

## 試験方法の選択における留意点 (細胞毒性試験)

### 抽出法による試験法

- コロニー法、ニュートラルレッド法とも定量性あるが、感度はコロニー法がやや高い。眼など刺激に対する感受性の高い組織に適用する機器については、コロニー法を推奨。

### 間接接触法

- 寒天重層法：寒天は脂溶性化合物は拡散しにくく感度が低い。フィルター法も同程度の感度。

### 直接接触法

- 細胞上に検体を載せる方法：検体の重み等による細胞の障害
- 検体上に細胞を播種する方法：検体の材料によっては細胞が付着しにくい。
- 材料からの溶出成分と細胞が即時に反応することから、不安定な化合物(過酸化物質)などの評価にはすぐれている。

2011/11/14

33

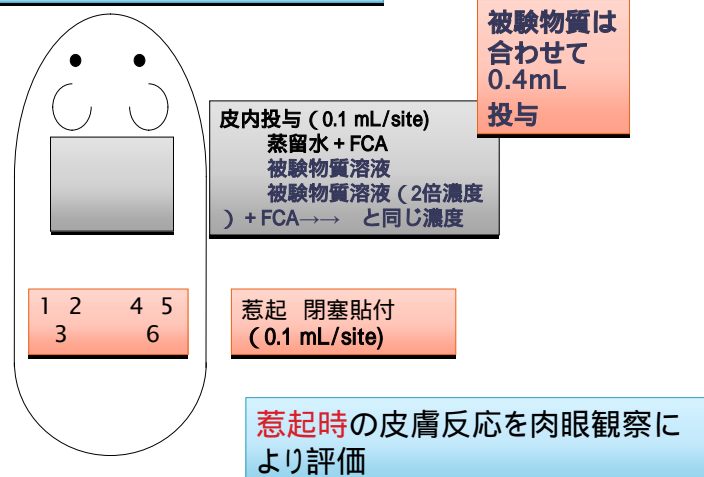
## 皮膚感作性試験

- ▶ 接触アレルギー(遅延型アレルギー)性を明らかにする試験(皮膚への接触に限らない)
- ▶ モルモット・マウスを用いる  
**GPMT**(Guinea pig Maximization test)から**LLNA**(Murine Local Lymph Node Assay)へ
- ▶ 生物学的安全性試験の必須項目(細胞毒性試験と同様) → **細胞毒性では評価できない安全性を評価する**

2011/11/14

34

## Guinea pig Maximization Test (GPMT)



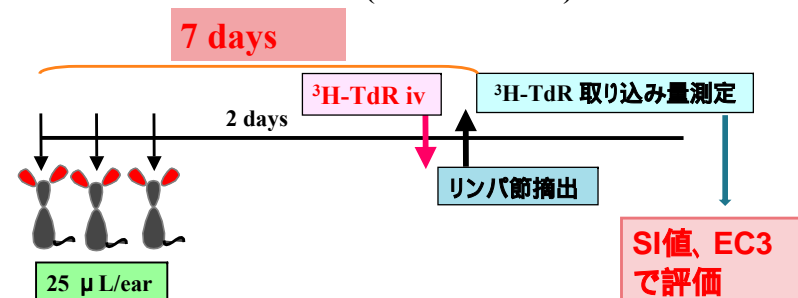
2011/11/14

35

## Local Lymph Node Assay (LLNA)

### 感作時のリンパ球の増殖反応を評価

Animal : CBA/J (CBA/Ca) Female, 7-12 W  
(OECD No.429)



2011/11/14

36

|       |                    |                           |
|-------|--------------------|---------------------------|
|       | 金属またはセラミックス        | 既知の知見を利用                  |
| 感作性試験 | 蒸留水またはアルコールに溶解するもの | 水またはアルコールに溶解              |
|       | 低分子有機化合物           | 適切な有機溶媒に溶解、懸濁             |
|       | ポリマー樹脂を含む複合材料、製品   | 有機溶媒による抽出物、抽出液、第1法あるいは第2法 |

