

第 12 改正日本薬局方/輸液用プラスチック容器試験法/埋植試験用対照プラスチック、又は直接接  
 触法による試験で使用する陰性材料

直接接触法による試験で使用する陰性材料：

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,または  
 No.164-08891）

## 8.2 標準材料及び標準物質

標準材料は、10.項に記載された方法に従って、抽出液を調製し、試験した時、中程度の細胞毒性を示  
 す材料（材料A）及び弱い細胞毒性を示す材料（材料B）の2種類である。検定済みの標準材料を使用  
 する。標準物質は、細胞の感度及び精度を明らかにするために、使用する物質である。検定済みの標準  
 物質を使用する。

材料A：0.1% Zinc diethyldithiocarbamate(ZDEC)含有ポリウレタン・フィルム

材料B：0.25% Zinc dibutyldithiocarbamate(ZDBC)含有ポリウレタン・フィルム

標準物質：ZDEC 及び ZDBC（例えば和光純薬 1 級）

## 10.1 抽出液の調製

10.1.1 医療用具又は材料の 1g を切断し、出来るだけ細切（約 2×15mm 程度の大きさ）し、無  
 菌試料はそのまま、滅菌されていないものについては、適切な滅菌処理を施す。特別な表面処  
 理をした試料は、細切しないものについても試験を行う。

10.1.2 細切された試料は、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、1g に対して、培地 10ml の割合で加え、軽く栓をする。

10.1.3 培地の pH7.2～7.4 を確認後、37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、軽く栓をし、合計 24 時  
 間静置する。

10.1.4 抽出容器から、抽出液のみを取り出す。この溶液を 100%抽出液とする。

10.1.5 100%抽出液を、さらに培地で 2～3 倍の割合で段階希釈し試験液とする。

10.1.6 表面積を一定にして試料を調製してもよい。その時、いずれの試験材料及び標準  
 材料も表面積は、5cm<sup>2</sup>/ml になるべく近い条件で試験を行う。

10.1.7 本試験法にない抽出条件での試験を行う時は、医療用具又は材料の使用状態を十  
 分に考慮し、細胞毒性に関する安全性を評価する上で適切な抽出条件で実施する。ただし、10.4  
 項に規定する内容に合うものでなければならない。

## 10.2 実験法

コロニー形成阻害試験は、以下の操作に従って行う。

10.2.1 継代した細胞をトリプシン処理して、単離細胞を調製し、培地に懸濁する。

10.2.2 希釈した細胞懸濁液を 60mm シャーレには、100～200 個（培地 4～5ml）、35mm シャー  
 レには、50～100 個（1～2ml）、12 穴又は 24 穴プレートには、40～50 個（0.5～1ml）の出

現コロニーになるように細胞を播種する。

- 10.2.3 シャーレ（又はプレート）を 37° の炭酸ガス培養器内に入れ、4～24 時間静置し、細胞をシャーレの底面に接着させる。
- 10.2.4 培地を捨て、10.1 項に従って調製した 100%抽出液及び種々の濃度の試験液を、60mm シャーレには 4～5ml、35mm シャーレには 1.5～2ml、12 穴プレートには 1ml、24 穴プレートには 0.5ml を加える。
- 10.2.5 陰性材料及び標準材料の抽出液についても同様に加える。
- 10.2.6 各同一濃度の試験液について、最低 3 穴あるいは 3 枚ずつのシャーレを使用する。
- 10.2.7 試験液を加えたシャーレ（又はプレート）は、直ちに炭酸ガス培養器内に入れ、静置して培養する。
- 10.2.8 培養期間は使用する細胞株により異なる。Balb/3T3 細胞は 9～11 日間、L929 細胞は 7～9 日間、V79 細胞は 6～7 日間培養を行う。
- 10.2.9 培養終了後、培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後、メタノール又は 10%ホルマリン溶液（5.7 項参照）を加えて固定する。
- 10.2.10 固定後、ギムザ染色液（5.8 項参照）を加え、コロニーを染色する。
- 10.2.11 コロニーが良く染色されたのを確認後、染色液を捨て、各シャーレ（又は各穴）のコロニー数を数える。
- 10.2.12 コントロール群での良好なコロニー形成率と試験結果の再現性を確認する。
- 10.2.13 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。機械での測定結果の精度等に注意する。
- 10.2.14 本試験法と異なる固定、染色法やマイクロプレートリーダー等を使用した試験法も可能であるが、コロニー法と同等の感度及び精度が必要条件となる。即ち、試験法の妥当性は、陰性材料、標準材料 A 及び標準材料 B での判定評価が 10.4.2～10.4.4 項の内容を満たす事により認められる。

### (ISO10993)

#### 【ISO 10993-12:2002】

#### 10.3 Extraction conditions and methods

10.3.1 Extraction conditions based on common practices are as follows (see also C.5):

- a) (37 ± 1) °C for (24 ± 2) h;
- b) (37 ± 1) °C for (72 ± 2) h;
- c) (50 ± 2) °C for (72 ± 2) h;
- d) (70 ± 2) °C for (24 ± 2) h;
- e) (121 ± 2) °C for (1 ± 0,1) h.

