

生醫材料

生物相容性測試

曾靖嬪

生醫材料暨組織工程所

生物相容性 測試之目的

- 判斷材料或醫療器材所使用的材料，在生物體應用上是否有潛在毒素？
- 這些毒素在器材接觸到人體後釋放出來，是否造成人體傷害或疾病？

生物相容性 概念

生物相容性 (biocompatibility) :

The quality of not having toxic or injurious effects on biological systems

**生醫材料對人體影響，依其影響範圍
區分**

局部反應(local response)

- 細胞反應(cellular response)
- 組織反應(tissue response)

系統反應(systematic response)

生醫材料之 生物相容性 標準

國際標準

ISO 10993

<https://www.iso.org/standard/68936.html>

ASTM F748-95

實驗室

<http://www.astm.org>

FDA Guidance documents

<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>

國家標準

中華民國國家標準(CNS)

CNS 14393:2004

International organization for standardization – International Standard (ISO)

- 1986 CA, BR, US developed
“Tri-party Bio-compatibility Guidance for Medical Devices”
- 1992 醫用裝置生物學評估系列國際標準

ISO10993-1

1992 Biological evaluation of medical devices:
Part 1: Evaluation and testing

Biologic Tests Suitable for Biomaterials for Chronic Bone and Soft Tissue Contact^a

- ISO 10993-12: 1996
- ISO 10993-10: 2002
- ISO 10993-4: 2002
- ISO 10993-1: 2003

-
- Cytotoxicity (cell culture)**
 - Intramuscular implantation (animal)**
 - Carcinogenicity (cell culture)**
 - Long-term implantation (animal)**
 - Systemic injection acute toxicity (animal)**
 - Intracutaneous injection (animal)**
 - Mutagenicity (cell culture)**
 - Pyrogen test (animal)**
-

ISO 10993

內容

- 醫療器材生物學評估標準
- 針對**材料**與**醫療器材**所訂出評估生物安全性的全部規範文件。
- 醫療器材與材料**應用於人體(包括臨床測試)之前**，經過本系列之評估，確認其生物安全性後才能使用。
- 是當今世界醫療器材生物性評估的最新潮流，亦是目前最完整的生物性評估標準。

Ex: 快篩 (n0)

- 本系列只限於評估**直接或間接地接觸人體的器材**。
- 非接觸人體的器材，不在本標準規範。
- 本系列標準，也不包含器材因機械疲乏產生的生物學危害之評估。

ISO 10993

內容

- 第一篇：評估與試驗
- 第二篇：動物福利規定
- 第三篇：基因毒性、致癌性與生殖毒性的試驗
- 第四篇：血液相互作用試驗選擇
- 第五篇：細胞毒性選擇：體外試驗法
- 第六篇：植入後局部效應試驗
- 第七篇：氧化乙稀消毒殘餘物
- 第八篇：臨床研究
- 第九篇：有關生物試驗材料降解作用
- 第十篇：刺激與過敏試驗

ISO 10993

內容

- 第十一篇：系統毒性試驗
- 第十二篇：樣品製備與參考材料
- 第十三篇：聚合物降解產品之識別與檢定
- 第十四篇：陶磁降解產品之識別與檢定
- 第十五篇：塗裝與未塗裝金屬及合金降解產品之識別
與檢定
- 第十六篇：醫療器材降解產品與可瀝濾物毒性學研究
設計一般準則
- 第十七篇：工業消毒醫療器材中戊二醛與甲醛殘餘物
- 第十八篇：材料的化學特性
- 第十九篇：材料的理化、形態與貌相特性
- 第二十篇：醫療器材免疫毒性試驗方法與原則

ISO 10993 內容

多一個 | ISO 110993 總則與精神說明

第一篇：評估與試驗

第八篇：臨床研究

動物保護

第二篇：動物福利規定

本標準規定對待動物的本要求

3R:

- 替代 (Replacement)
- 減少 (Reduction)
- 優化 (Refinement)

用較人道的作法

ISO 10993 內容

參考材料

確保試驗系統的正確性 / 試驗樣本

ISO 10993-8 採用參考材料的要求

ISO 10993-12 樣品製備參考材料選擇

滅菌後殘留

ISO 10993-7. 氧化乙烯消毒殘餘物

- End used products
- Ready for use

after Sterilization



ISO 10993

內容

衰解產物/可滲出物/生物衰解/ 材料化學特性

10993-9 降解評估

10993-13 聚合物降解產品之識別與檢定

10993-14 陶磁降解產品之識別與檢定

10993-15 塗裝與未塗裝金屬及合金降解產品之識別
與檢定

10993-16 醫療器材降解產品與可瀝滲物**毒性學研究**
設計一般準則

10993-17 工業消毒醫療器材中戊二醛與甲醛殘餘物

10993-18 材料的化學特性

ISO 10993

內容

生物反應測試相關

ISO 10993-3 基因毒性、致癌性、生殖毒性

ISO 10993-4 血液相容性

ISO 10993-5 體外細胞毒性

ISO 10993-6 植入試驗

ISO 10993-10 過敏性、刺激性、皮內試驗

ISO 10993-11 系統毒性、急毒性、慢性毒性 亞急性毒性

醫療器材 分類

醫療器材分類之主要依據：

決定生物評估試驗項目

接觸身體的“方式”
接觸身體的“時間”長短

與身體 接觸方式

■接觸體表 (Surface-contacting devices)

► 皮膚

只與完整體表接觸

固定膠布

壓迫性繩帶

體外義肢

感測器電極

► 黏膜

只與完整黏膜接觸

隱形眼鏡

導尿管

牙科填充物

腸內醫材

► 受傷表面

只與受傷體表接觸

傷口敷料

癒合之醫材封閉型貼片

■體外聯通 (External communicating devices)

與身體
接觸方式

➤ 血液路徑

與某一點血液路徑經處
靜脈輸液管
體液輸入套

➤ 組織牙骨

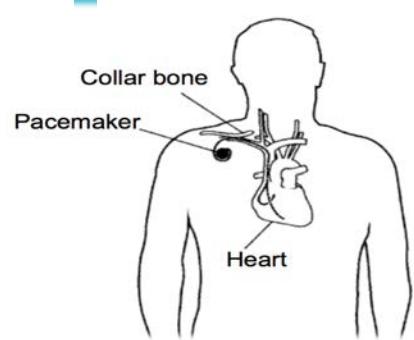
與組織/骨頭/牙齒接觸
牙科填充物
腹腔鏡
關節鏡
引流系統

➤ 血液循環

與血液循環接觸
血管內導管
透析器

與身體

接觸方式



► 血液

人工血管
心臟瓣膜
心室輔導器



► 骨頭

骨釘
骨板
人工關節
骨骼內醫材

► 組織（液）

心率調節器
人工肌腱
乳房植入物

■植入體內 (Implant devices)

與身體 接觸時間

■ 短期 (Limited)

≤ 24小時 單次、多次使用或接觸

■ 長期 (Prolonged)

24小時~30天 單次、多次、長期使用或接觸

■ 永久 (Permanent)

> 30天 單次、多次、長期使用或接觸

To select the required test

知道要做哪些 test



BIOCOMPATIBILITY SAFETY TESTING

[Based on ISO 10993-1 AND FDA G95-1 Guidelines]

DEVICE CATEGORIES		Contact Duration	BIOLOGICAL EFFECT					
			Initial		Other ⁴			
Body Contact		A – Limited [≤ 24 hrs]	Cytotoxicity 细胞毒性	Sensitization 过敏度	Irritation 刺激	Systemic Toxicity 全身毒性	Subacute (Subchronic) Toxicity 亚急慢性毒性	Genotoxicity 基因毒性
		B – Prolonged [>24 hrs to "30 days"]						
		C – Permanent [>30 days]						
SURFACE DEVICES	Skin	A	●	●	●			
		B	●	●	●			
		C	●	●	●			
	Mucosal Membranes	A	●	●	●			
		B	●	●	●	○	○	○
		C	●	●	●	○	●	●
	Breached or Compromised Surfaces	A	●	●	●	○		
		B	●	●	●	○	○	○
		C	●	●	●	○	●	●

2	Body Contact	Contact Duration A – Limited [≤ 24 hrs] B – Prolonged [>24 hrs to "30 days"] C – Permanent [>30 days]	BIOLOGICAL EFFECT						
			Initial			Subacute (Subchronic) Toxicity Genotoxicity Implantation	Other ⁴		
			Cytotoxicity	Sensitization	Irritation				
EXTERNAL COMMUNICATING DEVICES	Blood Path, Indirect ³	A	●	●	●	●	●	●	
		B	●	●	●	●	○	●	
		C	●	●	○	●	●	○	
	Tissue ¹ /Bone/ Dentin Communicating	A	●	●	●	○			
		B	●	●	●	●	●	●	
		C	●	●	●	●	●	●	
	Circulating Blood ³	A	●	●	●	●	○ ²	●	
		B	●	●	●	●	●	●	
		C	●	●	●	●	●	●	
IMPLANT DEVICES	Tissue / Bone	A	●	●	●	○			
		B	●	●	●	●	●		
	Blood ³	C	●	●	●	●	●	●	
		A	●	●	●	●	●	●	
		B	●	●	●	●	●	●	
		C	●	●	●	●	●	●	

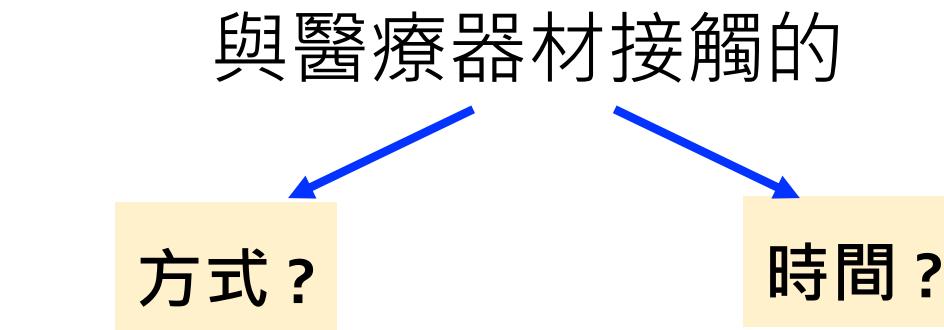
ISO 10993 生物評估試驗項目表

醫療器材分類			生物效應												
依與身體接觸性質			依接觸時間 短期： $\leq 24\text{h}$ 長期： $24\text{h} \sim 30\text{天}$ 永久： $> 30\text{天}$	初步評估試驗						補充評估試驗					
分類	接觸部位	舉例		細胞毒性	致敏性	刺激性或 內反應	全身性 毒性	亞慢性 毒性	否急性 毒性	基因 毒性	植入	血液相容性	慢性 毒性	致癌性	生殖及 發育
接觸體表 之器材	皮膚	各種電極、體外義肢、固定用繩布、壓迫性繩帶及監視器、熱敷墊	$\leq 24\text{h}$	●	●	●									
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●									
			$> 30\text{天}$	●	●	●									
體外連通 之器材	黏膜	隱形眼鏡、腸內醫療器材、氣管支管、牙內填料、齒列矯正器材	$\leq 24\text{h}$	●	●	●									
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●	⊕	⊕	⊕	●	●	●	●	●	●
			$> 30\text{天}$	●	●	●	⊕	●	●	●	●	●	●	●	●
植入器材	受傷體表	用於潰瘍、燒傷及肉芽組織之敷料或 適合醫材及封閉性貼布	$\leq 24\text{h}$	●	●	●	⊕								
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●	⊕	⊕							
			$> 30\text{天}$	●	●	●	⊕	●	●	●	●	●	●	●	●
體外連通 之器材	非直接之血 液路徑	體液輸入套(裝置)、轉接套、延伸套 及血液輸注夾(裝置)	$\leq 24\text{h}$	●	●	●	●					●			
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●	●					●			
			$> 30\text{天}$	●	●	⊕	●	●	●	●	●	●	●	●	●
植入器材	組織/骨頭/ 牙質	腹腔鏡、關節鏡、引流系統、牙科用 黏粉、皮膚用釘針及牙科填充物	$\leq 24\text{h}$	●	●	●	⊕								
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	⊕	⊕	⊕	⊕	●	●	●	●	●	●
			$> 30\text{天}$	●	●	⊕	⊕	⊕	⊕	●	●	●	●	●	●
植入器材	循環血液	血液內導管、充氣氣、透析器及其配 件、血液吸附器、免疫吸附器、暫時 性心律調整器	$\leq 24\text{h}$	●	●	●			⊕	●	●	●	●	●	●
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●			⊕	●	●	●	●	●	●
			$> 30\text{天}$	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
植入器材	骨頭/組織	骨釘、骨板、人工關節、心臟節律器 、藥物供應器、乳房植入物、人工肌 腱、鉗夾	$\leq 24\text{h}$	●	●	●	⊕								
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	⊕	⊕	⊕	⊕	●	●	●	●	●	●
			$> 30\text{天}$	●	●	⊕	⊕	⊕	⊕	●	●	●	●	●	●
植入器材	血液	心臟節律器的電極、心臟瓣膜、人工 血管、體內藥物輸送導管、心室輔助 器材、人工動靜脈廈管	$\leq 24\text{h}$	●	●	●	●				●	●	●	●	●
			$24\text{h} \sim 30\text{天}$	●	●	●	●	●	⊕	●	●	●	●	●	●
			$> 30\text{天}$	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● FDA + ISO