第1法：抽出物を作製する(濃縮、乾固)  
 第2法：一定の割合で抽出し、その液を用いる

## 抽出率の判定基準

|                      | 製品の重量   | 抽出率    |        |
|----------------------|---------|--------|--------|
|                      |         | 感作性試験* | 遺伝毒性試験 |
| 抽出物が得られる場合<br>(第1法)  | 0.5 g以上 | 0.1%以上 | 0.5%以上 |
|                      | 0.5 g未満 | 0.5%以上 | 1%以上   |
| 抽出物が得られない場合<br>(第2法) | 0.5 g以上 | 0.1%未満 | 0.5%未満 |
|                      | 0.5 g未満 | 0.5%未満 | 1%未満   |

第2法： クデルナ・ダニッシュ濃縮器(目盛り付き)等を用いて抽出液を濃縮または乾固し、試験試料1g当たり1mLに濃縮・調製するか、溶媒留去後適切な溶媒に溶解して1mLに調整し、それを試験液として試験を行う方法。

\* 薬機99号通知による

## 抽出物が得られない場合の試験液の調製法

|        |   |
|--------|---|
| 感作性試験  | 第2法：製品のサイズ等を考慮して次の方法を選択します。   |
|        | 抽出液を被験物質1 g当たり1 mLとなるように濃縮または乾固したのち溶媒を加えて1 mLに調整<br>(通常被験物質約25 g → 約25 mLの濃縮液作製)。<br>抽出物の濃縮率を高めて調製 <b>大きい製品</b><br>(通常被験物質約250 g → 約25 mLの濃縮液作製)。 |
| 遺伝毒性試験 | 復帰突然変異試験：DMSO抽出液<br>染色体異常試験(又はマウスリンフォーマTK試験)：培地抽出液  |

## 試験方法の選択における留意点 (感作性試験)

- ▶ 試験方法について
  - Maximization 法は最も感度が高い方法であり、推奨。Local Lymph Node Assay (LLNA) も適切な試験条件であればリスク評価可能。
- ▶ 抽出溶媒について(ポリマー樹脂を中心とした機器)
  - ハザードの確認：
    - 有機溶媒(メタノール、アセトン、n-ヘキサン、シクロヘキサン:2-プロパノールの1:1混液等)
  - 感作性リスクの低い医療機器：
    - 生理食塩液(水溶性物質の抽出)
    - 植物油(脂溶性物質の抽出)

## 刺激性、急性毒性、発熱性、溶血毒性

- 昔から行われてきた試験
- 短時間で結果が出る
- 投与方法、部位等に特徴のある特殊毒性、機能毒性を評価する試験

### 動物愛護・代替法

- in vivo* から *in vitro* へ
- 試験条件の厳密化 (pH)
- 文献等の利用

ウサギの眼刺激性 摘出角膜による試験  
三次元培養皮膚モデル

2011/11/14

41

## 刺激性試験とは

- ▶ 適用部位の急性の炎症反応 (刺激性) を明らかにする試験
- ▶ ウサギ、ハムスター、モルモットを用いる (適用部位と動物の特性)
- ▶ 投与が続けられるか、薬効・性能が得られるまで適用を維持できるかを確認する

2011/11/14

42

## 刺激性試験の種類

- ▶ 皮内反応試験
- ▶ 皮膚一次刺激試験
- ▶ 皮膚累積刺激試験
- ▶ 眼刺激試験
- ▶ 口腔粘膜刺激試験
- ▶ 膣粘膜刺激試験
- ▶ 陰茎刺激試験
- ▶ 直腸粘膜刺激試験
- ▶ ヒト皮膚刺激性試験

2011/11/14

43

## 急性毒性試験とは

- ▶ 急性毒性 (全身性) を有する物質が存在しないことを確認する試験
- ▶ 単回投与による毒性を調べる  
静脈内、腹腔内、経口 (歯科材料など)

従前は マウスによるLD50値を求めることが目的

ASTM Standard F750-87, USP25

ロットチェック、規格試験

- ▶ 反復投与試験のための用量設定予備試験
- ▶ ラットによる NOEL, NOAEL,
- ▶ 血液、病理検査
- ▶ ISO 10993-11 (2006)

2011/11/14

44

## 発熱性物質試験とは

発熱性物質試験(エンドトキシン、非エンドトキシン)

- ▶ ウサギ3匹、体重1.5kg以上、静脈内投与後3時間の直腸温変化 0.6 以上の体温上昇で陽性
- ▶ 合成ポリマーに添加された化学物質による発熱も想定

•パイロジェンフリー容器、水、シリンジを使用

エンドトキシン試験(材料由来:コラーゲン、ゼラチン、キチン、キトサンなど)  
▶ LAL試薬:カプトガニの血球抽出成分がエンドトキシンによりゲル形成する性質を利用

