

た場合には、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。用量相関性のある細胞増殖抑制が被験物質の析出状況下で認められる場合には、析出の見られる濃度が2用量以上あることが望ましい。析出物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞増殖抑制が得られなくても良い。

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染色体異常誘発物質による処理群を設ける(注6)。必要に応じ、溶媒を加えない無処理対照群を置く。

7) プレート数

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

8) 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり200個以上のおよび広がった分裂中期細胞(染色体数がモード数 ± 2)を観察し、染色体構造異常をもつ細胞数を記録する。更に、構造異常の種類別に細胞数あるいは出現数を記録する。2枚のプレートを用いた場合には、原則としてプレート当たり100個以上の分裂中期細胞を観察する。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常の判定には含めない。染色体の数的異常については、各用量当たり200個以上の分裂中期細胞について観察し、倍数体等の出現数を記録する。

c) 評価

9) 結果の判定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められた場合に陽性と判定する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件下で確認試験を実施する。

10) 結果の表示

プレート毎に、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度(%)並びに構造異常の種類別に細胞数あるいは出現数を表示する。また、各群の平均値を表示する。倍数体等についてもその細胞数と出現頻度(%)を表示する。用量設定のための細胞増殖抑制試験並びに染色体分析のための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ける各用量群と陰性対照群の細胞増殖に関するデータを表示する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

e) マウスリンフォーマ試験

a) 概要

この試験は、ほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験はほ乳類細胞に誘起された遺伝子突然変異を定量的に評価できる試験である。マウスリンパ腫 L5178Y 細胞のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を標的とした試験系 (以下マウスリンフォーマ TK 試験) は、現存する他の遺伝子突然変異検出系に比べ、高感度の遺伝子突然変異検出系であることが証明されており、被験物質のほ乳類細胞に対する遺伝子変異誘発能を評価するのに適した系であると考えられる。マウスリンフォーマ TK 試験では増殖速度が異なる 2 種類の変異体が出現するが、その出現頻度を比較することにより、変異の特徴を推定することも可能である。本試験にはマイクロウェルプレートを用いる方法 (マイクロウェル法) と、ソフトアガーを用いる方法がある。

b) 手順

具体的な手法に関して、医薬品の毒性ガイドラインと、OECD のガイドラインにおける手法を例示する。両者の試験法については、ほぼ同様な手法を採用しているといえる。

2) 使用細胞

マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk+/-3.7.2c 株を用いる。試験に用いる細胞については、マイコプラズマ汚染の有無、細胞周期、自然突然変異頻度などを調べておく。

3) 試験法

対数増殖期にある細胞を用い、最初に 3～4 時間の短時間処理法として代謝活性化系の非存在下及び、存在下について試験を実施する。代謝活性化系の非存在下の結果が陰性の場合には、代謝活性化系の非存在下の 24 時間連続処理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 2%) とする。

4) 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁させる。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、水に不溶の場合にはジメチルスルホキシド (DMSO) などを用いて溶解させる。

5) 用量段階

適切な間隔（原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下）で4段階以上の突然変異コロニーが解析できる用量を用いる。最高用量は、用量設定試験の結果から80%以上の細胞毒性（20%以下の相対生存率または相対増殖率）が得られる用量とする。ただし、90%以上の細胞毒性が認められる用量で陽性結果が得られた場合には、結果の解釈には注意を要する。

80%以上の細胞毒性が認められない場合には5 mg/ml または 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。80%以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。析出物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞毒性が得られなくても良い。

6) 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として小さなコロニーを主として誘発する既知の遺伝毒性物質で処理した群を設ける。

7) 処理系列数

被験物質の各用量群並びに陽性対照群について、それぞれ1～2系列の処理を行う。ただし陰性対照群については、2系列の処理を行う。

8) 細胞毒性及び突然変異の検出

被験物質処理直後の細胞を一部分取し、マイクロウェルプレートに播種して適切な期間培養し、生育コロニーを含むウェルを計数し、生存率を算出する。残りの細胞は2日間の突然変異発現期間に、毎日細胞濃度を測定して適宜継代した後、マイクロウェルプレートにトリフルオロチミジン (TFT) 存在下及び非存在下で播種して適切な期間（通常12日間）培養し、それぞれTFT耐性変異体コロニー、及び生育コロニーを含むウェルを計数して、突然変異頻度を算出する。なおコロニーサイズの解析のためにTFT耐性変異体コロニーを含むウェルはコロニーの大小別に計数する

c) 評価

9) 結果の判定

結果の判定は、適切な統計処理法を用いると共に、突然変異頻度の有意な上昇、及び用量依存性の有無を考慮して行う。最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行うことが望ましい。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。

