

第3部 遺伝毒性試験

1. 適用範囲

本試験は、医療機器又は原材料の遺伝毒性評価を目的としている（4.1項参照）。ISO 10993-3, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity においては、遺伝子突然変異及び染色体異常を検出する試験を推奨しており、ここでは細菌を用いる復帰突然変異試験及び培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験の実施を基本とする。ただし、得られた試験結果が陽性になった場合や、医療機器又は原材料の使用期間や使用条件によっては、*in vivo* 試験系を含む他の試験系の実施についても考慮しなければならない（4.2項参照）。

2. 引用規格

- 2.1 ISO 10993-3:2003, Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- 2.2 OECD 471, Bacterial Reverse Mutation Test
 - OECD 473, *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
 - OECD 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
 - OECD 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test
 - OECD 476, *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test
 - OECD 487, *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test
- 2.3 平成 11 年 11 月 1 日付け医薬審第 1604 号「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」

3. 試験の適用

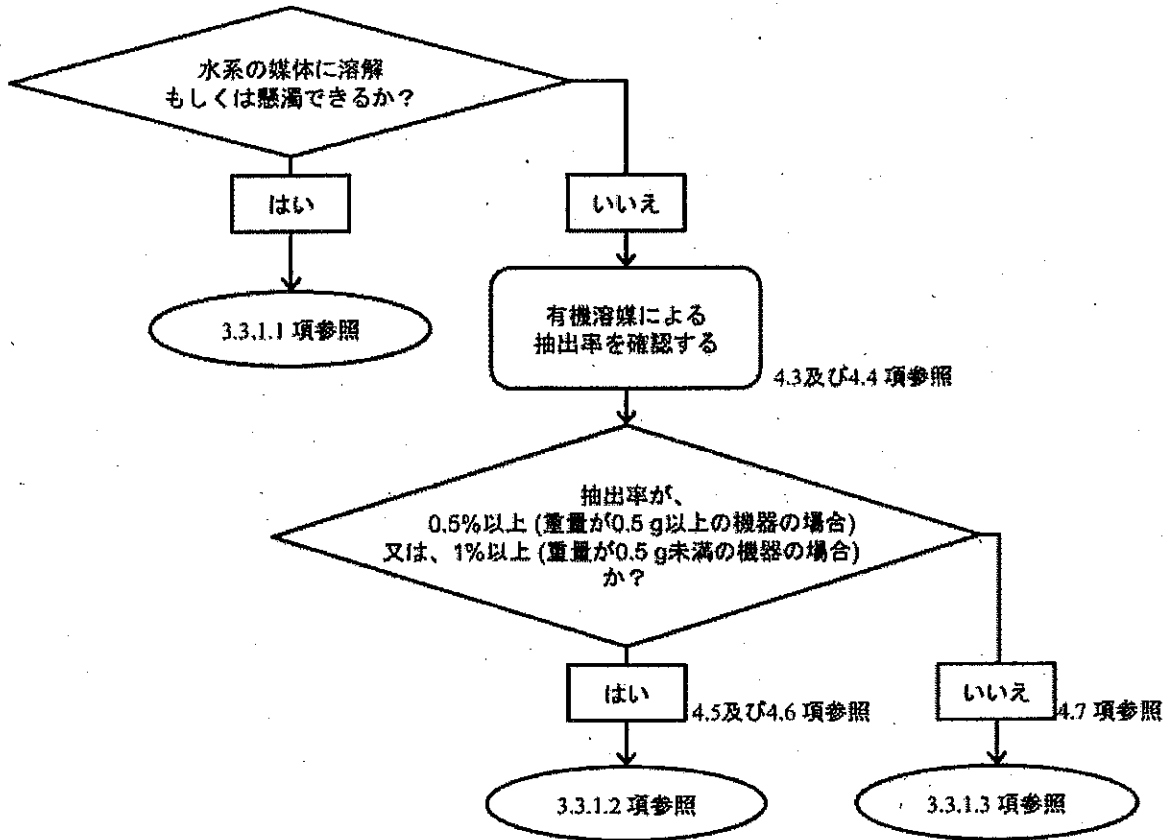
- 3.1 試験試料は最終製品又は原材料である。ただし、試験試料に含まれる原料化学物質、添加剤などについて遺伝毒性に関する安全性が確認されており、含まれる原料化学物質の相互作用などにより未知物質が生成される可能性が低い場合は、これら試料の試験を実施する必要はない。その場合、その科学的妥当性を明らかにする必要がある。
- 3.2 文献又は既存データなどにより遺伝毒性に関する安全性が確認できない場合は、引用規格に示したガイドラインなどを参照し、以下の試験の実施を基本とする（4.2項参照）。
 - 1) 細菌を用いる復帰突然変異試験
 - 2) 培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験、又はマウスリンフォーマ TK 試験

3.3 試験液の調製

3.3.1 有機材料の場合

試験試料（最終製品又は原材料）の材質、性状、溶解性などの物理化学的特

性を考慮して、以下の手順により試験に適用するための試験液を調製する。



- 3.3.1.1 水系の媒体に溶解もしくは懸濁できる試験試料は、媒体（水・生理食塩液・血清含有培養液など）に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。
- 3.3.1.2 水系の媒体に溶解又は懸濁できないが、有機溶媒により抽出物が得られる試験試料は、メタノール及びアセトンによる抽出率を確認する（4.3、4.4 項参照）。メタノール又はアセトンによって抽出物が得られる場合（4.5、4.6 項参照）は、より抽出率の高い溶媒を用い、細切した試験試料にその重量の10倍容量の溶媒を添加し、室温で24時間攪拌して抽出液を調製する。溶媒を留去し、必要量の抽出物を得、抽出物は試験系に適切な媒体に溶解又は懸濁して試験液とし、試験を実施する。
- 3.3.1.3 水系の媒体に溶解せず、有機溶媒でも抽出物が得られない試験試料は（4.7 項参照）、復帰突然変異試験においてはジメチルスルホキシド (DMSO) による抽出液を、染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマ TK 試験においては血清含有培養液による抽出液を用いて試験を実施する（4.3 項参照）。

1) 復帰突然変異試験

可能な場合は試験試料を細切し、その 0.2 g に対して DMSO 1 mL（あるいは試験試料 6 cm² に対して DMSO 1 mL）の割合で添加し、37°C で振盪攪拌しながら 48 時間抽出し、その抽出液を試験液として、プレート当たり最高 100 μL を

添加して試験を実施する。

2) 染色体異常試験、小核試験、マウスリンフォーマ TK 試験

可能な場合は試験試料を細切し、その 0.2 g に対して試験に用いる血清含有培養液 1 mL (あるいは試験試料 6 cm² に対して培養液 1 mL) の割合で添加し、37°C で 48 時間抽出する。その抽出液を 100% 抽出液とし、培養液で希釈して試験を実施する。