⊕ additional test for FDA

選擇生物 評估方法



初步評估試

- 細胞毒性(ISO 10993-5)
- 致敏性(ISO 10993-10)
- 皮內反應(ISO 10993-10)
- 刺激性(ISO 10993-10)
- 植入(ISO 10993-6)
- 急性毒性(ISO 10993-11)
- 亞急性毒性(ISO 10993-11)
- 血液相容性(ISO 10993-4)

補充性評估試驗

- 慢性毒性(ISO 10993-11)
- 致癌性(ISO 10993-3)
- 生殖發育毒性(ISO 10993-3)
- 生物可降解性(ISO 10993-9)

細胞毒性

Cytotoxicity

ISO10993-5

■ 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity)

細胞毒性試驗為體外試驗，採用**哺乳動物的細胞**，於生物體外把測試樣品利用不同接觸方式接觸細胞，之後檢測細胞之生物參數，測試醫療器材、材料或其萃取物所引起之生物反應

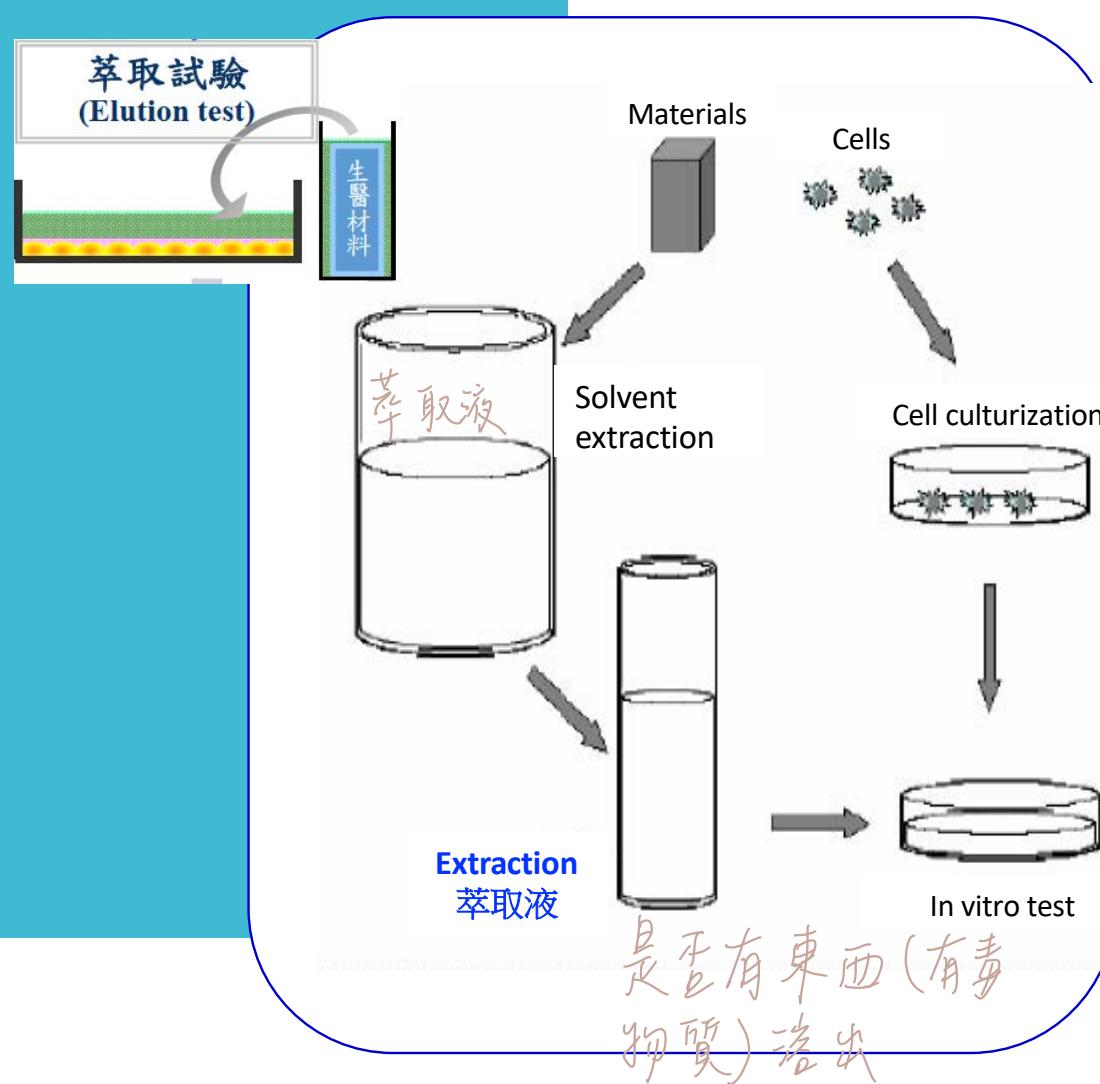
耐受性高

- 纖維母細胞 (L929, 3T3...)
- L929 (mouse fibroblasts)/
• 3T3 (mouse embryonic fibroblast cell line)
- 直接接觸模式? 間接接觸模式?
- 培養時間>24小時
 - 24 hour, 72 hours
 - Human osteoblast need to be cultured for 3 to 7 days.
- 正/負控制組
- 定性及定量評估

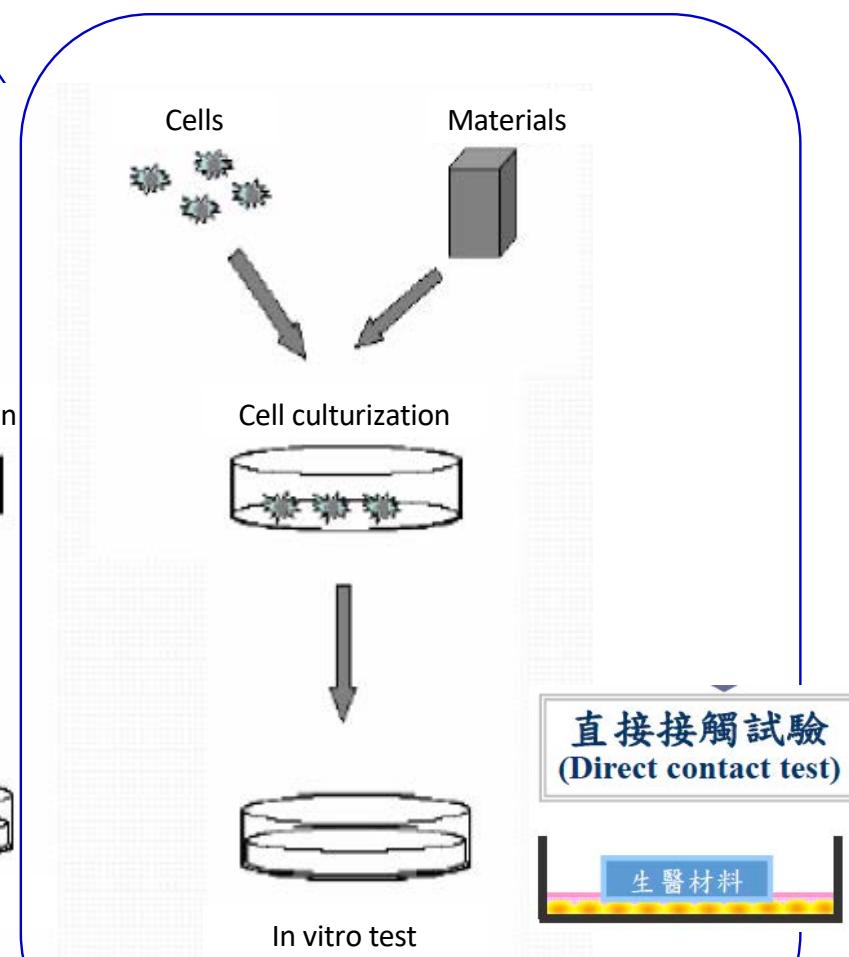
細胞毒性 等級	說明
0	無細胞毒性
1	輕微細胞毒性
2	中度細胞毒性
3	重度細胞毒性

■ 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity)

非直接：萃取測試 Elution test



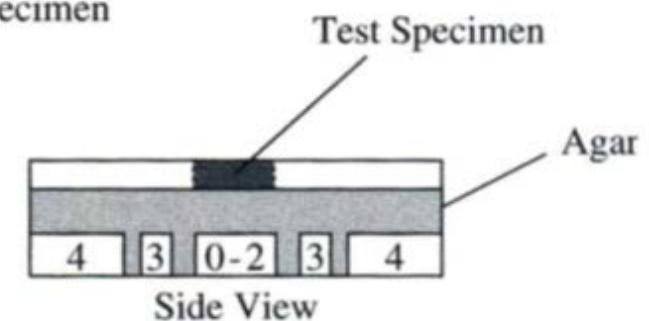
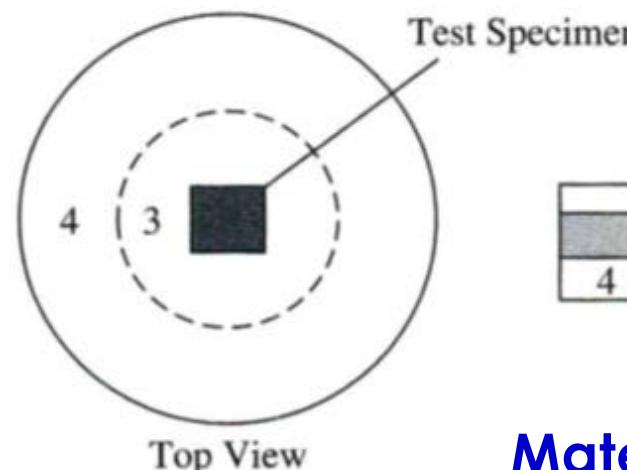
直接接觸 Contact test



■ 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity)

瓊指擴散試驗 Agar Diffusion assay

- Cells adhered to a well plate are covered with agar.
- The test specimen is then placed on top of the agar and the cells are kept in culture for 1-3 days.
- The cells are then divided into zones, depending on their distance from the sample, and viability is examined.
- The greater the number of affected zones and/or the farther away from the specimen the effects are observed, the greater the cytotoxicity of the sample.



Material : cell (area) = 1:1

ISO 10993-12 樣品製備參考材料選擇

Standard surface areas and extract liquid volumes

Thickness mm	Extraction ratio (surface area or mass/volume) $\pm 10\%$	Forms of material
<0,5	6 cm ² /ml	film, sheet, tubing wall
0,5 to 1,0	3 cm ² /ml	tubing wall, slab, small molded items items -
>1,0	1.25cm ² /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

NOTE - While there are no standardized methods available at present for testing absorbents and hydrocolloids, the following is a suggested protocol:

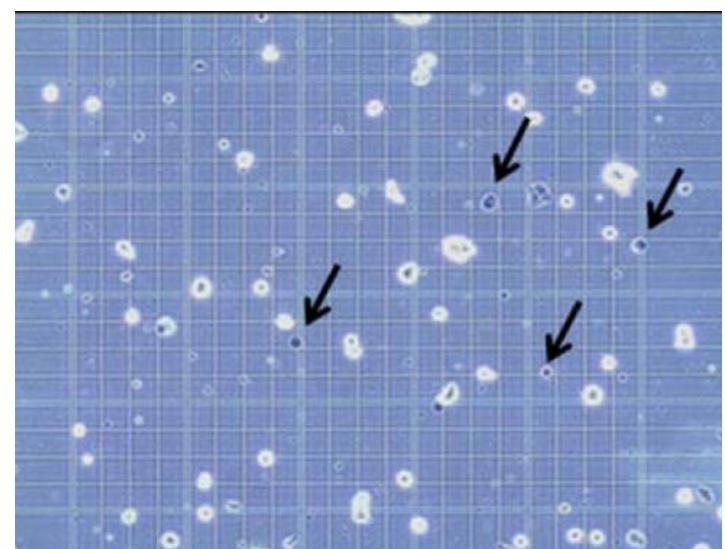
Determine the "absorption capacity" of the material, i. e. the amount of extract liquid absorbed per gram of the material. The test sample shall be 0,1 g/ml beyond the absorptive capacity of the material.

■ 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity)

Direct contact assay

- The test materials is fabricated to specific dimensions and places on top of a layer of cells cultured in a cell culture plate.
 - * At least one flat surface
 - * Sterile method
- After 24 hrs. in a culture incubator, the cells in the area around the sample are examined.