10) 結果の表示

被験物質処理群、陰性及び陽性対照群について、薬物処理直後のコロニー形成率 (PE0) と陰性対照に対する相対生存率 (RS)、2日間の突然変異発現期間中の細胞増殖率を考慮した細胞毒性指標

(RSG, RTG), 突然変異発現期間終了後のコロニー形成率 (PE2), 突然変異頻度 (MF), 統計処理結果を表示する。陰性及び陽性対照でのコロニーサイズの解析, ならびに被験物質処理群で突然変異頻度の上昇が認められた場合には, 最大突然変異頻度が得られた用量を含めた少なくとも一用量以上でのコロニーサイズの解析結果を表示する (注 10)。

(注 10) 突然変異体コロニーを大 (正常の増殖) と小 (増殖が遅い:SC) の 2 種類に分類してウェルを計数して, 全体に対する小コロニーの変異体の割合を%SC として算出する。

4) 急性毒性試験

①目的

急性毒性試験は、試験試料から抽出した抽出液に、急性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。

②試験法の類型

(a)急性経口毒性試験 (OECD TG420、TG423、TG425 参照)

(b)急性吸入毒性試験 (OECD TG403 参照)

(c)急性経皮毒性試験 (OECD TG402 参照)

皮膚を経由して吸収毒性を示すもの或いはその用途で皮膚への接触が多く考えられる場合などに行う試験であり、化学物質を動物 (ラット・マウス) 体重に対して最高 2000mg/kg で、24 時間塗布し、14 日間の死亡数、一般状態、体重、解剖検査より毒性を質的および量的に解明する。

(d)静脈内投与試験 (ASTMF750-87 参照)

a) 概要

試験試料から、生理食塩液、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、静脈内投与 (生理食塩液試験液) 又は腹腔内投与 (植物油試験液) する。投与後、72 時間まで観察し、対照液投与群と比較して、急性毒性の有無を評価する。

b) 手順

次に上げる試験法は、ASTMF750-87 に基づいて作成された試験法である。

3.4 試験法

3.4.1 試験動物

体重17~23gの栄養状態のよい健康なアルビノマウス。使用前1週間程度、一定環境/飼料で飼育し、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。雄性動物を用いる。ただし、試験動物の性別は、女性に適用される医療機器の試験などの場合は雌を用いるなど、試験試料の用途やそれを構成する原料化学物質を考慮して決定することが望ましい。

3.4.2 試験用量

試験液の投与量は、原則として、試験動物の体重 1kg につき試験液 50mL とする (5.2参照)。

3.4.3 投与経路

生理食塩液抽出の試験液及び生理食塩液抽出の対照液は静脈内投与とし、植物油抽出の試験液及び植物油抽出の対照液は腹腔内投与とする。

3.4.4 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24時間、48時間、72時間経過後に行う。
一般状態は、基本的には表1に従って記録する。死亡例が認められた場合、発見後ただちに剖検する。
- 体重測定：全例について投与前、投与後24時間、同48時間、同72時間経過後に測定する。(5.3参照)
- 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。

表1. 一般状態の分類

Normal, no symptoms(正常)	副作用は認められない
Slight(軽度な反応)	軽度の運動機能低下、呼吸困難、腹腔刺激性の症状が認められる。
Moderate(中等度の反応)	腹腔刺激性、呼吸困難、運動機能低下、眼まぶた下垂、下痢が明確に認められる。
Marked(著しい反応)	虚脱、チアノーゼ、振せんあるいは、重度の腹腔刺激性、下痢、眼瞼下垂、呼吸困難が認められる。
Dead(死亡)	死亡

c) 評価

3.4.5 判定方法

観察期間を通して、試験液投与群の全ての動物が、対照液投与群の動物と比較して強い毒性症状（一般状態、体重推移、病理解剖結果）が認められない場合に急性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、或いは2匹以上の動物で著しい毒性症状(表1. "Marked" の症状)を示した場合は急性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異常(表1. "Slight" の症状)を示した場合、或いは1匹の動物だけが重い症状(表1. "Marked" の症状)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。毒性症状は認められないが、1群全ての動物が有意な体重減少を示した場合（例えば対照液投与群と比較し、統計学的に有意な減少を示した場合）も同様に再試験(試験液投与群及び対照液投与群各々例数10匹)を行う。再試験の結果、試験液投与群のいずれの個体も、対照液投与群との比較において、強い毒性症状を示さなかった場合、急性毒性はないと判定する。

④参考規格等

- ・ BS5736:Part 3 Method of test for systemic toxicity; assessment of acute toxicity of extracts from medical devices
- ・ ASTM F750-82: Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the Mouse
- ・ ISO10993-11 Biological evaluation of medical devices Test for systemic toxicity.