Extraction conditions described above that have been used to provide a measure of the hazard potential for risk estimation of the device or material are based on historical precedent.

Other conditions that simulate the extraction that occurs during clinical use or that provide an adequate measure of the hazard potential may be used, but shall be described and justified.

Extraction is a complex process influenced by time, temperature, surface-area-to-volume ratio, extraction medium and the phase equilibrium<sup>1)</sup> of the material. The effects of higher temperatures or other conditions on extraction kinetics and the identity of the extractant(s) shall be considered carefully if accelerated or exaggerated extraction is used.

For example, two possibilities exist when elevated temperatures are used:

- the energy of the increased temperature can cause increased crosslinking and/or polymerization of the polymer, and therefore decrease the amount of free monomer that is available to migrate from the polymer;
- the increased temperature can produce degradant materials that are not typically found in the finished device under use conditions.

10.3.2 The standard surface area can be used to determine the volume of extract needed. This area includes the combined area of both sides of the sample and excludes indeterminate surface irregularities. When surface area cannot be determined due to the configuration of the sample, a mass/volume of extracting fluid shall be used. See Table 1

Table 1 Standard surface areas and extract liquid volumes

Thickness mm	Extraction ratio (surface area or mass/volume) ± 10 %	Forms of material
< 0,5	6 cm <sup>2</sup> /ml	film, sheet, tubing wall
0,5 to 1,0	3 cm <sup>2</sup> /ml	tubing wall, slab, small molded items
> 1,0	1,25 cm <sup>2</sup> /ml	larger molded item(s)
Irregularly shaped solid devices	0,2 g/ml	powder, pellets, foam, non-absorbent, moulded items
Irregularly shaped porous devices (low-density materials)	0,1 g/ml	membranes
<p>NOTE While there are no standardized methods available at present for testing absorbents and hydrocolloids, the following is a suggested protocol: Determine the "absorption capacity" of the material, i.e. the amount of extract liquid absorbed per gram of the material. The test sample shall be 0,1 g/ml beyond the absorptive capacity of the material.</p>		

[ISO 10993-5:1999]

## 8.2 Test on extracts

8.2.1 This test allows both qualitative and quantitative assessment of cytotoxicity.

8.2.2 Pipette an aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of vessels for exposure to the extracts. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle rotation.

8.2.3 Incubate the cultures at  $(37 + 2)$  °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium. The test should be performed on a subconfluent monolayer or on freshly suspended cells. In the colony-forming assay, only an appropriate low cell density shall be used.

8.2.4 Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

8.2.5 Perform the test on

a) the original extract; and

b) a dilution series of the extract, using the culture medium as diluent. If monolayers are used for the test, remove and discard the culture medium from the cultures and add an aliquot of the extract or dilution thereof into each of the vessels. If suspended cells are used for the test, add the extract or dilution thereof into each of the replicate vessels immediately after preparation of the cell suspension.

8.2.6 When a non-physiological extract is used, e.g. water, the extract shall be tested at the highest physiologically compatible concentration after dilution in culture medium.

NOTE Concentrated culture medium, e.g. 2', 5', is recommended for use in diluting aqueous extracts.

8.2.7 Add known aliquots of the reagent blank and the negative and positive controls into additional replicate vessels.

NOTE A fresh culture medium control may also be tested, if appropriate.

8.2.8 Incubate the vessels, using the same conditions as described in 8.2.3, for an appropriate interval corresponding to the selected specific assay.

8.2.9 After an incubation period of at least 24 h, determine the cytotoxic effects in accordance with 8.5.

#### c) 評価

結果の評価については、生物学的試験ガイドラインと ISO10993 においては、次のように説明されている。両者を比較すると、日本のガイドラインでは、コントロール群のコロニー数を 50%阻害する試験液の濃度 (%) を求め IC50(%)として数値的な指標で表し基準を設定しているのに対し、ISO10993 では顕微鏡による観察によって、0 (細胞毒性なし) ~3 (重度の細胞毒性あり) の定性的な 4 段階評価と、細胞数による定量的な評価を行っている。

#### (厚労省ガイドライン)

#### 10.3 結果の提示

10.3.1 各シャーレ (又は各穴) 内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは、実体顕微鏡で

観察し、細胞が 50 個以上集まっている集落について数える。

10.3.2 新鮮培地のみで培養したシャーレ（又は穴）をコントロール群とする。コントロール群に播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数からコロニー形成率を求める。コントロール群でのコロニー数の平均値を 100%として、100%抽出液及び種々の濃度に希釈された抽出液（10.1 項参照）で形成されたコロニー数を百分率で示す。