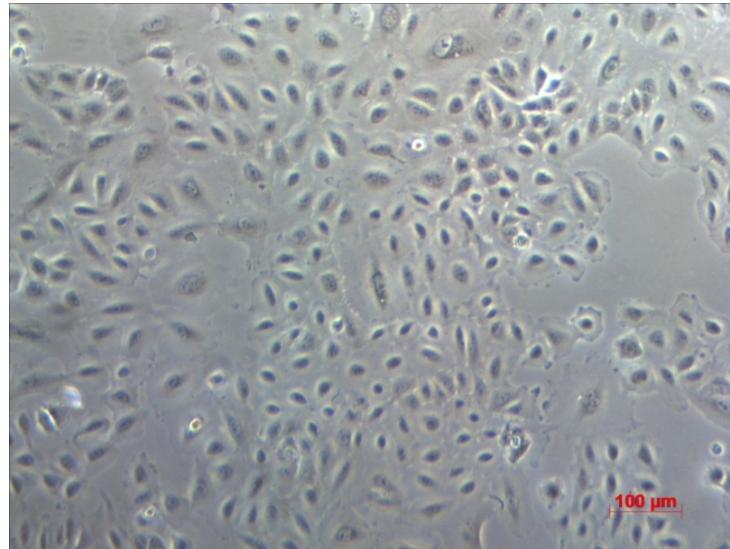
- ✓ Microscope observation : morphology
- ✓ MTT assay : Mitochondria activity
- ✓ LDH assay: cell lysis



顯微鏡檢察 (必要時可採細胞染色)

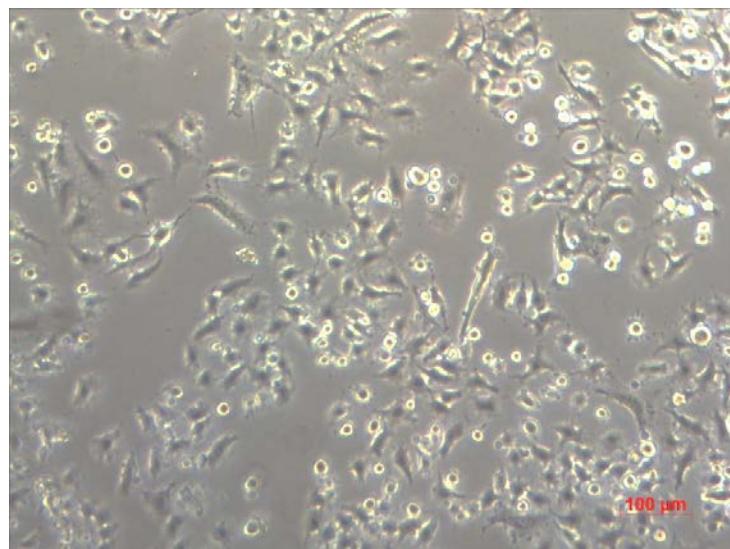
direct contact

Control

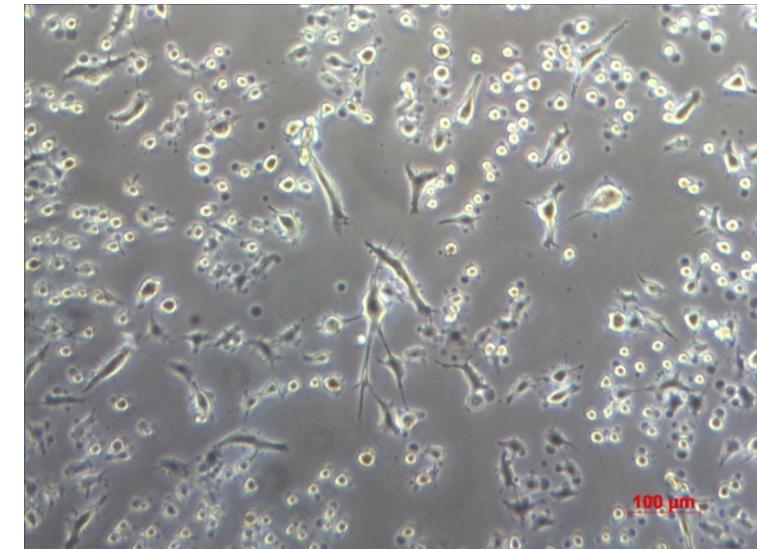
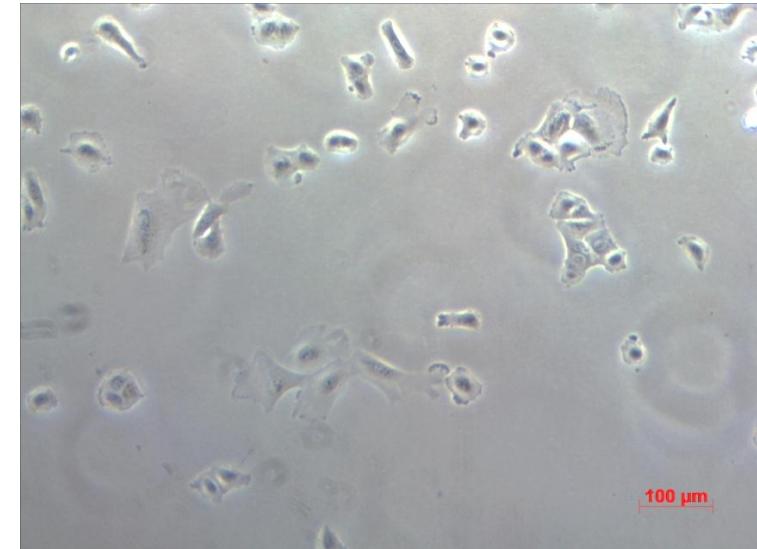


d1x

d10x



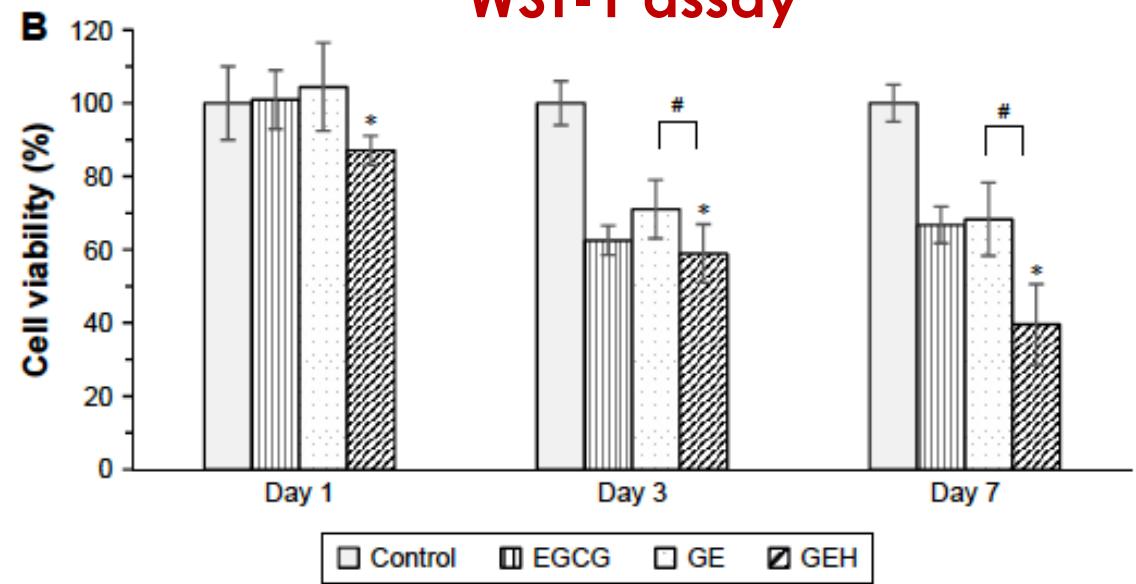
d100x



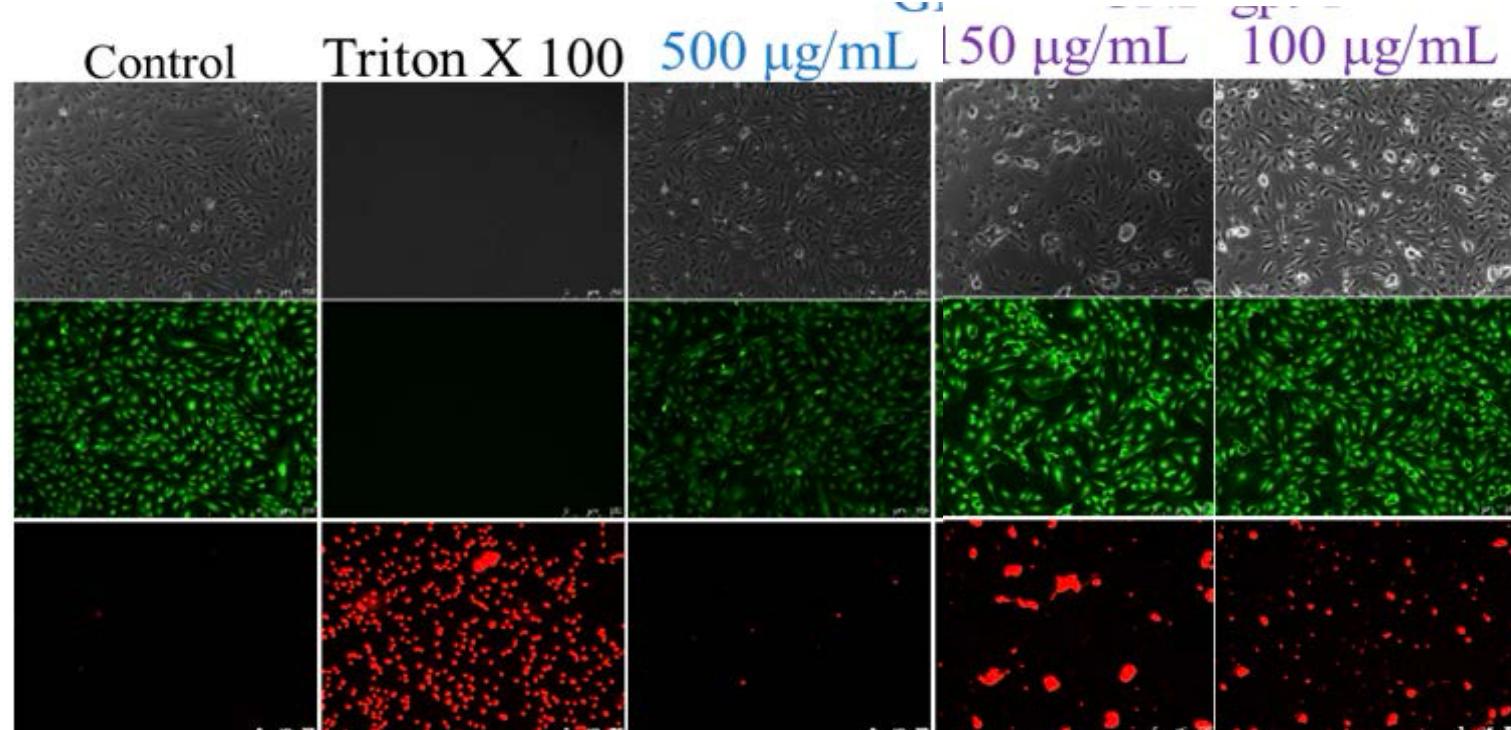
WST-1 assay

量測細胞死亡、細胞抑制成長

細胞增殖或菌落形成等參數



Live/dead stain

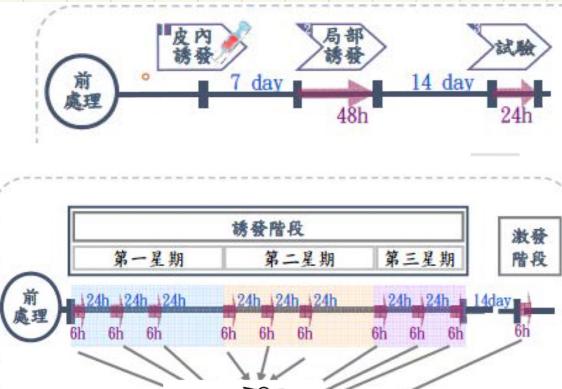


刺激
(Irritation)

{ 皮內反應
皮膚刺激
眼部刺激

過敏

- 最大化試驗
- 封閉試驗



刺激反應

Irritation

ISO10993-10

■ 刺激性試驗 (Irritation)

ISO 10993-10

Test for **Irritation** and Delayed-type **Hypersensitivity**

- 以臨床將應用之模式部位，選擇以皮膚、眼睛、黏膜等組織，來評估醫療器材、材料及其萃取物之刺激性。
- 試驗方法也須選擇合適的測試途徑及暴露或接觸待測物以測定醫療器材、材料及其萃取物之刺激性。

- ✓ 兔子/天竺鼠
- ✓ 選擇合適的測試途徑(皮膚、眼睛、黏膜、皮內)
- ✓ 暴露或接觸待測物時間

刺激反應

Irritation

ISO10993-10

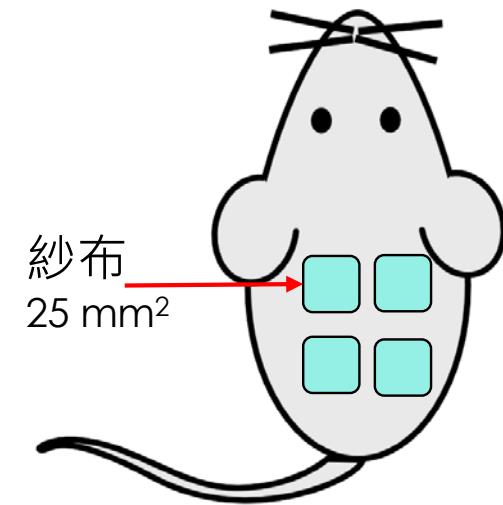
■ 刺激性試驗 (Irritation)

皮膚刺激 (skin irritation)

對照組：紗布

實驗組：紗布 [浸泡材料萃取液](#)

時間：1,24,48,72 hrs.