5) 発熱性物質試験

①目的

この試験は、医療機器や医療材料中に存在する発熱性物質の有無を調べることを目的に実施され、医療用具又は材料から抽出した抽出液中に、材料に由来するエンドトキシン以外の発熱性物質が存在しないことを確認するための試験と、主に天然由来材料から構成される医用機器や医療材料の場合に、材料に由来するエンドトキシン汚染の可能性を調査することを目的に実施される試験とがある。日本の生物学的試験ガイドラインでは、最終製品の品質管理試験としてのエンドトキシン試験方法を対象外としているが、ここでは、広く両者の試験法を発熱性物質試験として取り上げる。

②試験法の類型

広義の発熱性物質試験には、大きく、エンドトキシン以外の発熱性物質試験と、エンドトキシン試験とがある。エンドトキシン試験には、ゲル化法と光学的測定法がある。ゲル化法は、エンドトキシンの存在によるライセート試液の凝固反応に基づいて、エンドトキシンを検出又は定量する方法である。光学的測定法には、さらに比濁法と比色法とがあり、比濁法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度の変化を測定することにより、試料溶液のエンドトキシン濃度を測定する方法である。エンドポイント比濁法とカイネティック比濁法があり、エンドポイント比濁法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における反応液の濁度との間の用量反応関係に基づく方法である。カイネティック比濁法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された濁度に達するのに要した時間又は濁度の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。他方、比色法は、エンドトキシンのライセート試液との反応により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は透過率で測定することにより、エンドトキシンを定量する方法である。比色法には、エンドポイント比色法とカイネティック比色法があり、エンドポイント比色法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における発色基の遊離量との間の用量反応関係に基づく方法である。カイネティック比色法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された吸光度又は透過率に達するのに要する時間又は発色の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。

(a) 発熱性物質試験（エンドトキシン以外）

a) 概要

発熱性試験は、材料中にエンドトキシン以外の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。

b) 手順

日本薬局方で提示されている試験法は次の通りである。試験動物のウサギの使用頻度に関しては、日本薬局方では述べられていないが、米国薬局方（USP）では、同一のウサギを試験に繰り返し使用する場合は、少なくとも 48 時間の休養期間をおくことが規定されており、欧州薬局方（EP）では、3 日間の休養期間が規定されている。また、陽性判定のウサギの再使用は不可能になっているが、USP では 2 週間、EP では 3 週間の経過を待つ際しように可能であることが規定されている。

6.1 試験動物

体重 1.5kg 以上の栄養状態のよい健康なウサギで、使用前 1 週間以上は一定飼料で飼育し、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。試験に用いたウサギを再び使用するには、

休養期間をできるだけ長くし、また、発熱性物質陽性と判定された試験に用いたウサギは、再び使用しない。試験動物は、固定器具および体温測定に慣らすために、試験前 1～3 日間に少なくとも 1 日は、固定して 5～6 時間体温を測定する。この期間、試験動物 1 匹ずつをおりに入れ、できるだけ興奮しないようにし、試験日には特に注意して取り扱う。試験室の温度は、試験前 48 時間以上及び試験中 20～27° で、なるべく恒温恒湿に保つ。

6.4 操作

試験は、試験動物が入れられていた部屋と同一温度及び湿度の部屋で行う。試験動物は、通例、適当な固定器に固定する。直腸体温測定は、温度計を直腸内に 60～90mm の範囲内で一定の深さに十分な時間挿入した後、読みとる。第 1 回体温測定の数時間前から、その日の最終体温測定まで飼料を与えない。試験液の注射前、体温を 1 時間間隔で 3 回測定し、第 2 回及び第 3 回の測定体温がほとんど一致した時、第 3 回の値を対照体温とする。第 2 回及び第 3 回の測定体温が、一致しない場合、又は一致してもその値が 39.8° を超える時は、その試験動物を試験から除外する。試験液は 37° に加温し、第 3 回の体温を測定した後 15 分間以内に、耳静脈に注射する。注射後の体温測定は、注射後 1 時間間隔で 3 回行う。対照体温と最高体温との差を体温上昇とする。

c) 評価

第 1 回の試験には、試験動物 3 匹を用いる。注射後の体温上昇 0.6℃以上の試験動物が 2 又は 3 匹の時は、発熱性物質陽性と判定する。

また、体温上昇 0.6℃以上の試験動物が 1 匹であるとき、または 3 匹の体温上昇の合計が 1.4℃を超える時は、さらに試験を行う。

第 2 回の試験には試験動物 5 匹を用い、体温上昇 0.6℃以上の試験動物が 2 匹以上のときは、発熱性物質陽性と判定する。

(b) エンドトキシン試験

a) 概要

エンドトキシン試験法は、グラム陰性菌由来のエンドトキシンがカプトガニの血球抽出成分 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* 試験法であり、試験方法としては、ゲル形成を指標とするゲル化法、ゲルの濁度変化を指標とする比濁法、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高感度であることから、発熱性物質試験法の代替法としても利用されることがある。

b) 手法と評価

日本薬局方に提示されている試験法に従うと次のようになる。この試験法は、アメリカ USP などで提示されている試験法とほぼ同等であるが、細かい数値が若干異なる箇所もある。

