

## 目 次

	ページ
序文	1
1 適用範囲	1
2 引用規格	2
3 用語及び定義	2
4 医療機器のカテゴリ分類	3
4.1 接触形態によるカテゴリ分類	3
4.2 接触期間によるカテゴリ分類	4
5 生物学的評価プロセス	4
5.1 一般	4
5.2 試験の選択及び結果の全体評価	5
5.3 試験方法の選択	5
5.4 試験の種類	5
5.5 生体適合性の再評価	6
6 歯科材料のための試験手順	6
6.1 試料調製のための推奨事項	6
6.2 寒天拡散試験	8
6.3 フィルタ拡散試験	10
6.4 歯髄・象牙質使用模擬試験	13
6.5 覆髄試験	19
6.6 根管充填使用模擬試験	22
附属書 A (参考) 歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮する試験の種類	26
附属書 B (参考) 象牙質バリア細胞毒性試験	28
附属書 C (参考) 歯科用骨内インプラント使用模擬試験	35
参考文献	39
附属書 JA (参考) JIS と対応国際規格との対比表	42

## まえがき

この規格は、産業標準化法第 16 条において準用する同法第 12 条第 1 項の規定に基づき、日本歯科材料工業協同組合（JDMA）及び一般財団法人日本規格協会（JSA）から、産業標準原案を添えて日本産業規格を改正すべきとの申出があり、日本産業標準調査会の審議を経て、厚生労働大臣が改正した日本産業規格である。これによって、**JIS T 6001:2016** は改正され、この規格に置き換えられた。

なお、この規格の改正公示日から 3 年間は **JIS T 6001:2016** を適用してもよい。

この規格は、著作権法で保護対象となっている著作物である。

この規格の一部が、特許権、出願公開後の特許出願又は実用新案権に抵触する可能性があることに注意を喚起する。厚生労働大臣及び日本産業標準調査会は、このような特許権、出願公開後の特許出願及び実用新案権に関わる確認について、責任はもたない。

## 歯科用医療機器の生体適合性の評価

## Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry

## 序文

この規格は、2018年に第3版として発行されたISO 7405を基とし、技術的内容を変更して作成した日本産業規格である。

なお、この規格で点線の下線を施してある箇所は、対応国際規格を変更している事項である。変更の一覧表にその説明を付けて、**附属書 JA**に示す。

この規格は、歯科用医療機器（歯科材料を含む。）の生体適合性について規定している。また、この規格は、**JIS T 0993-1**及び**ISO 10993**規格群と併せて用いる。また、この規格は、歯科において適用されてきた実績をもち、歯科用医療機器に固有の特殊性を踏まえた特徴ある試験で、十分にデータが公表されているとみなされるものについて実施方法の詳細を含む。

さらに、試験方法を推奨するに当たって、動物の使用数及び暴露を最小限にすることを優先した。他の試験では要求する評価の結果が得られないという証拠を十分慎重に検討した後に、初めて動物を使う試験の実施を決定する。試験に要する個体数及び処置の回数を最小限にするために、複数の試験（例えば、歯髄・象牙質使用模擬試験及び覆髄試験）を同じ個体に同時に行う場合がある。いかなる場合も、**ISO 10993-2**に従い、これらの試験を効率的かつ人道的な方法で実行する。動物実験を実施する場合は、常に細やかな心遣いをもって行い、各試験の記載に従って規定された手順に従い実施する。

なお、医療機器の使用に伴うリスクに関する試験方法については、詳細に記載していない。

**附属書 A**は、歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮するエンドポイント（評価の項目）を示している。

**附属書 B**は、歯科用医療機器の生体適合性の評価において、動物の使用を更に少なくするインビトロ及びエクスピボ（*ex vivo*）試験方法の開発を奨励するための情報を提供するものである。

**附属書 C**は、技術仕様書である**ISO/TS 22911**に代わるものである。

## 1 適用範囲

この規格は、歯科用医療機器の生物学的影響を評価する試験方法について規定する。この規格は、試験する医療機器の構成要素となっている薬理学的作用をもつ物質の試験も含む。この規格は、患者の身体に直接的にも間接的にも接触しない材料及び機器には適用しない。

**注記** この規格の対応国際規格及びその対応の程度を表す記号を、次に示す。

ISO 7405:2018, Dentistry—Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (MOD)

なお、対応の程度を表す記号“MOD”は、**ISO/IEC Guide 21-1**に基づき、“修正している”ことを示す。

## 2 引用規格

次に掲げる規格は、この規格に引用されることによって、この規格の規定の一部を構成する。これらの引用規格のうちで、西暦年を付記してあるものは、記載の年の版を適用し、その後の改正版（追補を含む。）は適用しない。西暦年の付記がない引用規格は、その最新版（追補を含む。）を適用する。

**JIS R 6010** 研磨布紙用研磨材の粒度

**注記** 対応国際規格：ISO 6344-1, Coated abrasives—Grain size analysis—Part 1: Grain size distribution test

**JIS T 0993-1** 医療機器の生物学的評価—第1部：リスクマネジメントプロセスにおける評価及び試験

**注記** 対応国際規格：ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process

**JIS T 14971** 医療機器—リスクマネジメントの医療機器への適用

**注記** 対応国際規格：ISO 14971, Medical devices—Application of risk management to medical devices

**ISO 1942**, Dentistry—Vocabulary

**ISO 10993-2**, Biological evaluation of medical devices—Part 2: Animal welfare requirements

**ISO 10993-3**, Biological evaluation of medical devices—Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity

**ISO 10993-5**, Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

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

**ISO 10993-10**, Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and skin sensitization

**ISO 10993-11**, Biological evaluation of medical devices—Part 11: Tests for systemic toxicity

**ISO 10993-12:2012**, Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials

**ISO 10993-18**, Biological evaluation of medical devices—Part 18: Chemical characterization of materials

**ISO/TS 10993-19**, Biological evaluation of medical devices—Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials

**ISO 16443**, Dentistry—Vocabulary for dental implants systems and related procedure

## 3 用語及び定義

この規格で用いる主な用語の定義は、**JIS T 0993-1**、**ISO 10993-12:2012**、**ISO 1942** 及び **ISO 16443** によるほか、次による。

### 3.1

**歯科材料** (dental material)

歯科診療及び／又はその関連処置で用いるために、特別に配合、製造された材料及び／又は物質若しくはそれらの組合せ。

### 3.2

**最終製品** (final product)

包装及び該当する場合は、滅菌を含めて“販売される状態”にある医療機器に関する全ての製造工程を終え、さらに、該当する場合は、混合、前処理及び調製のように意図する用途の前の工程を終えた医療機器又は医療機器の構成部材。

### 3.3

#### 陽性対照材料 (positive control material)

規定する手順によって試験したとき、再現性のある適切な陽性又は活性反応を試験系に生じて、その手順の妥当性を示す、十分に特性が明らかな材料及び／又は物質。

### 3.4

#### 陰性対照材料 (negative control material)

規定する手順によって試験したとき、再現性のある適切な陰性若しくは不活性反応、又は最小限の反応を試験系に生じて、その手順の妥当性を示す、十分に特性が明らかな材料及び／又は物質。

**注記** 実際には、ブランク、媒体・溶媒及び標準材料 (3.5 参照) が陰性対照材料に含まれる。

### 3.5

#### 標準材料 (reference material)

機器の校正、測定方法の評価又は材料の評価値の決定のための材料及び／又は物質として用いるものであって、十分に再現性のある確立された一つ以上の特性値を示すもの。

**注記** この規格では、標準材料は、規定した手順で試験したとき、再現性のある予見できる反応を生じて、その手順の妥当性を示す、十分に特性が明らかな材料及び／又は物質である。その反応は、陰性又は陽性の場合がある。

### 3.6

#### インビトロ歯髓くう (腔) (in vitro pulp chamber)

二つのチャンバ間に象牙質の薄切片 (以下、象牙質スライスという。) からなる仕切りをもち、流体及び分子がその象牙質の障壁 (以下、象牙質バリアという。) を通過し、ろ過又は拡散が可能な装置。

### 3.7

#### 拡散 (diffusion)

“象牙質バリア” を隔てた濃度勾配による、溶質 (可溶成分) の受動的な移動。

## 4 医療機器のカテゴリ分類

### 4.1 接触形態によるカテゴリ分類

#### 4.1.1 一般

この規格の目的上、歯科用医療機器のカテゴリは JIS T 0993-1 に由来する。ある機器又は材料が二つ以上のカテゴリに属し得る場合には、より厳しい試験要件となるものを適用しなければならない。身体との接触が多数回生じる場合に、どのカテゴリに当てはめるかを決めるときには、身体との接触が生じる期間に留意して、潜在的な累積効果を考慮しなければならない。

**注記** この規格において、“歯科” という用語には、口くう (腔) 顎顔面領域が含まれる。

#### 4.1.2 非接触機器

非接触機器は、患者の身体に直接的又は間接的に接触することはなく、この規格及び JIS T 0993-1 の適用外である。

#### 4.1.3 表面接触機器

表面接触機器とは、健全又は損傷皮膚の表面に接触するもの、健全又は損傷口くう (腔) 粘膜の表面に接触するもの、及び歯の硬組織 (エナメル質、象牙質及びセメント質) の外表面に接触するものをいう。

**注記** 象牙質及びセメント質は、表面と考えられる場合がある (例えば、歯肉の退縮後の歯根露出面)。

#### 4.1.4 体内と体外とを連結する機器

体内と体外とを連結する機器とは、口くう（腔）粘膜、歯の硬組織、歯髄組織若しくは骨、又はこれらの複合組織を貫通して接触するもので、その一部が口くう（腔）環境にさら（曝）されているものをいう。

**注記** 修復物の下に用いるあらゆる種類の裏装材及び裏層材もこのカテゴリに含まれる。

#### 4.1.5 歯科用体内植込み機器

歯科用体内植込み機器は、次のうちの一つ以上に、部分的に又は完全に埋め込む、歯科用インプラント及びその他の歯科用体内植込み機器をいう。

- a) 軟組織（例えば、骨膜下インプラント、皮下インプラント）
- b) 骨 [例えば、骨内インプラント、骨（代替）補填材]
- c) 歯髄象牙質系（pulpodentinal system）（例えば、歯内療法用材料）
- d) これらの組合せ（例えば、骨貫通インプラント）

### 4.2 接触期間によるカテゴリ分類

#### 4.2.1 一般

この規格の目的上、歯科用医療機器を **JIS T 0993-1** 及び **4.2.2～4.2.4** に規定しているように、接触期間によって分類する。

#### 4.2.2 一時的接触機器

単回又は複数回使用され、その累積接触期間が、24時間以内の医療機器。

#### 4.2.3 短・中期的接触機器

単回又は複数回使用され、その累積接触期間が、24時間を超え30日以内の医療機器。

#### 4.2.4 長期的接触機器

単回又は複数回使用され、その累積接触期間が、30日を超える医療機器。

## 5 生物学的評価プロセス

### 5.1 一般

それぞれの歯科用医療機器は、リスクマネジメントプロセスの実施の中で、体系化された生物学的な評価プログラムによる評価を受けなければならない（**JIS T 0993-1** を参照）。このプログラムの実施については、**JIS T 14971** 及び **JIS T 0993-1** に規定されている指針を使用する。

生物学的な評価プログラムには、各々の機器の生物学的性質についてのデータセットが十分そろっているかの精査を含めなければならない。生物学的な評価プログラムでのデータセットの精査で、一つ以上のデータセットが不完全で、更に試験が必要であることが示された場合には、**JIS T 0993-1**、及び **ISO 10993** 規格群若しくはこの規格又はそれらの両方に規定している方法の中から、試験を選択する。これらの規格に含まれていない試験を選択する場合には、それらの規格に規定している試験の適用を考慮したことを示すと同時に、その他の試験を選択したことが妥当である理由を記載しなければならない。