3.3.2 無機材料の場合

金属材料あるいはセラミックなどの無機材料における遺伝毒性の多くは、溶出する金属イオンの影響で評価することができる。したがって、これらの遺伝毒性試験は以下に留意する。

- 1) 文献あるいはこれまでの実験によって、これらの材料を構成する金属元素種のイオンの遺伝毒性に関する情報が得られる場合は、試験を実施する必要はない。
- 2) 構成金属元素種に関して遺伝毒性に関する十分な情報が得られない場合は、その代表的な金属イオン溶液又は材料からの抽出液について試験を実施する。
- 3) 遺伝毒性の最終評価を行う際には、当該金属イオンの試験試料からの溶出量も考慮する。

3.3.3 原材料化学物質の場合

適切な溶媒に溶解又は懸濁して試験に供する。

3.4 判定及び評価

本ガイダンスに記載されている代表的な試験法については、試験結果の判定はガイドライン (2. 項参照) に従う。陽性結果が得られた場合は、遺伝毒性のもつ重要性から、更に *in vivo* 試験を含む他の遺伝毒性試験を実施することにより、ヒトへのリスク評価の一助となる場合も考えられる。ただし、医療機器の安全性評価は、遺伝毒性の強さや濃度依存性、抽出に用いた溶媒の種類や抽出率、医療機器の接触部位や接触期間など、種々の条件を総合的に考慮して行う。

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 (最終製品又は原材料) 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) 対照物質 (背景データ)
- 5) 試験液の調製方法
例: 溶媒による抽出法と抽出率、滅菌方法など
- 6) 試験方法
例: 菌株又は細胞
- 7) 試験結果
必要に応じて、表、図、写真を添付すること
- 8) 結果の評価と考察

9) 参考文献

4. 参考情報

4.1 背景

遺伝毒性試験 (genotoxicity test) は、1個の細胞に生じたDNA傷害 (DNA damage) から派生して、細胞や個体レベルで遺伝子突然変異 (gene mutation) や染色体異常 (chromosomal aberration) を誘発する遺伝毒性物質の検出を目的とする試験である。遺伝毒性物質の作用は、その傷害が生体内の体細胞で起きるか、もしくは生殖細胞で起きるかにより傷害の現われ方が異なる。各組織の体細胞においてDNA傷害が生じると、がんの原因となる場合がある。その意味で、遺伝毒性試験は発がん物質の短期スクリーニング試験の役割を果たしている。一方、卵子や精子など生体内の生殖細胞にDNA傷害が生じると、傷を持つ大部分の細胞は生殖細胞や胚の発生過程で淘汰を受けるが、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。また、妊娠中の母体が暴露を受け、胎児の体細胞DNAに傷害が生じた場合、奇形や身体的障害を有する新生児が産まれる可能性もある。このように、遺伝毒性物質はDNAに作用して、がんの発生や次世代に遺伝的影響を及ぼすことから、医療機器は短期的又は長期的いずれの使用条件下においても、生体に作用して遺伝毒性を示さないことが望まれる。

4.2 試験法の選択

本ガイダンスは、原則として、遺伝毒性の主たる事象である遺伝子突然変異及び染色体異常の誘発を検出することができる試験系として、微生物 (ネズミチフス菌、大腸菌) を用いる復帰突然変異試験とは哺乳動物培養細胞を用いる試験 (染色体異常試験、小核試験又はマウスリンフォーマTK試験) の二種の *in vitro* 試験の実施を基本としている。

試験種を選択に関しては、ISO 10993-3 “Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity” において上記の *in vitro* 試験に加えて *in vivo* 試験の実施が必要な場合も記載されており、本ガイダンスにおいても、医療機器の使用期間あるいは使用条件、得られた試験結果の科学的妥当性などを総合的に勘案して、*in vivo* 試験系を含む他の試験系の実施を考慮することとしている。

4.3 抽出溶媒

試験試料から抽出物を得るための有機溶媒として、主に水溶性物質を抽出するメタノールと脂溶性物質を抽出するアセトンの二種類をあげた。これは試験試料から可能な限り多くの抽出物を得ることを目的とした組み合わせであり、体内植込み機器のように低濃度かつ長期にわたる暴露の影響が想定される場合をも考慮したものである。有機溶媒で抽出物が得られないと判断された試験試料で、さらにDMSOが使用不可能な場合には、生理食塩液やリン酸緩衝液、血清含有培養液などでの抽出が考えられる。どのような抽出媒体を選択する場合であってもその妥当性を説明すること。

4.4 抽出率（試験試料の重量に対する試験試料から得られる抽出物量の割合）

メタノール及びアセトンによって試験試料から得られる抽出物量に関する情報がない場合は、3.3.1.2に従って抽出率を求める。抽出率が0.5%以上（又は1%以上）と、0.5%未満（又は1%未満）の場合では、試験液の調製法が異なる。ここで、抽出率0.5%は最終製品重量が0.5g以上の医療機器に、抽出率1%はその重量が0.5g未満の医療機器に適用する。したがって抽出率をもとに試験計画を立案する必要がある。なお抽出率を調べるには、乾固した抽出物の重量を直接測定して求めるか、又はソックスレーフラスコなどを用いて抽出残量を測定して求める。

4.5 「抽出物が得られる場合」の判断

医療機器（最終製品）の重量0.5gを基準として、抽出率の基準を以下のように定めた。「抽出物が得られる場合」とは、通例、抽出率が0.5%以上（医療機器の重量が0.5g以上の場合）又は抽出率が1%以上（医療機器の重量が0.5g未満の場合）の場合とする。0.5%又は1%という抽出率の限界値は、試験に必要な抽出物量を得るための試験試料の量から設定したものである。

4.6 抽出物量

抽出物を用いて遺伝毒性試験を実施する場合に必要な抽出残留物の量は、試験計画によって増減はあるが、およその目安として、少なくとも復帰突然変異試験では1g、染色体異常試験では2g程度が必要である。

4.7 「抽出物が得られない場合」の判断

「抽出物が得られない場合」とは、通例、抽出率が0.5%未満（医療機器の重量が0.5g以上の場合）又は抽出率が1%未満（医療機器の重量が0.5g未満の場合）の場合とする。ただし溶媒中で材料が溶解する場合、又は原形をとどめないほどに変形するような場合、抽出物は得られないものとする。

また、抽出物を用いて試験を実施せずに、原材料に含まれる原料化学物質（モノマーや添加物）の試験を実施するとともに、試験試料からの原料化学物質の溶出量を定量して評価することも可能である。

5. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

- 1) *In vitro* 小核試験の OECD 試験法ガイドラインが作成された (2010.7.22) ことから、その感度、再現性は検証されたと考えられるため、*in vitro* 小核試験を実施可能な試験に追加し、引用規格に OECD 487 を追加した。
- 2) 実施可能な *in vivo* 試験として、現時点では小核試験と染色体異常試験が適切と考えられるため、該当する OECD 試験法ガイドラインを引用規格に追加した。
- 3) 引用規格を現在有効で、直接参考となるものに更新した。
- 4) 有機材料からの試験液調製について、手順流れ図を追加した (3.3.1 項参照)。
- 5) 無機材料については、最終評価を行う時、遺伝毒性試験結果だけでなく、試験試料からの金属イオンなどの溶出量を考慮できることを明記した (3.3.2 項参照)。

6) 試験液の調製において、原材料化学物質の項を追加した(3.3.3項参照)。

6. 参考文献

- 1) 石館基監修：微生物を用いる変異原性試験データ集，エル・アイ・シー，東京(1991)
- 2) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法，朝倉書店，東京(1996)
- 3) 林真：小核試験－実験法からデータの評価まで－，サイエンティスト社，東京(1999)
- 4) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集－改訂1998年版－，エル・アイ・シー，東京(1999)
- 5) 三宅幸雄他編：医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A，サイエンティスト社，東京(2000)
- 6) 小島幸一，田中憲穂：医療用具の生物学的安全性試験の新ガイドライン，秦野研究所年報 26, 53-68 (2003)
- 7) Wever, D.J., Veldhuizen, A.G., Sanders, M.M., Schakenraad, J.M., van Horn J.R.: Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18, 1115-1120 (1997)
- 8) Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K.I., Kodani, N.U., Nishi, Y., Nakadate, M., Sofuni, T.: Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutagenesis* 14, 5-22 (1999)
- 9) Chauvel-Lebret, D.J., Auroy, P., Tricot-Doleux, S., Bonnaure-Mallet, M.: Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. *Biomaterials* 22, 1795-1801 (2001)
- 10) Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Ono, H., Tanaka, N.: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals. *Mutat. Res.* 517, 187-198 (2002)
- 11) Müller, B.P., Ensslen, S., Dott, W., Hollender, J.: Improved sample preparation of biomaterials for *in vitro* genotoxicity testing using reference materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 61, 83-90 (2002)
- 12) Muramatsu, K., Nakajima, M., Kikuchi, M., Shimada, S., Sasaki, K., Masuda, S., Yoshihara, Y.: *In vitro* cytocompatibility assessment of β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 71, 635-643 (2004)
- 13) Matsuoka, A., Isama, K., Tsuchiya, T.: *In vitro* induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 75, 439-444 (2005)
- 14) Matsuoka, A., Haishima, Y., Hasegawa, C., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the *in vitro* chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 86, 13-22 (2008)

第4部 埋植試験

1. 適用範囲

本試験は、体内植込み機器又は原材料の局所への影響を動物試験により評価するものである。埋植材料の材質、表面性状、又は分解過程などによって、周囲組織に引き起こされる組織反応の種類と程度を評価するもので、特に製品そのものを臨床模擬として埋植して評価する場合を除き、製品の設計仕様により引き起こされる影響を評価するためのものではない。また、本試験により埋植試料の毒性病理学的異常だけではなく、新生骨の形成や組織再構築などの適合性を含め、生体適合性を総合的に評価することが可能である。

試験に用いる埋植材料の形状による物理的刺激などの非特異的反応を引き起こさないよう注意すべきであり、また、ラット皮下への固形物の長期埋植による異物発がんなど、動物種、埋植期間によって特異的に引き起こされるが、ヒトでは想定されない傷害が発生する可能性のある試験設計をしてはならない。

埋植初期から安定期にかけての組織反応の経時的変化を確認することは、ヒトでの体内植込み機器の影響を予測する上で有用な情報を提供する。また、吸収・分解性の医療機器では、吸収・分解過程で様々な分解物に局所が暴露されることから、どのような組織反応を惹起するかを確認することは極めて重要である。

埋植試験の中で全身毒性を評価する場合の注意事項についても、本パートにおいて言及する。

2. 引用規格

ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation

3. 一般的注意事項

3.1 試験法

3.1.1 それぞれの埋植部位における試験法として、筋肉内、皮下及び骨内埋植試験法を例として後述する。

3.1.2 埋植試験による局所の炎症反応を考察するに際し、細胞毒性、感作性、刺激性などの試験データを参考にすることは重要である。

3.2 試験試料及び対照材料

3.2.1 最終製品を用いる場合は、最終製品そのもの又は最終製品の一部を切り出すなどして調製した試料を用いる。

3.2.2 埋植用試験試料を調製する場合には、その形状、断端の形状、大きさ、表面性状が組織反応に影響することを考慮し、物理的影響を最小限に抑えるために、できる限り平滑な形状とすることが求められる。また、試験試料と同様の形状の対照材料を埋植することが評価を容易にする。なお、表面処理を施す場合は、最終製品と同じ表面性状に加工する。

3.2.3 滅菌は最終製品と同じ方法を用いる。試験試料を調製する場合は、無菌的に加

工するか、滅菌前の製品を加工した後最終製品と同じ滅菌工程を経たものを用いることが望ましい。再滅菌する場合は、試料が変質などの影響を受けない方法を採用する。

- 3.2.4 陰性対照材料としては、高密度ポリエチレンや純チタン、既承認品として使用実績のある材料などを用いる。陽性対照材料は必須ではないが、試験法や動物の感度を比較したい場合などにおいて設定してもよい(7.3項参照)。滅菌は、必ずしも試験試料と同じ方法にする必要はなく、材料が変質などの影響を受けない方法を採用する。
- 3.2.5 吸収・分解性材料の場合は、消失した後に埋植部位を特定することが困難になる恐れがあるため、①埋植時に写真を撮影するなどして埋植位置を特定しておく、その位置に試験試料がない場合は吸収されたものとみなす、②陰性対照材料や局所への影響がないことが知られている物質をマーカーとして同時に埋植してその付近を観察する、③X線撮影などを経時的に行って埋植部位を特定するなど、消失した後の取り扱いを明確にしておく、あるいは消失した場合でも観察位置が特定できるよう工夫する。
- 3.2.6 骨セメントや歯科材料など、生体内で硬化する医療機器を評価する場合は、臨床適用を模擬して非硬化物を局所に埋植する。埋植が技術的に困難な材料に対しては、すでに硬化したものを整形して埋植する場合がある。後者の場合は、硬化中の生体反応について、別の生物学的安全性試験を実施することにより評価することが望ましい。
- 3.2.7 非固形(例:粉末)を評価する場合は、①ペレット化する、②粉末状態で臨床適用されるのであれば、臨床適用される形状で一定の面積、容積を埋植する、③シリコーンやポリプロピレン製などの刺激性の低いことが知られている開口チューブに充填して埋植するなどの設計とする。③の充填時にはコンタミネーションがないよう注意し、対照材料のひとつとしてチューブのみを埋植する。
- 3.2.8 組織工学により製造される医療機器を試験する場合、生体由来材料は埋植する動物種に対して免疫反応を引き起こす可能性があることに留意する。
- 3.2.9 複数の部材からなる医療機器を埋植する場合、それぞれの部材による局所影響が明確に解析できる設計とする。最終製品そのものを埋植した時、それぞれの部材の組織反応が組織標本において特定できないと想定される場合は部材を単離して埋植する、表裏などが異なる材料ではそれが明確に区別できる方法で埋植するなどである。ただし、部材間の相互作用が予測される場合や、血管内埋植などにおいて臨床模擬試験として埋植試験を実施する場合は、最終製品そのものを埋植することにより評価する。
- 3.2.10 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、動物への埋植試料の総量とヒトの埋植量を比較して一定の安全係数を担保できる設計とすべきである。ただし、人工関節材料など、ヒトへの埋植量が大きいものについては、一定の安全係数を担保する設計は困難である。このような場合は、できる限りヒトの適用量を下回らない設計として、合わせて抽出液などによる全身毒性試験を検討する。また、生体内分解材料の場合は、*in vitro*における分解動態が生体内と同程度であることが判明していない限り、抽出液を用いるべきではなく、埋植によって全身毒性を検索すべきである。