(ゲル化法)

(1) 予備試験

(i) ライセート試薬の表示感度確認試験

ライセート試薬の表示感度とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試薬の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度である。ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその表示感度を確認しなければならない。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

ライセート試薬の表示感度の確認は、次の方法により行う。

エンドトキシン標準原液をエンドトキシン試験用水で希釈し、2ス、1ス、0.5ス及び0.25スの4種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製する。ライセート試薬をエンドトキシン試験用水又は適当な緩衝液で溶解し、ライセート試液とする。

ライセート試液及びそれと等しい量、通例、0.1 mL のエンドトキシン標準溶液を試験管にとり、混和する。単回試験用の凍結乾燥ライセート試薬を用いる場合は、その容器にエンドトキシン標準溶液を直接加え、ライセート試薬を溶解する。

これらの試験管又は容器を通例、 $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ に保ち、振動を避けて 60 ± 2 分間静置した後、穏やかに約 180° 転倒し、内容物を観察する、流出しない堅固なゲルが形成されているとき、陽性とする。ゲルを形成しないか、又は形成したゲルが流出するとき、陰性とする。

調製した4種の濃度のエンドトキシン標準溶液を用いて、この4種の液を1組とした試験を4同行う。

各回の試験において、濃度0.25スのエンドトキシン標準溶液がすべて陰性を示さないとき、試験は無効である。試験が無効となったときは、試験条件を整備して再試験を行う。

各回の試験において、陽性を示す最小エンドトキシン濃度をエンドポイント濃度とし、次の式によって幾何平均エンドポイント濃度を求める。

$$\text{幾何平均エンドポイント濃度} = \text{antilog}(\Sigma e / f)$$

Σe : 各回のエンドポイント濃度の対数値の和

f: 試験の回数

求めた幾何平均エンドポイント濃度が $0.5 \sim 2.0 \lambda$ の範囲にあるとき、ライセート試薬の表示感度は確認されたことになる。

(ii) 反応干渉因子試験

本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験である。

表 7-1 に従い、試料溶液を用いて A 及び B 液を調製し、エンドトキシン試験用水を用いて C 及び D 液を調製する。これらの液につき、A 及び B 液は 4 回、C 及び D 液は 2 回試験する。反応温度、反応

時間及びゲル化判定法は、(1)予備試験(1)ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

B 液及び C 液の幾何平均エンドポイント濃度は、(1)予備試験(1)ライセート試薬の表示感度確認試験の計算式を準用して求める。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

表 7-1

液	エンドトキシン 添加濃度/被添加液	希 釈 液	希釈 倍数	希釈後の添加エン ドトキシンの濃度	試験の 回数
A	0/試料溶液	---	---	---	4
B	2 λ/試料溶液	試料溶液	1	2 λ	4
			2	1 λ	
			4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
C	2 λ/エンドトキシ ン試験用水	エンドトキシ ン試験用水	1	2 λ	2
			2	1 λ	
			4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
D	0/エンドトキシン試験 用水	---	---	---	2

A 及び D 液のすべてが陰性を示し、C 液の試験結果によりライセート試薬の表示感度が確認されたとき、反応干渉因子試験は有効とする。B 液の試験において幾何平均エンドポイント濃度が 0.5 ~ 2.0 λ の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないものと判定し、試料溶液は反応干渉因子試験に適合とする。幾何平均エンドポイント濃度がこの範囲にないとき試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。なお、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液又は希釈した試料溶液につき、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。

(2) 限度試験法

本法は、試料溶液に規格値を超えるエンドトキシンが含まれるか否かを、ライセート試薬の表示感度を指標とし、ゲル化反応により判定する方法である。

(i) 操作法

表 7-2 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の試料溶液は、(1)予備試験 (i) 反応干渉因子試験に適合する溶液を用いる。

反応温度、反応時間及びゲル化判定は、(1)予備試験、(i)ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