組合せ製品については、適用し得るその他の規格と併せて、この規格によって最終製品を評価する。

**注記 1** この規格では、“組合せ製品”（combination products）とは、次の特性をもつ物質を組み込んでいる、又は組み込むことを意図したあらゆる種類の機器をいう。

- a) 個別に使用する場合には、医薬品又は生物学的製剤である。
- b) 補助的作用によって、患者の身体に影響する。

一例としては、成長因子（すなわち、生物学的製剤）を含有する骨補填材及び骨造成材が該当する。

組合せ製品については、機器コンポーネントと薬理的コンポーネントとが別々に包装されている場合、

機器コンポーネントだけの試験結果は、参考情報になる場合がある。

全ての試験は、適用可能であれば、一般的に認定された、現時点で有効な最善の試験実施基準又は品質保証基準に従って実施されなければならない。

**注記 2** 関連する手引書の例として、優良試験所規範（Good Laboratory Practice）又は **ISO/IEC 17025** がある。

## 5.2 試験の選択及び結果の全体評価

試験の選択及び結果の全体評価は、その医療機器について適切な化学的、物理学的及び生物学的データに精通し、使用条件を熟知している専門家が行わなければならない。

## 5.3 試験方法の選択

試験方法を選択するときは、次のことを考慮しなければならない。

- a) 医療機器の意図する用途
- b) 医療機器が接触する可能性のある生体組織（複数を含む。）
- c) 接触期間

選択する試験方法が規格などに規定されていない場合には、その試験方法の選択が妥当であることを、個々の医療機器についての報告書に記載しなければならない。また、同じカテゴリの中で複数の試験方法が推奨されている場合には、選択する試験方法が妥当である理由を示さなければならない。

## 5.4 試験の種類

### 5.4.1 一般

歯科用医療機器のカテゴリによって、**表 A.1** に示す試験を適用することを考えなければならない。**表 A.1** は、いずれの種類の試験方法を用いるかを考えるためのものであり、必ずしもその種類の試験方法を用いることを強制するものではない。**表 A.1** に示す種類の試験を行わない場合には、その妥当性を各医療機器の試験報告書に記載する。**表 A.1** に示す試験の種類は、歯科用医療機器の生体適合性に対する評価のための枠組みである。それぞれの種類の試験の大部分について、特定の試験方法を規定しているが、一部の医療機器については、**表 A.1** に示す以外の方法が適切な場合もある。

### 5.4.2 物理的及び化学的特性評価

医療機器又は構成品の材料特性（**表 A.1** 参照）は、生物学的評価における重要な第一段階である。材料特性の評価を実施する場合、**ISO 10993-18** 及び **ISO/TS 10993-19** に従って実施しなければならない。ナノマテリアルについては、**ISO/TR 10993-22** を参照する。

生物学的試験の種類を便宜上、次の三つのグループに分ける。

### 5.4.3 グループ 1

このグループは、細胞毒性のインビトロ (*in vitro*) 試験からなる。インビトロ細胞毒性試験は、**ISO 10993-5** に規定する一般指針によらなければならない。歯科材料に適する、寒天拡散法及びフィルタ拡散法の詳細な試験プロトコルは、この規格に規定している。インビトロ細胞毒性試験方法は、次による。

- a) 寒天拡散試験（**6.2** 参照）
- b) フィルタ拡散試験（**6.3** 参照）
- c) **ISO 10993-5** によって行う直接接触試験又は抽出液試験
- d) 象牙質バリア細胞毒性試験（**附属書 B** 参照）

**注記 1** 上記の順序は、ある方法が別の方法に優先することを示すものではない。

**注記 2** 対象となる医療機器について、ここに記載する全ての細胞毒性試験を実施しなければならないということではない。

**注記 3** 象牙質バリア細胞毒性試験を適用することが提案され、この方法が**附属書 B**に記載されている。この試験方法について、参照資料が参考文献に記載されている。

#### 5.4.4 グループ 2

このグループは、**ISO 10993** 規格群による試験からなり、それぞれ特定の試験がある。

- a) 急性全身毒性—経口投与 (**ISO 10993-11** による。)
- b) 急性全身毒性—吸入投与 (**ISO 10993-11** による。)
- c) 亜急性及び亜慢性全身毒性—経口投与 (**ISO 10993-11** による。)
- d) 皮膚刺激性及び皮内反応 (**ISO 10993-10** による。)
- e) 遅延性過敏症 (**ISO 10993-10** による。)
- f) 遺伝毒性 (**ISO 10993-3** による。)
- g) 埋植による局所的影響 (**ISO 10993-6** による。)

**注記 1** 規格の最新版を引用できるように、あえて引用規格には発行年を付記していない。該当する箇条及び細分箇条を特定して示すには、発行年を付記して引用する必要がある。したがって、個々の規格を適用する場合には、引用規格中で該当する箇条番号を調べる必要がある。

**ISO 10993-6** によって、石灰化組織を含めて、局所植込み後のインプラント材料を評価するには、通常の脱灰切片に加えて非脱灰切片の検査を行うことを推奨する。

**注記 2** 適切であれば、歯科用骨内インプラントの場合、植込み後の局所の影響については **ISO 10993-6** の代わりに、**附属書 C** を用いて評価される [**5.4.5 d**] 参照]。

#### 5.4.5 グループ 3

このグループは、**JIS T 0993-1** 及び **ISO 10993** 規格群では規定していない、歯科用医療機器に特有の、次の試験からなる。

- a) 歯髄・象牙質使用模擬試験 (pulp and dentine usage test) (**6.4** 参照)
- b) 覆髄試験 (pulp capping test) (**6.5** 参照)
- c) 根管充填使用模擬試験 (endodontic usage test) (**6.6** 参照)
- d) 歯科用骨内インプラント使用模擬試験 (endosseous dental implant usage test) (**附属書 C** 参照)

歯科用骨内インプラント使用模擬試験は要求事項ではないが、実施可能である場合は推奨される。

### 5.5 生体適合性の再評価

成分、品質及び／又は性能仕様の改良又は変更を行うときは、**5.4** に規定しているように、その機器の生体適合性の再評価を行わなければならない。

**注記** 再評価の要否を判断する場合は、**JIS T 0993-1** の **B.4.5.1** (生物学的安全性の再評価が必要となる変更) を参照する。

## 6 歯科材料のための試験手順

### 6.1 試料調製のための推奨事項

#### 6.1.1 一般

この推奨事項は、インビトロ試験のためのものであるが、その他の目的にも用いることが可能である。

#### 6.1.2 試料調製のための一般的な推奨事項

試料調製について、製品規格及び／又は製造販売業者の取扱説明書を参照し、できる限り厳密にその記載に従う。製造販売業者の説明書に従わない場合には、それが妥当である理由を説明する。試料調製については、試験報告書に詳細に記載しなければならない。機器の最終的な用途を考えて、次の因子 (例えば、

環境因子) を考慮する。

- a) **温度**
- b) **湿度**
- c) **露光** 感光性材料の試料は、環境光によって活性化しない条件下で作製する。
- d) **試料作製の材質** 試料作製の材質、及び必要に応じて用いた分離剤が、試料の硬化を妨げないことを確認する。
 

**注記** 試料作製の材質として、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン（以下、PTFE という。）などの半透明又は白のプラスチック材料が適している。
- e) **酸素ばく（曝）露** 硬化中に酸素による重合阻害層が生じる材料については、硬化中は、試料を適切に密閉する。
- f) **滅菌** 必要かつ可能である場合には、無菌条件下で試料を作製するか、又は材料に適する方法で試料を滅菌する。滅菌によって材料が影響を受けないようにする（例えば、滅菌によって材料から物質が溶出しない。）。
- g) **細胞層又は細胞培養培地と試料接触面積との比** 細胞層又は細胞培養培地に対する試料接触表面積の比を記録する。試料の形状及び表面積の選択、並びに用いた細胞層又は細胞培養培地に対する試料接触表面積の比が妥当である理由を説明する。
- h) **抽出液** 抽出液を必要とする場合には、ISO 10993-12:2012 の箇条 10 によって調製する。

#### 6.1.3 光重合型材料のための推奨事項

光重合型材料の最終的な用途を考えて、次の因子を考慮する。

- a) **試料作製の材質** 臨床での使用状態を模擬するために、試料作製に用いる材料の反射率は、象牙質の反射率にできるだけ近いことが望ましい。
 

**注記** 試料作製の材質として、ポリエチレン、PTFE などの半透明又は白のプラスチック材料が適切である。
- b) **光照射** できる限り臨床使用を模擬して、光重合を行う。実際の使用時と同じ重合レベルとなるように、製造販売業者の添付文書に従わなければならない。多くの場合、片面から重合させるが、時には、両面からの重合が必要となる。重合方法は、材料及び／又はプロセスに特有である。完全に重合した試料が試験に必要な場合には、型から取り出した後、試料が均質であることを確かめることが重要である。
 

単一構成の材料の場合、目視したときに、空隙、亀裂及び気泡が存在してはならない。使用した光源について記載する（光強度、照射時間、照射光のスペクトル分布及び光源の種類を記録する。）。光源は、試験する材料に推奨されていること、また、正常に作動することを確認しなければならない。
- c) **酸素の遮断** 光重合中に酸素による重合阻害層を生じる材料については、光重合中、透明な酸素遮蔽材料（例えば、ポリエステルフィルム）で、型の両端を覆う。材料の重合後の表面仕上げを製造販売業者が推奨している場合には、推奨の臨床的手順を用いて、試料表面を研削・研磨する。このような指定がなく、かつ、試験に必要な場合には、透明な酸素遮蔽材料に接して硬化させた後、JIS R 6010 による P2000 の粒度の人造研削材を付着させた耐水研磨紙を用いて、試料の両面を研磨する。

#### 6.1.4 化学的に硬化する材料のための推奨事項

化学的に硬化する材料の最終的な用途を考えて、次の因子を考慮する。

- a) **練和** 試料の作製に当たっては、十分な量の材料を 1 回で、試料の作製ごとに新たに練和する。製造販売業者が指定する場合には、それぞれの製品に指定された方法によって練和しなければならない。

- b) 酸素の遮断** 化学重合中に酸素による重合阻害層を生じる材料については、重合中、酸素遮蔽材料（例えば、ポリエステルフィルム）で、型の両端を覆う。材料の重合後の表面仕上げを製造販売業者が推奨する場合には、推奨の臨床的手順を用いて、試料表面を研削・研磨する。このような指定がなく、かつ、試験に必要な場合は、酸素遮蔽材料に接して硬化させた後、**JIS R 6010** による P2000 の粒度の人造研削材を付着させた耐水研磨紙を用いて、試料の両面を研磨する。

### 6.1.5 陽性対照材料

インビトロ試験、及びある種のインビボ (*in vivo*) 試験（例えば、歯髄・象牙質使用模擬試験）については、試験材料と同じように取り扱い、加工し（例えば、練和後は可塑性を示し、その後硬化する。）、かつ、自由に入手可能な化学物質又は材料からなる標準陽性対照材料を含めることを推奨する。

成形充填材料のインビトロ試験のためのそうした陽性対照材料は、**表 B.1** に記載されている。こうした特定の陽性対照物質の使用は選択肢の一つであり、既に検証済みの経歴をもつ物質、及び毒性について再現性のあるデータをもち、十分評価されたその他の陽性対照物質を代替品として使用することが可能である。

## 6.2 寒天拡散試験

### 6.2.1 目的

この試験は、寒天又はアガロースを通して拡散した後の試験材料の非特異的細胞毒性を検出するためのものである。この試験方法は、寒天又はアガロース中に拡散しない溶出物には適さない。

### 6.2.2 細胞株

入手可能な樹立線維芽細胞株又は上皮細胞株〔例えば、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能である (<http://www.atcc.org> 参照)。〕<sup>1)</sup>を用いる。細胞株の識別番号を報告書に明記する。同等の細胞株で同じ結果が得られることを示すことができる場合には、その細胞株を用いてもよい。必要な場合には、用いた細胞株の説明及び呼称、並びにそれを選択した理由も報告書に明記する。

**注<sup>1)</sup>** この情報は、この規格の使用者の便宜のために提供するものであって、日本産業規格がこれらの細胞株を推奨するものではない。

### 6.2.3 培地、試薬及び器具

選択した細胞株に対して指定された培地を用い、ろ過滅菌する。また、寒天培地を調製するための2倍濃度の培地を用意し、ろ過滅菌する。3%寒天又は3%アガロースのいずれかの溶液を調製し、オートクレーブによって滅菌する。

使用直前に、0.01 mol/L りん酸緩衝生理的塩類溶液〔例えば、ダルベッコのりん酸緩衝塩類溶液<sup>2)</sup>〕で、1%ニュートラルレッド溶液（供給元を記録する。）の原液を100倍に希釈して、生体染色液を調製する。