3.3 埋植部位

- 3.3.1 埋植部位は臨床適用部位に近い組織とする。本試験法では、例として筋肉内、皮下及び骨内埋植試験法について記載しているが、これ以外の組織・器官に臨床適用される場合は、その組織・器官の起原、構成組織、細胞種などを総合的に勘案して、例として挙げた組織のいずれか又は複数を選択する。また、新たな組織への標準的な試験法が ISO 10993-6などで明らかとなった場合は、それを示した上で、採用することができる。文献などで明らかとなった方法を採用する場合は、その妥当性を示した上で、十分なサンプル数（1埋植期間について10箇所以上）の観察を行う設計とする。
- 3.3.2 局所への影響を確認する場合、動物の個体差の指標とするため、原則として対照材料と試験試料は同じ個体に埋植する。
- 3.3.3 埋植試験により全身毒性を合わせて評価する場合、予め試験計画立案の際に全身毒性を評価できるよう、血液学的、血液生化学的、病理組織学的検査などを計画する。対照材料と試験試料を同一の動物に埋植すると全身毒性の評価が困難となることから、試験試料埋植群と対照群は別々に設定する。また、複数の材料を同一動物に埋植しても、全身毒性の評価は困難となる。ただし、複数の部材から構成される医療機器の埋植試験を設計する場合は、複数の部材を同一動物に埋植することで、臨床適用を模擬することが可能となる。

3.4 埋植期間

- 3.4.1 埋植期間は、臨床適用期間を超える必要はないが、ヒトにおける埋植反応を予測し得る期間とする。吸収・分解性の材料でない場合、埋植初期の反応、埋植中期の埋植試料と生体界面の組織反応、そして安定化（すれば）した場合の反応を評価することが望ましい。複数の期間を観察して安定化することが明らかであった場合は、それ以上の期間の埋植群を省略することを検討する。ただし、試験計画を立案する際には、短中期の試験を予め行った上で長期埋植を計画するなど、動物愛護の観点から動物数を減らすことを検討する。
- 3.4.2 短期の埋植を1週から4週とし、長期埋植は12週を超える期間とする。また、その間を中期埋植とする。生体適合性の高い材料の場合、短期において、埋植後2週間程度は埋植手術の影響が残るが、対照材料と比較することにより、試料に起因する炎症反応を区別して観察することができる。また、器質化や新生骨の形成は埋植後2週間程度でも開始されており、生体適合性に関する情報が多く得られる。埋植後4週には、すでに安定化する場合が多い。中期では、周囲組織の多くは埋植前の状態に近づいており、界面や周囲はおおむね安定化し、その後の長期における反応を推測するための時期である。長期では、周囲組織は正常組織と同様となり、界面は非常に薄い被膜や新生骨で覆われ安定化する。
- 3.4.3 吸収・分解性材料の場合は、その過程で様々な物質が細粒化又は溶出するなどして、埋植局所は初期とは異なる環境となるため、分解過程を評価し得る埋植期間を設定する。ただし、数年にわたって分解するなど動物試験では分解時間が長期間にわたるため評価できない材料の場合、材料の分解過程がその期間中同様に推移し、局所への影響が最小限であれば、代表的な期間を評価すること

で代用できる。また、加速分解した材料を埋植することによって評価してもよいが、その分解過程が生体内分解と同等であることを予め確認しておく。

3.5 試験動物

3.5.1 短中期の埋植試験には、げっ歯類、ウサギなどが一般的に用いられる。長期埋植では、げっ歯類、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどが用いられる。ラットでは異物発がんが知られているため¹⁾、26週を超える皮下埋植試験に用いる場合は注意を要する。表1に長期埋植の際の動物種の選択を示した。

表1 長期埋植における動物種の選択

種	埋植期間 (週)				
	12	26	52	78	(104)
ラット	○	○	○		
モルモット	○	○	○		
ウサギ	○	○	○	○	○
イヌ	○	○	○	○	○
ヒツジ	○	○	○	○	○
ヤギ	○	○	○	○	○
ブタ	○	○	○	○	○

注: ISO 10993-6:2007 Table 1 を引用した。医療機器の臨床使用に応じた試験期間とする。すべての期間を実施する必要はない。ラットの場合、26週を超える皮下埋植は異物発がんの可能性を考慮する。また、104週は特定の場合のみに設計する。

3.5.2 動物数は複数を用いることとするが、ISO 10993-6に記載された動物数以上とする(4.2、5.2、6.2項参照)。

3.5.3 動物の性は、臨床適用の際にいずれかの性に特化される場合その性について設計し、性差が予測される場合は両性とし、それ以外はいずれかの性でよい。

3.5.4 各埋植期間終了後、動物を適切な方法で安楽死させる。

3.6 埋植方法

3.6.1 埋植手術は原則として全身麻酔下で行う。全身麻酔には、一般的医薬品又は動物用医薬品を用い、動物に苦痛をもたらす薬品を用いてはならない。

3.6.2 術野は刈毛後、適切な消毒薬を用いて清拭する。熟練した術者により滅菌した清浄な器具を用いて切開し、出血は最小限になるよう埋植を行う。埋植後は、刺激性の低い縫合糸やステープラーで切開創を閉じ、消毒する。また、動物が縫合部位を舐めないよう、ウサギやイヌの場合は埋植初期には首にカラーを装着するとよい。抗菌剤や抗生物質などの医薬品の投与は、知見や予備検討などにより当該医薬品が埋植部位の組織反応に影響しないことを予め確認する必要があり、確認されていない場合は原則として使用しない。