表 7-2

液	エンドトキシン添加濃度/被添加液	試験の回数
A	0/試料溶液	2
B	2 λ/試料溶液	2
C	2 λ/エンドトキシン試験用水	2
D	0/エンドトキシン試験用水	2

(ii) 判定

B 及び C 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性で、D 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、試験は有効とする。

A 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン規格に適合とする。

A 液の 2 回の試験結果において、1 回が陰性で、他の 1 回が陽性のとき、試験を更に 2 回行う。この 2 回の試験結果がいずれも陰性でないとき、被検試料はエンドトキシン規格に不適とする。

A 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性のとき、A 液が最大有効希釈倍数で希釈された試料溶液で調製されている場合、被検試料はエンドトキシン規格に不適とし、A 液の試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合、最大有効希釈倍数で希釈した試料溶液で試験を行う。

(3) 定量試験法

本法は、試料溶液中のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求めることによって測定する方法である。

(i) 操作法

表 7-3 に従い、A、B、C 及び D 液を調製する。これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の試料溶液は、(1) 予備試験 (ii) 反応干渉因子試験に適合する溶液を用いる。

試験の操作条件は (1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する

表 7-3

液	エンドトキシン 添加濃度/被添加液	希 釈 液	希釈 倍数*	希釈後の添加エン ドトキシンの濃度	試験の 回数
A	0/試料溶液	エンドトキシン 試験用水	1	—	2
			2	—	
			4	—	
			8	—	
B	2 λ/試料溶液	—	1	2 λ	2
C	2 λ/エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン 試験用水	1	2 λ	2
			2	1 λ	
			4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
D	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2

(ii) エンドトキシン濃度の算出及び判定

2 回の試験でいずれも、D 液は陰性を、B 液は陽性を示し、C 液の幾何平均エンドポイント濃度が 0,5～ 2,0λ の範囲にあるとき、試験は有効とする。

A 液の希釈系列において、陽性を示す最大の希釈倍数をエンドポイントとし、スにエンドポイントにおける希釈倍数を乗じて得た値を A 液のエンドトキシン濃度とする。

A 液の 2 回の試験結果より、幾何平均エンドトキシン濃度を求める。幾何平均エンドトキシ/濃度は、(1)予備試験(i)ライセート試薬の表示感度確認試験の計算式を準用して求める。

A 液の希釈系列の中に陽性を示すものがないとき、A 液のエンドトキシン濃度はスに A 液の最小希釈倍数を乗じた値未満とする。

A 液の希釈系列のすべてが陽性のとき、A 液のエンドトキシン濃度は、スに A 液の最大希釈倍数を乗じた値以上とする。

A 液の平均エンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/m&EU/mEq 又は EU/単位) を算出する。

被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位) が、医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合する。

(光学的測定法)

(3)予備試験

比濁法又は比色法の精度と有効性を保証するために、検量線の信頼性確認試験及び反応干渉因子試験を行う。

(i)検量線の信頼性確認試験

本試験は、ライセート試薬の各ロットにつき行う。用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも 3 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度の溶液につき、3 回以上測走して検量線を作成する。エンドトキシン標準溶液とライセート試液の容量比、反応時間、反応温度、pH などの操作条件は用いるライセート試薬の季適条件に従う。検量線の濃度範囲を 2 桁より大きくするとき、1 桁大きくするごとに用いるエンドトキシン標準溶液の濃度を 1 濃度ずつ追加する。

作成した検量線の相関係数を求めるとき、その絶対値 $|r|$ が 0.980 以上であることを確認する。

検量線の信頼性が確認されなかったときは、試験条件を整備して再試験を行う。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

(ii) 反応干渉因子試験

表 7-4 に従い、A、B、C 及び D 液を調製して、試験を行う。ライセート試液の採取量、ライセート試液に対する試料溶液の容量比、反応時間などの操作条件は、用いるライセート試薬の至適条件に従う。

本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

表 7-4

液	エンドトキシン添加濃度	被添加液	試験管又はウエルの数
A	0	試料溶液 ^{※1}	2 以上
B	検量線の中点濃度 ^{※2}	試料溶液 ^{※1}	2 以上
C	3 濃度以上 ^{※3}	エンドトキシン試験用水	各濃度、 2 以上
D	0	エンドトキシン試験用水	2 以上

本試験は次の条件に適合しないとき、無効である。

1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。
2. D 液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である。

B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。

添加エンドトキシンの回収率が 50～200% の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定する。

エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。

(4) 定量**(i) 操作法**

表 7-4 に示す A,B,C 及び D 液を調製し,(3)予備試験(ii)反応干渉因子試験を準用して操作する。

(ii) エンドトキシン濃度の算出

C 液で作成した検量線を用い,A 液のエンドトキシン濃度を算出する。ただし,次のすべての条件に適合しないとき,試験は無効である。

1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。
2. B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて,B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算するとき,その回収率は 50~200%の範囲にある。
3. D 液の結果が,ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか,又はエンドトキシンの検出限界未満である。