ニュートラルレッド溶液は、遮光保存する。組織培養用6穴プレート（直径35 mm）又は組織培養に適する呼び径50 mm～100 mmのシャーレを用いる。

**注<sup>2)</sup>** この情報は、この規格の使用者の便宜のために提供するものであって、日本産業規格がこの製品を推奨するものではない。

### 6.2.4 試料調製

**6.1** 及び次によって試料を調製する。材料の抽出液又は材料そのもののいずれかについて、**ISO 10993-5** を手引書として試験を行う。

- a)** 固体材料では、寒天重層又はアガロース重層に十分に接触できるように平らな面をもつ、直径約5 mmの円形試料を調製する。
- b)** 硬化する材料では、内径5 mmで高さ2 mmのリング内に練和直後の材料を注入する。リングの材質

を試験報告書に記載する。練和直後の状態で材料を試験する場合には、材料の注入に先立って寒天又はアガロースの上にリングを置く。種々の硬化時間経過後に試験する場合には、材料の表面がリングの縁と同じ高さになるようにリングに材料を充填し、試験の直前まで温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  及び相対湿度  $(90\pm 10)\%$  で硬化させる。

- c) 液体試料又は抽出液では、寒天又はアガロースの上に置いた直径 5 mm のほうけい酸マイクロガラスフィルタのディスクに、液 0.01 mL を吸収させる。

**注記 1** リングの材質として、不活性な材料であるガラス又は PTFE が適切である。

**注記 2** 適切なディスクは、プレフィルタから作製される。

### 6.2.5 対照材料

陽性対照材料、陰性対照材料及び標準材料を用いる。

### 6.2.6 試験手順

試験手順は、次による。

- a) 細胞を対数増殖期の終わりまで培養する。十分な数のシャーレ中に、適切な量（例えば、100 mm のシャーレに 10 mL）の細胞懸濁液（1 mL 当たり  $2.5\times 10^5$  個の細胞を含んだもの。）をピペットで注入し、体積分率 5 % の二酸化炭素を含む飽和水蒸気の雰囲気中において、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養する。別の細胞培養条件を用いる場合には、それが妥当である理由を説明する。
- b) 滅菌した寒天又はアガロースを湯浴で  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  に加熱した後、 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  まで冷却させる。寒天又はアガロース 1 容を、新たに調製した 2 倍濃度の培地 1 容と混合し、 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  に加温する。各シャーレから液体培地を吸引除去し、使用直前に調製した寒天又はアガロース・液体培地混合液 10 mL で置換する。
- c) 寒天又はアガロース・液体培地混合液を室温で固化させる（約 30 分間）。ニュートラルレッド溶液 10 mL を加えて、暗所に 15 分～20 分保管する。過剰なニュートラルレッド溶液を吸引除去する。
- d) 細胞が損傷するおそれがあるため、ニュートラルレッドが存在するときは、培養物を遮光する。
- e) 適切な数の試験材料及び対照材料を、近接する材料の間に十分な距離（可能な場合には 20 mm 以上）を空けて、各シャーレに静置する。体積分率 5 % の二酸化炭素濃度を含む飽和水蒸気の雰囲気中において、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養する。試験材料ごとに少なくとも例数 4（例えば、一つの試験材料につき、2 枚のシャーレ）で試験する。

### 6.2.7 評価のパラメータ

試験材料及び対照材料の周囲の脱色域を、目盛板付きの倒立顕微鏡を用いて評価し、表 1 及び表 2 に規定する評価基準によって各試料に対する脱色指数及び融解指数を決定する。

表 1—脱色指数及び評価基準

脱色指数	評価基準
0	試験体の周囲又は直下に脱色域が認められない
1	脱色域が試験体の下に限定される
2	脱色域の広がり試験体辺縁から 5 mm 未満
3	脱色域の広がり試験体辺縁から 5 mm 以上 10 mm 以内
4	脱色域の広がり試験体辺縁から 10 mm を超えるが、シャーレ全体には至らない
5	シャーレ全体が脱色される

表 2—融解指数及び評価基準

融解指数	評価基準
0	細胞毒性が認められない
1	脱色域の 20 %未満の細胞融解
2	脱色域の 20 %以上 40 %未満の細胞融解
3	脱色域の 40 %以上 60 %未満の細胞融解
4	脱色域の 60 %以上 80 %以下の細胞融解
5	脱色域の 80 %を超える細胞融解

各試験材料について脱色指数及び融解指数の中央値を求める。試験材料の 4 連の試験体の指数値が 0～3 であり、それらの間で指数の差が 2 を超える場合には、再試験を行う。ただし、指数値に 4 又は 5 が含まれる場合には、再試験の必要はない。

抽出液を試験する場合には、試験材料だけによる指数を得るために、試験材料を含む抽出溶媒の指数中央値から、抽出溶媒だけの指数中央値を差し引く。

陰性対照材料として機能する抽出溶媒に対する指数中央値が 1 を超える場合には、異なる抽出溶媒を用いて再試験を行う。

試験が有効な場合には、通常、陰性対照材料の直下に正常な細胞層が観察されることになる。

### 6.2.8 結果の評価

試験結果の評価は、試験で得られた全ての情報、特に試験群及び対照群の結果の違いを考慮して行う。細胞応答は、少なくとも 4 連の試験による脱色指数及び融解指数の中央値に基づいている。細胞応答は、表 3 によって各パラメータについて別個に等級付けしなければならない。

表 3—細胞応答（脱色指数及び溶解指数を別個に等級付ける）及び細胞毒性の判定

等級	細胞応答	判定
0	0	細胞毒性なし
1	1	軽度の細胞毒性
2	2～3	中程度の細胞毒性
3	4～5	強度の細胞毒性

評価の結果は、試験報告書の中に含める。

細胞培養試験から得られたデータを解釈する場合、この試験システムの限界（すなわち、細胞毒性をもつ材料が本質的に不適切なのではなく、特定の用途ごとにデータを解釈しなければならないこと）に留意する。

### 6.2.9 試験報告書

試験報告書には、採用した全ての手順の記録、得られた全ての結果及び結果の評価に必要なその他のデータを含める。試験材料の調製及び適用の方法の詳細を記録し、材料のロット番号がある場合には、それも同時に含める。

## 6.3 フィルタ拡散試験

### 6.3.1 目的

この試験は、酢酸セルロースフィルタを通して拡散した後の試験材料の非特異的細胞毒性を検出するためのものである。

### 6.3.2 細胞株

入手可能な樹立線維芽細胞株又は上皮細胞株〔例えば、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能である (<http://www.atcc.org> 参照)。〕<sup>1)</sup>を用いる。細胞株の識別番号がある場合にはその番号、用いた細胞株の説明及び呼称、並びにそれを選択した理由を報告書に明記する。

### 6.3.3 培地、試薬及び器具

培地及び重層として用いるための寒天又はアガロースを、6.2.3 によって調製する。こはく酸脱水素酵素染色用又は非特異的加水分解酵素染色用の溶液を調製する。

こはく酸脱水素酵素染色用に、次の原液を調製する。

- a) **こはく酸塩溶液** こはく酸ナトリウム 13.6 g を 0.2 mol/L のりん酸塩緩衝液に加えて 100 mL とし、pH 7.6 に調整する。
- b) **塩化ニトロブルーテトラゾリウム溶液** 塩化ニトロブルーテトラゾリウム 100 mg を 0.2 mol/L のりん酸塩緩衝液に加えて 100 mL とし、pH 7.6 に調整する。
- c) **フェナジンメトスルファート溶液** フェナジンメトスルファート 4 mg を直前に調製した蒸留水に加えて 10 mL とする。

こはく酸塩溶液 1 mL、塩化ニトロブルーテトラゾリウム溶液 9 mL 及びフェナジンメトスルファート溶液 1 mL を混合して染色液を調製する。

非特異的加水分解酵素染色用に、アセトン 1 mL 中にフルオレセイン二酢酸 5 mg を含むフルオレセイン二酢酸の原液を調製する。使用時には、原液 20 µL をりん酸緩衝生理的塩類溶液（例えば、ダルベッコのりん酸緩衝塩類溶液）100 mL に加える。組織培養に適する直径 60 mm のシャーレを用いる。

直径 47 mm、ポアサイズ 0.45 µm の酢酸セルロース及びニトロセルロースの混合エステルからなるフィルタ<sup>3)</sup>を用いる。

**注<sup>3)</sup>** ミリポア HATF04700 は、市場で入手できる適切な製品の例である。この情報は、この規格の使用上の便宜のために提供するものであって、日本産業規格がこの製品を推奨するものではない。

### 6.3.4 試料調製

6.1 及び次によって試料を調製する。材料の抽出液又は材料そのもののいずれかについて、ISO 10993-5 を手引書として試験を行う。

- a) 固体材料では、フィルタに十分に接触できるように平らな面をもつ、直径約 5 mm の円形試料を調製する。試料の質量は、3.5 g 以下でなければならない。
- b) 硬化する材料では、内径 5 mm で高さ 2 mm のリング内に練和直後の材料を注入する。練和直後の状態で材料を試験する場合には、材料の注入に先立ってフィルタの上にリングを置く。種々の硬化時間経過後に試験する場合には、材料の表面がリングの縁と同じ高さになるようにリングに材料を充填し、試験直前まで温度 37 °C ± 2 °C 及び相対湿度 (90 ± 10) % で硬化させる。試料の質量は、3.5 g 以下でなければならない。

**注記 1** リングの材質について、不活性な材料として適しているものには、ガラス又は PTFE がある。

- c) 液体試料又は抽出液では、寒天の上に置いた直径 5 mm のほうけい酸マイクロガラスフィルタのディスクに、液 0.01 mL を吸収させる。

**注記 2** ディスクとして適切なものは、プレフィルタから作製される。

### 6.3.5 対照材料

陽性対照材料，陰性対照材料及び標準材料を用いる。

### 6.3.6 試験手順

試験手順は，次による。

- a) 細胞を対数増殖期の終わりまで培養する。十分な数のシャーレの底に，酢酸セルロースフィルタを置き，細胞懸濁液（1 mL 当たり  $2.5 \times 10^5$  個の細胞を含んだもの。）6 mL を各シャーレ中にピペットで注入する。体積分率 5 % の二酸化炭素を含む飽和湿度の雰囲気中で， $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  で 24 時間培養する。別の細胞培養条件を用いた場合には，それが妥当であることの理由を説明する。
- b) 直前に調製し， $48 \text{ }^\circ\text{C}$  に保った寒天又はアガロース・液体培地混合液（6.2.6 参照）5 mL を十分な数のシャーレの中にピペットで注入し，室温で凝固させる。
- c) 酢酸セルロースフィルタが入っているシャーレから過剰の液体培地を吸引除去し， $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  のりん酸緩衝生理的塩類溶液（例えば，ダルベッコのりん酸緩衝塩類溶液）でフィルタを洗って，細胞の付着面を下に向けて寒天又はアガロースの上に静置する。
- d) 3 個～5 個の試験試料を各シャーレ中のフィルタの上に乗せて，体積分率 5 % の二酸化炭素を含む飽和湿度の雰囲気中で， $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  で更に 2 時間及び 24 時間培養する。試料がフィルタの面と確実に密着していることを確認する。
- e) 2 時間及び 24 時間のばく（曝）露後に，細胞毒性の発現を評価する。各シャーレ中に一つの陽性対照材料及び一つの陰性対照材料を含める。その他に，試験材料を含まない細胞単層だけのフィルタ，及び細胞を含まない試験材料だけのフィルタを対照として用いる。抽出液を試験する場合には，抽出溶媒だけの対照も用いる。各試験材料は，少なくとも例数 4 で試験する。
- f) 培養後に，試料を取り除き，寒天又はアガロースからフィルタを静かに外す。次の方法 A 又は方法 B によって，細胞酵素活性が低下した面積を細胞化学的に評価する。
  - 1) **方法 A** Barka 及び Anderson<sup>[15]</sup>の方法によって，こはく酸脱水素酵素（酵素分類 1.3.99.1）を検出する。恒温保持時間は， $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  で 3 時間とする。恒温保持中に二酸化炭素が存在すると，こはく酸脱水素酵素活性が阻害され，フィルタ染色の退色につながる可能性があるため避けることが望ましい。測定に先立ってフィルタを蒸留水中で洗浄し，空気乾燥する。

**注記** 蒸留水で洗浄する前に，10 % 中性ホルマリンで 15 分間，細胞を固定すると，細胞がよりよく保持される。
  - 2) **方法 B**  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  で 30 分間，フルオレセイン二酢酸溶液中に恒温保持することによって，非特異的加水分解酵素を検出する。フィルタを紫外光の下で調べる。