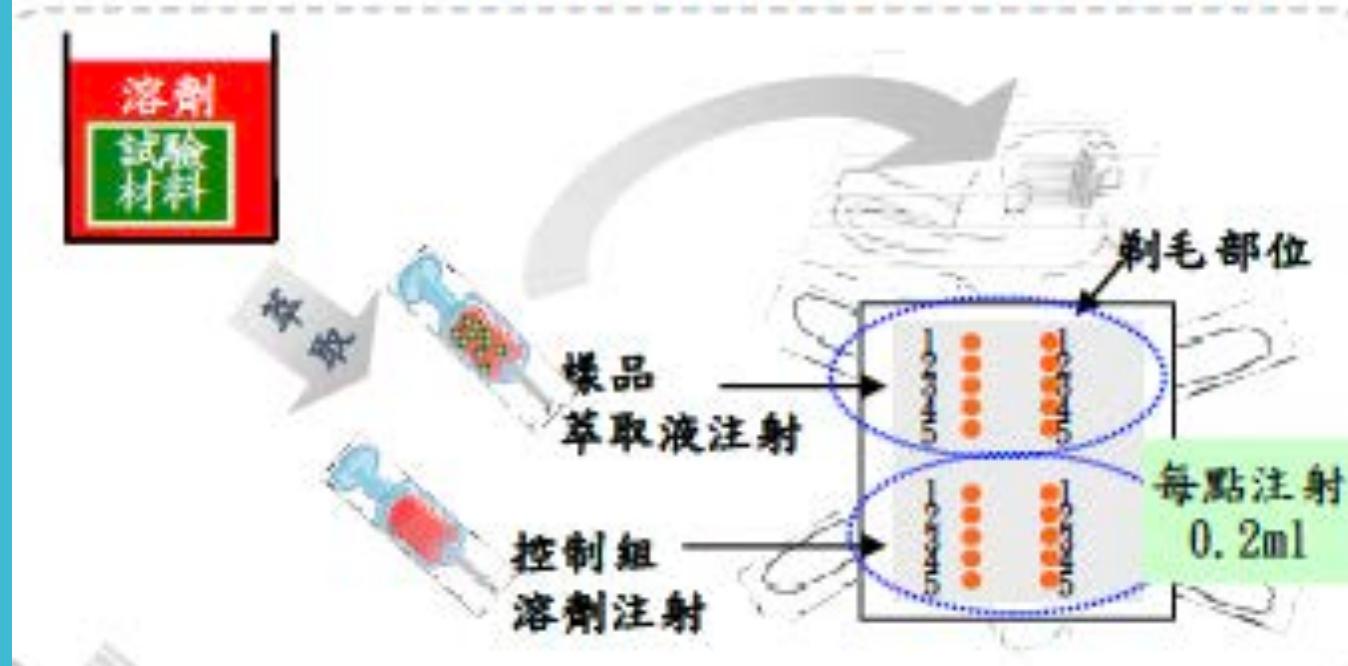
刺激反應

Irritation

ISO10993-10

■ 刺激性試驗 (Irritation)

皮內反應 (Intracutaneous reactivity)



刺激反應

Irritation

ISO10993-10

平均評分	反應分類
0~ 0.4	可忽略
0.5 ~ 1.9	輕微
2.0 ~ 4.9	中度
4.9 ~8.0	嚴重

■ 刺激性試驗 (Irritation)

刺激反應之評分歸類系統

反應	評分數值
紅斑及痂之生成	
無紅斑	0
非常輕微之紅斑(幾乎無法觀察的程度)	1
清晰的紅斑	2
中度的紅斑	3
重度的紅斑(甜菜紅)至形成痂以致無法評估紅斑之程度	4
水腫之生成	
無水腫	0
非常輕微的水腫(幾乎無法察覺的程度)	1
清晰之水腫(面之邊緣有清晰的高起)	2
中度的水腫(突起約1mm高)	3
重度水腫(突起超過1mm高且面積大於暴露區域)	4

■ 刺激性試驗 (Irritation)

眼部刺激 (Eyes irritation)

Table 2

Grading system of macroscopically evaluated signs in the *in vivo* tolerance study for the colloidal systems tested

Grade	Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Discharge	Lids
0	No reaction	No alterations	No alterations	No discharge	No swelling
1	Blinking	Mild opacity	Mild hyperemia; mild edema	Mild discharge without moistened hair	Mild swelling
2	Enhanced blinking; intense tearing; vocalizations	Intense opacity	Intense hyperemia; intense edema; hemorrhage	Intense discharge with moistened hair	Obvious swelling

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for ocular irritation testing (2002)

OECD: 經濟合作與發展組織



過敏反應 Sensitization

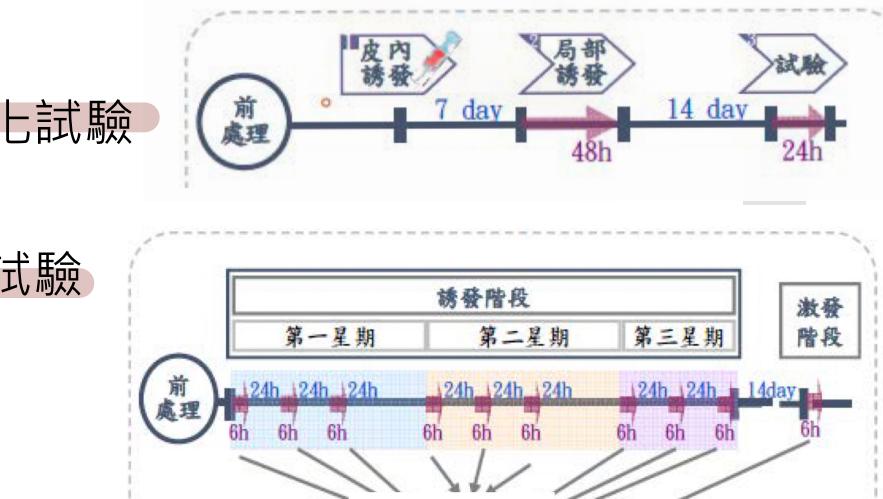
ISO10993-10

■ 過敏試驗 (Hypersensitivity)

- 使用適當實驗模式，評估醫療器材、材料及/或其萃取物所引發之接觸性過敏或致敏性反應。
- 因為暴露或接觸微量潛在的溶出物，即會引起過敏或致敏反應，因此適合進行此類試驗

- 白天竺鼠 (300~500g)
- 試驗模式選擇

- 最大化試驗
- 封閉試驗



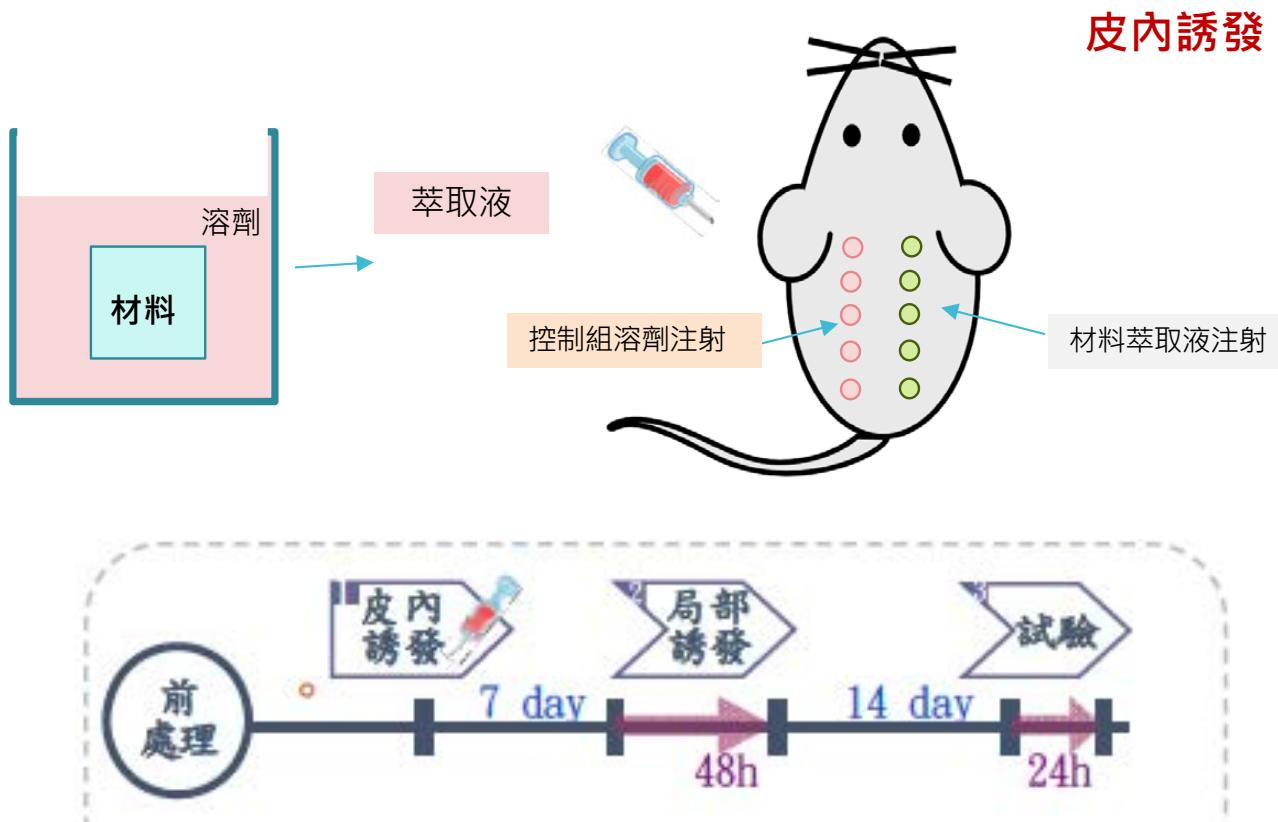
過敏反應 Sensitization

ISO10993-10

■ 過敏試驗 (Hypersensitivity)

最大化試驗

- 用萃取液混入佐劑於特定部位皮內誘發
- 七天後，進行局部誘發(48h)
- 十四天後，進行考驗(24h)

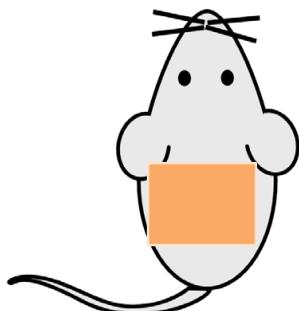


■ 過敏試驗 (Hypersensitivity)

最大化試驗

1. 皮內誘發

- 以弗氏完全佐劑與樣品（對照組），以體積比為1:1混合。
- 取0.1 mL樣品，皮內注射於動物剃毛背上



2. 局部誘發

- 七天後，以局部皮內注射方式，再以彈性繩帶固定住($48\pm2h$)

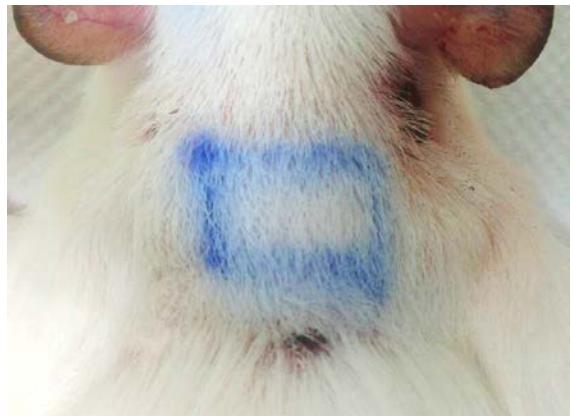


3. 考驗階段

- 局部誘發十四天後
- 將紗布浸於樣品溶液及對照組溶液內，施加於每隻動物的背部部位，再以彈性繩帶固定住 $24\pm2h$ 後，再將彈性繩帶移除
- 觀察試驗結果

■ 過敏試驗 (Hypersensitivity)

