりも大きく異なる場合には、前述した点についても考慮する必要がある。

Fig 3 のプロトコールに従って材料 B について試験した結果を Fig. 4 に示した。即ち、材料 B 1 グラムに含まれる有機溶媒抽出物濃度で、モルモットを GPMT 法で感作させた。惹起時には、B 濃度、B/2 濃度、B/4 濃度、抽出有機溶媒 (アセトニッククロロホルム等量混液濃縮) 対照 (CEA) アセトン溶媒対照について、閉塞貼付テストで評価した結果である。試験抽出物で閉塞パッチを 24 時間行ない、パッチ除去後 48 時間目での判定結果である。

B 濃度では、平均評価点は、3.0、陽性率は 100% であった。惹起濃度を B/2、B/4 と倍々希釈すると平均評価点は、0.8、0.6 と激減し、陽性率も 60%、40% とそれぞれ、惹起濃度に応じて減少した (Fig. 4)。一方、開放貼付を行うと惹起濃度 B、B/2、B/4 では、それぞれ平均評価点は、4.0、3.6、3.4 を示し、閉塞貼付の同濃度での結果と比較すると、いずれも高い平均評価点を示した (Fig. 5)。陽性

率は、いずれも 100%であった (Fig. 5)。

Fig. 3 のプロトコールに従って、材料 A、B、C から有機溶媒抽出物を調製して得られたアセトン溶液を皮膚に開放塗布し、非感作群で得られた一次刺激性について検討した結果、平均評価点が最高 1 を示した。

次に、一次刺激性のない惹起濃度 A/4、B/4、C/4 濃度で、各材料の感作群でテストした時の平均評価点は、A/4 が 3.8、B/4 が 3.6、C/4 が 0 であった (Fig. 6)。動物の反応陽性率は、A/4、B/4 濃度惹起群でいずれも 100%、C/4 濃度惹起群では、陽性率 0%であった (Fig. 6)。

以上の GPMT 結果をまとめ、ヒトで得られた結果(アンデルセン教授)と比較した(Table 1)。材料 A は、MBT で感作を確認したヒト 3 例中 2 例が最高のスコア (ICDRG の国際評価基準) 3 を、1 名がスコア 2 を示す材料である。

材料 B は、MBT で感作を確認したヒト 3 例中 1 例が最高スコア 3 を、2 例がスコア 2 を、材料 C は、4 名のヒトにおいて陰性であった (Table 1)。従って、材料 A、B、C のヒトでの感作性強度は、材料 A > 材料 B であり、材料 C は陰性であった。このヒトでの結果と相関したのは、有機溶媒抽出物で評価した結果と一致する。USP にある生食抽出液では、ヒトでの反応が強い材料 A および B でいずれも評価 0 であった。綿実油抽出液では、材料 A で 1.2、材料 B で 0.8 と弱い反応を示す結果に留まった (Table 1)。

GPMT での皮膚反応の写真を Fig. 7 および Fig. 8 に示した。Fig. 7 は材料 A を生食抽出液でパッチした結果 (左図)、全く反応が出ていない。材

料 A の綿実油抽出液でパッチした結果 (右図) では、綿実油のみの溶媒対照との差が明確ではない。Fig. 8 は、左図が材料 B の開放貼付での結果、右図が材料 B での閉塞貼付での結果である。開放貼付の方が皮膚反応を視覚で明瞭に判別しやすいことがわかる (Fig. 8)。

次に、材料 B について、感作時の濃度を B/2 (2 倍希釈) および B/4 (4 倍希釈) で感作させた 2 群において、惹起濃度は、B、B/2、B/4、B/8 の 4 段階で試験した (Fig. 9)。皮膚反応を明瞭に判別可能な開放貼付で惹起反応を評価した。Fig. 9 は、B 濃度で感作させた時の結果も、一緒に記載した。この結果から、有機溶媒抽出物で調製した溶液では、4 倍希釈した B/4 感作および惹起濃度まで、同程度の皮膚反応を示すことが明らかになった (Fig. 9)。