10.3.3 実験結果は、縦軸がコロニー形成率（コントロール群：100%）を、横軸が試験液の濃度（対数）を示すグラフ上にプロットする。グラフよりコントロール群のコロニー数を 50%阻害する試験液の濃度（%）を求め IC50(%)とする。

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

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

10.4 結果の評価

以下に記載する内容を満たした試験において、医療用具又は材料の抽出液の細胞毒性を正しく評価できる。

10.4.1 陰性材料での 100%抽出液を試料として試験した時、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度であり、統計的に有意差を認めない。

10.4.2 溶媒を使用した時は、使用溶媒濃度で試験した結果、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数が、コントロール群のコロニー数と同程度であり、統計的に有意差を認めないことを確認する。

10.4.3 標準材料 A 及び標準材料 B の抽出液を試験材料と同様に抽出して試験した時、抽出液の濃度とコロニー形成阻害の強さに各々用量反応関係を認め、さらに、得られた IC50 は標準材料 A 及び標準材料 B において各々下記の値を満たす。

標準材料 A の IC50 : 7%未満

標準材料 B の IC50 : 70%未満

(ISO10993)

8.5 Determination of cytotoxicity

8.5.1 Determine cytotoxic effects by either qualitative or quantitative means.

a) Qualitative evaluation: examine the cells microscopically, using cytochemical stain if desired. Assess changes in, for example, general morphology, vacuolization, detachment, cell lysis and membrane integrity. The change from normal morphology shall be recorded in the test report descriptively or numerically. A useful way to grade test materials is presented below.

[Cytotoxicity scale]	[Interpretation]
0	Noncytotoxic
1	Mildly cytotoxic

2 Moderately cytotoxic

3 Severely cytotoxic

The method of evaluation and the results of the evaluation shall be included in the test report.

b) Quantitative evaluation: measure the parameter cell death, inhibition of cell growth, cell proliferation or colony formation. The number of cells, amount of protein, release of enzymes, release of vital dye, reduction of vital dye or other measurable parameter may be quantified by objective means. The objective measure and response shall be recorded in the test report.

NOTE For particular methods of determining cytotoxicity, a zero time or baseline cell culture control may be necessary.

8.5.2 Ensure that care is taken in the choice of evaluation methods, as the test results may be invalid if the test specimen releases substances that interfere with the test system or measurement.

NOTE Materials that may release formaldehyde can only be reliably tested when cell viability is evaluated.

8.5.3 If there are evident differences in the test result for replicate culture vessels, then the test is either inappropriate or invalid.

8.5.4 If the negative, positive and any other controls (reference, medium, blank, reagent, etc.) do not have the expected response in the test system, then repeat the assay(s).

## (b) 直接接触法

### a) 概要

直接接触法において、日本のガイドラインでは、コロニー法を用いている。他方、ISO10993-5では、直接接触によるサブコンフルエント法が用いられている。前者は、陰性材料上では陰性対照と同等のコロニーが形成されるのに対して、陽性標準材料上では、コロニー形成が阻害されていることが確認される方法で、後者は、陰性材料では材料周囲に正常に細胞が増殖するのに対して、陽性の標準材料では材料周囲の細胞が死滅することが確認される。

### b) 手順

#### (直接接触によるコロニー法)

##### 11.1 試料の調製

11.1.1 60mm、35mm のシャーレ、又は 12 穴、24 穴プレートのいずれかの大きさに合うよう

に試験材料を切断し、円板又は半円板の試料を最低 3 枚ずつ作製し、重量及び表面積を測定する。

11.1.2 陰性材料及び標準材料 B は、試験材料と同様に切断する。

11.1.3 試験医療用具又は材料の使用目的に適切な滅菌処理を施す。

11.1.4 試料はシャーレ(又は穴)によく密着させる。

## 11.2 実験法

11.2.1 細胞株は V79 細胞を、培地には ME10 培地(5.4 項参照)を用いる。

11.2.2 60mm シャーレには 100~200cells(培地 8ml)、35mm シャーレには 50~100cells(培地 2.5ml)、12 穴プレートには 40~50cells(培地 1ml)、又は 24 穴プレートには 40~50cells(培地 0.5ml)を加える。

11.2.3 陰性材料及び標準材料 B は、試験材料と同様に細胞及び培地を加える。

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

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

11.2.6 固定後、5.8 項に従って調製されたギムザ染色液を加え、コロニーを染色する。

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

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

## (直接接触によるサブコンフルエント法)

### 8.3 Test by direct contact

8.3.1 This test allows both qualitative and quantitative assessment of cytotoxicity.

8.3.2 Pipette a known aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of vessels for direct exposure to the test sample. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle horizontal rotation.

8.3.3 Incubate the culture at (37 + 2) °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to subconfluency.

8.3.4 Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

8.3.5 Remove and discard the culture medium. Then add fresh culture medium to each vessel.

8.3.6 Carefully place individual specimens of the test sample on the cell layer in the centre of each replicate vessel. Ensure that the specimen covers approximately one-tenth of the cell

layer surface. Exercise care to prevent unnecessary movement of the specimens, as this could cause physical trauma to the cells, for example patches of dislodged cells.