3.6.3 適当な対照材料がない場合や埋植術により手術の影響が残ることが予想される場合は、偽手術群を設定することを考慮する。偽手術群で著しい反応が見られた場合は、試験試料の反応がマスクされる可能性があるため、試験法に問題

があると判断し、埋植法などを再検討する。

- 3.6.4 埋植期間中は、動物の一般状態を定期的に観察し、体重測定を行う。埋植初期は手術の影響により体重が減少することがあるため、摂餌量や摂水量をモニターしてもよい。
- 3.6.5 埋植期間中に動物の状態が悪化し、回復の見込みがない場合は、動物を安楽死させる。その場合、埋植局所の観察は通常どおり行い、すべてのデータを記録する。この場合、状態の変化が試料の埋植に起因するか否かを十分検討する。評価の対象としない例としては、骨内埋植した直後に離断骨折し、治療を行わない限り苦痛を与え続けるなどで安楽死させ、観察の結果埋植部位以外の骨折が原因であった場合など、原因が試料の埋植による影響ではないことが明らかである。
- 3.6.6 埋植部位の皮膚が哆開するなど、再手術の必要がある場合は、直ちに麻酔下で縫合するなどの処置を行う。化膿が見られる場合はできるだけ除去し、多量の生理食塩液や緩衝液を用いて洗浄する。この場合でも抗菌剤や抗生物質の使用はできるだけ控える。これらの処置を行った場合は、すべて記録する。
- 3.6.7 埋植期間終了後は、動物を全身麻酔下で安楽死させる。原則として放血処置を行う。

3.7 観察

3.7.1 肉眼的観察

3.7.1.1 埋植試験試料周囲組織及び試料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。

- 1) 試験試料周囲組織における出血、被包形成、新生骨形成、変色の有無とその程度（広がり、厚さなど）
- 2) 試験試料の変色及び変質（ひび割れ、硬さなど）の有無とその程度
- 3) 埋植周囲リンパ節²⁾の腫脹などの変化

3.7.1.2 埋植部位を破壊しないと観察できない場合は、組織観察標本用の組織を固定した後、埋植試料を引き抜く際などに埋植部位の肉眼観察を行い、組織観察用の標本と兼ねてもよい。この場合、予め試料が固定液により変色するか否かなどを確認しておく。

3.7.2 組織学的観察

3.7.2.1 埋植組織及び埋植周囲リンパ節（肉眼的に異常が見られた場合）を、直ちに固定液に浸す。一般的には10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、固定完了後、切り出し、パラフィン包埋、薄切を行う。ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光学顕微鏡下で観察する。必要に応じて、その他の固定法、包埋法及び染色方法を採用してもよい。

3.7.2.2 薄切片の作製に際し、ミクロトームによる薄切が可能な柔らかい試料の場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷せず、界面の観察が可能となる。

3.7.2.3 試料が硬い場合は、試料とともに薄切すると周囲組織を損傷する恐れがあるため、固定（脱灰）後に引き抜く、適当な溶媒で溶解させるなど、試料を除去し、組織損傷がないことを確認した後、薄切することを検討する。

3.7.2.4 試料が硬く有機溶媒などにも不溶である、多孔性であるなど、引き抜く際に

界面の周囲組織を破壊してしまうおそれがある場合は、埋植部位全体を樹脂包埋し、研磨標本作製する。一般的にギムザ染色やトルイジンブルー染色が用いられる。骨内埋植の場合、在来骨又は新生骨と試料の界面が重要な観察ポイントであり、研磨標本作製により、界面の保存が容易となる。また、ビラヌエバ染色を施した標本を蛍光顕微鏡で観察すると、石灰化骨と類骨の判別が容易になる。ただし、炎症性細胞の種類などを検索する際、標本が厚く細胞レベルの観察が困難である場合には、骨組織を脱灰後、試料を引き抜くなどしてパラフィン包埋し、薄切標本作製・観察する。

- 3.7.2.5 作製した標本は、顕微鏡下で観察する。埋植周囲に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見られた異常所見を記録する。例えば、被膜を構成する成分とその状態、線維芽細胞の増生、好中球（ウサギ及びモルモットの場合、偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、マクロファージ、巨細胞などの浸潤、変性・壊死、脂肪化、新生骨形成などについて観察し、評価を加える。筋肉内埋植の場合、炎症性細胞の浸潤や炎症反応は筋線維間に延びる線維性結合組織の方向に拡大し易く、また、筋肉の収縮方向に長くなり、紡錘形となる傾向がある。観察にあたっては、そのようなことに留意して所見をとる。
- 3.7.2.6 筋肉内埋植の場合は、炎症領域の幅を測定するなど、組織形態計測を行うことにより、局所への傷害を定量的に評価することが可能である。この際、標本中における試料の薄切面を一定にするなど、組織形態計測におけるばらつきを少なくすることに留意する。吸収・分解性の試料では食食などにより形状が維持されないため、また、多孔性や繊維状のものでは、内部に線維組織が侵入するため、炎症領域の幅を測定することはできない。また、皮下や骨内埋植では、炎症領域の幅の計測が困難又は必ずしも炎症を定量化するための指標とはならないため、他に適切なパラメータがある場合はその根拠を示した上で組織形態計測を行ってもよい。

3.8 評価

- 3.8.1 各観察項目について、程度とともにその現象を観察する（評価基準を設けて観察し、表に示す）。表2に評価のために着目すべきポイントを示した。スコアリングの後、統計学的検定を行ってもよいが、その場合は観察項目ごとに比較する。すべてのスコアの合計値を指標とする場合、それぞれの観察項目が評価において同等の重みとなるよう適切な係数を乗じるなどの処理を行うことを原則とする。
- 3.8.2 組織形態計測を行った場合は、その数値を表にして示す。
- 3.8.3 ある観察期間において、試験試料の反応が陰性対照材料と比較して有意（7.6項参照）に強い場合、陽性と判定する。
- 3.8.4 肉眼的観察では、反応の広がり全体として捉えることが可能であり、組織学的観察では肉眼的観察で見られた反応がどのような細胞が主体になって起きているのかがわかる。反応が微弱であれば、組織学的観察でのみ見られるにとどまり、局所的反応は肉眼的観察においてしか見られない可能性もある。したがって、組織学的観察を評価するに当たっても、肉眼的観察結果も考慮すべき

である。

- 3.8.5 まれに動物個体の感受性が異常に高い（陰性対照でも細胞浸潤などの反応が見られる）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。ただし、評価の対象外とした動物のデータも試験の報告に含めるべきである。