原材料の受け入れ規格、最終製品の品質管理試験、GMP対応

2011/11/14

45

## 血液適合性試験

- ▶ 血液に接触する医療機器または原材料の血液適合性を評価する

- 血栓性
- 血液凝固系
- 血小板
- 血液学的項目
- 補体系

2011/11/14

46

## 血液適合性試験の問題点

- ▶ 医療機器において、公知の陽性対照物質が存在しない
- ▶ *in vitro*の試験結果を外挿する考え方が確立していない → 使用模擬試験
- ▶ 実際にどの程度反応が起これば臨床的に危険なのかの判断が確立していない  
→ 既承認品の結果と比較(同等性)

2011/11/14

47

## 遺伝毒性試験

•遺伝子や染色体に変異を誘発するかどうかを調べる

- 短時間で結果が出る(*in vitro*試験が中心:細菌、培養細胞を用いる)
- 遺伝子への影響から発がん性、先天異常などの予測を行う試験

DNA傷害性も要検討(ISO10993-3):現時点では求めている

2011/11/14

48

## 遺伝毒性試験

•医療機器からの溶出物、原料化学物質がDNAを傷害 → 修復が不十分 → 変異が受け継がれる → 先天異常、発がん

- 細菌を用いる復帰突然変異試験(エームス試験)
- 培養細胞を用いる染色体異常試験
- マウスリンフォーマTK試験
- マウスを用いる小核試験(*in vivo*)

2011/11/14

49

## 試験方法の選択における留意点 (遺伝毒性試験)

- ▶ 試験方法について
  - 細菌を用いる試験と動物細胞を用いる試験の2種類の実施を推奨
- ▶ 抽出溶媒について
  - ハザードの確認:
    - 有機溶媒(メタノール、アセトン)
    - 有機溶媒による抽出率が低い場合:
      - DMSOあるいは培地抽出



2011/11/14

50

## 亜急性(亜慢性)毒性試験

医療機器あるいは化学物質を、長期間にわたり連続あるいは繰り返し使用した場合の全身性の中長期毒性を調べる試験

医療機器からの溶出物に、全身性の毒性を示す物質が存在しないことを確認する

2011/11/14

51

## 亜急性(亜慢性)毒性試験

亜急性(亜慢性)毒性試験で要求される評価項目について評価できていれば、埋植試験で代替することができる。

•医療機器の使用方法、適用部位によっては、埋植試験で評価する方が臨床使用に近い場合もある。

2011/11/14

52

## 亜急性(亜慢性)毒性試験

### 国内ガイドライン

- 動物種: ラット 雌雄各5匹/群
- 抽出媒体: 生理食塩液
- 投与経路: 静脈内
- 投与量: 2 mL/100gBW
- 投与期間: 28日(亜急性)、90日(亜慢性)

ISO(iv)では14日(亜急性)、14から28日(亜慢性)

2011/11/14

53

## 抽出媒体の選択

- ▶ 静脈内投与: 生理食塩液
- ▶ 他の投与経路(経口): 植物油、CMC-Na

媒体により対照群の測定値が異なるので、背景データが重要

2011/11/14

54

## 埋植試験

生体内に埋植・留置される医療機器の局所的影響を病理組織学的に検査・評価する試験

- 皮下埋植試験
- 筋肉内埋植試験
- 骨内埋植試験
- 膝関節内埋植試験
- 血管内埋植試験

2011/11/14

55

## リスク評価が難しい場合

使用模擬試験の実施 → 陰性 → リスク低い

他の安全性試験結果(急性・長期試験、皮内投与試験)、臨床試験、類似品のデータ、海外の不具合報告

総合的リスク評価

2011/11/14

56

## 1種類の試験で複数の生物学的安全性の評価が可能となる場合

- ▶ **眼装用試験と細胞毒性試験による眼刺激性の評価**  
装用初日に装用前後の眼組織を肉眼観察すること及び、細胞毒性試験結果を踏まえて、刺激性の評価が可能となる場合がある。
- ▶ **埋植試験による反復毒性の評価**  
全身への影響を評価できる測定項目を設定し、また対照群を別に設定することで、反復投与毒性を評価する。植込み医療機器では、適切な形状の試験試料を適切な部位に埋植して評価することで、より臨床使用に即した安全性評価が可能となる場合がある。