NOTE When appropriate, the specimen can be placed in the culture vessel prior to the addition of the cells.

8.3.7 Prepare replicate vessels for both the negative-control and positive-control materials.

8.3.8 Incubate the vessels, under the same conditions as in 8.3.3, for an appropriate interval (a minimum of 24 h) corresponding to the selected specific assay.

8.3.9 Discard the supernatant culture medium and determine the cytotoxic effects in accordance with 8.5.

### c) 評価

#### (コロニー法)

##### 11.3 結果の提示

11.3.1 培養用シャーレ (又は穴) に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数をコントロール群としその平均値を 100%とする。

11.3.2 試験材料に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数を数え、コントロールのコロニー数に対する割合 (%) を求める。

11.3.3 陰性材料及び標準材料 B のコロニー形成率 (%) を求める。

##### 11.4 結果の評価

11.4.1 次項に記載する内容を満たした試験において、医療用具又は材料の直接接触法での細胞毒性を正しく評価できる。

11.4.2 陰性材料及び標準材料 B でのコロニー形成率が下記の値を満たす。

陰性材料でのコロニー形成率：80%以上

標準材料 B でのコロニー形成率：0%

11.4.3 試験材料に直接細胞を撒いた時のコロニー形成率が<30%で、抽出液での IC50 が >100%であった時、試験材料の抽出を 72 時間行い、10 項に従って、再度抽出液の試験を行う。

#### (サブコンフルエント法)

##### 8.5 Determination of cytotoxicity

8.5.1 Determine cytotoxic effects by either qualitative or quantitative means.

- a) Qualitative evaluation: examine the cells microscopically, using cytochemical stain if desired. Assess changes in, for example, general morphology, vacuolization, detachment, cell lysis and membrane integrity. The change from normal morphology shall be recorded



in the test report descriptively or numerically. A useful way to grade test materials is presented below.

[Cytotoxicity scale]	[Interpretation]
0	Noncytotoxic
1	Mildly cytotoxic
2	Moderately cytotoxic
3	Severely cytotoxic

The method of evaluation and the results of the evaluation shall be included in the test report.

b) Quantitative evaluation: measure the parameter cell death, inhibition of cell growth, cell proliferation or colony formation. The number of cells, amount of protein, release of enzymes, release of vital dye, reduction of vital dye or other measurable parameter may be quantified by objective means. The objective measure and response shall be recorded in the test report.

NOTE For particular methods of determining cytotoxicity, a zero time or baseline cell culture control may be necessary.

8.5.2 Ensure that care is taken in the choice of evaluation methods, as the test results may be invalid if the test specimen releases substances that interfere with the test system or measurement.

NOTE Materials that may release formaldehyde can only be reliably tested when cell viability is evaluated.

8.5.3 If there are evident differences in the test result for replicate culture vessels, then the test is either inappropriate or invalid.

8.5.4 If the negative, positive and any other controls (reference, medium, blank, reagent, etc.) do not have the expected response in the test system, then repeat the assay(s).

### (c) 間接接触法

#### a) 概要

間接接触（寒天重層法）による細胞毒性試験は、L929細胞をシャーレ全体に播種し、ニュートラルレッドで染色した後、寒天を重層し材料、陰性対照物質および陽性対照物質をしみ込ませたる紙を置き、周囲にできる阻止円の大きさを細胞毒性試験を評価する方法である。

#### b) 手順

(ISO10993)

#### 8.4 Test by indirect contact

##### 8.4.1 Agar diffusion test

8.4.1.1 This test allows a qualitative assessment of cytotoxicity. This assay is not appropriate for leachables that cannot diffuse through the agar layer, or that should react with agar.

8.4.1.2 Pipette a known aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of replicate vessels for the test. Distribute the cells evenly over the surface of each vessel by gentle horizontal rotation.

8.4.1.3 Incubate the cultures at  $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$  in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to approximate confluence at the end of the logarithmic phase of the growth curve.

8.4.1.4 Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

8.4.1.5 Remove and discard the culture medium from the vessel. Then mix fresh culture medium containing serum with melted agar to obtain a final mass concentration of agar of 0,5 % to 2 %, and pipette an appropriate volume into each vessel. Use only agar that is suitable for the growth of mammalian cells in culture. The agar culture medium mixture should be in a liquid state and at a temperature that is compatible with mammalian cells.

NOTE Agar is available in various molecular weight ranges and purities.

8.4.1.6 Carefully place replicate specimens of the test sample on the solidified agar layer in each vessel. Ensure that the specimen covers approximately one-tenth of the cell layer surface. Presoak any absorbent material with the culture medium before placing it on the agar to prevent dehydration of the agar.