### 6.3.7 細胞損傷の評価

細胞の損傷は，次のいずれかで評価する。

- a) 脱色面積を，例えば画像解析システムによって測定する。
- b) 表 4 に定義した等級を用いる。

表 4—細胞損傷の評価基準

等級	等級付け評価基準	脱色面積 mm <sup>2</sup>
0	フィルタ全面で染色強度の差が認められない。	0
1	染色強度が低下した領域、又は非染色域の直径が試料の直径（5 mm）未満	20 未満
2	非染色域の直径が 5 mm～7 mm	20～40
3	非染色域の直径が 7 mm を超える	40 を超える

**注記** 陰性対照試料の下のフィルタ及び細胞だけの対照フィルタは、濃青（こはく酸脱水素酵素を用いる場合）又は明緑（非特異的加水分解酵素を用いる場合）で、通常、いずれも均一に染色される。細胞なしの対照フィルタは、フィルタに対する試料の影響の可能性を判定するために用いられる。

### 6.3.8 結果の評価

試験結果を評価する場合には、試験で得られた全ての情報、特に試験群及び対照群の結果の違いを考慮する。表 5 に規定する細胞損傷指数（表 4 に規定する等級に対応する。）によって、試験材料の毒性を等級付ける。

表 5—試験材料の毒性の評価

細胞損傷指数	評価
0	細胞毒性なし
1	軽度の細胞毒性
2	中等度の細胞毒性
3	強度の細胞毒性

これらの評価結果は、試験報告書中に記載する。

細胞培養試験から得られたデータを解釈する場合、この試験システムの限界（すなわち、細胞毒性をもつ材料が本質的に不適切なのではなく、特定の用途ごとにデータを解釈しなければならないこと）に留意する。

### 6.3.9 試験報告書

試験報告書には、採用した全ての手順の記録、取得した全ての結果及び結果の評価に必要なその他のデータを含める。試験材料の調製及び適用の方法の詳細を記録し、材料のロット番号がある場合には、それも同時に含める。

## 6.4 歯髄・象牙質使用模擬試験

### 6.4.1 目的

この試験は、歯髄及び象牙質に対する歯科材料の生体適合性を評価するためのものである。

### 6.4.2 動物及び動物福祉

動物福祉については、ISO 10993-2 を遵守しなければならない。

**注記 1** 実験動物に対する各国の規制要求事項が存在することがある。

動物は ISO 10993-2 によって飼育され、餌及び水を自由に摂取できるようになっていなければならない。根せん（尖）が完成し閉鎖している、健全な永久歯の歯列をもつ年齢の、一つの種の非げっ歯類ほ（哺乳類）

乳動物を用いる。

サル、イヌ、フェレット（シロイタチ）又はミニブタは、適切な動物種である。特別な目的に対しては、その他の動物種が適することもある。選択する動物種の数、動物福祉を考慮して、科学的な目的を達成するために必要な最小数でなければならない。動物種の実験については、その理由を記録しなければならない。

**注記 2** サル、イヌ及びミニブタは、M3 以外の永久歯が全てほう（萌）出し終わっているものが適切である。フェレットでは、犬歯だけが使用に適しているため、4本の永久犬歯がほう（萌）出し終わっているものが適切である。

### 6.4.3 試験手順

#### 6.4.3.1 動物の準備

各試験期間において、試験材料を充填した歯を少なくとも7本提供できる数の動物を選ぶ。動物に麻酔を行い、その後の手順は、6.4.3.2による。

#### 6.4.3.2 歯の処置

歯の処置は、次による。

- a) 歯面から歯石、歯こう（垢）などを全て除去する。体積分率3%の過酸化水素水、続いてポビドンヨード又はクロルヘキシジンからなる消毒剤を塗布して、試験に用いる歯の表面を清掃し、消毒する。十分な注水スプレー下で鋭利なバーを用いて、必要な数の頬側又は唇側の5級か（窩）洞を形成する。残存象牙質の厚さが1.0 mm未満（望ましくは、0.5 mm未満）で、露髄しないような深さに全てのか（窩）洞を形成する。試験材料を挿入するときにその他の手順が必要でない場合には、か（窩）洞を水洗し、綿球で乾燥する。

歯肉に著しい炎症をもつ動物の場合には、か（窩）洞形成の数日前に歯石及び歯こう（垢）を除去し、歯肉の炎症が抑えられるまで、更に繰り返す必要がある場合もある。

**注記 1** 根管長測定器などの電気インピーダンス測定器具を用い、あらかじめ校正しておくことで、か（窩）洞形成中に残存象牙質の厚さが推測される。

- b) ある歯科材料を合着材料として使用する場合、歯の表面から歯石及び歯こう（垢）を完全に除去した後、5級か（窩）洞のインレーを作製しなければならない。歯冠におけるセメント合着中の液圧を模擬するために、5級コンポジットレジンインレーを作製する必要がある。光重合型コンポジットレジンを充填するためのか（窩）洞形成の際に、潤滑剤として人工唾液を使用することが可能である。コンポジットレジンインレーの光重合及び撤去の後、か（窩）洞を完全に洗浄し、最終的なセメント合着のためにインレーを挿入するための準備を行う必要がある。

インレーを過充填の状態修復することで、インレーの取出しを容易にすることが可能で、過充填の部分は、セメント合着の際に、合着材料が硬化した後、切削除去することが可能である。その際、硬化が完了したセメント合着材を破壊し、無用な崩壊を生じることのないように、大量の冷却水の使用の下、目の細かい高速ダイヤモンドバーを軽い圧力で使用することを推奨する。

インレーは、セメントの初期硬化に要する時間、圧力をかけて保持しなければならない。これによって、全部被覆冠の合着時の液圧を模擬する。小動物の場合、露髄することなく、か（窩）洞が象牙質内側3分の1の深さまで到達するようにする。

**注記 2** 合着材を、合着材として用いる場合（稠）度を超過して固めに練和して、充填材として試験することは認められていない。

全部被覆冠の支台形成を行う場合、容認できる歯髄との近接度を確保するために（0.5 mm～1.0 mm）、

最初に5級のか(窩)洞を形成することが望ましく、基本的にこれを、歯髄との望ましい距離に到達するためのガイドとして利用し、その後全部被覆冠の支台形成を完了する。

- c) 試験材料の調製については、製造販売業者の指定による。試験材料の製造販売業者が、裏装材又はか(窩)洞処理材(例えば、象牙質接着材)との併用を指定する場合には、これらの手順を追加して用いる。
- d) 各試験期間において、少なくとも7か(窩)洞を試験材料で、4か(窩)洞を陰性対照の材料で、無作為割付けに基づいて修復する。必要な場合には、各試験期間において、陽性対照材料で最大で4か(窩)洞を修復する。

選択する動物種の数、動物福祉を考慮して、科学的な目的を達成するために必要かつ最小数でなければならない。動物種を選択については、その理由を記録しなければならない。サル、イヌ又はミニブタを用いる場合には、各試験期間について1匹でなければならない。フェレットを用いる場合には、各試験期間について少なくとも3匹でなければならない。

陰性対照材料：急速硬化型の酸化亜鉛ユージノールセメントは、それを歯髄から容認できる距離、すなわち、0.5 mmを超えて配置することを条件とすれば、適切な陰性対照材料である。残存象牙質の厚さが0.5 mm未満の歯は、評価から除外する(充填物が歯髄に近ければ近いほど、未反応のユージノールがより刺激物となる)。長期評価では、酸化亜鉛ユージノールセメントを流失から保護しなければならない。酸塩基反応で硬化する従来型のグラスアイオノマーセメントは、硬化後削合することで効果的な封鎖をもたらす。

試験材料が、長期にわたり継続して表面封鎖に適用される組成物である場合、酸化亜鉛ユージノールセメントは、物質中の未反応ユージノール(硬化後に多量に存在する。)が試験材料に沿って漏出し、か(窩)洞底に到達することになり、それによって実験対象の試験材料の真の反応を不明瞭にして、代わりにユージノールの組織学的反応が評価されるため、使用禁忌である。試験材料を流失から保護する必要がある場合、次の方法が推奨される。試験材料を0.5 mm~1.0 mmだけ削除し、エナメルマージンをエッチングした後、洗浄し、軽く乾燥させて、接着性ボンディング材及び光重合型コンポジットレジン材を用いる。

陽性対照材料：修復材料又は露髄を伴わないか(窩)洞形成であって、中等度から重度までの歯髄反応を常に起こす修復材料又は手法は、適切な陽性対照材料である。歴史的に陽性対照材料として用いられてきたシリケートセメントは、もはや入手できないという事実によって、臨床医に代替となる材料を示すことは困難である。りん酸亜鉛セメントの“湿潤(多液)”練和物は、恐らく最も適切な陽性対照材料である。湿潤(液成分過剰)練和物とは、最終練和物に含まれる粉末量が過少の状態と定義される。同じ動物モデルシステムを用い、一名の同じ実験者から得られたデータバンクをもつ試験機関であれば、既に市場化された過去の試験材料と比較し、良好な臨床データとして提供してもよい。

- e) か(窩)洞形成に先立って、試験対象の充填材料、陰性対照材料及び陽性対照材料を填入するか(窩)洞を決定するために、無作為抽出法を用いなければならない。合理的に可能な限り、例えば上顎右側小白歯及び上顎左側小白歯、下顎右側小白歯及び上顎右側小白歯など、対照歯及び実験歯を解剖学的に対にする。無作為抽出法によって、一方の歯が試験標本となり、対側及び対向する歯が対照標本となる。動物の種及びその入手の難易度に応じて、歯の種類を変更することが可能である。
- f) 術後は、少なくとも日に一度、動物の状態を観察して記録する。

摂食行動の変化、炎症又は感染によって生じる苦痛を最小限にするために対策を講じなければならない。術後、必要に応じて、鎮痛剤を投与しなければならない。

### 6.4.3.3 安楽死

実験期間の終了時に、動物を麻酔剤の過剰投与、又は他の容認されている人道的方法によって安楽死させる（ISO 10993-2 又は安楽死に関する国内・国際動物倫理福祉ガイドラインによる最新の勧告を参照）。

### 6.4.3.4 スライドの作製

5 日±2 日、25 日±3 日及び 70 日±5 日後に、試験材料を充填した歯を少なくとも 7 本提供できるだけの数の動物に麻酔剤を過剰投与、又は他の一般に容認されている物質を投与して、安楽死させる。修復物、歯及びそれらの支持組織を検査して、全ての異常を詳しく記録する。各処置歯をその周囲の硬組織及び軟組織とともに摘出して、適切な固定剤で固定する。

### 6.4.3.5 歯髄の保存

歯髄の保存は、次による。

- a) 摘出に先立って、安楽死させるときに固定液による組織の血管かん（灌）流をすると、より良い固定が得られる。かん（灌）流安楽死の技術は、大部分の組織を保存できるが、歯髄は保存できない場合が多い。化学的固定液は、自己融解を防止する上で十分な速さ（20 分以内）をもって、急速に浸透することはない。根せん（尖）側 3 分の 1 の歯髄は、顎を頭部から離断した後に除去しなければならない。容認されている有効な方法は、根せん（尖）から歯冠側に向かって約 4 mm～5 mm の位置で歯根を切断するために、高速ハンドピース、及びダイヤモンド又はカーバイドバー、並びに大量の冷却水を用いるものである。これによって、顎骨に植立したままの歯については骨及び歯根を同時に、又は抜去歯の場合には根せん（尖）側 3 分の 1 を通って切断する。この方法は歯冠部歯髄に影響を及ぼさないで、間接及び直接覆髄に関する研究に適用される。歯根及び歯髄組織に到達した後に徹底的に洗浄することで、固定液が歯髄に到達することを妨げる可能性のある切断くず（屑）が除去される。

4 分の 1 顎を固定液中に浸せき（漬）する前に、各歯根の根せん（尖）に歯髄組織を示す赤い点が見えるようにしなければならない。

試験が根せん（尖）部分の評価を目的としている場合、かん（灌）流安楽死は、根せん（尖）部組織の最善の保存を達成する上で、望ましい方法である。しかし、歯髄組織は適切に固定されておらず、上述の術式を用いて歯けい（頸）部の骨及び歯根を経由して歯髄に到達する必要がある。