Allergic testing



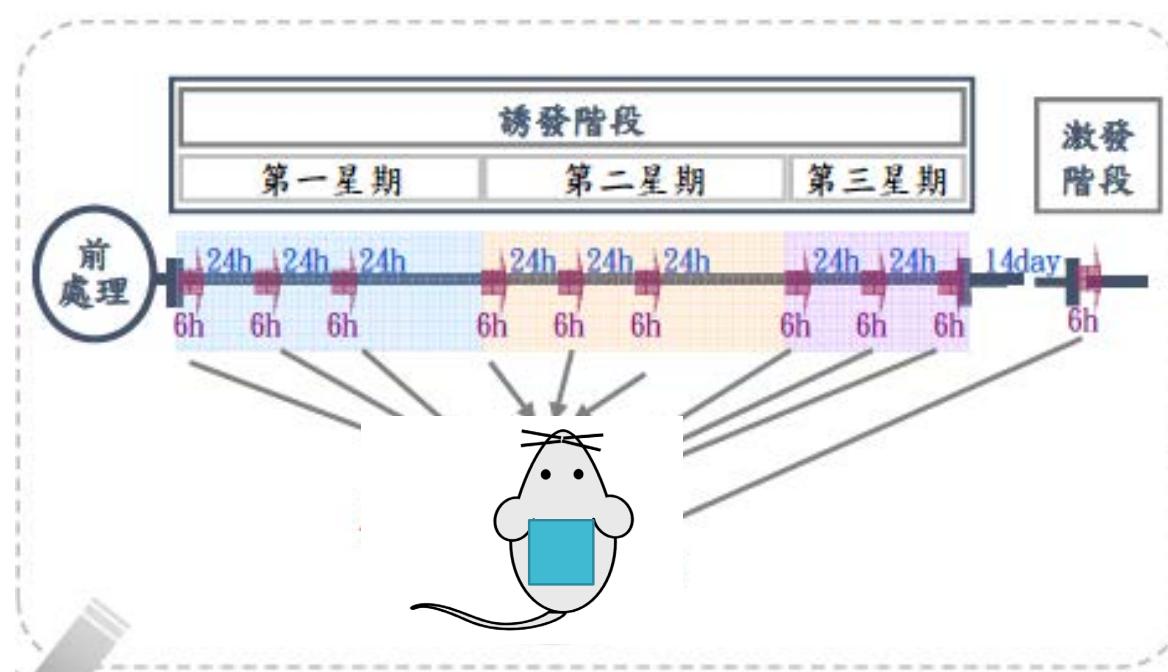
評分分數	貼片試驗反應
0	無可見之變化
1	分散或片狀之紅斑
2	中度且連成一片之紅斑
3	嚴重紅斑及水腫

■ 過敏試驗 (Hypersensitivity)

封閉試驗

- 每週擇連續3天，
- 每次六小時，
- 以敷貼方式對天竺鼠進行誘發，
- 連續3週
- 再於十四天後再進行考驗。

評分分數	貼片試驗反應
0	無可見之變化
1	分散或片狀之紅斑
2	中度且連成一片之紅斑
3	嚴重紅斑及水腫



植入試驗

Implant Effects

ISO10993-6

■ 植入試驗 – 試驗對象

ISO 10993-6 Tests for local effects
after implantation

1. 接觸組織(骨、牙)時間超過24h的外部接器械
2. 植入組織(骨)超過24h的植入器械，所有接觸血液的植入器械

應進行植入後局部反應試驗的器械或材料

- 對於要進行植入後局部反應評價的器材或材料，如果經證實，其**材料與已上市產品相同且表面結構和狀態也相同**，則**不必進行植入後局部反應試驗**。
- 如果**材料與已上市產品不同，或表面結構和狀態不同**，則**需要進行植入後局部反應試驗**。
- 如果**無法確定醫療器材與已上市產品的異同**，也**必須進行進行植入後局部反應試驗**。

植入試驗

Implant Effects

ISO10993-6

■ 植入試驗 – 試驗對象

ISO 10993-6 Tests for local effects
after implantation

用來評估在預期的用途下，以外科手術方式置入或植入器材或材料，於組織之適當部位時，活體組織在巨觀總體上與顯微學層面的局部病理效應。

植入部位與時間長短依據在人體上預期用途來決定

植入部位

皮下植入 (Subcutaneous)
肌肉植入(Muscle)
骨植入(Bone)

植入時間

短期試驗 (12周以內)
長期試驗 (12周以上)

植入試驗 Implant Effects

ISO10993-6

■ 植入試驗 – 試驗對象

動物選擇

依試驗樣品大小、試驗周期與動物壽命、
以及硬組織及軟組織在種屬間的差異性
等因素選擇動物



觀察期選擇

- **短期試驗** (皮下組織、肌肉):
小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子
- **長期試驗**(皮下組織、肌肉、骨骼):
大鼠、天竺鼠、兔子、狗、羊、豬
或其他壽命較長動物



■ 植入試驗 - 觀察時間點

ISO 10993-6 Tests for local effects
after implantation

短期試驗

皮下組織和肌肉短期植入期間之選擇

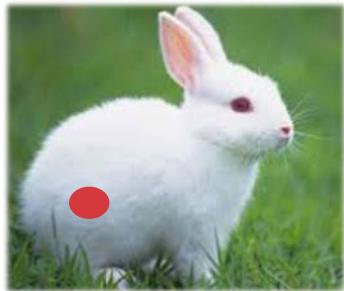
種類	植入期間 (週)				
	1	3	4	9	12
小鼠	○	○	-	○	-
大鼠	○	-	○	-	○
天竺鼠	○	-	○	-	○
兔子	○	-	○	-	○

長期試驗

皮下組織、肌肉和骨組織長期植入期間之選擇

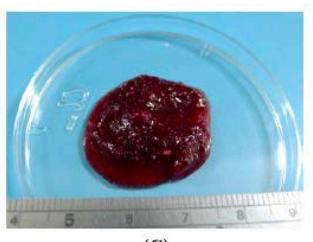
種類	植入期間 (週)				
	12	26	52	78	104
大鼠	○	○	○	-	-
天竺鼠	○	○	○	-	-
兔子	○	○	○	○	-
狗	○	○	○	○	○
山羊	○	○	○	○	○
豬	○	○	○	○	○

■ 骨填補植入試驗



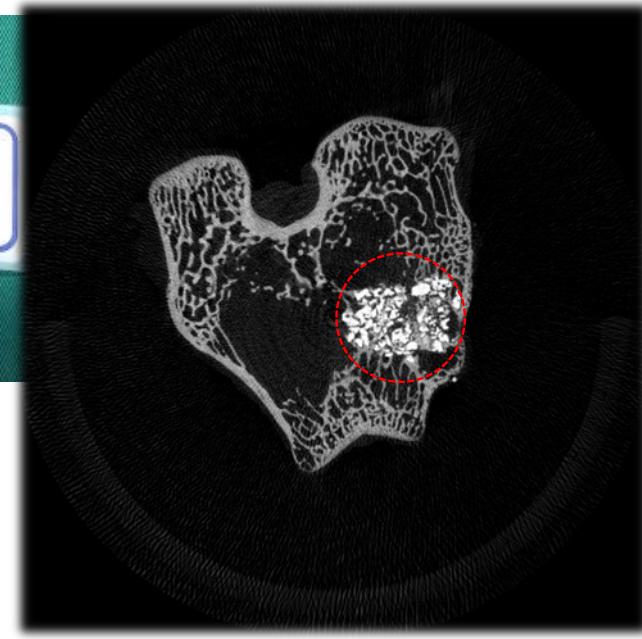
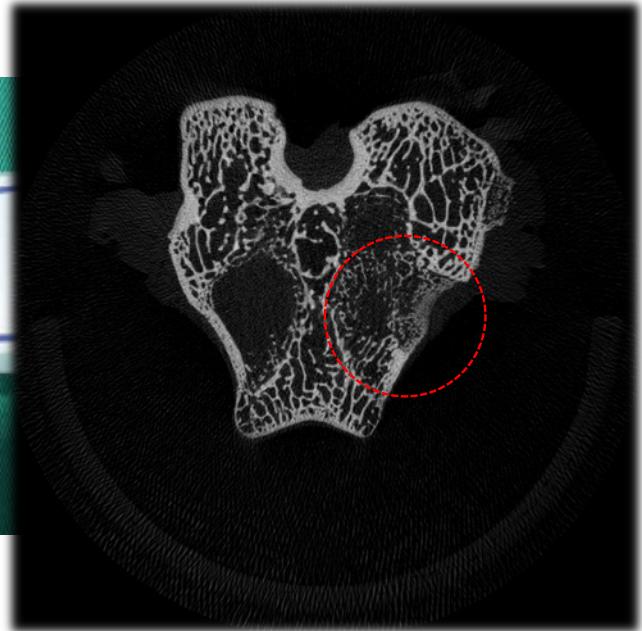
(A)

(B)



(C)

(D)



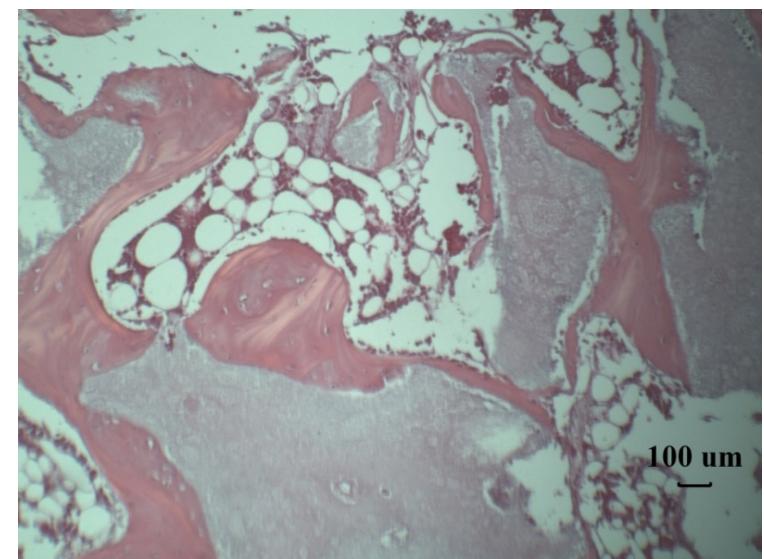
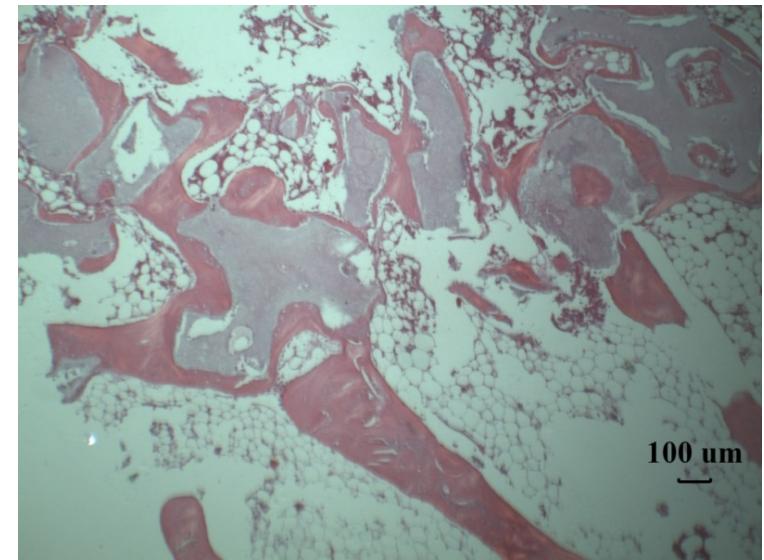
■ 骨填補植入試驗