材料 B について、種々のテスト法で評価した結果をまとめた (Fig. 10)。有機溶媒抽出物での結果 (New GPMT)、粉末の Adjuvant and patch、綿実油抽出液、生食抽出液と、ヒトでのパッチテスト結果 (アンデルセン教授) を棒グラフで示した。ヒトでの反応に近いのは、NEW GPMT であった。

Table 2 は、B 材料 7 g、3.5 g、1.75 g を使用して有機溶媒抽出物から調製された溶液について、GPMT で評価した時の平均評価点と一次刺激性を評価した時の結果である。いずれの材料量を用いたときも、同レベルの惹起反応を示した (Table 2)。

我が国の細胞毒性試験に採用されている細胞毒性試験用標準材料 A および B の IC<sub>50</sub>(%) と眼粘膜刺激性、筋

肉組織刺激性、健常皮膚刺激性の関係を Fig. 11 に示した。SRM-A よりも+強い細胞毒性を示す材料は、眼粘膜刺激性、筋肉組織刺激性を示す材料である。SRM-B よりも強い細胞毒性を示すが SRM-A よりも弱い細胞毒性を示す材料は、眼粘膜には、刺激性を示すが筋肉組織への刺激性は、低い材料であると判断できる。眼粘膜刺激性を示さない材料の選択は、SRM-B よりも弱い細胞毒性を示す材料の中から選択可能となる。

日本のガイドラインで採用されているコロニー法で試験したときの SRM-A および B の IC50(%)値は、それぞれ 0.48%と 54.1%であり、両材料間で 100 倍程度の開きがあった (Table 3)。

次に、USP の Elution test 法で SRM-A について試験した細胞をギムザ染色した時の標本の顕微鏡写真である。5%FCS-MEM で、材料面積 6cm<sup>2</sup>/ml の割合で、37度で24時間抽出した溶液について試験した時の標本である。抽出溶液を2倍(50%)、4倍(25%)希釈した試験溶液では、細胞はほとんど観察されず、細胞傷害の grade は最高の4を示した (Fig. 12)。SRM-B について同様に試験した時のギムザ染色標本の写真を Fig.13 に示した。2倍希釈した溶液でのみ、細胞傷害が観察され、grade は4であった (Fig.13)。USP の Elution test での評価基準を Table 4 に示した。この基準に従って、SRM-A および SRM-B について評価した結果を Table 5 に示した。SRM-A と SRM-B では、各々25%と50%抽出液濃度以上で grade 4 を示し、細胞毒性を示す最小抽出液濃度は、両材料間で2倍程度のみのものであった

(Table 5)。

次に、SRM-A について、血清不含有、血清5%および10%含有 MEM 培地で同様に抽出した溶液について USP Elution test で試験した。その結果、血清含有培地を用いて抽出した時の方が細胞の傷害の程度が強いことがギムザ染色写真から明らかである

(Fig 14)。陰性対照について同様に試験した結果、この場合には、血清不含有、血清5%、および10%含有培地で試験してもコントロールと同様細胞に傷害性を検出されないことを確認した (Fig. 15)。

次に、蒸留水で37度で抽出し、USP の Elution test で試験した結果では、明らかに in vivo で傷害性を示す SRM-A および SRM-B とともに、その細胞毒性を検出できないことが明らかになった。また、血清不含有の培地では、血清含有培地に比べて、grade が低く、USP では2以下の grade を示す材料は、合格させていることから、同じ材料が培地の違いにより、判定結果が異なることが明らかになった (Table 6)。

次に蒸留水を抽出溶液にしたときの抽出温度と時間について、ISO で記載されている方法で試験した。その結果、50度、72時間、70度、24時間、121度、1時間抽出しても、細胞毒性のある SRM-A の蒸留水抽出液は、コントロールと同様な細胞形態を示し (Fig. 16)、USP Elution test では grade 0 で細胞毒性を検出できないことが明らかになった (Table 7)。