- b) 顎ブロックを化学固定液中に少なくとも 24 時間浸せき（漬）し、新鮮な固定液を補充し、更に 24 時間～48 時間浸せき（漬）した後に脱灰操作を開始する〔脱灰については 6.4.3.5 d) を参照〕。固定液の用量は、試料の体積の 5 倍とする。固定後、適切な薬剤で歯を脱灰し、パラフィン包埋のための標準的な術式を用いる。
- c) 自己融解性変化の指標としては、象牙芽細胞の細胞質空胞化、網様萎縮、濁った赤血球、及びリンパ管に似た、太く拡張した空の管構造〔静脈りゅう（瘤）と呼ばれることもある。〕及び一般的に見られる象牙芽細胞の象牙細管内への吸引が挙げられる。光学顕微鏡で観察可能な象牙芽細胞の細胞質内の空胞形成は、容易に発現するため、最良の条件で保存された標本においてさえ、病理学的に重要であると考えない方がよい。自己融解による歯髄の完全な崩壊は、老化、歯周疾患、多種の修復材料、術式、更には全身麻酔の影響に起因するとして旧知の特徴である“網様萎縮”として、多数の成書にも記載されている。
- d) 多くの種類の脱灰方法及び化学物質を用いることが可能であるが、最も一般的な薬剤は 10 % ぎ酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、硝酸又はぎ酸－クエン酸ナトリウムである。これ以外の適切な薬剤として、塩酸、EDTA 二ナトリウム及び固定液からなる Cal-XII 固定液・脱カルシウム化剤があり、これは細胞構造の喪失を防ぐ。いずれの方法にかかわらず、最も効果的に使用する技術に精通しなければ

ばならない。例えば、ぎ酸の場合（検体の容積の 10 倍の容積を用いる。）では、これを利用する際に水が蓄積するため、溶液は 4 日～5 日ごとに交換しなければならない。また、水が歯の周囲に蓄積するので、歯の周囲の酸-水界面を破壊するため、溶液を機械的にかくはん（攪拌）しなければならない。また、容器の底面に接する歯の表面が酸による侵食を受けないので、検体は保持バット内につ（吊）るさなければならない。

- e) 酸性溶液を交換する場合、歯の近心・遠心面をあらかじめ切除しておくことも可能である。余分な組織を除去することによって、脱灰過程が加速される。脱灰は、標本のサイズ及び無機成分密度に依存して、通常、10 日～21 日で完了する。脱灰の終了時点を検出するために、ラジオグラフィ（X 線画像撮影）を用いる。また、歯は、鋭いかみそり（剃刀）の刃で容易に切断できる程度にまで切削できるようになるが、これは脱灰が進み過ぎたことを示している可能性もある。しかし、（脱灰期間中）毎日注意深く、切断の容易さを評価することで、脱灰過剰を防ぐことが可能である。
- f) 歯軸に沿って、各か（窩）洞を通る厚さ 5  $\mu\text{m}$ ～10  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製する。ヘマトキシリン及びエオシンで 1 枚おきにスライドを染色する。存在する細菌の菌数及び微小漏えい（洩）の範囲を推定するために、挟まれる中間のスライド（関連する歯髄病変に近接し、望ましくは、残存象牙質厚さが最小である部位に隣接するもの）を、適切な細菌染色（例えば、Brown-Brenn 染色、McKay 染色、又は Gram-Weigert 染色）で染色する。これらの染色法には欠点がある。多くの場合、グラム陰性細菌を同定することは容易ではなく、この細菌類の生存率又は同定に関する情報は得られない。多数の微生物が組織処理中に失われ、定量化が困難になることがある。脱灰は、微生物の数及び染色性を著しく低下させる。か（窩）縁及びか（窩）壁、並びにか（窩）底、同様に象牙細管内の歯こう（垢）又は微生物の存在は、各試験片についてその有無を記載する。微生物の存在を示す標本の割合（%）を、試験報告書に記録することが望ましい。

#### 6.4.3.6 象牙質及び歯髄の評価

検査対象が試験群又は対照群のいずれであるかの情報を検査者が事前に知らされない状態で、切片を検査する。各連続切片に対して、か（窩）洞形成に起因する可能性のあるものを含めて、象牙質、歯髄及び根せん（尖）周囲組織の組織学的特徴を全て詳細に記録する。連続切片から、か（窩）洞全長にわたって均等に間隔をおいて少なくとも 5 枚の切片を後続の炎症の分析のために選択し、個別に、表面組織（象牙芽細胞層、細胞希薄層、細胞緻密層）及び残りの（より深部の）歯髄組織における炎症性細胞浸潤を、表 6 によって等級付けする。

表 6—歯髄及び象牙質使用試験の等級付け

炎症の等級	炎症の程度	炎症性変化の説明
0	炎症なし	象牙細管によってか（窩）底とつながる、象牙質に隣接する歯髄組織の構造が正常である。
1	軽度の炎症	象牙細管によってか（窩）底とつながる、象牙質に隣接する歯髄組織内に、炎症性細胞が散在するほかは、歯髄組織の構造が正常である。
2	中等度の炎症	象牙細管によってか（窩）底とつながる、象牙質に隣接する歯髄組織内に、炎症性細胞の限局的な病巣が存在するが、正常な構造は残存している。
3	重度の炎症	象牙細管によってか（窩）底とつながる、象牙質に隣接する歯髄組織において、広範な炎症性細胞浸潤が見られ、正常な構造が消失している。
4	組織のえ（壊）死	のう（膿）瘍形成、又は象牙細管によってか（窩）底とつながる、象牙質に隣接する歯髄組織だけに限局されないで、広範な炎症性細胞浸潤が見られる。

等級付けした各切片について、か（窩）底から歯髄・象牙（前）質界面まで直角に測定した距離及び象牙細管の走行に沿った距離を測定して、最小残存象牙質厚さとして記録する。後者において、切片の断面が象牙細管の切断面と一致せず、その結果、当該領域の各象牙細管が、か（窩）底から歯髄・象牙（前）質界面までの全距離を走行していない場合には、象牙細管の一般的な走行方向に沿って測定する。

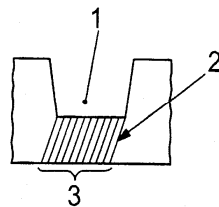
各試験期間について、個々の等級の総和を観察総数で除することによって、切片の両部位における炎症反応指数を求める。

製造販売業者が指定する場合には、裏装材又はか（窩）洞処理材とともに試験材料で充填したか（窩）洞、陰性対照で充填したか（窩）洞、及び陽性対照で充填したか（窩）洞について、個別にデータを示す。

陽性対照を充填したか（窩）洞については、試験条件が同じである過去の実験からのデータを用いてもよい。さらに、試験材料及び陰性・陽性対象について、各試験期間において、か（窩）底又はか（窩）壁に細菌を含有するか（窩）洞の数を記録する。このようにして、上記の等級に基づき各材料について、各試験期間における炎症反応指数で表すことが可能であるが、その指数に意味をもたせるためには、最小残存象牙質厚さの測定値及び細菌の微小漏えい（洩）の観察量を併せて評価する必要がある。

#### 6.4.3.7 象牙芽細胞の生存率分析（補助的評価）

象牙芽細胞生存率の組織形態計測分析のために、か（窩）底全長にわたり均等に間隔をおいて、ヘマトキシリン-エオシンで染色した切片を少なくとも5枚選び、個々の細胞を識別でき、か（窩）洞下の歯髄・象牙（前）質界面の全域が視野に入るように拡大して検査する。か（窩）洞下の歯髄・象牙（前）質界面の全長方向に沿って、目盛付きレンズを用いて象牙（前）質表面の単位長さ当たりの、形態学的に健全な象牙芽細胞の数を数える。その界面は、**図1**に規定する象牙細管がか（窩）底とつながる領域とする。



- 1 か（窩）洞
- 2 象牙細管
- 3 象牙芽細胞の計数のための歯髄・象牙（前）質界面領域

**図1—象牙芽細胞の計数のための歯髄・象牙（前）質界面領域**

試料から選んだ切片5枚の各々について、か（窩）洞下の歯髄・象牙（前）質界面領域の単位長さ当たりの象牙芽細胞数を数えて、そのか（窩）洞の平均細胞数を求める。その後、全ての試験材料か（窩）洞及び陰性対照か（窩）洞について平均細胞数を求める。細胞死の百分率は、次の式によって求める。

$$CD = \left( \frac{NC - T}{NC} \right) \times 100$$

ここに、  
 CD： 細胞死の百分率（%）  
 NC： 陰性対照か（窩）洞の細胞数  
 T： 試験材料か（窩）洞の細胞数

**表7**に規定する等級で、象牙芽細胞死を等級付けする。

表 7—象牙芽細胞死の等級付け

等級	象牙芽細胞死
0	なし
1	細胞死が 25 %未満
2	細胞死が 25 %～50 %
3	細胞死が 50 %を超えて 75 %以下
4	細胞死が 75 %を超える

等級付けした各切片について、6.4.3.6 によって最小残存象牙質厚さを記録する。このようにして、表 7 に規定する等級に基づいて、各材料について象牙芽細胞生存指数を示すが、評価に影響する因子として、その材料グループのか（窩）洞について測定した最小残存象牙質厚さを提示する。製造販売業者が推奨する場合には、裏装材又はか（窩）洞処理材をも含めて試験材料を充填したか（窩）洞、及び陽性対照として用いたか（窩）洞について、個別にデータを示す。上記の試験か（窩）洞と同様に、陽性対照のデータを陰性対照の百分率として表す。試験条件が現在の試験と同じ場合には、陽性対照のデータを過去の試験から得てもよい。

#### 6.4.4 結果の評価

##### 6.4.4.1 一般

試験結果を評価する場合には、試験で得た全ての情報、特に試験群及び対照群の結果の違いを考慮する。評価結果を試験報告書に記録する。

##### 6.4.4.2 残存象牙質厚さの統計解析

残存象牙質厚さ [remaining dentine thickness (RDT)] のデータはミリメートル (mm) 単位で記録し、データが正規分布し、その分散が等しいという仮定に基づいて、パラメトリック分析を用いて分析する。RDT は、実験群と参照群・対照群との間で統計学的に差がないものでなければならない。結果について、組織学的特徴の下で、上記に列記するような分類基準で（ノンパラメトリックデータを）等級付けして報告する場合、ノンパラメトリック検定を用いる。

##### 6.4.5 試験報告書

結果は、試験報告書として作成する。試験報告書には、用いた全ての手順の記録、取得した全ての結果及び結果の評価に必要な他の資料を含める。試験材料の調製及び適用方法の詳細も、その材料のロット番号とともに報告に含める。

#### 6.5 覆髄試験

##### 6.5.1 目的

この試験は、歯髄に対する覆髄材料の生体適合性を評価するために行う。評価方法には、製造販売業者が指定する臨床使用に必要な手順を含む。

**注記** この試験は、一部を変更して断髄試験に用いられる。

歯髄・象牙質使用模擬試験及び覆髄試験は、動物の同一個体の異なる歯を用いて、同時に実施することが可能である。

##### 6.5.2 動物及び動物福祉

動物福祉は、6.4.2 による。

6.4.2 によって、一種類の非げっ歯類哺乳動物を少なくとも個体数 2 を用いる。

### 6.5.3 試験手順

#### 6.5.3.1 動物の準備

各試験期間において、試験材料を充填する歯を少なくとも 10 本提供できる数の動物を選ぶ。

動物を麻酔して、6.5.3.2 の処置を行う。

#### 6.5.3.2 歯の処置

歯の処置は、次による。

- a) 歯面から歯石、歯こう（垢）などを全て除去する。使用する歯を隔離するためにラバーダムを装着する。歯面及び手術野を清掃し、乾燥する。体積分率 3 %の過酸化水素水、続いてポビドンヨード又はクロルヘキシジンからなる消毒剤を塗布して消毒する。十分な注水スプレー下で鋭利なバーを用いて、頬側又は唇側に必要な数の 5 級か（窩）洞を形成する。形成したか（窩）洞は、そのか（窩）縁をエナメル質としつつ、当該歯の近心面及び遠心面まで拡張し、かつ、象牙質の厚さの 3 分の 1 まで達していることが望ましい。質量分率 0.9 %の滅菌生理食塩液をスプレーしつつ、歯髄組織内にできる限りバーを貫通させないように、慎重にか（窩）洞中央部に直径約 0.5 mm～1.0 mm 露髄させる。露髄部の直径は、0.1 mm 単位で測定する。露髄部の直径は、使用したバーの既知の直径から推定可能である。止血するまで、露髄部を滅菌生理食塩液で十分に洗浄する。滅菌した綿球で乾燥する。