3.9 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（最終製品又は原材料）を特定する情報
（例：医療機器の名称、製造業者名、製造番号、原材料名など）
- 4) 対照材料
（例：対照材料名、入手先、入手年月日、製造番号など）
- 5) 試験試料及び対照材料の調製方法
（例：切断、滅菌、サイズなど）
- 6) 試験動物（種、系統、性、週齢、体重、入手元。動物の収容方法及び飼育方法）
- 7) 試験方法（麻酔方法及び術後処置を含む試料の埋植方法、回収方法、病理組織標本の作製方法）
- 8) 試験結果
試料及び試料周囲組織の肉眼的観察結果
試料周囲組織の組織学的観察結果（組織形態計測結果を含む）
肉眼及び組織の代表例の写真
- 9) 結果の評価と考察
- 10) 参考文献

表2 埋植局所の組織学的観察ポイント

埋植組織	観察ポイント
筋肉内	線維性被膜の状態（被膜、被包の成熟度合いと線維芽細胞の増生程度）及びその厚み、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球、肥満細胞など）、変性・壊死、出血、血管新生、脂肪化など
皮下	筋肉内と同様
骨内	組織と埋植試料の界面の状態（軟組織又は骨の介在の程度）、新生骨の形成（埋植試料周囲の骨新生の程度と石灰化骨/類骨の割合など）、細胞浸潤（マクロファージ、巨細胞、好中球（偽好酸球）、リンパ球、形質細胞、好酸球、肥満細胞など）、変性・壊死、出血など

注：吸収・分解性の試料の場合は、残存した試料の形状や残存の程度などについて評価する。

4. 筋肉内埋植試験法

4.1 試験試料の大きさ

4.1.1 埋植する動物によって適切な大きさを設定する。なお、ウサギの場合は、幅（又は直径）1～3 mm、長さ約 10 mm とし、断端の角をできるだけ滑らかにする。筋肉を切開して埋植するよりも、15 ゲージ程度の穿刺針で埋植する方が、動物の全身状態と周囲組織へのダメージが少ない。

4.1.2 製品の材質や形状、サイズなどにより、試験試料が整形不可能な場合、あるいは最終製品が試験試料の規定サイズよりも細かい若しくは薄い場合で、それらを規定サイズに整形した場合に、臨床適用の場合とはかけ離れた組織反応が生じると推定される場合は、その旨を示した上で規定サイズとは異なるサイズの試験試料を埋植しても差し支えない。その場合は、できる限り陰性対照材料も同じ形状に整形すること。

4.2 試験動物と埋植部位

4.2.1 ウサギの脊柱旁筋肉内への埋植が推奨される。ウサギであれば左右の脊柱旁筋肉内へ各 4 箇所程度の埋植が可能である。

4.2.2 1 埋植期間につき、肉眼的観察用と組織学的観察用に少なくともそれぞれ 2 匹以上の動物を用い、試験試料及び対照材料ともに、肉眼的観察用と組織学的観察用それぞれ 10 箇所以上の埋植部位を観察する。

4.2.3 既承認品などの対照材料を用いる場合で、ある程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため陰性対照材料を埋植する。

4.2.4 陰性対照材料はすべての埋植期間において埋植、観察すべきであるが、やむを得ず 1 埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

4.3 埋植方法

4.3.1 埋植時は全身麻酔下で、皮膚を切開し、埋植は 15 ゲージ程度の穿刺針か、トロッカーを用いて埋植する。

4.3.2 穿刺針などに試料が装填できない場合は、筋肉を外科的に切開して埋植する。この場合は、陰性対照材料などの対照材料も同様の方法で埋植する。

4.3.3 筋線維方向に並行するよう各試料を埋植する。

4.3.4 埋植箇所は 25 mm 程度の間隔を開ける。

4.3.5 必要に応じて、切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

4.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

4.5 評価方法

3.8 項参照。

4.6 試験報告書

3.9 項参照。

5. 皮下埋植試験法

5.1 試験試料の大きさ

- 5.1.1 シート状の場合は、厚み 0.3～1.0 mm、直径約 10～12 mm の円板状とする。
- 5.1.2 直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm として、断端を丸く加工したものでよい。
- 5.1.3 非固形試料の場合は、直径約 1.5 mm、長さ約 5 mm のチューブに充填する。チューブに充填した量を記録すること。
- 5.1.4 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

5.2 試験動物と埋植部位

- 5.2.1 成熟したマウス、ラット、モルモット、ウサギのうち1種を用いる。
- 5.2.2 埋植期間につき、少なくとも3匹の動物を用いて、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計10箇所以上の埋植部位を観察する。
- 5.2.3 既承認品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測されるときは、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。
- 5.2.4 陰性対照材料はすべての埋植期間において埋植、観察すべきであるが、やむを得ず1埋植期間のみにしか設定しなかった場合には、その妥当性を記録する。

5.3 埋植方法

5.3.1 背部皮下に埋植する場合

- 5.3.1.1 全身麻酔下で、皮膚を切開して切開部位から約1 cm 離れた部位を鈍性剥離して皮下ポケットを作製し、1個の試料を埋植する。複数の試料を埋植する場合は、それぞれを1 cm 程度離す。
- 5.3.1.2 穿刺針などを用いて埋植してもよい。
- 5.3.1.3 切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

5.3.2 頸部皮下に埋植する場合

- 5.3.2.1 マウスを用いる場合は、全身麻酔下で腰部を切開して、頸部までゾンデなどを用いて皮下を鈍性分離して皮下トンネルを作製し、1個の試料を頸部皮下に埋植する。
- 5.3.2.2 ラットの場合は、全身麻酔下で両側の頸部に皮下トンネルを作製して埋植する。体幹、後肢に埋植してもよい。
- 5.3.2.3 切開部位を非刺激性の縫合糸で縫合するとともに、皮下トンネルを通して試料が移動しないよう、縫合しておく。

5.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を3.4項に従って設定する。

5.5 評価方法

3.8項参照。

5.6 試験報告書

3.9項参照。

6. 骨内埋植試験法

6.1 試験試料の大きさ

- 6.1.1 円柱状に加工したものとする。スクリー状に加工したものの方が骨への初期密着性に優れるが、標本作製時は試料の長軸に沿って切断しないと骨と試料の界面の観察がしづらい。
- 6.1.2 ペースト状のものは、そのまま骨に充填するが、予め骨に埋植腔を作製して充填する。埋植前後の容器込み重量を差し引きするなどして埋植量を記録しておく。
- 6.1.3 ラットなどの小動物の場合は、直径約 1 mm、長さ約 5 mm の円柱状とする。
- 6.1.4 ウサギなどの中型動物の場合は、直径約 2 mm、長さ約 6 mm の円柱状とする（最大でも直径 4 mm 以下とする）。
- 6.1.5 イヌ、ヒツジ、ヤギなどの大型動物の場合は、直径約 4 mm、長さ約 12 mm の円柱状とする。
- 6.1.6 スクリュータイプのインプラントをウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタに埋植する場合は、2~4.5 mm の径とする。
- 6.1.7 試験試料を規定以外のサイズに調製する場合は、4.1.2 項を参照する。