USP Elution test とコロニー法での感度の違いについて、SRM-A の種々の希釈倍率で調製した溶液を用いて比較した結果、SRM-A の 12.5%

から 2.5%溶液では、Elution test では、grade 0 で細胞傷害性がないと判定されるが、コロニー法では、コロニー形成率が 0%であり、明らかに細胞毒性がある溶液であることとなる。両法では、播種する細胞数の違いがもっとも感度の違いとなってあらわれているものと考えられるが、材料の 100%抽出溶液でコロニー形成が認められない材料(IC50%)<100%)では、弱い眼粘膜刺激性 (Draize core 2-4) を示すことから、Elution test は、眼刺激性のような細胞毒性に鋭敏な組織で評価には、感度が低い可能性が示唆される。

Fig. 17 は、米国で採用されている寒天重層法とコロニー法を比較した結果を示した。FA シリーズの材料は、ウサギ眼にコンタクトレンズ装用試験を行った時、いずれもドレイズスコアが 2-4 程度を示したが、この材料を寒天重層法で試験すると陰性になるが、コロニー法では、明らかに IC50(%)が 100%以下であり、細胞毒性を検出する事が可能であった (Table 9)。Fig. 17 は、細胞接着活性、溶出液のコロニー法、材料直接接触によるコロニー法および材料からコンタクトレンズを作製し、ウサギ眼装用試験を行った時の試験結果を比較したものである。Draize sore で 2-4 を示す材料は、血清含有培地での抽出液をコロニー法で試験すると、IC50(%)値は 70%から 90%を示し、眼粘膜刺激性物質を検出する事が可能であった。直接接触法では、コロニー形成はほとんど 0%に近く鋭敏に細胞毒性を検出できた。細胞接着活性は、in vivo での眼粘膜刺激性や、in vitro 細胞毒性試験の結果と相関しないことが明らかになった。

#### D. 考察

医療材料及び医療用具の感作性試験は、米国では、生食抽出と植物油抽出で得られた試験溶液について、モルモットを用いた GPMT による試験方法が採用されている。一方、わが国のガイドラインでは、有機溶媒抽出物について、GPMT で試験することとなっている。抽出方法の異なる感作性試験法の感度を比較するために、同一の感作性材料について、比較試験を行った。その結果、有機溶媒抽出物で調製された試験法で得られた結果が、ヒトでのデータと相関した。現行ガイドラインで採用されている粉末の adjuvant and patch テストでは、USP の綿実油抽出液と同レベルであった。また、生食抽出液では、感作強度の強い材料の感作性を全く検出できないことが明らかになった。

現行ガイドラインでは、抽出物を 10%、5%で感作し、惹起濃度は 10 倍希釈系列でテストすることとなっている。材料からの抽出物が多い場合には、試験することは、比較的容易であるが、材料からの抽出物が少ない場合には、抽出物を得るために、多量の材料を必要とする。そのために、コンタクトレンズでは、多くの枚数を必要とするため、コスト面での課題があり、コンタクトレンズのような小さい医療用具では、0.5%以上抽出物が得られたときにのみ、有機溶媒抽出物でテストし、0.5%未満の抽出物しか得られない材料では、粉末の adjuvant and patch テストを行うこととされている。

抽出物量が少なくても、ppm オーダーの低濃度で感作性を引き起こす物質もしられており、抽出物量の多少で、感度が適切な GPMT か、感度の

低い adjuvant and patch テストを選択する論理も、安全性上疑問があった。

今年度は、抽出物量の多少は関係なく、材料 7 g から出発して、最終テスト溶液を 7ml に調製して試験しても、ヒトでの反応と相関する結果を得られることを明確にすることができた。材料 B では、GPMT 試験溶液として調製するのに、7 g、3.5 g、1.75 g いずれを用いても同じレベルの結果を得ているが、GPMT 評価は、最終の惹起時の皮膚反応で評価しており、このときの感作性物質の皮膚浸透性が飽和に達しておれば、惹起時の濃度をあげても、反応は同じレベルに留まることとなる。