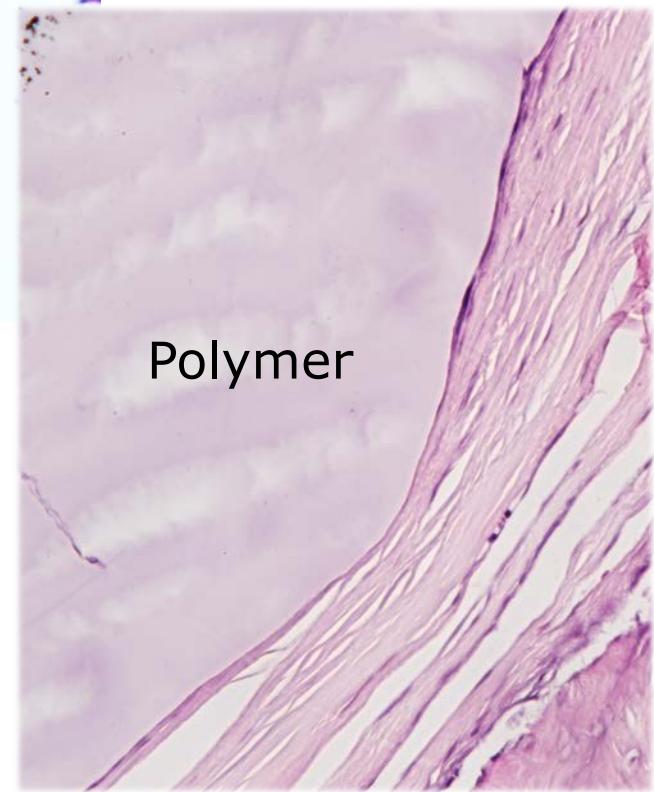
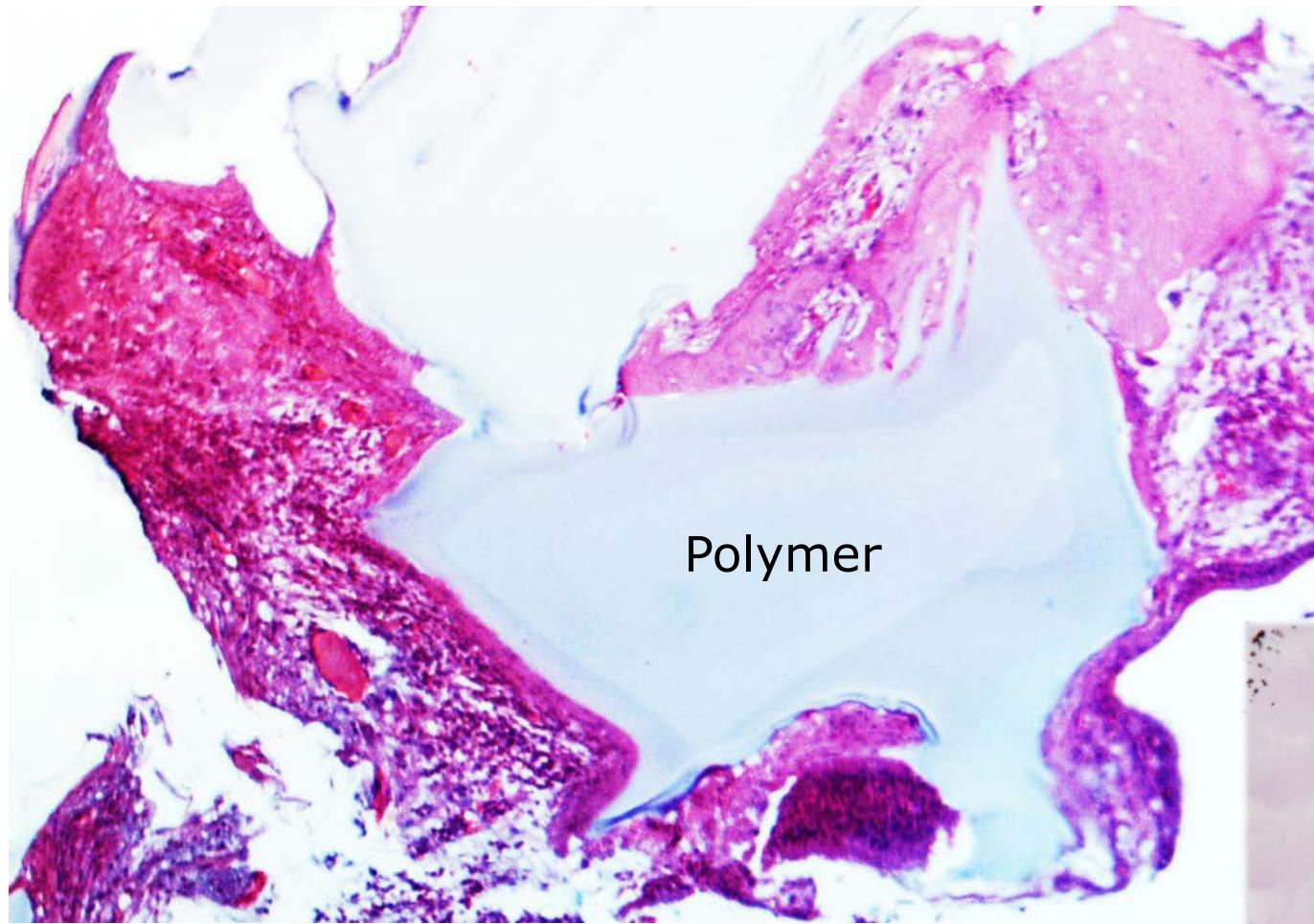
骨新生組織切片染色



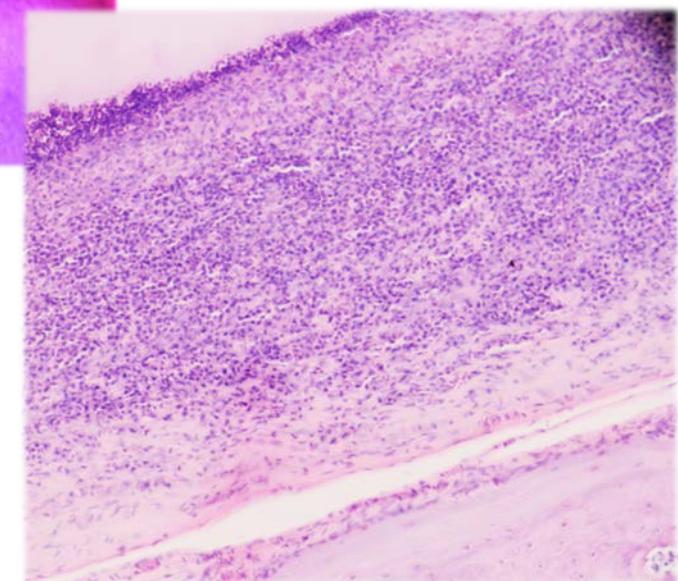
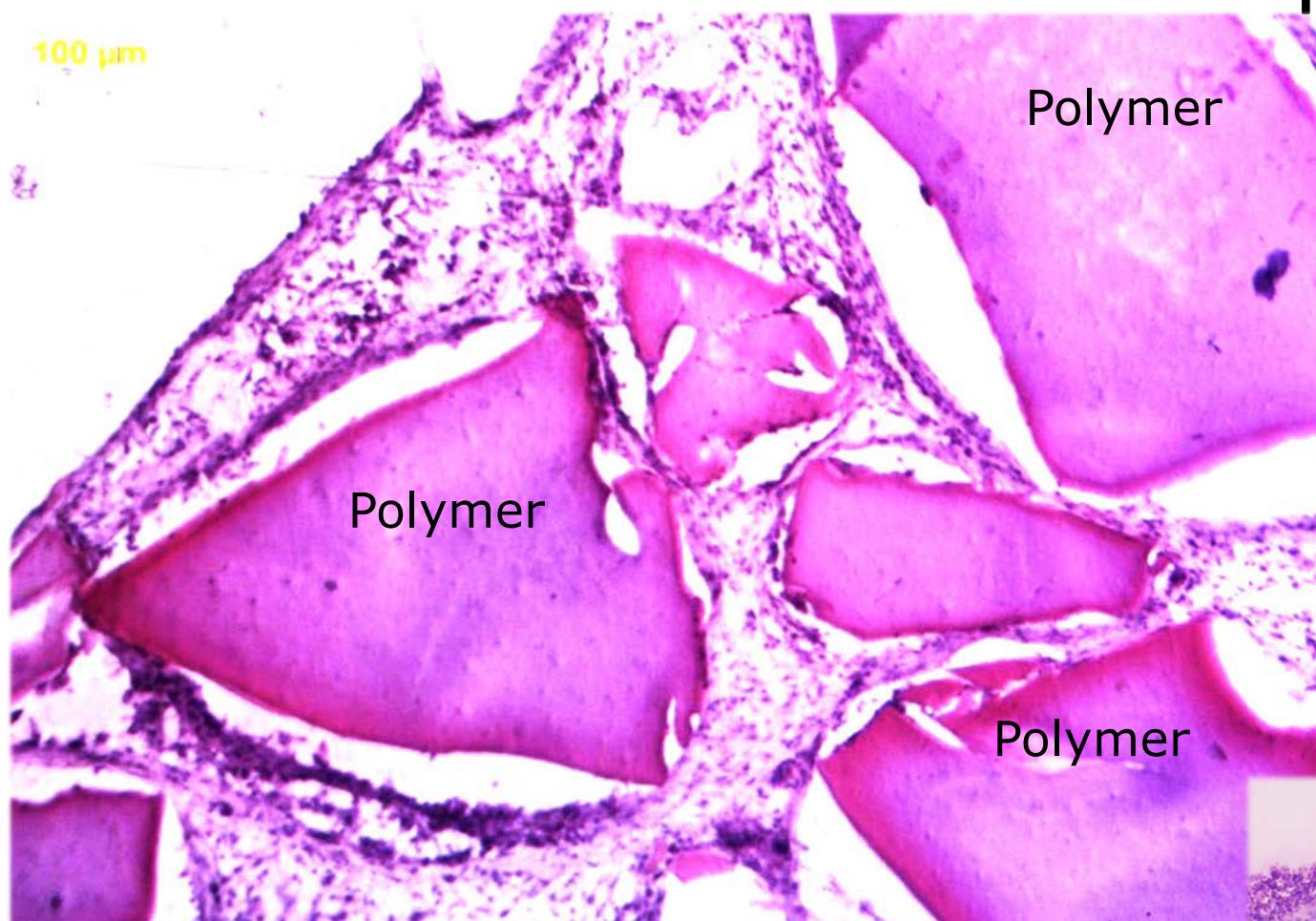
Calcium + PRP (Leg)

3M





Histological changes



系統反應 Systemic Effects

ISO10993-11

ISO 10993-11 Tests for
systemic toxicity

■ 全身毒性試驗

- 所有與血液直接或間接接觸的器械，都要進行急性全身毒性評價
- 所有與血液接觸超過30天的器械，接觸黏膜或損傷表面的時間超過30天的表面器械，都要進行亞急性、毒性，和(或)亞慢性毒性評估。
- 所有與血液接觸超過30天的器械，植入組織或骨超過30天的植入器械，應進行慢性毒性評估。

- 全身毒性試驗中的急性全身毒性試驗和熱源試驗在許多國家已有規範的標準方法，試驗方法和結果判定基本一致。
- 亞急性毒性、亞慢性毒性和慢性毒性試驗，目前尚無統一的標準，各國對同一試驗的要求也有所不同。

系統反應 Systemic Effects

ISO10993-11

■ 全身毒性試驗

ISO 10993-11 Tests for
systemic toxicity

依醫材使用時間長短

- 急性毒性 (acute toxicity) : < 24 hours
- 亞急(subacute) : 14-28 days
- 亞慢性毒性 (subacute/subchronicotoxicity) :
up to 90 days
- 慢性毒性 (chronic toxicity) : > 90 days

評估項目：

體重、攝食量、臨床症狀、死亡率、...

依投予方式不同

- 口服 (oral)
- 皮膚(dermal)
- 口鼻吸入(inhalation)
- 靜脈注射(intravenous)
- 腹腔注射(intraperitoneal)

系統反應 Systemic Effects

ISO10993-11

■ 全身毒性試驗

動物毒理測試常規觀察之臨床症狀

觀察項目	內容
死亡	發現死亡、瀕死犧牲、計畫性犧牲、意外死亡、死後變化
外觀	蒼白、皮毛粗鈍，豎毛，紅斑、水腫、脫水、身體曲弓
眼睛	突眼、流淚、瞳孔放大/縮小、眼瞼下垂
口鼻	流涎、鼻分泌物
糞尿	下痢、排尿失禁
呼吸	呼吸急迫、呼吸困難、咳血、發鉗、肺囉音
中樞神經	昏眩、過度敏感、遲鈍、後弓反張、俯臥、側臥、驚嚇等反射動作
行為/活動	活動增加/減少、疲軟、僵直、震顫、抽蓄、共濟失調、麻痺、痙攣
循環系統	出血

.....依產品登記要求....

系統反應 Systemic Effects

ISO10993-11

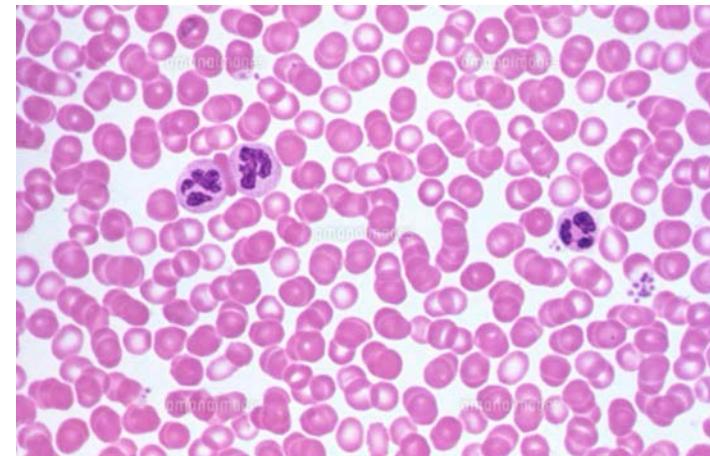
■ 全身毒性試驗

血液/組織病理分析

動物麻醉 → 採血 → 安樂死 → 解剖 → 組織採樣

血液分析：

- 血球含量分析
- 血清生化分析
- 血液凝固分析檢驗



組織病理檢查

- 器官組織目視檢查
- 組織切片處理
- 切片染色
- 顯微鏡觀察

基因毒性

Genotoxicity

ISO10993-3

■ 基因毒性

ISO 10993-3 Tests for **genotoxicity**, carcinogenicity and reproductive toxicity