6.2 試験動物と埋植部位

- 6.2.1 成熟したげっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギのうち 1 種を用いる。
- 6.2.2 埋植部位はできるだけ臨床適用部位に近い部位とする。大腿骨や脛骨が用いられることが多いが、いずれにおいても、骨体部の緻密骨に埋植する場合と、骨端部の海綿骨部に埋植する場合は、組織反応は異なるため、注意を要する。
- 6.2.3 埋植期間につき、少なくとも 3 匹の動物を用い、試験試料及び対照材料ともにそれぞれ合計 10 箇所以上の埋植部位を観察する。
- 6.2.4 既承認品などの対照材料を用いる場合である程度の組織反応を呈することが予測される場合は、動物の感受性の確認のため、陰性対照材料を埋植する。
- 6.2.5 1 個体に複数の試料を埋植してもよいが、ウサギでは骨が比較的薄く、骨折する可能性があるため、左右の大腿骨と脛骨にそれぞれ 1 箇所ずつ、計 4 箇所の埋植が現実的である。

6.3 埋植方法

- 6.3.1 全身麻酔下で、埋植局所の皮膚を切開し、骨を露出した後、リーマーを用いて孔を開ける。この際、発熱による局所の組織ダメージを最小にするよう、また、切削した組織片が周囲に付着しないように生理食塩水などを注水して洗浄する。
- 6.3.2 埋植孔は、試料のサイズにできるだけ一致するものとし、ギャップをできる限り少なくする。
- 6.3.3 切開部位を非刺激性の縫合糸、若しくはステープラーで閉じる。

6.4 埋植期間

埋植箇所の反応が安定期を迎えるまでの期間を 3.4 項に従って設定する。

6.5 評価方法

3.8 項参照。

6.6 試験報告書

3.9 項参照。

7. 参考情報

7.1 試験法の選択

埋植試験法としては、ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation があり、体内植込み機器の原材料を試験する際には、ISO 基準に従うことで基本的には十分である。一方、Nakamuraらの報告^{3,4)}にあるように、筋肉内埋植試験では炎症領域の幅が細胞毒性などとの相関性がよいことも事実であるため、組織学的評価のみならず、炎症領域の幅のような定量的指標を利用することが望ましい。また、骨内埋植試験では、標準仕様書⁵⁾において新生骨形成におけるいくつかの形態計測パラメータが示されており、これを利用することで生体適合性評価の一助となる。

7.2 滅菌法

高圧蒸気滅菌、乾熱滅菌、煮沸滅菌などの加熱による滅菌の場合には、熱による試験試料の変質、変形に注意する必要がある（例：純ニッケルなどは、酸化被膜の形成により毒性発現に影響があるため、乾熱滅菌などの高温環境を避ける）。エチレンオキシドガスなど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なくてはならない。また、アルコールに長時間浸漬して消毒する場合には、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恐れがあるため、本試験の滅菌法としては不適切である⁶⁾。また、他に γ 線滅菌や電子線、紫外線滅菌などがあるが、照射によって試料の変質や劣化が起こる場合があるので注意しなくてはならない。いずれにしても、採用した滅菌法によって、試験試料とする原材料の変質や変形、及びガスや化合物の残留・吸着などによって実際に生体に適用する最終製品と異なった組織反応を起こすような変化が試験試料及び対照材料に生じてはならず、原材料の性質や臨床適用時の滅菌法などを十分に考慮した上で適切な滅菌法を選択すべきである。

7.3 陽性対照材料

陽性対照材料としては、天然ゴム製品の毒性原因物質のひとつであるジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (ZDEC) を種々の濃度で含有させたポリウレタンシート/ロッドが代表的である。これは、ZDECの含有量と、ウサギ筋肉内埋植試験における「炎症領域の幅」及び *in vitro* 細胞毒性試験との相関性を調べた結果をもとに設定されたものである⁷⁾。陰性対照材料（検定済み高密度ポリエチレンシート/ロッド）と共に、陽性対照材料も財団法人食品薬品安全センター秦野研究所（第1部細胞毒性試験 4.6 項参照）から入手可能である。

また、骨内埋植試験の場合は、純ニッケルを用いることができる。

7.4 埋植期間による組織像の変化

陽性対照材料などを用いたウサギ筋肉内埋植における組織反応の経時的検索では、「炎症領域の幅」が最大となるピークは偽好酸球などの炎症細胞浸潤のピーク時期とほぼ一致しており、その後、肉芽形成、癒痕化による線維性被膜の形成へと組織反応の進行に伴って徐々に幅は狭くなっていくようである。この炎症性細胞浸潤のピークの時期は、試料中に含まれる毒性物質の絶対量、溶出速度、毒性強度などによって異なるものと考えられる。したがって、幅の計測部位の名称を便宜上「炎症領域の幅」としているものの、組織傷害性が低い物質であれば、埋植から1週間後では、マクロファージや線維芽細胞を主体とする細胞浸潤から肉芽形成に至るステージ、4週間後では線維性被膜が形成されるステージにあると考えられ、主として線維性被膜の幅を測定することとなる。

7.5 埋植周囲リンパ節の変化

局所に炎症がある場合、その支配領域下のリンパ節にリンパ管を經由して異物あるいは抗原物質などが達すると、炎症が起きてリンパ節が腫脹することがある。組織学的には、充血、リンパ組織の増生、胚中心細胞の増生が認められる⁸⁾。埋植試験では埋植局所の生体組織に及ぼす影響を検索することが目的であるが、支配領域のリンパ節を確認することにより、局所に生じた炎症の種類や程度を把握する一助となる。なお、ラットなどでは安楽死操作に起因して、アーティファクトとしてリンパ洞や皮質に赤血球が見られることがある⁹⁾。

7.6 組織反応について

「有意に強い組織反応」とは、単に統計学的手法を用いた判定のみを意味するものではなく、対照材料の観察結果と比較して、試験試料の炎症性あるいは組織傷害性が強く認められた場合や質的に異なる反応が生じる場合を指すと考える。ただし、組織形態計測を実施した場合は、対照材料と試験試料との微妙な差の判定根拠について苦慮することが想定され、判定に客観性を持たせる方法として統計学的手法を用いることもひとつの対応策と思われる。なお、炎症とは、静的な反応ではなく、時間の経過とともに循環障害や浸潤細胞の種類と、反応の強さが変化する動的な反応であるため、組織像の評価に際しては炎症反応の時間的経過を十分に考慮しておく必要がある。複数の観察期間を設けているのは、このような動的な反応の変化を検索するためであり、いずれかの埋植期間の情報が重要というわけではなく、すべての情報から総合的に組織反応を評価すべきである。