従って、次年度は、感作性物質が用量反応的に皮膚を浸透するモデル材料を作製し、材料 7 g—1.75g 使用時での GPMT 反応評価を比較する。また、USP 試験法に従った生食抽出液、植物油抽出液についても、同様に比較する予定である。

医療材料および医療用具の細胞毒性試験は、米国では、培地や蒸留水を抽出溶液として ISO に記載されている各種温度、時間で抽出し、semi-confluent の状態の細胞に抽出液を加えて 48 時間後に、細胞の傷害の程度に応じた grade で判定する Elution test 法を採用している。日本のガイドラインでは、血清含有培地で 37 度、24 時間抽出した液を段階希釈してコロニー法で試験することとなっている。両国での試験法で得られた細胞毒性評価の違いを明らかにするために、日本の細胞毒性試験用標準材料を用いて比較した。その結果、コロニー法の方が SRM-A および SRM-B の IC50(%) 値に 100 倍以上の

抽出液濃度の違いが認められた。USP Elution test では細胞毒性を示す最小抽出液濃度は、両材料間で 2 倍程度の違いであった。したがって、コロニー法の方が材料評価の判別精度の点で優れている。USP Elution test 法では、SRM-B を血清不含培地で抽出し、試験すると grade 2 以下を示し、試験適合 (USP 評価基準) となるが、血清含有培地では、severely reactive (grade = 4) となつて、不適合となり、同一材料の判定結果が異なる問題点も明らかになった。以上のことから、抽出溶液としては、一般的に血清含有培地が適切であり、コロニー法は、USP Elution test 法に比べて、精度高く、定量的に細胞毒性強度を評価できる点において優れている。

#### E. 結論

抽出方法の異なる感作性試験法の感度を比較するために、同一の感作性材料について、比較試験を行った結果、ヒトで明らかに感作性を有する材料において、生食抽出では、陰性、植物油抽出では、弱い陽性反応を示した。有機溶媒抽出では、ヒトでの感作性の反応を予測するのに適切な感度を示すことが明らかになった。試験試料調製に必要な材料量を従来に比べて少量、かつ、適切な感作性評価を行える試験法のプロトコール (案) を提示できた。コンタクトレンズポリマーを基材とした感作性物質含有材料の評価結果と併せて次年度には、最終プロトコール案を提示できる。また、粉末の adjuvant and patch テストは、材料の感作性を評価する試験系として不適切であることを明らかにした。

日本および米国での細胞毒性試験



法で得られた細胞毒性評価の違いを明らかにするために、細胞毒性試験用標準材料を用いて比較検討した結果、細胞毒性を示す標準材料において、蒸留水や血清不含の培地を用いて抽出した場合、細胞毒性陰性か非常に弱い陽性反応を示した。血清含有培地で試験した場合、コロニー法では、2種の細胞毒性材料間でIC50値が100倍程度の違いが認められたが、Elution test methodでは、細胞毒性を示す抽出液濃度は、2倍程度の違いのみであった。また、コロニー法で検出される弱い細胞毒性材料は、Elution test methodでは検出されないことも明らかになった。細胞毒性に鋭敏な組織に使用する材料の細胞毒性評価には、コロニー法が適切であると考えられる。

#### F.健康危害情報

なし

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

なし

##### 2.学会発表

土屋利江、大庭耕輔、医療材料の生物学的試験の標準化に関する研究(1)感作性試験：生食抽出、綿実油抽出、有機溶媒抽出物での試験結果の比較

第23回日本バイオマテリアル学会

(2001年10月京都)

土屋利江、松岡厚子、医療材料の生物学的試験の標準化に関する研究(2)細胞毒性試験：コロニー法とElution Test method (USP)を用いた各種抽出溶液での試験結果の比較

第23回日本バイオマテリアル学会

(2001年10月京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**Extraction : physiological saline (48h)**