(iii) 判定

A 液のエンドトキシン濃度に基づき,被検試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL,EU/mg,EU/mEq 又は EU/単位)を求め,その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき,被検試料はエンドトキシン試験に適合する。

6) 埋植試験**① 目的**

この試験は、医療用具又は材料が生体内に埋め込まれた場合の、局所的な影響を評価するための試験である。

② 試験法の類型

埋植試験は、医療機器や医療剤の使用部位と使用期間とによって変化する。主も二、短期埋植試験と長期埋植試験に大きく分類することが可能である。基本的な手順は同じであるが、埋植する期間が異なってくる。その参考として、ISO10993 では次のように規定している。

(a) 短期埋植試験**a) 概要**

医療用具又は材料を組織内に埋植した際、初期には埋植物周囲に必ず炎症反応が惹起されるが、その強さは材料からの溶出物や表面性状によって異なる。この試験では主として

この初期の炎症反応の強さを評価する。

b) 手順

日本の生物学的試験ガイドラインでは、次のように提示されている。

3. 準備

3.1 試験動物

体重 2.5 kg 以上の雄ウサギを 1 観察期間について 4 匹以上用いる。試料埋植の当日若しくは前日に埋植部位に相当する背部の毛を刈っておく。

備考 1：試料の埋植部位である傍脊柱筋肉の十分発達した動物で、一定の品質のものを
用いることが望ましい。また、以前に他の試験に使用され、なんらかの物質に感作されて
いる恐れのある動物は用いるべきではない。

3.2 試料の調製

滅菌済みの試験材料は無菌的に取り扱って、試験動物 1 匹につき、長さ 10～12 mm、幅 1.0～1.5 mm の試験試料 4 個を調製する。未滅菌試験材料は同様にして埋植用試料を調製し、
適当な方法で滅菌後に試験に使用する。別に同様の方法で陰性対照試料 2 個を調製する。また、必
要に応じて陽性対照試料を同様の方法で調製する。

備考 2：試料の形状について：試料の角で組織が物理的に障害され易く、また後に示す
「炎症領域の幅」も角の部分で薄くなる傾向があるので、試料表面は滑らかに整形しておく
ことが望ましい。できれば両端を丸めた円柱体が理想的である。

最終製品が指定の形状に調整できない場合には、試験に支障のない範囲の適当
な形状で試験してもよい。

備考 3：滅菌方法について：高圧蒸気滅菌、乾熱滅菌、煮沸滅菌等の加熱による滅菌の
場合には、熱による試験材料の変質、変形に注意する必要がある。

エチレンオキサイドガス等を用いてガス滅菌を行う場合にはガスの残留のない
よう注意してはならない。また、アルコールに長時間浸漬して滅菌を行う場合には、試
料中に含まれる化合物がアルコール中に溶出しやすく、真の毒性を検出し得ない場合が多い
ため、本試験の滅菌法としては不適當である。

備考 4：陰性対照試料としては、日本公定書協会で販売されている日本薬局方陰性対照
(高密度ポリエチレン) を用いる。

陽性対照試料としては Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 0.5% 含有ポリウ
レタンがある。この陽性対照試料については、常に試験に用いる必要はないが、陽性反応の
確認のため必要に応じて用いることができる。

4. 試験方法

4.1 埋植方法

滅菌した 15 ゲージの注射針内に、あらかじめ試料を別々に挿入しておく。試料の埋植は動物

に麻酔をかけて行う。試験動物の各1匹につき、片側の脊柱傍筋肉内に脊柱から約3.5 cm 離して、約2.5 cm 間隔で4個の試験試料をスタイレットを用いて埋植する。脊柱の他の側に陰性対照試料を同様の方法で2個埋植する。

備考5：試料埋植の方向、角度、深度は、摘出時の埋植部位の確認を容易にするためだけでなく、後の「炎症領域の幅」の計測にも影響を与えるので、一定に保つよう心掛けなくてはならない。埋植に当たっては、注射針を脊柱と平行に保ち、皮膚表面に約30度の角度で刺入する。埋植の深度は、針の先端から一定の距離にマークを付けておくことにより一定に保つことができる。また、埋植部位が摘出時及び切り出し時に確認し易いように、針の刺入部位をマーキングしておくといよい。

備考6：埋植に際し、局所を出血させた場合あるいは周囲組織を必要以上に損傷した場合には、試料周囲の炎症反応が大きくなり、組織学的検索結果の判定が困難となる。従って、このような場合には、別の場所を選んで試料を埋植し直す必要がある。