8.4.1.7 Prepare replicate vessels with both negative-control and positive-control specimens.

8.4.1.8 Incubate the vessels, using the same conditions as described in 8.4.1.3, for between 24 h and 72 h.

8.4.1.9 Examine the cells to determine cytotoxic effects before and after carefully removing the specimens from the agar. Use of a vital stain, e.g. neutral red, may aid in the detection of cytotoxicity. The vital stain may be added before or after the incubation with the specimen. If the stain is added before the incubation, protect the cultures from light to prevent cell damage elicited by photoactivation of the stain.

##### 8.4.2 Filter diffusion test

8.4.2.1 This test allows a qualitative assessment of cytotoxicity.

8.4.2.2 Place a surfactant-free filter of pore size  $0,45 \mu\text{m}$  into each vessel, and add a known

aliquot of the continuously stirred cell suspension into each of a sufficient number of replicate vessels for the test. Distribute the cells evenly over the surface of each filter by gentle rotation.

8.4.2.3 Incubate the cultures at  $(37 \pm 2)$  °C in air with or without 5 % (volume fraction) carbon dioxide as appropriate for the buffer system chosen for the culture medium until the cultures have grown to approximate confluence at the end of the logarithmic phase of the growth curve.

8.4.2.4 Verify the subconfluency and the morphology of the cultures with a microscope before starting the test.

8.4.2.5 Remove and discard the culture medium from the vessels. Then transfer the filters, cell-side down, on to a layer of solidified agar (see 8.4.1.6).

8.4.2.6 Carefully place the replicate specimens of the test sample on the acellular (top) side of the filter. Retain liquid extracts and freshly mixed compounds in non-reactive rings placed on the filter.

8.4.2.7 Prepare replicate filters with both the negative-control and positive-control specimens.

8.4.2.8 Incubate the vessels, using the same conditions described in 8.4.2.3, for  $2 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$ .

8.4.2.9 Carefully remove the specimens from the filter and carefully separate the filter from the agar surface.

8.4.2.10 Determine the cytotoxic effects using an appropriate stain procedure.

(ASTM F895-84)

13. Test Procedure

13.1 Perform the agar diffusion cytotoxicity assay as follows:

13.2 Microscopically examine the cell cultures and reject any in which the cell monolayer is not of correct confluency or the cells show signs of granulation or sloughing.

13.3 Autoclave 3 % Nobel Agar for 15 min at 121°C.

13.4 Place the autoclaved agar into a 45°C waterbath and allow it to cool to 45°C.

13.5 Place 2X MEM into a 45°C waterbath and allow it to warm to 45°C. Do not allow the medium to remain at 45°C longer than 1 h.

13.6 Mix equal volumes of the 2X MEM and 3 % Nobel Agar thoroughly. Allow the mixture to cool to approximately 39°C.

13.7 Aspirate the medium from all acceptable cultures, and replace it with 2.0 mL of agar medium.

13.8 Place the cultures on a flat surface to solidify at room temperature.

13.9 Place a single test or control specimen in each dish in contact with the agar surface.

Prepare duplicate cultures for each test material and both positive and negative controls.

NOTE 8—This method may be modified by using larger culture dishes to accommodate the positive and negative control specimens in the same dish as the test specimen. Quantities of cells and reagents must be increased appropriately if larger dishes are used.

13.10 Incubate all cultures for 24 6 1 h.

13.11 Mark the outline of the specimen on the bottom of the culture dish with a permanent marker, and then remove the specimen.

13.12 Add 2 mL of Neutral Red solution to each dish and incubate for 1 h.

13.13 Pour off the Neutral Red solution and examine each culture microscopically under and around each control and test specimen

c) 評価

(ASTM F895-84)

14. Evaluation of Results

14.1 A cell culture shall be deemed to show a cytotoxic effect if microscopic examination reveals malformation, degeneration, sloughing, or lysis of the cells within the zone or a moderate to severe reduction in cell layer density.

14.2 The Zone Index (Table 1) measures the clear zone in which cells do not stain with neutral red.

14.3 The Lysis Index (Table 2) measures the number of cells affected within the zone of toxicity.

NOTE 9—A slight reduction of cell layer density is acceptable, provided there is no other evidence of cytotoxicity as specified in 14.1.

14.4 A Response Index may be determined by assigning a fraction with the Zone Index in the numerator and the Lysis Index in the denominator to each specimen ( $RI = ZI/LI$ ).

$$\text{Response Index} = (\text{Zone Index}(0-5)) / (\text{Lysis Index}(0-5))$$

The response index should be reported as a fraction, for example, 3/2.