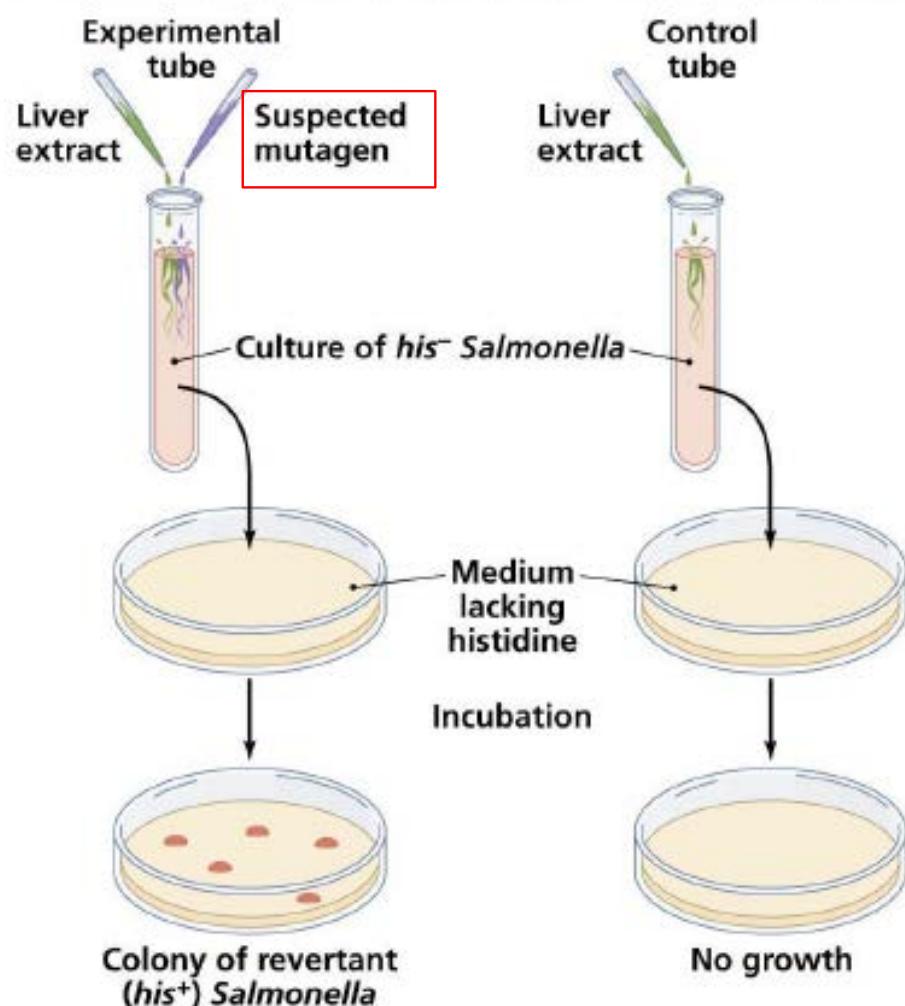
運用哺乳動物或非哺乳類**細胞培養**或其他技術，來測定由器材、材料或其萃取物引起的**基因突變**、**染色體變化**與**數目變化**、以及其他DNA或基因毒性。

- 安氏試驗或沙門氏菌逆突變試驗
In vitro Ames test
- 染色體變異試驗
In vitro Chromosomal aberration
- 鬃鼠淋巴瘤細胞TK分析
In vitro Mouse lymphoma
- 微核或小核試驗
In vivo micronucleus

若結果有產生細胞遺傳基因突然變異、或染色體異常的陽性物質，則為**變異原性物質(mutagenic substance或mutagen)**，**可能需要增做致癌性試驗(carcinogenicity)**

Ames Test (安氏試驗)

Gene Mutation test: Ames Test

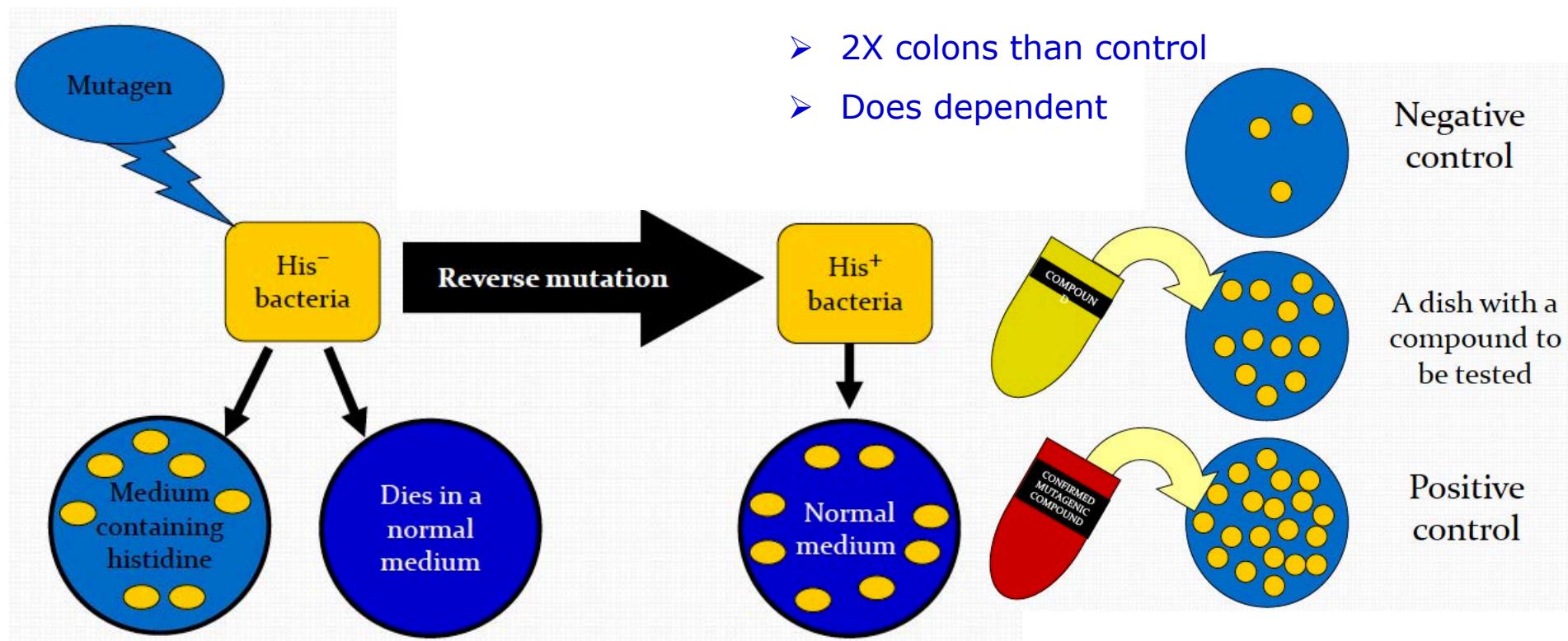


Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- The Ames bacterial reverse mutation assay is most commonly used to detect gene mutations and utilizes **histidine-dependent *Salmonella typhimurium*** strains as the test organisms.
- Rat liver extract are incorporated into a portion of the test organisms to simulate whole-animal exposure.
- Following **exposure to the fluid extract from the test material**, the organisms are plated in triplicate on to **histidine –free growth nutrient agar** and incubated for a specified period.
- The colonies are then enumerated and these data are compared to counts obtained for negative control conditions.
- Since the **unreverted test strains will not grow without histidine**, any further growth indicates that exposure to a genotoxic agent has caused **point mutations that have produced bacterial strains that no longer require histidine**.

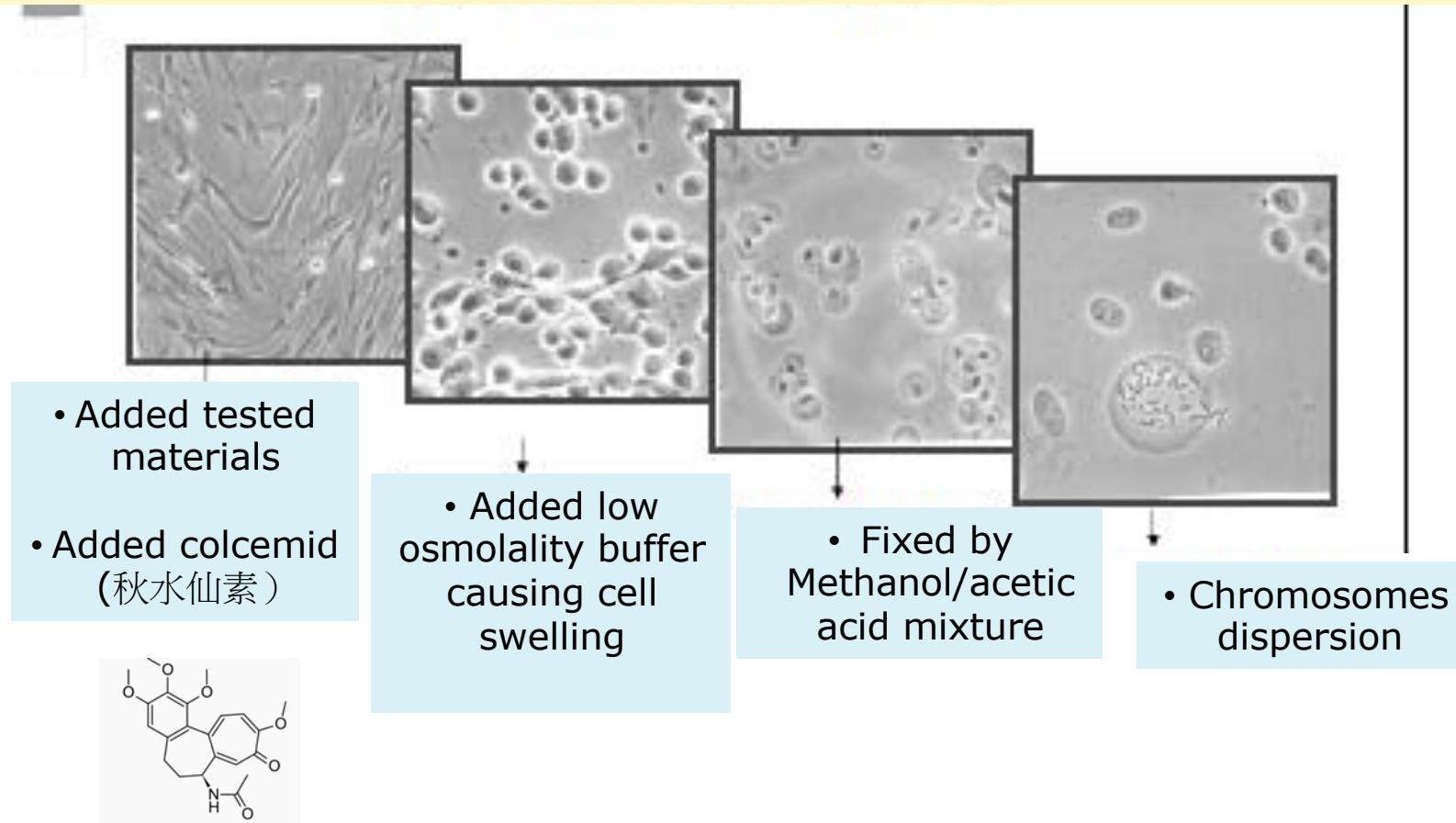
Ames Test (安氏試驗)

- Test system – auxotrophic strain of *Salmonella typhimurium*–
 - survives only in medium with histidine
(dies in normal medium without histidine)
- After treatment with mutagen, some auxotrophic cells are turned into normal ones that synthesize histidine and survive in a normal medium.
- These cells are called revertant (due to reverse mutation).

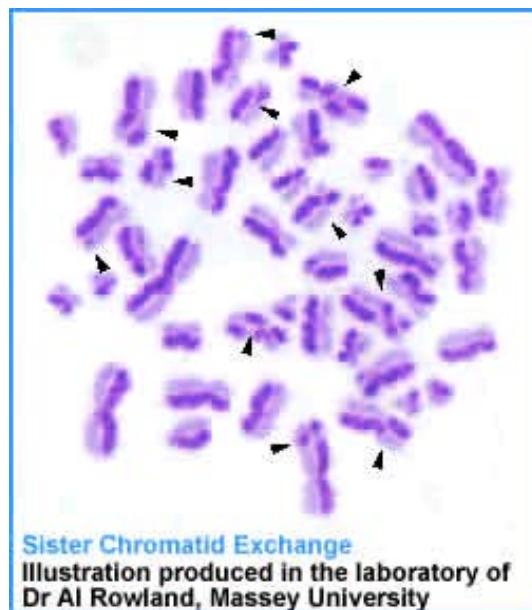


Chromosomal aberration test (染色體變異試驗)

This test detect **chromosomal damage** induced after one cellular division; **structural changes in the chromosomes** are evaluated while cells are in the meta phase stage of division. The *in vitro* model employs **Chinese hamster ovary (CHO) cells**. Gaps, breaks, and exchanges are other examples of observable aberrations.