**注記 1** 歯肉に著しい炎症がある動物の場合には、か（窩）洞形成の数日前に歯石、歯こう（垢）などを除去し、歯肉の炎症が治まるまで、更に繰り返す必要がある。

- b) 試験材料の調製については、製造販売業者が指定する方法によって行う。製造販売業者が止血又は損傷歯髄の特定の前処理のために、その他の洗浄液又は薬剤の使用を推奨している場合には、それに従う。
- c) か（窩）洞形成に先立って、試験充填材料、陰性対照材料及び陽性対照材料を填入するか（窩）洞を決定するために、無作為抽出法を用いなければならない。合理的に可能な限り、例えば上顎右側小白歯及び上顎左側小白歯、下顎右側小白歯及び上顎右側小白歯など、対照歯及び実験歯を解剖学的に対にする。無作為抽出法によって、一方の歯が試験標本となり、対側及び対向する歯が対照標本となる。動物の種及びその入手の難易度に応じて、歯の種類を変更してもよい。
- d) 各試験期間において、試験材料について少なくとも 10 か（窩）洞、適切な標準材料について 5 か（窩）洞を無作為に配置し、充填する。微生物汚染を避けながら、練板（練和紙）上で覆髄材料及び対照材料を練和する。圧力をかけないようにして露髄部に材料を充填する。ポリ酸添加型コンポジットレジン又はレジン添加型ガラスイオノマーセメントをか（窩）洞に充填する。さらに、接着性コンポジットレジンで修復することが望ましい。
- e) 選択する動物種の数は、動物福祉を考慮して、科学的な目的を達成するために必要な最小数であることが望ましい。動物種の選択について、その理由を記録しなければならない。サル、イヌ又はミニブタを使用する場合には、各試験期間について、少なくとも個体数 1 を使用する。フェレットを使用する場合には、犬歯だけが適合するので、各試験期間について少なくとも 4 匹を使用する。

**注記 2** 無機三酸化物凝集体 [Mineral Trioxide Aggregate (MTA)] のようなけい酸カルシウムセメント又は質量分率 0.9 %の滅菌生理食塩液で練和した直後のパテ状の水酸化カルシウムは、適切な対照材料である。

**注記 3** 填入したけい酸カルシウムセメントの流出を防止するため、レジン添加型ガラスイオノマー (RMGI) 材料によって、セメント及び周囲の象牙質が 0.5 mm～1.0 mm 被覆される。酸エッチング（又はセルフエッチング）象牙質接着材及びコンポジットレジンを用いるこ

とによって最終形態まで修復される。

**注記 4** 上記の参照材料は生物学的に活性をもっているため、これ以外に陽性又は陰性の対照材料は不要である。

**注記 5** 水酸化カルシウム剤を用いる場合、ポリカルボキシレートセメント又は従来型（酸塩基反応硬化型）ガラスイオノマーセメントの薄い層で水酸化カルシウム剤を覆い、次いで酸エッチング（又はセルフエッチング）象牙質接着材及びコンポジットレジンを用いることによって修復される。

f) 6.4.3.2 d) によって動物を観察・管理する。

### 6.5.3.3 スライドの作製

スライドの作製は、次による。

a) 25 日±5 日及び 70 日±5 日後に、試験材料を充填した歯を少なくとも 10 本提供できるだけの数の動物に麻酔剤の過剰投与、又は他の一般に容認されている物質を投与して、安楽死させる。修復物、歯及びそれらの支持組織を検査して、全ての異常を詳しく記録する。各処置歯をその周囲の硬組織及び軟組織とともに一つのブロックとして摘出して、適切な固定剤で固定する。

**注記** 摘出に先立って、安楽死させるときに固定液による組織の血管かん（灌）流をすると、より良い固定が得られる。

b) 固定後、各組織ブロックの X 線写真を撮影し、X 線画像上の変化が生じているかどうかを判定した後、

6.4.3.5 によって、検査のための切片を作製する。

### 6.5.3.4 歯髄の評価

6.4.3.6 の手順によって切片を調べ、組織学的特徴を記録し、炎症性細胞浸潤を等級付けて、炎症反応指数を求める。表面の歯髄組織は、露髄させるときに損傷しているため、評価の対象とせず、表 8 の等級を用いて炎症性細胞浸潤についてだけ等級付けする。

表 8—覆髄試験の等級付け

炎症の等級	炎症の程度	炎症性変化の説明
0	炎症なし	試料の組織像には炎症性変化を認めない。
1	軽度の炎症	露髄部に隣接する歯髄組織内に、炎症性細胞が散在
2	中等度の炎症	露髄部に隣接する歯髄組織内に、炎症性細胞の局所的な小集合が存在
3	重度の炎症	露髄部に隣接する歯髄組織に、広範な炎症性細胞浸潤
4	組織のえ（壊）死	のう（膿）瘍形成、又は露髄部に隣接する歯髄組織だけに限局されないびまん性の炎症性細胞浸潤

さらに、バリアとしてのデンティンブリッジの有効性を妨げる可能性がある、トンネル状欠損の存在及び細胞封入体に注意して、デンティンブリッジの形成量、分布及び性状について、十分に記載しなければならない。デンティンブリッジが“ない”、“部分的に存在”、又は“完全封鎖”の等級で、第三象牙質によって露髄部が塞がれている度合いを等級付けする。デンティンブリッジの組織学的特徴を解釈するための手引を次に示す。

デンティンブリッジの形成量及び形成範囲については、露髄部を完全に被覆しているか、露髄部における被覆の深さ又は厚さ、及び形成範囲について検討しなければならない。デンティンブリッジの形成が不完全な場合には、露出した歯髄を効果的に保護できないが、逆にデンティンブリッジ形成時に無制限に修

復象牙質が形成される場合、歯髄くう（腔）が閉塞し、歯髄の活性が低下する危険性がある。デンティンブリッジの形成範囲を超えた広範な修復象牙質の形成又は覆髄材料とつながる管状構造が認められる場合には、覆髄材料に対する反応だけではなく、施術時などにおける損傷（例えば、外科的損傷）に対する細胞の反応があるとみなしてもよい。デンティンブリッジ形成中の形成不全の程度は、デンティンブリッジの象牙細管構造の規則性から知ることが可能である。細管構造の形成がない場合、又は細管構造の形成が僅かである場合には、組織の形成中に生じた形成障害がより大きかったことを示す。デンティンブリッジ中のトンネル状の欠損又は細胞封入体の存在は、組織形成不全を示しており、デンティンブリッジによってもたらされる正常な透過性及び封鎖性に影響を与える可能性がある。

#### 6.5.4 結果の評価

結果は、統計学的な分析も含め、6.4.4 によって評価する。結果について、組織学的特徴の下で、表 8 に列記するような分類基準で（ノンパラメトリックデータを）等級付けして報告する場合、ノンパラメトリック検定を用いなければならない。

#### 6.5.5 試験報告書

試験報告書は、6.4.5 による。

### 6.6 根管充填使用模擬試験

#### 6.6.1 目的

この試験は、根管充填用材料と根せん（尖）部残存歯髄組織（残髄）及び根せん（尖）周囲組織との生体適合性を評価するためのものである。評価方法には、製造販売業者が指定する臨床使用に必要な手順を含む。

根管充填使用模擬試験は、根管充填又は逆根管充填に用いる歯内療法用生体活性材料、例えば、根せん（尖）部硬組織の形成促進を標ぼう（榜）する材料について適用する。

#### 6.6.2 動物及び動物福祉

動物福祉は、6.4.2 による。

6.4.2 に規定しているように、根せん（尖）の形成が完成（閉鎖）した健全な永久歯をもつ年齢の、1 種類の非げっ歯類哺乳動物を少なくとも個体数 4 を用いる。切歯、犬歯及び小白歯の使用が望ましい。2 根をもつ小白歯を使用してもよい。

#### 6.6.3 試験手順

##### 6.6.3.1 動物の準備

各試験期間において、試験材料を充填する歯を少なくとも 10 本提供できる数の動物を選ぶ。

イヌの種類によっては、根せん（尖）形態が複雑で、根管形成が困難な場合がある。

動物を麻酔して、6.6.3.2 の処置を行う。

##### 6.6.3.2 歯の処置

歯の処置は、次による。

- a) 充填する全ての歯の根せん（尖）周囲の X 線写真を撮影する。6.5.3.2 a) によって歯面から歯石、歯こう（垢）などを全て除去し、歯を清掃し、隔離する。

**注記 1** 歯肉に著しい炎症がある動物の場合には、か（窩）洞形成の数日前に歯石、歯こう（垢）などを除去し、歯肉の炎症が治まるまで更に繰り返す必要がある。

根管充填材を充填するために、必要な数の歯を用意する。無菌条件下に、鋭利なバーを用いて適切な髄くう（腔）開拓を行う。質量分率 0.9 % の滅菌生理食塩液で露髄部を洗浄し、滅菌綿球で乾燥する。抜髄には、新しい滅菌済み根管ファイル又は抜髄針を用い、X 線写真を参考にして、根せん（尖）

孔の手前 1.0 mm±0.5 mm まで歯髄を切除する。先に質量分率 1.0 %～5.25 %の次亜塩素酸ナトリウム溶液で、続いて質量分率 0.9 %の滅菌生理食塩液で、繰り返し根管を洗浄する。

歯髄を切断した位置までの長さに印を付けた滅菌済み根管ファイルを用いて、順次大きなサイズのファイルで、充填に適する大きさになるまで根管を拡大する。象牙質切削くず(屑)が残っていると、根せん(尖)を塞いで根管充填材料が根せん(尖)周囲組織に接触するのを妨げる可能性があるため、根管から象牙質切削くず(屑)をできる限り取り除く。根管拡大処置が完了した後、先に質量分率 1.0 %～5.25 %の次亜塩素酸ナトリウム溶液で、続いて質量分率 0.9 %の滅菌生理食塩液で根管を洗浄し、滅菌済み綿球及び大きな、先の丸い滅菌済みペーパーポイントで、根せん(尖)の残存歯髄に触れないようにして乾かす。

- b) 試験材料の調製については、製造販売業者の指示に従う。製造販売業者が上記 a) とは異なる歯の形成方法を推奨する場合には、その指示に従う。
- c) か(窩)洞形成に先立って、試験充填材料、陰性対照材料及び陽性対照材料を填入するか(窩)洞を決定するために、無作為抽出法を用いなければならない。合理的に可能な限り、例えば上顎右側小白歯及び上顎左側小白歯、下顎右側小白歯及び上顎右側小白歯など、対照歯及び実験歯を解剖学的に対にする。無作為抽出法によって、一方の歯が試験標本となり、対側及び対向する歯が対照標本となる。動物の種及びその入手の難易度に応じて、歯の種類を変更してもよい。
- d) 各試験期間について、少なくとも 10 歯を試験材料で、少なくとも 5 歯を適切な標準材料で充填する。微生物汚染を避けながら、練板(パッド)上で根管充填材料及び標準材料を練和する。歯髄を除去した所にガッタパーチャを置き、試験材料又は標準材料で根管を充填する。開拡したか(窩)洞を強化型酸化亜鉛ユージノール[Zinc oxide eugenol (ZOE)]セメントで填塞し、その上をポリカルボキシレートセメント又は従来型(酸塩基反応硬化型)グラスアイオノマーセメント若しくは酸エッチングで維持するコンポジットレジンで覆う。根管を充填した全ての歯の根尖部をとらえた X 線写真を撮影する。
- e) サル、イヌ又はミニブタを使う場合には、各試験期間について少なくとも個体数 2 を使用することが望ましい。フェレットを使う場合には、犬歯だけが適しているため、各試験期間について少なくとも個体数 4 を使用することが望ましい。
- f) コンポジットレジンを用いる場合には、まず従来型(酸塩基反応硬化型)グラスアイオノマーセメント又はポリカルボキシレートセメントの薄い層で ZOE セメントを覆うことが望ましい。コンポジットレジンが ZOE セメントに直接接触した場合、コンポジットレジンの重合を阻害する可能性がある。