14.5 If, for a given set of specimens, a cytotoxic effect is observed for the negative controls or no cytotoxic effect is elicited by the positive controls, the results for that set of specimens shall be considered invalid

TABLE 1 Zone Description

Zone Index	Description of Zone
0	No detectable zone around or under specimen
1	Zone limited to area under specimen
2	Zone extends less than 0.5 cm beyond specimen
3	Zone extends 0.5 to 1.0 cm beyond specimen
4	Zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen but does not involve entire dish
5	Zone involves entire dish

TABLE 2 Lysis Description

Lysis Index	Description of Zone
0	No observable cytotoxicity
1	Less than 20 % of zone affected
2	20 to 39 % of zone affected
3	40 to 59 % of zone affected
4	60 to 80 % of zone affected
5	Greater than 80 % of zone affected

### 3) 遺伝毒性試験

#### ①目的

遺伝毒性試験は、1個の細胞に生じたDNA傷害に派生して、細胞や個体レベルで遺伝子突然変異や染色体異常を起こす遺伝毒性物質を検出する試験である。体細胞でDNA傷害が生じるとがんの原因となる場合があり、他方、生殖細胞でDNA傷害が生じると、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。ここで、遺伝毒性に対して、変異原性という用語があるが、変異原性は、遺伝子突然変異、染色体の構造異常、染色体の数的異常を意味し、遺伝毒性は、化学的物質自体またはその代謝物によるDNA傷害生やDNA付加体形成などを含む広い意味で使用されているため、ここでは、変異原性を含めて遺伝毒性という用語を用いる<sup>10</sup>。

#### ②試験法の類型

遺伝毒性を検出する試験法には多くの手法があり、検出する内容によって、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA傷害性、その他、に分類することができる。他方、*in vitro*の試験か*in vivo*の試験かによっても分類することができる。これらの分類によって主な遺伝毒性試験を挙げると、下表のようになる。

<sup>10</sup> 医薬品の安全生 92 頁。

表 遺伝毒性試験

	in vitro	in vivo
DNA 傷害性検出	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 不定期 DNA 合成試験</li> <li>・ 単細胞ゲル電気泳動試験など</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 不定期 DNA 合成試験</li> <li>・ 単細胞ゲル電気泳動試験など</li> </ul>
染色体異常検出	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 培養細胞を用いる小核試験など</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 哺乳動物を用いる小核試験</li> <li>・ 精原細胞染色体異常試験など</li> </ul>
遺伝子突然変異、 細胞悪性化検出	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 細菌を用いる復帰突然変異試験</li> <li>・ 軟寒天コロニー形成阻害試験</li> <li>・ マウスリンフォーマ細胞試験</li> <li>・ BALB3T3 細胞を用いる形質転換試験など</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ トランスジェニックマウスを用いる試験など</li> </ul>
その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 姉妹染色分体交換試験など</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 姉妹染色分体交換試験など</li> </ul>

日本の生物学的試験ガイドラインでは、医薬品毒性試験法ガイドラインや、化審法毒性試験法、OECD ガイドラインに従って、復帰突然変異試験と染色体異常試験を実施することを推奨しているが、国際規格である ISO10993-3 では、in vitro の場合は、OECD 471、OECD 473、OECD 476、OECD 479、OECD 482 の各ガイドラインの試験法を採用することが推奨され、in vivo の場合には、OECD 474、OECD 475、OECD 478、OECD 483、OECD 484、OECD 485、OECD 486 の試験が推奨されており、これらの中では、DNA への影響を調べる試験も必須としている。

### ③ 具体的試験手法とその評価基準

以下では、遺伝毒性試験の内、代表的な例として、小核試験、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスリンフォーマ試験を取り上げる。

#### (a) 小核試験

##### a) 概要

動物の骨髄細胞を用いた遺伝毒性試験で、染色体異常（または紡錘体形成阻害作用）を効率良く検出することができる。動物を用いた試験としては簡便なため、各種のガイドラインにも採用され、最も多く実施されている。動物個体を用いて染色体損傷を検出する試験としては、通常げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験と造血系細胞を用いる小核試験が用いられる。染色体異常を観察する試験では、様々な染色体の変化が検出できる。また、染色体異常に起因して生成する小核を骨髄または末梢血を用いて検出する小核試験

は、染色体異常誘発物質を検出する簡便な試験法として、前者と同等に受け入れられる。更に小核試験では異数性誘発物質を検出できる可能性がある。

#### b) 手順

##### 2) 動物

通常若い成熟げっ歯類を用いる。原則として小核誘発作用の感受性が高い雄動物を用いるが、雌雄間に毒性または代謝の相違が明確に認められる場合には雌雄両性を用いるべきである。また、特定の性にのみ用いる薬剤を試験する場合は、該当する性を使用すべきである。なお、ラットについては、骨髄を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核が出現する可能性があることから、適切な手法を用いて観察する。また、末梢血を用いた場合には小核を持つ赤血球が脾臓で除去される可能性があることなどを考慮する必要がある。

##### 3) 動物数

1群，性あたり5匹以上とする。

##### 4) 被験物質の調製

被験物質は適当な媒体に溶解または懸濁させて調製する（注1）（液体物質の場合は直接投与可能）。溶媒は、生理食塩液などの水系溶媒が推奨されるが、溶解しにくい場合には適切な媒体に懸濁するか、またはオリーブ油など他の溶媒（被験物質と反応性がなく、毒性を示さない投与量）を用いる。