備考7：柔らかな材料を試料とする場合、試料が筋肉内で折れ曲がり易く、後の「炎症領域の幅」の計測を困難とする。試料の折れ曲がりを防ぐためには、筋肉中に注射針を刺入後、試料を無理に押し込まず、慎重に針を引き抜くことが重要である。

4.2 埋植期間

7日間及び4週間とする。

4.3 動物の取扱い

試験期間中は、動物を個々に観察し、異常所見があれば記録しておく。屠殺予定日以前に動物が死亡した場合は、すみやかに剖検し死因を確認する。その死因が埋植した試験試料の影響によると思われる場合には、その動物を評価の対象に加える。それ以外の死因による場合は、その動物を評価の対象から除外する。最終的に評価のための有効動物数が1観察期間について肉眼的検索用及び組織学的検索用として各々2匹以上である場合、その試験を有効とみなす。有効動物数を確保できなかった場合は、同様の試験を行い、不足匹数分を追加、補充する。

4.4 動物の屠殺及び試料の回収

動物は1観察期間につき、肉眼的検索用に2匹以上、組織学的検索用に2匹以上となるように任意に振り分ける。試料埋植後7日目及び4週間目にそれぞれの動物を麻酔下に瀉血、屠殺し、試料埋植部位の筋組織を試料と共に摘出する。

4.5 肉眼的検索

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

- a) 試料周囲組織における出血、被包形成、変色の有無

所見が認められた時は、その詳細

- b) 試料自身の変色及び変質の有無

所見が認められた時は、その詳細

- c) その他に認められた異常所見の全て

4.6 組織学的検索

4.6.1 組織学的検索用に摘出した筋組織は、病理組織標本作製用に直ちに固定液に浸す。固定完了後、試料の横断面が出るように組織を皮膚表面と水平方向に切り出し、包埋後、薄切片を作製し染色を施す。

備考 8：組織の切り出しについて：固定後の組織は皮膚表面と水平方向に上から数ミリずつ切り出し、試料の切断面が組織標本上に出るようにする。また、切り出し面を、切り出し面上における試料の埋植方向が長径となるような長方形に整形しておく（図 1）、組織標本上で試料の埋植方向を確認でき、後の「炎症領域の幅」の計測部位の選択が容易になる。

備考 9：試料がマイクロームによる薄切を困難とするような硬い材料であるときは、切り出し時に引き抜いておく方が良い。但し、引き抜きの際、周囲組織を傷つけないよう十分に注意しなくてはならない。

4.6.2 試料周囲組織を光学顕微鏡にて観察し、認められた炎症性細胞の種類や出現の程度及びその他にみられた異常所見を記録する。

4.6.3 通常、試料周囲の組織は陰性対照試料においても軽度の炎症性の変化を呈しており、この試料周囲の「炎症領域の幅」を計測することにより、試料の周囲組織に対する障害性を定量的に評価することができる。

「炎症領域の幅」の計測：埋植された試料の長軸に対し垂直方向の、試料と周囲筋組織との間の炎症領域の幅を顕微鏡下にマイクロメーターを用いて計測し、平均的な「炎症領域の幅」を求める。

備考 10：「炎症領域の幅」の計測部位の選択について：炎症領域は通常、試料の周囲組織に及ぼす影響が均一であれば、試料周囲にほぼ均一の幅で観察される。ただし、本試験における組織標本は試料の長軸に対し斜め切れの状態にあるので、試料の長軸方向の「炎症領域の幅」は実際の幅より広くなる。また、炎症領域を取りまく筋線維間に試料に対して垂直方向に延びる線維性結合織が存在する場合は、その方向に炎症領域が拡大し易く、そのような場所は「炎症領域の幅」の計測部位としてふさわしくない。

「炎症領域の幅」の計測部位は、実際の平均的な幅が得られるように考慮して、試料の形状に応じ適切な部位を選択しなくてはならない。例えば、試料が円柱状の場合は、試料断面短径方向の頂点に相当する部位 2 箇所 "A と B" について幅を計り、その平均 " $(A + B) \div 2$ " を「炎症領域の幅」とする（図 2）。また、試料が四角柱状の場合は、埋植された試料の長軸に対し垂直方向について、炎症領域の最も厚い部分の幅 "A" と最も薄い部分の幅 "B" を計測し、その平均を「炎症領域の幅」とする（図 2）。

(c) 評価

5. 評価

5.1 組織学的検索結果、7日間あるいは4週間のいずれかの観察期間で、全ての個体において試験試料4個中2個以上が陰性対照試料と比較して有意に強い組織反応が観察された場合、陽性と判定する。