**注記 2** 単独の ZOE セメント又は Grossman の処方によるシーラのようにその他の添加剤を含む ZOE セメントは、適切な標準材料である。

- g) 6.4.3.2 f) によって動物を観察・管理する。

### 6.6.3.3 スライドの作製

スライドの作製は、次による。

- a) 28 日±3 日及び 90 日±5 日後に、試験材料を充填した歯を少なくとも 10 本提供できる数の動物に麻酔剤を過剰投与、又は他の一般に容認されている物質を投与して、安楽死させる。修復物、歯及び歯の支持組織を検査して、全ての異常を詳しく記録する。各処置歯を、その周囲の硬組織及び軟組織とともに一つのブロックとして摘出して、適切な固定液で固定する。

**注記** 摘出に先立って、安楽死させるときに固定液による組織の血管かん(灌)流をすると、より良い固定が得られる。

- b) 固定後，各組織ブロックの X 線写真を撮影し，X 線画像上の変化の有無を判定する。根管及びその分岐部を通り，歯の長軸に平行な断面で材料・歯髄組織界面及び隣接する根せん（尖）周囲組織が観察できるように，6.4.3.5 によって組織切片を作製する。

#### 6.6.3.4 組織の評価

検査対象が試験群又は対照群のいずれであるかの情報を検査者が事前に知らされない状態で切片を検査する。各連続切片に対して，歯髄，根せん（尖）周囲組織，並びに根せん（尖）部の象牙質及びセメント質の組織学的特徴の全てを詳細に記録する。各試料について，その組織変化を表 9 によって等級付けする。考慮すべき組織学的特徴の例を，次に示す。

表 9—根管充填使用模擬試験の等級付け

等級	炎症の程度	所見
0	炎症なし	試料の組織像には炎症性変化を認めない。
1	軽度の炎症	試料の組織像は，炎症性細胞，主に慢性炎症性細胞の散在を示すが，残存歯髄の構造的特徴は，識別可能な程度に保持されている。
2	中等度の炎症	試料の組織像は，炎症性細胞の局所的な集積を示すが，組織のえ（壊）死はなく，残存歯髄及び根せん（尖）周囲組織の構造的特徴は，部分的に崩壊している。
3	重度の炎症	残存歯髄又は根せん（尖）周囲組織が，広範囲に炎症性細胞浸潤によって置換されている。
4	組織のえ（壊）死	のう（膿）瘍形成

記録すべき組織学的特徴の例は，次による。

- a) 根管充填が根せん（尖）孔の位置との関係において，未到達，一致又は突出しているかを判定する評価：この所見を炎症の存在，根吸収及び骨反応と関連させる。
- b) 根管シーラ（セメント）の過剰充填：根管シーラが根せん（尖）を突き抜けて，周囲の歯周組織及び骨組織中にいつ（溢）出していないかを判定する。28 日後に観察することが多いが，長期間観察をこの評価から除外してはならない。
- c) え（壊）死した根せん（尖）組織の存在
- d) 良好，可又は不良で等級付けする根管充填材料の適合度：
  - “良好”な適合とは，一つの切片だけでなく連続した切片で，充填材料が空隙なく根管壁に適合していることを意味する。
  - “可”の適合とは，幾つかの切片に，空隙，すなわち，充填材料が根管壁に適合していない部分の一部が存在することを意味する。
  - “不良”な適合とは，充填材料が根管壁に適合していない，すなわち，多数の空隙が存在することを意味する。
- e) 表 9 によって等級付けした炎症（0～4）について，炎症部位に存在する炎症細胞の種類に基づく詳細な説明：大多数を占める細胞の種類を調べ，リンパ球，単球，マクロファージ及び多核巨細胞は，後期に出現するのに対し，急性炎症細胞（好中球）は，初期に出現することに基づき，炎症反応を急性（A），慢性（C）又は混合（M）に分類する。
- f) 根吸収の有無
- g) 根せん（尖）周囲の骨組織の反応を正常又は炎症状態に等級付けし，さらに肉芽腫が存在するか否か，及び骨吸収の徴候の有無を判定する。

h) 表 9 の等級付け (0~3) によって炎症反応の程度を評価する。

#### 6.6.4 結果の評価

結果は、統計学的な分析も含め、6.4.4 によって評価する。結果について、組織学的特徴の下で、表 9 に列記するような分類基準で (ノンパラメトリックデータを) 等級付けして報告する場合、ノンパラメトリック検定を用いなければならない。

#### 6.6.5 試験報告書

試験報告書は、6.4.5 による。

JIS DRAFT 2020/08/03

附属書 A  
(参考)

歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮する試験の種類

A.1 表 A.1 に歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮する試験の種類を示す。

表 A.1—歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮する試験の種類

接触状態	接触期間	一般	グループ 1			グループ 2					グループ 3				
		物理的及び／又は化学的データ	細胞毒性試験	細胞毒性試験	細胞毒性試験	遅延型過敏症(感受性)	皮膚刺激性又は皮内反応	急性全身毒性	亜急性(又は亜慢性)全身毒性	遺伝毒性	埋植	歯髄・象牙質使用模擬試験	覆髄試験	根管充填使用模擬試験	歯科用骨内インプラント使用模擬試験
		ISO 10993-18 ISO/TS 10993-19	6.2 及び 6.3	ISO 10993-5	附属書 B	ISO 10993-10	ISO 10993-10	ISO 10993-11	ISO 10993-11	ISO 10993-3	ISO 10993-6	6.4	6.5	6.6	附属書 C
表面接触機器	A	X	E	E	—	E	E	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	X	E	E	—	E	E	E	E	—	E	—	—	—	—
	C	X	E	E	—	E	E	E	E	E	E	—	—	—	—
体内と体外とを連結する機器	A	X	E	E	E	E	E	E	—	—	—	E	—	—	—
	B	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	—	—	—
	C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	—	—	—
体内植込み機器	A	X	E	E	—	E	E	—	—	—	—	—	E	—	—
	B	X	E	E	—	E	E	E	E	E	E	—	E	—	E
	C	X	E	E	—	E	E	E	E	E	E	—	E	E	E

著作権法により無断での複製、転載等は禁止されております。

表 A.1－歯科用医療機器の生体適合性の評価を行う上で考慮する試験の種類（続き）

**注記 1** X はリスクアセスメントに必要な前提条件となる情報を示す。

**注記 2** E は評価するエンドポイントを意味する。エンドポイントとして、既知の毒性情報、追加となるエンドポイントに特有の試験の実施、又は追加のデータが不要な場合はその妥当性の根拠の説明のいずれかが該当する。評価の対象となる医療機器が、これまで医療機器用途に使用されたことのない新規材料から製造され、既存の文献からその材料に関する毒物情報が得られない場合は、この表で“E”と記されたエンドポイント以外についても評価の実施を考慮する必要がある。ある種の医療機器については、この表で指定したものに追加、又は削減してエンドポイントを選択することが妥当である場合もある。

**注記 3** JIS T 0993-1 の表 A.1 も参照。

著作権法により無断での複製、転載等は禁止されております。

JIS DRAFT 2020/08/13

## 附属書 B

### (参考)

# 象牙質バリア細胞毒性試験

#### B.1 目的

この附属書では、単独で、又は他の細胞毒性試験、免疫原性試験、突然変異原性試験及び分子試験と組み合わせて使用する象牙質バリア細胞毒性試験について説明する。

ここで説明する方法は、象牙質の片側に配置された物質が反対側に拡散することが可能である状態で、歯科材料の既知の成分、又は最終の使用形態となる重合済み材料若しくは硬化後の材料からの抽出物について、その濃度がどのように変化するかを示すように設計されている。特にこの方法は、形成された歯のか（窩）洞から歯髄への材料の通過及び拡散について、インビトロ歯髄くう（腔）での模擬による再現を目的としている。

“象牙質バリア”を通過する材料の移動を測定するために、臨床での使用時の重合体若しくは硬化物をそのまま使用、又はこれらの材料の成分を用いることが可能である。通過物又は拡散物である成分の濃度を測定するために、放射性同位元素で標識された溶質を使用するか、又は比色分析、分光光度法、クロマトグラフィー若しくはその他の方法によって目的の溶質を測定することが可能である。

#### B.2 装置及び材料

##### B.2.1 細胞

入手が容易な [例えば、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能である。] 樹立細胞株、又は代替品として、SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入細胞クローン [例えば、こ（仔）ウシの歯乳頭に由来するもの] の使用が可能である。それらの細胞を、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  で 5 % 炭酸ガス雰囲気に加湿環境下にある増殖用培地で培養する。また、象牙芽細胞様の性質、又は歯髄組織の生理機能に類似した性質をもつ、その他の樹立細胞株も使用することが可能である。

##### B.2.2 培地

ATCC 又はこれと同等の機関が供給する選択した細胞株用の培地を用いる。

**注記** 手引きとして、[https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=ch](https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=ch) を参照。SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入細胞のための増殖培地は、20 %ウシ胎児の血清 (FBS)、150 IU/mL ペニシリン、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン、0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンホテリシン B 及び 0.1 mg/mL ジェネティシンを添加した MEM $\alpha$  からなる。

##### B.2.3 試薬

###### B.2.3.1 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル) -2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT)

**B.2.3.2 抗生剤又は防かび剤** ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン B を用いる。ただし、SV40 遺伝子導入細胞クローンを使用する場合には、これに加えてジェネティシンを用いる。

##### B.2.4 機器

###### B.2.4.1 細胞培養皿インサート 例え、Millicell<sup>4)</sup>。

**注<sup>4)</sup>** Millicell は、ミリポアが供給する製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。同じ結果が得られる場合には、これと同等のその他のものが使用される。

**B.2.4.2 プレート（培養皿）** 6穴及び24穴のもの

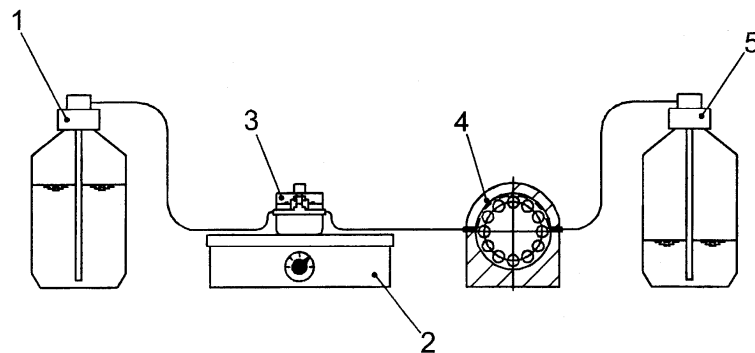
**B.2.4.3 ポリアミドメッシュ** 直径8 mmのもの。例えば, Sefar<sup>5)</sup>, メッシュ幅 150 μm

**注<sup>5)</sup>** Sefar は, Sefar が供給する製品の商標名である。この情報は, この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので, この製品を推奨するものではない。同じ結果が得られる場合には, これと同等のその他のものが使用される。

**B.2.4.4 分割チャンバかん（灌）流装置** 次に記載する, インビトロ歯髄くう（腔）を模した二つのかん（灌）流チャンバは, 両方とも装置として適している。

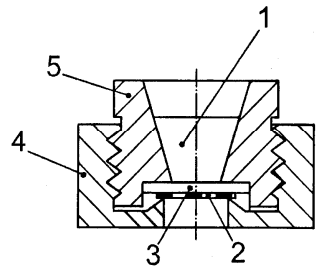
第一の分割チャンバかん（灌）流装置, Minucells<sup>6)</sup> (図 B.1 参照) は, 底部が 40 mm×40 mm で, 高さが 35 mm のポリカーボネート製のかん（灌）流チャンバからなる。この装置において歯髄に該当する部分は, 片方が培養液供給瓶に, 他方がぜん（蠕）動ポンプ及び培養廃液瓶に接続されている。試験装置内で, 二つのチャンバは, ステンレス鋼製ホルダ (図 B.2 参照) で定位置に保たれる象牙質スライスによって分離されている。

**注<sup>6)</sup>** Minucells は, Minucells & Minutissue GmbH が供給する製品の商標名である。この情報は, この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので, この製品を推奨するものではない。同じ結果が得られる場合には, これと同等のその他のものが使用される。