8. 事務連絡医療機器審査 No. 36 からの変更点

構成及び内容を全面的に見直したが、要点は以下のとおり。

- 1) 一般論として埋植部位を問わず共通する事項をまとめ、その後に埋植部位ごとの方法の概略を記載した。
- 2) 埋植試験において全身毒性を検索する際の留意事項を記載した。
- 3) 埋植周囲リンパ節を肉眼観察することとし、異常が見られた場合は組織学的観察を行うこととした。
- 4) 埋植部位は基本的に臨床適用部位であることを示し、例として筋肉内埋植の他、

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. Biomat.* 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)

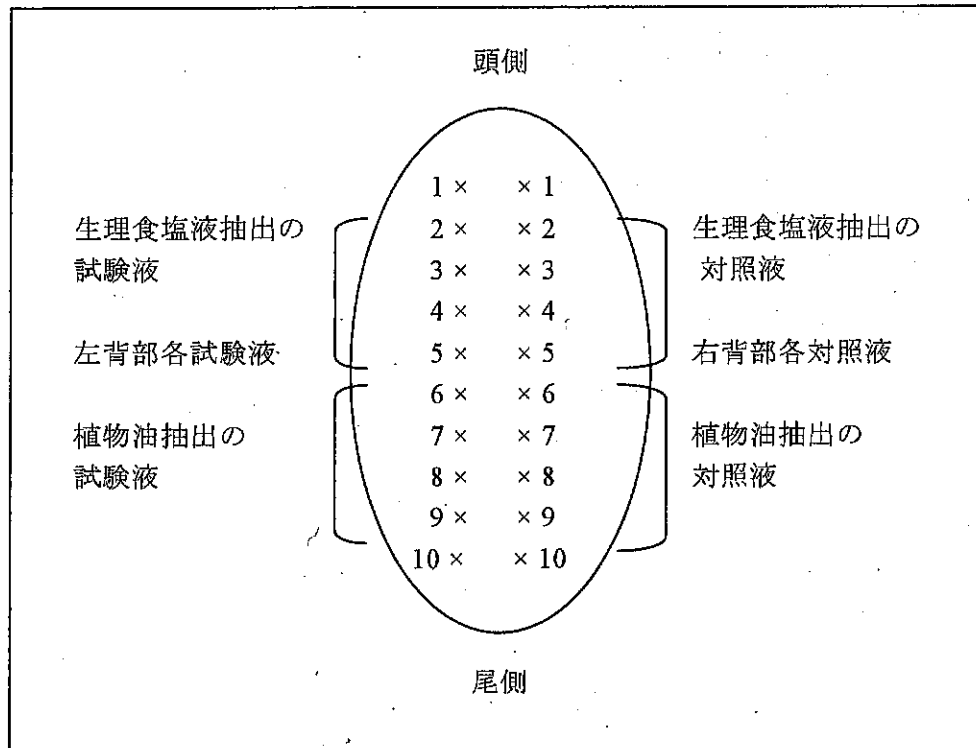


表1 皮膚 (皮内) 反応の評点付けシステム(ISO 10993-10, 6 Irritation tests)

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。

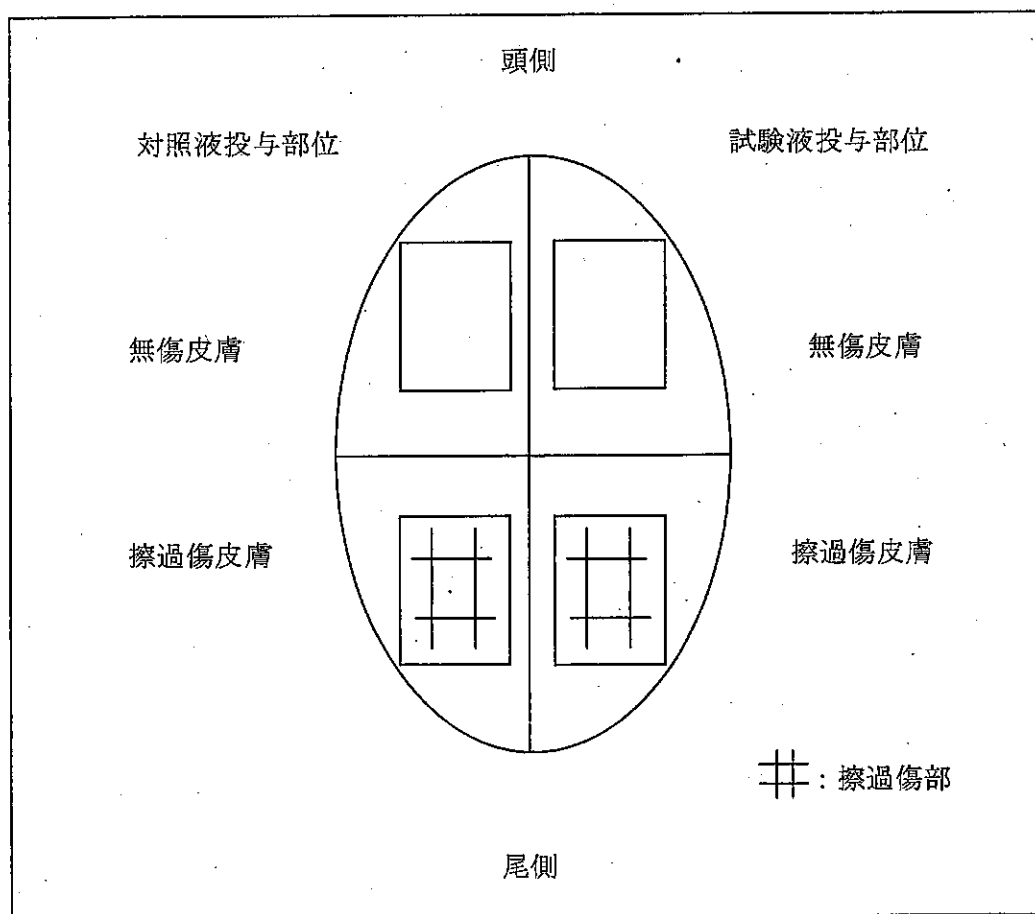
4.4.3 投与経路及び投与期間

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 ≥ 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

I 角膜	
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
II 虹彩	
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*
III 結膜	
A 発赤(角膜及び虹彩を除く眼瞼、眼球結膜)	
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 結膜浮腫	
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*
C 分泌物	
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みえる。
- 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。