**必ずしも全ての機器において可能なわけではない。試験実施前には十分な検討を！**

57

## 生物学的安全性評価の原則

- ▶ ISO14971「医療機器—リスクマネジメントの医療機器への適用」…**リスク分析手法**を用いる
- ▶ 関連情報(原材料、溶出物、分解生成物等)と安全性試験結果、文献等を踏まえ、**総合的に判断する**
- ▶ **専門家による評価**
- ▶ 試験の再実施の必要性を**吟味**

2011/11/14

58

## 生物学的安全性評価のポイント

- **被験物質の妥当性**  
接触部位、新規材料、洗浄の有無、形状、大きさ、表面処理
- **試験方法・測定項目の妥当性**  
感度、精度(定量、定性)、背景データ、局所の炎症領域幅
- **抽出方法の妥当性**  
原材料の特性、接触部位(生理食塩液)、水系溶媒、有機溶媒
- **検査時期の妥当性**  
原材料の特性(吸収性、非吸収性)、使用期間
- **試験結果の信頼性**  
対照群の反応性、統計学的有意差、変化項目の意味、関連項目の変化、経時的変化、組織変化の意味、細胞増殖抑制
- **リスク評価の妥当性**  
用量依存性、再現性、化学分析、他の毒性試験結果、陰性対照群の反応性、経時的変化、組織変化の意味

2011/11/14

59

## 4. 今後の流れ



2011/11/14

60

## 今後の流れ

### ▶ 通知の改定について(改定作業中)

平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」  
平成15年3月19日付け事務連絡医療機器審査No.36「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」

### < 改定のポイント >

- ▶ 動物愛護、代替法の導入
- ▶ 総合的評価の考え方、リスク評価、リスクマネジメントの明確化
- ▶ 認証品目も対象
- ▶ ISOやJISガイドラインとの評価項目の整合

今後の改定状況に留意し、最新の通知情報をご確認ください。

2011/11/14

61

## 5. 承認申請に際してのお願い

2011/11/14

62

## 申請資料作成時のお願い

### < 最終報告書について >

承認申請時には、医療機器GLPに準拠した試験報告書を提出する。その際、併せてISO17025又はJIS Q 17025に適合したものであることが必要。

### ▶ GLP省令第17条(最終報告書)

・最終報告書に記載すべき事項について規定。

### ▶ ISO17025またはJIS Q 17025

・承認申請資料として提出する試験報告書は、ISO17025またはJIS Q 17025おける試験報告書の要求事項をみたす必要がある。(平成17年2月16日付け薬食機発第0216001号「医療機器の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について」)

2011/11/14

63

## 申請資料作成時のお願い

### < 申請資料について(添付資料/添付資料概要) >

添付資料あるいは添付資料概要へは、各試験内容の説明や試験に対する申請者の考察を十分に記載してください。

### ▶ 試験の概要、試験条件、結果(数値等)

- ・試験結果が「適合」の記載のみでは不十分。
- ・試験結果が「陽性」の場合には、その他の試験成績等を含めた製品全体のリスク分析を行い、総合的に申請品目の生物学的安全性が十分であり、臨床上許容可能であることを説明する。

### ▶ 試験方法の選択理由

- ・通知等で示されていない試験方法を用いる場合には、その妥当性について説明する。

2011/11/14

64



## 申請資料作成時のお願い

### ▶ 試験検体と申請品目との関係

- ・試験報告書の検体名が申請品目の販売名と異なる場合には、申請品目と試験検体の関係性について記載する。
- ・申請品目とは異なる検体、または同一製品であっても最終製品でない検体を用いる場合には、検体選択の妥当性を説明する。

### ▶ 試験を省略する場合

- ・生物学的安全性試験を省略する場合には、その妥当性について十分な説明が必要。

<例> 既承認品目との同等性により新たな生物学的安全性試験を省略する場合には、申請書に規定した原材料の同一性、製造方法(滅菌方法、加工等)等の影響について考察し、改めて生物学的安全性の評価を行う必要のないこと(スライド16頁)を示し、省略の妥当性について十分に説明する。

2011/11/14

65

ご清聴有り難うございました。



2011/11/14

66