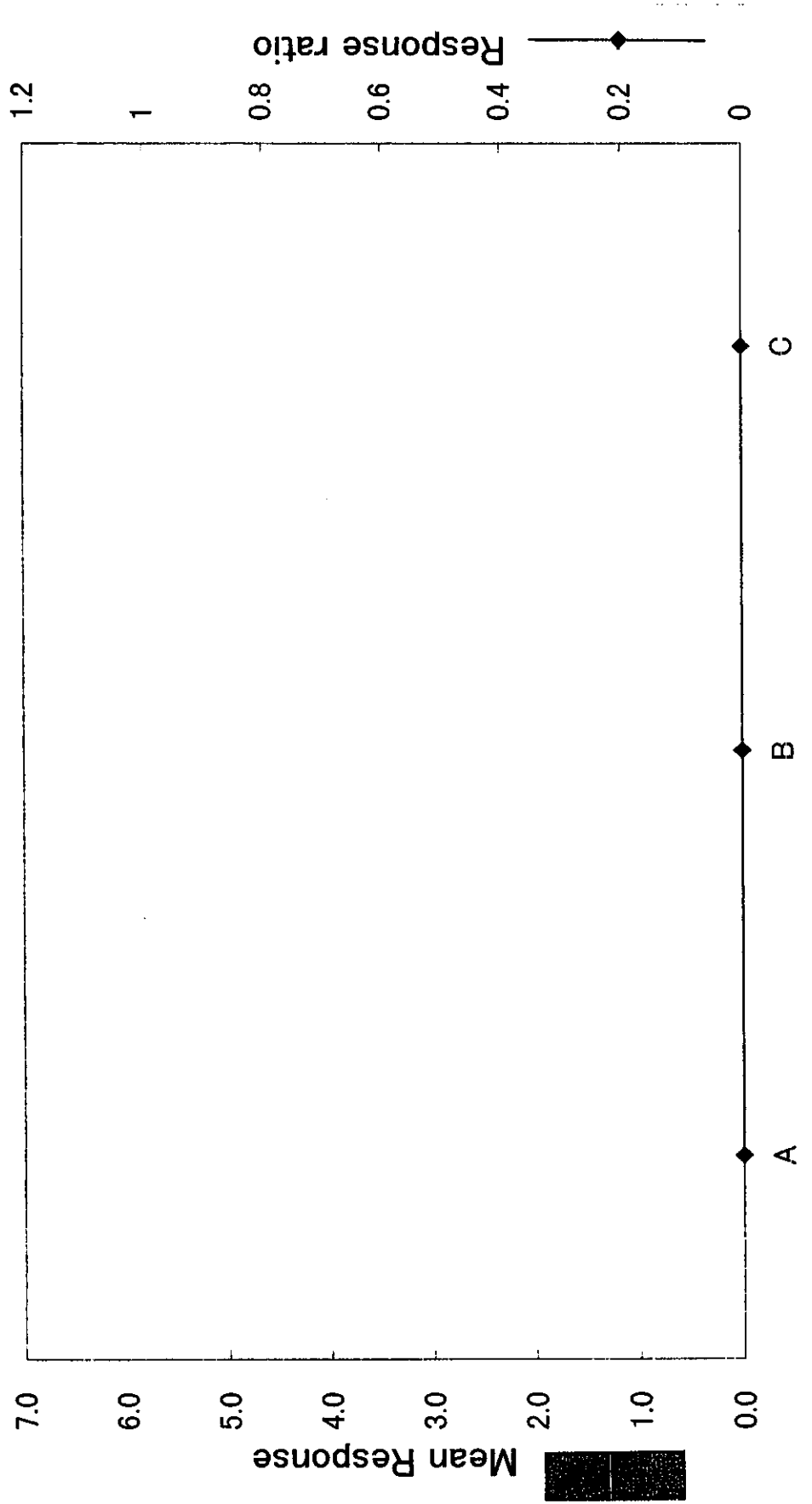


Fig 1. Comparison of the GPMT data among three materials (A, B, C) using physiological saline-extraction method.