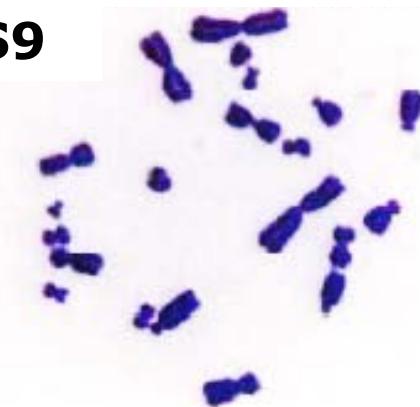


■ 基因毒性

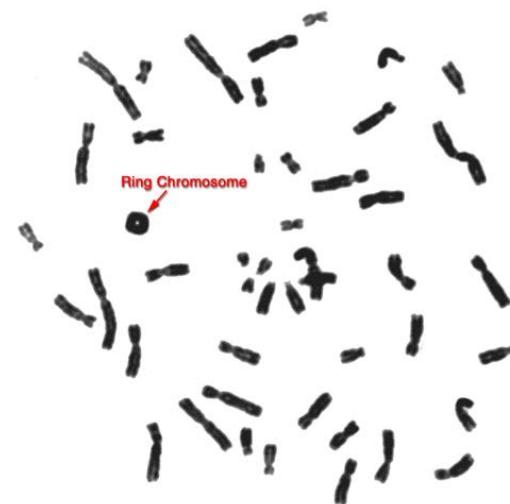
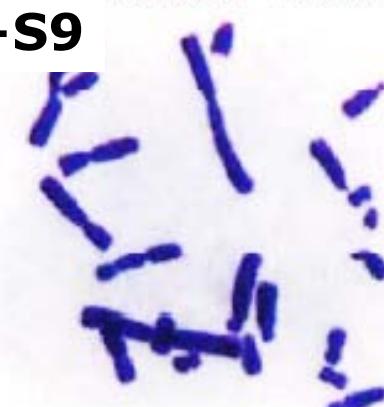


[http://imbs.massey.ac.nz/images/
al_Sce.jpg](http://imbs.massey.ac.nz/images/al_Sce.jpg)

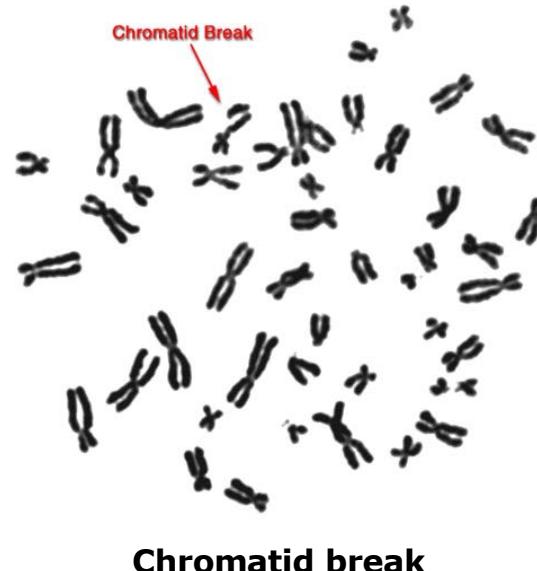
Negative Control
+S9



Negative Control
+S9



Ring Chromosome



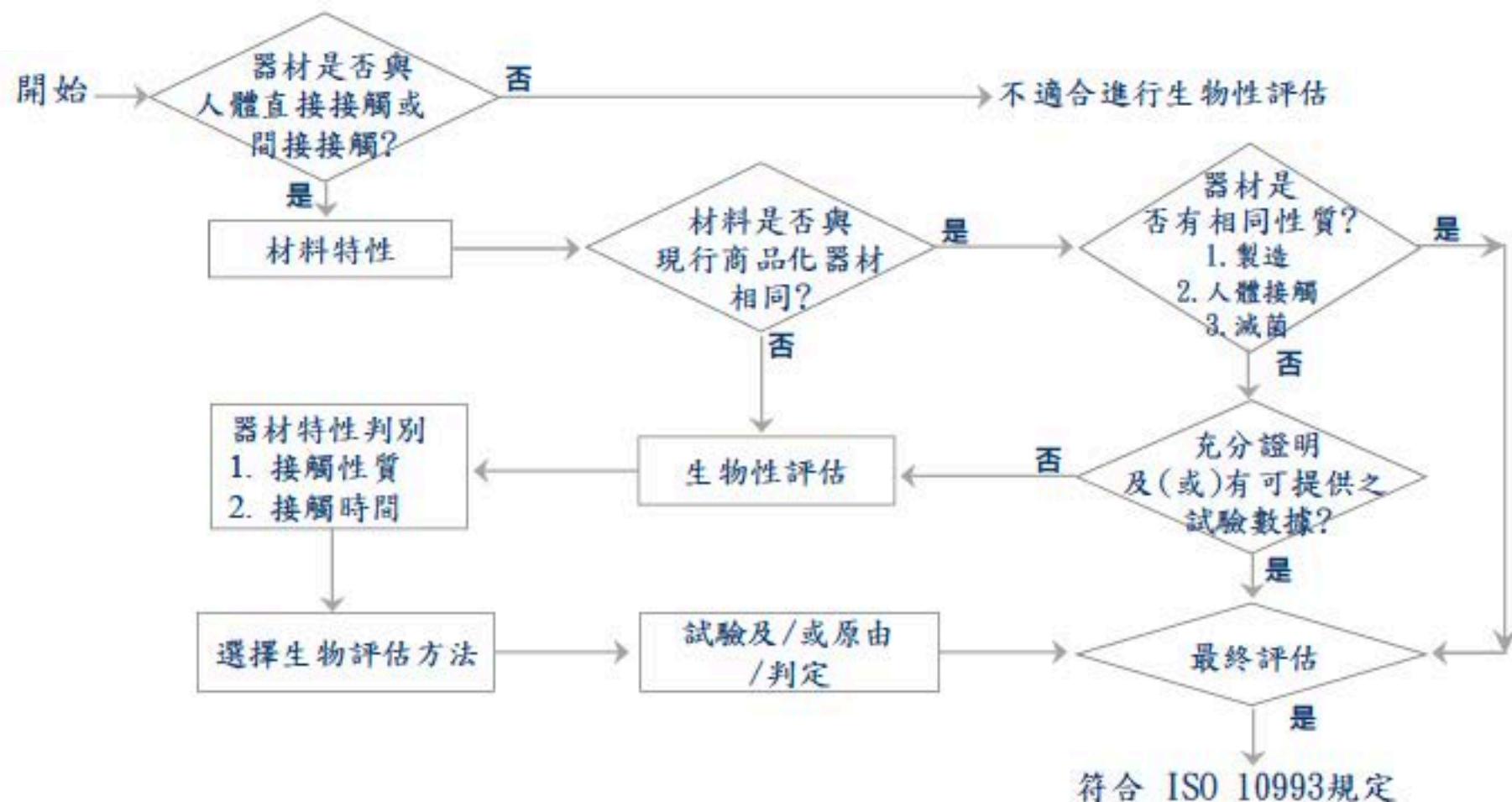
Chromatid break



Dicentric

生物相容性測試

ISO 10993-1 提供一評估指引，供醫療器材製造商選擇生物評估試驗時，利用此標準規範之評估表，以考量材料、加工輔助物質以及過往使用紀錄的所有訊息，以降低額外試驗的必要性。



Ref: 陳佳君, "醫療器材生物相容性與安全性考量", 2015 生醫產業商品化人才培訓課程)

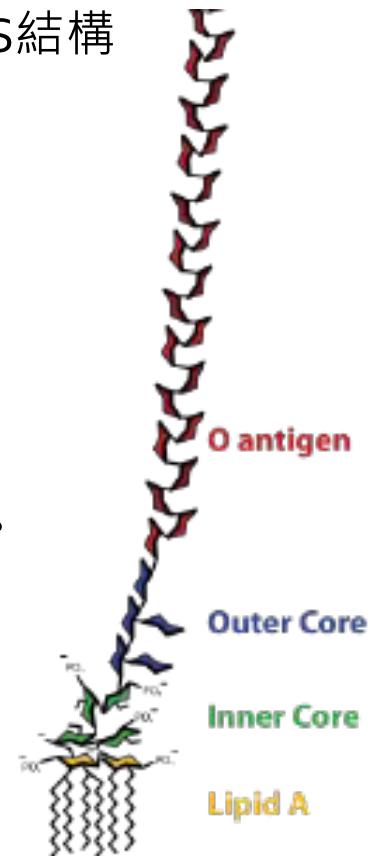
常規試驗項目

試驗項目	試驗內容
細胞毒性試驗 - MEM elution method	依據ISO10993-5 使用細胞培養技術，測試由醫療器材或其萃取物引起之細胞死亡、抑制細胞生長及其它效應。利用 L929 纖維母細胞檢測樣品。
血液相容性試驗 - 溶血試驗	依據ISO10993-4、ASTM，在體外測試醫療器材或其萃取物，對紅血球細胞破裂及血紅素的釋放程度。
致敏性試驗 - 天竺鼠極大化過敏性試驗 - 天竺鼠封閉敷貼過敏性試驗	依據ISO10993-10，以天竺鼠為受試動物，評估醫療器材或其萃取物所引發之接觸性過敏或致敏性反應。
刺激性試驗 - 兔子皮膚刺激性試驗 - 兔子眼睛刺激性試驗	依據ISO10993-10，以紐西蘭白兔為受試動物，依據樣品使用之方式，選擇合適的測試途徑(皮膚、眼睛、黏膜等)，測定醫療器材或其萃取物之刺激性。
皮內刺激性反應 - 兔子皮內刺激性試驗	依據ISO10993-10，以紐西蘭白兔為受試動物，以皮下注入醫療器材或其萃取物，藉由量測紅斑及其他皮膚反應，評估主要的組織對器材的刺激效應。
急性系統性毒性試驗 - 急性系統性毒性試驗	依據ISO10993-11，藉由受試動物單次短期接觸醫療器材或其萃取物，評估其潛在危害效應。
重複劑量亞急性/亞慢性試驗 - 亞急/亞慢性試驗	依據ISO10993-11，藉由受試動物重複接觸醫療器材或其萃取物(14天~90天)，評估其潛在危害效應。
慢性毒性試驗 - 慢性毒性試驗	依據ISO10993-11，藉由受試動物長期重複接觸醫療器材或其萃取物(>6個月)，評估其潛在危害效應。
熱原試驗 - 兔子熱原試驗 - LAL Test	依據USP<151>，熱原試驗反應可測試由材料及細菌內毒素引起之熱原反應。評估醫療器材或其萃取物注射於紐西蘭白兔體內後，受試動物體溫之變異，或以LAL test內毒素試驗進行評估。
基因毒性試驗 - 沙門氏桿菌回覆突變測試 - 染色體變異試驗 - 嘴齒類動物周邊血液微核分析 - 小鼠淋巴細胞瘤TK試驗	依據ISO10993-3，以沙門氏桿菌或哺乳類細胞培養等技術，評估醫療器材或其萃取物造成基因突變性、染色體結構與數目之改變，與其他DNA或基因毒性等。
植入試驗 - 肌肉植入 - 皮下植入 - 骨頭植入	依據ISO10993-6，考量適當植入位置及測試時間，將原料或成品植入適當部位或擬應用之組織部位開刀植入材料或成品的樣品，以評估其局部活體組織之病理學效應，包含整體及顯微層面的局部組織病理效應。

熱原(Pyrogen)測試

LPS結構

- 細菌內毒素(Bacterial Endotoxin)
- 內毒素主要來自革蘭氏陰性菌(Gram-Negative)細胞壁外層中的一種複合物，在細菌分裂或是死亡的過程中會被釋放出來。
- 而其主要的成分為**脂多醣(LPS, Lipopolysaccharide)**，而Lipid A的結構為主要的毒性原因，
- 若被釋放到體內會引起致熱反應或敗血性休克，嚴重更有可能引發瀰漫性血管內凝結(DIC, Disseminated Intravascular Coagulation)。
- 內毒素具有高度的熱穩定性，若要去除其活性，在藥典法規中建議進行30~45分鐘250°C以上的乾熱處理進行去熱原(Depyrogenation)。



LAL (Limulus Amebocyte Lysate)試劑

鱉魚血液中的阿米巴變形細胞水性抽提液備製而成的生物檢測試劑，



單核球活化試檢法 (Monocyte Activation Test, MAT)

- 係用於檢測或定量可活化人單核球(monocytes) ，促使其釋放內源性介質 (endogenous mediators) 之成份的試驗法。
- 前述內源性介質包含；腫瘤壞死因子TNF - α (tumor necrosis factor α) 、介白素 - 1β (interleukin-1 beta, IL-1β) 、介白素IL - 6 (interleukin-6, IL-6) 等在發燒致病機轉中扮演重要角色之促炎症細胞激素 (pro-inflammation cytokines)。本法可偵測樣品中是否存在熱原(pyrogens) ，並在經過產品專一性確效後，用以取代家兔熱原試檢 (rabbit pyrogen test)
 1. 人肝素化周邊血(human heparinised peripheral blood), 取出後最好不超過4小時，適當以培養基或生理食鹽水稀釋至2-50%v/v (最終濃度) 。
 2. 含單核球之成分血(blood fractions) ，如以密度梯度離心 (density-gradient centrifugation) 分離之人周邊上單核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 。
 3. 人單核細胞株(monocyte cell line) 。

細胞培養後，以適當方法 (如ELISA法) 測定選定之測試標的 (促發炎反應或致發熱反應之細胞激素，如IL-1β) ，並取樣品與內毒素‘當標準品’或與對照批次之試驗結果做比對及判定。上述測定法慮以適當標準品進行校正及驗證。

**Thank you for your
attention**