##### 5) 投与経路

臨床適用経路，強制経口投与または腹腔内投与とする。

##### 6) 用量段階

何らかの毒性徴候が現れる用量を最高用量とし，原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下で少なくとも3段階以上の試験群を設定する。なお，毒性徴候が現れない場合の最高用量は，単回または14日以内の反復投与の場合2000 mg/kg/日，それを超える長期連続投与では1000 mg/kg/日とする。

##### 7) 対照群

陰性対照は，原則として溶媒対照とする。陽性対照としては，既知小核誘発物質を用いる。

##### 8) 投与回数

単回又は反復投与とする。

## 9) 標本作製時期

## ①骨髄を用いる場合

単回投与では、投与後 24～48 時間の間に適当な間隔をおいて最低 2 回の標本作製時期を設定し、動物を屠殺、骨髄塗抹標本を作製する。また、複数回の投与を行った場合には、最終投与後 18～24 時間の間に 1 回標本作製を行う。

## ②末梢血を用いる場合

単回投与では、投与後 36～72 時間の間に適当な間隔をおいて最低 2 回の採血時期を設定し、標本を作製する。また、複数回の投与を行った場合には、最終投与後 24～36 時間の間に 1 回標本作製を行う。

## 10) 観察細胞数

コード化した標本について、個体当たり 2000 個以上の幼若赤血球について小核の有無を検索する。同時に骨髄細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、骨髄細胞を用いる場合には最低 200 個、末梢血を用いる場合には最低 1000 個の赤血球を観察することにより求める。

## c) 評価

## 11) 結果の表示

個体ごとに小核を有する幼若赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の比を表示する。陰性対照群の背景データの利用を含め、適切な統計処理を用いることにより結果の判定を行う。ただし、統計的な有意性のみが判断基準ではないので、判断の付きにくい結果が得られた場合には実験条件を検討した上で再試験を行い、最終的な判定を下すことが望ましい。なお、両性を用いた場合に、明確な性差が認められなければ、両性のデータをまとめて統計処理を行っても良い。

## 12) 陰性の場合の骨髄での暴露証明

いずれかの *in vitro* 試験で陽性の結果を示した被験物質については、以下の方法のいずれかにより *in vivo* での暴露の証拠を示さねばならない。*In vitro* 試験で遺伝毒性が認められなかった場合には、標的細胞が暴露されたことを以下の方法を用いて証明するか、標準的な吸収、分布、代謝、排泄(ADME)試験の結果から推察する。

①小核試験における全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な変化。

②血中もしくは血漿中における被験物質またはその関連物質の測定による生体への取り込みの確



認.

- ③骨髄中での被験物質またはその関連物質の直接的測定.
- ④オートラジオグラフィによる組織暴露の評価.

②～④の方法においては、in vitro 試験で陽性の場合には小核試験と同じ動物種、系統、及び投与経路を用いて、最高用量あるいは適切な用量について行われることが望ましい。

なお、代謝活性化により作用を現す物質においては、活性体が不安定で②～④の測定が適さない場合もある。骨髄でのじゅうぶんな暴露証明が得られないような場合には、肝臓など他の臓器を標的とする遺伝毒性試験系のうち適切なものを被験物質に応じて選び、追加することが望ましい。

#### (b) 細菌を用いる復帰突然変異

##### a) 概要

この試験の原理は、必須アミノ酸のヒスチジンがないと生育できない(ヒスチジン要求性と言う)変異株のネズミチフス菌を用い、これが変異性を有する物質(変異原)に会うと菌が分裂する過程で元のヒスチジン非要求性株に戻る(復帰突然変異)を利用した試験である。変異したヒスチジン非要求性株はヒスチジンを自己生産して増殖しコロニーを形成するため、このコロニー数を計測することにより変異原性が陽性か陰性かを知ることができる。通常は5菌株 [ネズミチフス菌 4 菌株並びに大腸菌 1 菌株] を用いて行われることが多い。生体内の代謝活性により変異原となる物質も知られているため、ラットの肝臓抽出物(S9mix)を加えた代謝活性系での試験も同時に行う。陽性の判定基準はコロニー数が溶媒対照の2倍以上で、用量依存性が見られる場合とする。

##### b) 手順

以下では、例として医薬品の毒性試験に関するガイドラインにおける手法を取り上げ散るが、化審法のガイドラインや OECD のガイドラインにおいても、同様な試験を行うことが説明されている。

#### 2) 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う。

- (1) ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) TA98
- (2) ネズミチフス菌 TA100
- (3) ネズミチフス菌 TA1535
- (4) ネズミチフス菌 TA1537, TA97 または TA97a
- (5) ネズミチフス菌 TA102, 大腸菌 (Escherichia coli) WP2uvrA または大腸菌