# Extraction : cottonseed oil

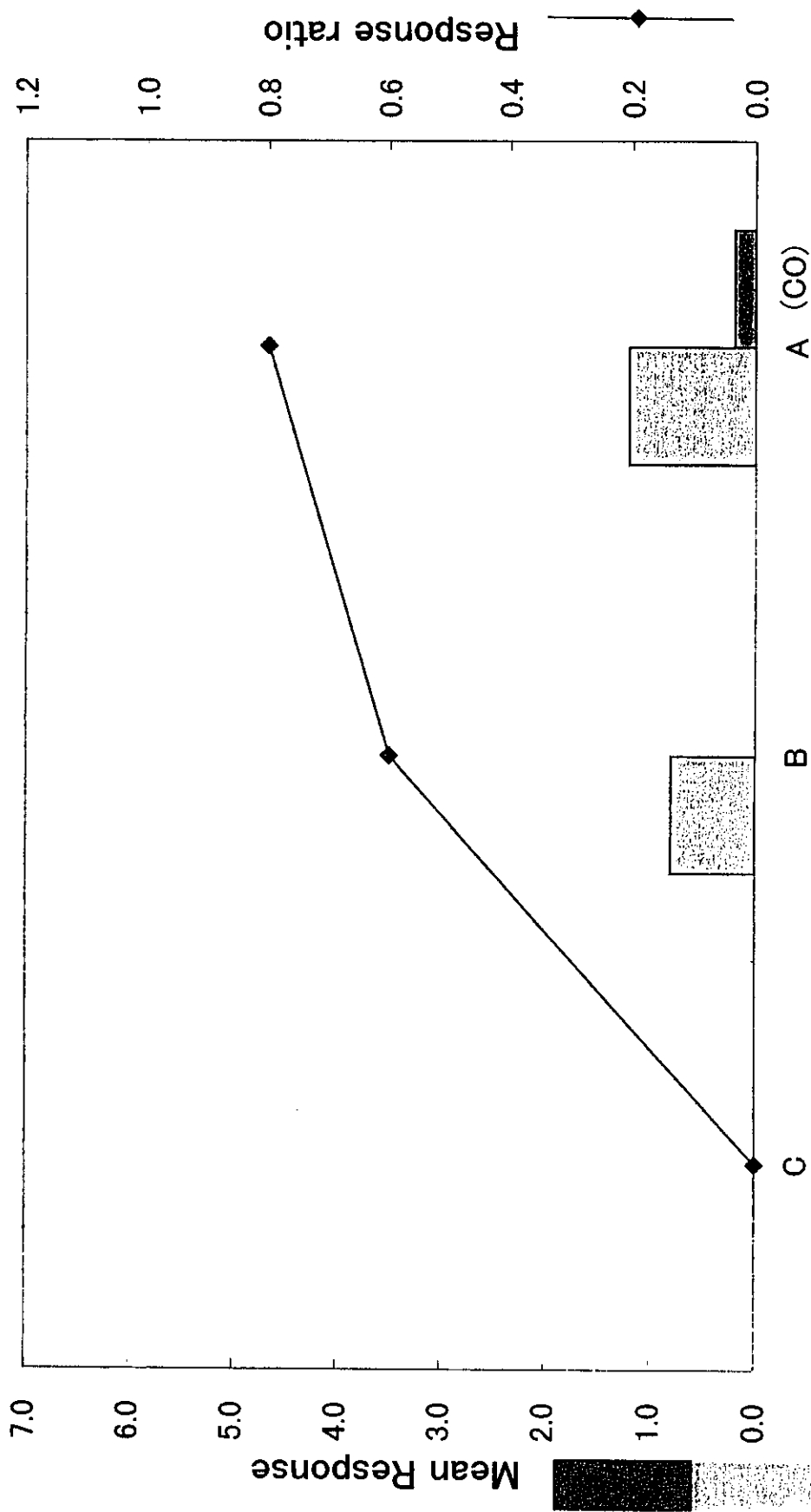
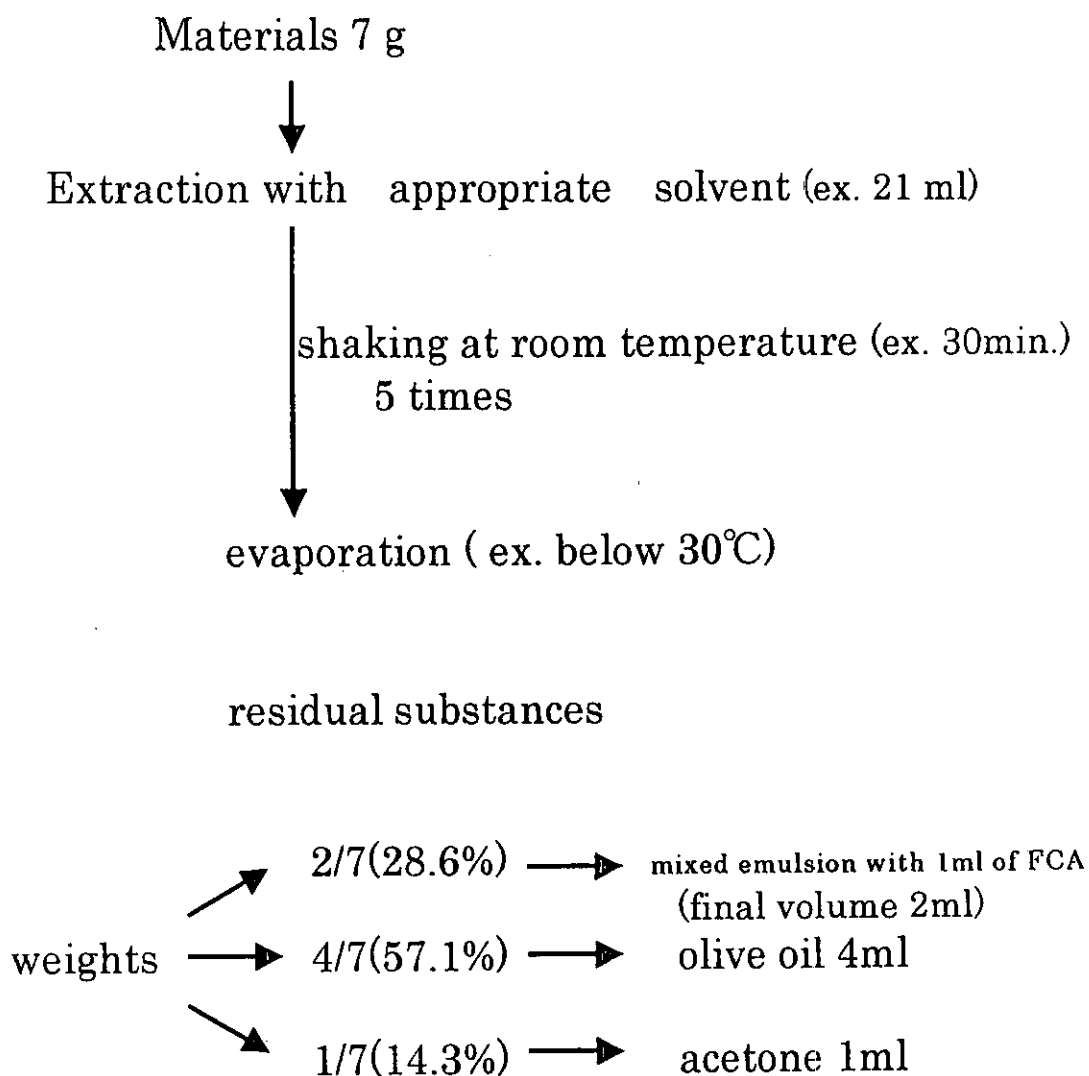


Fig 2. Comparison of the GPMT data among three materials (A, B, C) using cottonseed oil-extraction method.



GPMT at extract conc. in materials	
sensitization	10 animals
control	10 animals

Objects: minimize the amounts of materials used in GPMT to maintain the similar sensitization responses in human cases.

Fig 3. Protocol of the sample preparation for minimizing. the amounts of materials used in GPMT using the organic solvent-extraction method.