備考 11：まれに、動物個体の感受性が異常に高い場合があり、評価が困難となることがある。このような場合には、その動物を評価の対象から外し、新たに動物を追加、補充することができる。ただしこの場合、評価の対象外とした動物のデータも試験の報告に加えなくてはならない。

(b)長期埋植試験

上述した短期間での埋植試験では、主に埋植期間を1週間以内として規定しているが、ISO10993-6では、医療機器の使用部位や接触期間に応じて、また、使用する試験動物に応じて、選択すべき評価期間を規定している。

3.3.2 Test periods

The local tissue response to implanted materials is assessed in short-term tests up to 12 weeks and in long-term tests exceeding 12 weeks.

Test periods are chosen to ascertain that a steady state has been reached with respect to biological response. The local biological response to implanted materials depends both on the properties of the materials and on the trauma of surgery. The tissue configuration found in the vicinity of an implant changes with the time elapsed after surgery. Usually, at one week observation periods, a high cell activity is found, followed by a transitional stage. In muscle and connective tissue, depending on the species, a steady state is seen in the cell population after 9 to 12 weeks. Implantation in bone tissues may need longer observation periods.

Test periods shall be selected from those specified in table 1 for short-term implantation, or from table 2 for long-term implantation.

Depending on the intended use of the test material, not all implantation periods may be necessary (see ISO 10993-1). An observation period of 104 weeks may be of interest in selected instances. The number of implants per animal and the number of animals per observation period are described in clauses 4 to 6. A sufficient number of implants shall be inserted to ensure that the final number of specimens to be evaluated will give valid results.

Table 1 — Selection of test periods for short-term implantation in subcutaneous tissue and muscle

Species	Implantation period				
	weeks				
	1	3	4	9	12
Mice	x	x		x	
Rats	x		x		x
Guinea-pigs	x		x		x
Rabbits	x		x		x

Table 2 — Selection of test periods for long-term implantation in subcutaneous tissue, muscle and bone

Species	Implantation period				
	weeks				
	12	26	52	78	(104)
Rats	x	x	x		
Guinea-pigs	x	x	x		
Rabbits	x	x	x	x	
Dogs	x	x	x	x	x
Sheep	x	x	x	x	x
Goats	x	x	x	x	x
Pigs	x	x	x	x	x

③参考規格等

- ・ ISO 10993-6:Biological evaluation of medical devices Part 6:Tests for local effects after implantation
- ・ 厚生労働省「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」

7) 血液適合性試験

①目的

この試験は、医療機器や医療材料が、血液と接触する場合に起こる可能性のある反応を調べるための試験である。

②試験法の類型

血液適合性試験で評価を実施する項目は、下表のように分類できる。

表 1. 血液適合性試験の評価項目 (1) 体内と体外を連結し、循環血液に接触する医療機器 (又はその原材料) の評価項目

評価カテゴリー	方法 (例)	備考
血栓性	光学顕微鏡下での観察 血小板, 白血球, 血球凝集物, 赤血球, フィブリン等の粘着/付着状態	走査式電子顕微鏡での観察に置換えても良い
血液凝固系	PTT 測定	
血小板	血小板数測定	
血液学的項目	白血球数及び白血球百分率の測定 血漿ヘモグロビン濃度の測定, または溶血毒性試験の実施	本報告書における溶血毒性試験の標準的な試験方法は次項参照のこと。
補体系	補体活性化産物 (C3a または C5a) の測定	

表 2. 血液適合性試験の評価項目 (2) 循環血液に接触する体内埋込み医療機器 (またはその原材料) の評価項目

評価カテゴリー	方法 (例)	備考
血栓性	埋込み試験等での血栓による閉塞率, 血流量低下の測定 埋込み試験後の当該医療用具の観察結果 (外観及び顕微鏡観察による血栓付着状況) 埋込み試験後の臓器観察 (当該医療用具により形成された血栓の影響を観察する)	
血液凝固系	PTT, PT, TT 測定 血漿フィブリンノーゲン濃度測定 FDP 定量	
血小板	血小板数測定 血小板凝集能測定	
血液学的項目	白血球数及び白血球百分率の測定 血漿ヘモグロビン濃度の測定, または溶血毒性試験の実施	本報告書における溶血毒性試験の標準的な試験方法は次項参照のこと。
補体系	補体活性化産物 (C3a または C5a) の測定	

【出典】ハーモナイゼーション

これらの表の内、血液学的項目を評価する試験として、溶血性試験を例に説明する。日本における安全性評価ガイドラインにおいては、溶血性試験は次のように提示されている。