## WP2uvrA/pKM101

DNA にクロスリンクする化合物を検出する時には、ネズミチフス菌では TA102 を含めるか、大腸菌では除去修復能が野生型の WP2 株または WP2/pKM101 株を追加する。ただし、そのような化合物は染色体損傷を検索する試験でも検出可能である（注 1）。

## 3) 試験法

プレインキュベーション法またはプレート法のいずれかで実施する。科学的に正当な理由があれば、他の方法を用いてもよい。いずれの方法においても、代謝活性化系の存在下及び非存在下について試験を行う。代謝活性化系の存在下で行う試験には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネート 9000×g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の S9 mix 中の濃度は 5～30% の範囲内（通常 10%）とする（注 2）。

## 4) 被験物質の調製

被験物質が水溶性の場合は滅菌蒸留水あるいは生理食塩液などに溶解し、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などに溶解する。いずれにも溶解しない場合には懸濁液を用いるか、試験菌及び S9 mix の活性に影響を及ぼさない適切な溶媒を用いる。

## 5) 用量段階

適切な用量間隔（原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下）で 5 段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は 5 mg/plate を最高用量とする。難溶性物質で試験に用いた菌株において生育阻害がみられない場合には、析出する用量を最高用量とすることができる（注 3）。

## 6) 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける（注 4）。

## 7) プレート数

被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ 2 枚以上のプレートを用いる。

## 8) 復帰変異コロニーの観察

全てのプレートを原則として 37°C で 48～72 時間培養した後に、プレート毎に復帰変異コロニー数を計測し、記録する。同時に生育阻害を観察し、それが認められた場合には、その用量を記

録する。また、被験物質の析出が認められた場合にも記録する（注 5）。

#### 9) 再現性

原則として、試験結果には再現性がなければならない。ただし、全菌株を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、陰性対照及び陽性対照も含めた用量設定試験が各用量 2 枚以上のプレートを用いて行われている場合には、本試験と合わせて再現性の確認に用いることができる。用量設定試験及び本試験の結果に再現性が認められない場合には、再現性を確認する試験を実施する。

#### c) 評価

上記の試験法を採用した場合の結果とその評価は次のとおりに行う。

#### 10) 結果の判定

復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する（注 6）。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

#### 11) 結果の表示

各プレート毎の復帰変異コロニー数を示すと共に、各用量毎にその平均値を表示する。また、処理終了時（または変異コロニー計測時）の被験物質の析出並びに生育阻害も表示する。

この判断基準の例としては、「プレート当たりの復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、かつ、用量依存性が認められた場合に陽性と判定する 2 倍法などが統計学的手法と並用されている。結果の判定に際しては、必要に応じ背景データを考慮すると共に、統計学的手法を用いる場合においても、最終的な判定は試験条件下での生物学的妥当性を考慮して行うことが望ましい」としている。

#### (d) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

##### a) 概要

この試験はほ乳類細胞を用いて染色体損傷を細胞遺伝学的に評価する *in vitro* 試験である。染色体異常は、形態の変化（構造異常）と染色体数の変化（異数性、倍数性）に分けられる。構造異常は通常 DNA 鎖切断に起因すると考えられる。一方、数的異常は主として分裂装置への作用の結果生じる染色体の不分離や分裂の停止に起因する。構造異常や数的異常が誘発された細胞の多くは増殖できずに死滅すると考えられているが、生存した場合には正常と異なる染色体構成（染色体変異）を持つ細胞集団に移行する可能性がある。

## b) 手順

以下では、例として医薬品の毒性試験に関するガイドラインにおける手法を取り上げ散るが、化審法のガイドラインや OECD のガイドラインにおいても、同様な試験を行うことが説明されている。

## 2) 使用細胞

チャイニーズハムスター細胞株（例えば CHL/IU, CHO）、ヒト末梢血リンパ球、もしくはその他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数（モード数）、細胞周期、マイコプラズマの汚染の有無などを調べておく（注 3）。

## 3) 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化系の存在下及び非存在下について、3~6 時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 正常細胞周期後に染色体標本を作製する。代謝活性化系の非存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、代謝活性化系非存在下で約 1.5 正常細胞周期の連続処理法による試験を実施する。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて代謝活性化系存在下での確認試験を行う。

代謝活性化には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9000×g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の最終濃度は 1~10% の範囲内（通常 5%）とする。

## 4) 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩液などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

## 5) 用量段階

適切な間隔（原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 5 mg/mL 又は 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とした細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。細胞増殖抑制の指標は、株細胞の場合、細胞数または単層培養密度とし、ヒト末梢血リンパ球では分裂指数を用いてもよい。原則として、被験物質の培養液中での溶解性にかかわらず、細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする。細胞増殖は短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験においても染色体標本作製時に計測する。50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5 mg/mL 又は 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。細胞増殖抑制が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められ