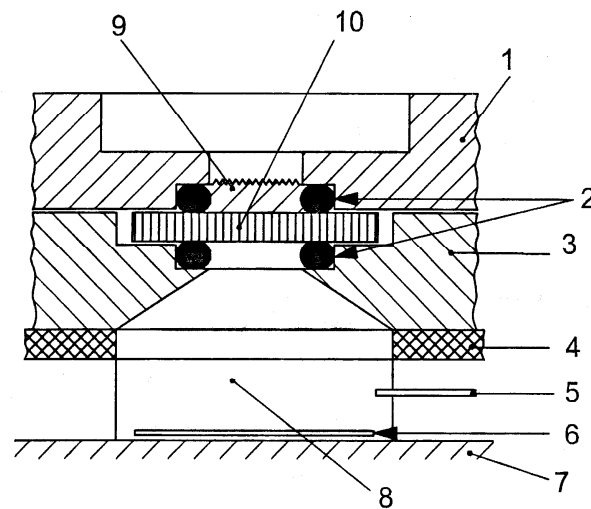
- 1 培養液供給瓶
- 2 ホットプレート
- 3 かん（灌）流チャンバ
- 4 ポンプ
- 5 廃液瓶

図 B.1—象牙質バリア細胞毒性試験用の実験装置



- 1 試験材料
- 2 細胞を増殖させたメッシュ
- 3 象牙質スライス
- 4 ステンレス鋼製リング
- 5 ステンレス鋼製インサート

図 B.2—試験装置に象牙質スライス及び培養細胞を固定するステンレス鋼製ホルダ



- 1 上部
- 2 ゴム製Oリング
- 3 中間部
- 4 エラストマーシート
- 5 入りー出口
- 6 ガラス製カバーガラス (glass coverslip)
- 7 底部
- 8 培養液
- 9 試験材料
- 10 ゴム製Oリングで定位置に保たれる象牙質スライス

図 B.3—ADA かん（灌）流チャンバ

第二の分割チャンバかん（灌）流装置、米国歯科医師会（以下、ADA という。）かん（灌）流チャンバ<sup>7)</sup> (図 B.3 参照) は、毒性のない Derlin<sup>8)</sup>又は Lexan<sup>9)</sup>によって作られた透明の壁からなる。流入口及び流出口弁は毒性のないステンレス鋼製細管である。小さなOリングは、赤のシリコン製である(外径 15.9 mm, 内径 12.42 mm)。内径 6 mm の、より小さいOリングによって、表面拡散面積が 28 mm<sup>2</sup>になる。このチャンバ部分は、0.5 mL の液を保持する。チャンバを底から、毒性のないポリビニルシロキサン印象材 [例え

ば、Reprosil<sup>10)</sup>] で満たすことによって、チャンバ容積が 100  $\mu$ L 未満になる。

**注<sup>7)</sup>** ADA かん (灌) 流チャンバは、Biomedical Engineering, Medical College of Georgia が提供する製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。

<sup>8)</sup> Derlin は、DuPont が提供する材料区分のポリアセタールで製造された製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。

<sup>9)</sup> Lexan は、General Electric Plastics が提供する材料区分のポリカーボネートで製造された製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。

<sup>10)</sup> Reprosil は、Dentsply International が提供する材料区分の疎水性無毒性ポリビニルシロキサン印象材で製造された製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。

**B.2.4.5 マイクロプレートリーダー** 96 穴プレート用、波長 540 nm、又は適切なその他の光度計

**B.2.4.6 象牙質スライス** ヒト又はウシの象牙質から作製したもの

**注記** ヒト以外の象牙質を使用する場合には、使用に先立って、その象牙質スライスの透過性を測定して、その透過性が歯髄・象牙質界面に匹敵するレベルで、ヒト象牙質の透過性と同等であることを確認することが必要である。このために、キャピラリシステム [例えば、Flodec<sup>11)</sup>] が用いられる。

**注<sup>11)</sup>** Flodec は、DeMarco Engineering が提供する製品の商標名である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため記載するもので、この製品を推奨するものではない。

## B.3 試験手順

### B.3.1 細胞培養の準備

#### B.3.1.1 3次元細胞培養

3次元細胞培養は、Minucells かん (灌) 流チャンバとともに用いることを推奨する。ポリアミドメッシュを 0.1 mol/L 酢酸中で 30 分間加温し、脱イオン水で 3 回洗浄し、風乾した後、滅菌状態でフィブロネクチン (0.03 mg/mL) を用いて被覆し、風乾する。プレートインサートを 1.25 mL の培養液とともに、6 穴プレートの各ウェルの中に入れる。メッシュをインサートの上に静置し、1 mL 当たり  $4 \times 10^6$  個の細胞を含む細胞懸濁液 20  $\mu$ L をは (播) 種する。37  $^{\circ}$ C  $\pm$  2  $^{\circ}$ C、5 %炭酸ガス雰囲気、相対湿度 (90  $\pm$  10) %で 48 時間培養した後、メッシュを 24 穴プレートへ移して 14 日  $\pm$  2 日間培養する。培養液を週に 3 回交換し、第 1 週の終わりにメッシュを新しい 24 穴プレートへ移す。

#### B.3.1.2 単層培養

単層培養は、ADA かん (灌) 流チャンバとともに用いることを推奨する。入手が容易な [例えば、ATCC から] 樹立細胞株を用いて、ISO 10993-5 に規定する方法を適用する。

### B.3.2 象牙質スライスの作製

#### B.3.2.1 ヒト由来象牙質

うしょく (蝕) のない、抜去直後の臼歯を選び、歯石、付着軟組織などを手用器具で除去して、70 %エタノール中に少なくとも 15 分間浸す。歯冠の最大豊隆部において、こう (咬) 合面のエナメル質の下、髓室角の上で、歯軸に垂直に歯を切断することによって、象牙質スライスを作製する。

### B.3.2.2 ウシ由来象牙質

3才～7才の食肉ウシの下顎中央の切歯4本の中から、過度にこう（咬）耗していない健全な歯を選ぶ。抜歯し、歯石、付着軟組織などを手用器具で除去して、使用するまで0.5%クロラミン又は他の同様な薬剤中に保存する。歯髓になるべく近接して、歯軸に沿って歯を切断する。試験には、象牙質スライスの歯けい（頸）部近傍を用いる。

### B.3.2.3 象牙質スライスの処理

象牙質スライスの“歯髓”側と想定した面を50%クエン酸で30秒間エッチングし、十分に洗浄して、0.9%塩化ナトリウム溶液中でオートクレーブ滅菌（121℃、9.6MPa、25分間）するか、又は70%エタノール中に15分間浸して滅菌した後、脱イオン水で十分に洗浄する。象牙質スライスは、4℃±2℃の0.9%塩化ナトリウム溶液中で3週間までは保存が可能である。保存した象牙質スライスは、使用前に、各バッチからサンプリングした試料の微生物培養によって、その無菌状態を確認する。

象牙質スライスの厚さは、その試験が模擬する臨床か（窩）洞の深さに応じて変えることが可能である。厚さ500µm±50µmの象牙質スライスは、中程度の深さとなる臨床か（窩）洞の下の残存象牙質に相当する。より薄い象牙質スライスは、より深い臨床か（窩）洞の状況を再現するために用いる。

象牙質スライスは、使用するまで、0.9%塩化ナトリウム溶液中で保存が可能である。

### B.3.2.4 かん（灌）流装置

#### B.3.2.4.1 Minucells 装置

細胞を増殖させたメッシュを試験装置に入れ、象牙質スライスを挿入する。象牙質スライスは、ステンレス鋼製ホルダによって定位置に保持する。

**注記** 適合するホルダを、**図 B.2** に示す。

流量0.3 mL/hのアッセイ培地（6 g/L HEPES 緩衝液を用いた増殖培地）で、チャンバを24時間かん（灌）流する。かん（灌）流を止めて、試験材料を上室内の象牙質スライスの“か（窩）洞”側に直接接触するように入れる。

適切な期間（例えば、24時間又は3日）後に、被験細胞の入ったメッシュをチャンバの歯髓部分から取り出して、あらかじめ温めたMTT溶液（0.5 mg/mL増殖培地溶液）0.5 mLが入っている48穴プレートの各ウェル中に入れ、りん酸緩衝生理的塩類溶液とともに、37℃±2℃で2時間インキュベートする。プレートを30分間室温で振とう（盪）して、0.25 mLのジメチルスルホキシドで青色ホルマゼン沈殿を抽出する。この溶液の200 µLを96穴プレートへ移して、分光光度法で540 nmの吸光度を測定する。対照の値に対する百分率として、又は吸光度測定値として結果を表す。

各材料及び対照について、1回の試験で5組～10組のチャンバを用い、各試験を少なくとも2回行う。

#### B.3.2.4.2 ADA かん（灌）流チャンバ装置

かん（灌）流チャンバ装置に象牙質スライスを取り付ける。下室に、適合する細胞培養液（又は他の抽出用媒体）を満たし、必要に応じて下室を培養液供給瓶及び廃液瓶に接続する。その後、試験材料を充填する。所定のばく（曝）露時間後に細胞培養液を除去して、それを通常の単層培養の細胞毒性試験、例えば、生物学的評価指標（biological endpoints）としてのDNA合成、ミトコンドリア酵素活性（MTTアッセイ）、又は遺伝子制御といった機能のこう（亢）進に用いる。

## B.4 対照材料

試験する各材料について、陽性対照材料及び陰性対照材料を用いる。陽性対照材料は、24時間のばく（曝）露後に、細胞生存率を約50%減少させることが望ましい。陰性対照材料は、生細胞数に影響しないことが

望ましい。陽性対照材料<sup>12)</sup>の例を表 B.1 に示す。

**注記** 陰性対照材料として、毒性のない疎水性ポリビニルシロキサン印象材が好適である。陽性対照材料として、表 B.1 に記載した組成の材料又はこれと同等の材料が用いられる。

**注<sup>12)</sup>** 次の原材料は、好適な市販製品の例である。この情報は、この規格の使用者の便宜を図るため提供するもので、これらの材料を推奨するものではない。

- － 粒径 30 μm ± 10 μm のガラス粉：Schott, order No. GM35429
- － ポリアクリル酸：Sigma-Aldrich, order No. 323667
- － 塩化ジフェニルヨードニウム：Sigma, order No. D209082
- － カンファーキノン：Sigma, order No. 124893
- － 4-ジメチルアミノ安息香酸エチル：Merck, order No. 841086
- － HEMA (2-hydroxyethyl-methacrylate)：Merck, order No. 800588

表 B.1－陽性対照材料の例

材 料 <sup>a)</sup>	試料質量 mg	試料質量 %	最終質量 %
粉部			
ガラス粉	829.000	82.90	66.30
ポリアクリル酸	146.000	14.60	11.70
塩化ジフェニルヨードニウム	25.000	2.50	2.00
計	1 000.00	100.00	80.00
液部			
カンファーキノン	0.625	0.25	0.05
4-ジメチルアミノ安息香酸エチル	0.625	0.25	0.05
HEMA	187.500	75.00	15.00
脱イオン水	61.250	24.50	4.90
計	250.000	100.00	20.00
<b>注<sup>a)</sup></b> 文献 [33] を参照			

粉末及び液のそれぞれの成分を別個に混和した後、直ちに粉末 1 000 mg, 液 250 mg の割合で両者を混ぜ合わせる。一般の光重合用装置によって、混和物を 40 秒間、700 mW/cm<sup>2</sup>～800 mW/cm<sup>2</sup> で硬化させる。

## B.5 結果の評価

陰性対照材料及び陽性対照材料の間に統計的に有意の差が生じない場合には、その試験は棄却する。

ここで得られた評価に加えて、より詳細な情報については、ISO 10993-5 を参考にする。Minucells 装置から得られたデータの評価は、試験材料、陰性対照材料、及び陽性対照材料の各材料について 5 回～10 回の独立した培養を行ったと想定して、試験材料を二つの対照材料と統計学的に比較して行う（ノンパラメトリック法）。表 B.2 によって細胞損傷を評価し、表 B.3 によって結果を等級付けする。

試験報告書に評価の結果を記載する。

表 B.2—細胞損傷の評価

等級	等級付け評価
0	陽性対照材料とは統計的に有意差があり、陰性対照材料とは有意差がないか、陰性対照材料より弱い細胞損傷だけしか引き起こさない。
1	陰性対照材料及び陽性対照材料のいずれとも、統計的有意差がある。
2	陰性対照材料とは統計的に有意差があり、陽性対照材料とは有意差がないか、陽性対照材料よりも強い細胞損傷を生じている。

表 B.3—試験材料の等級付け

等級	内容
0	細胞毒性なし
1	中等度の細胞毒性
2	強度の細胞毒性

## B.6 試験報告書

試験報告書には、次の情報を記載しなければならない。

- a) 試験に用いた細胞株
- b) 試験に用いた培地
- c) 試験材料の詳細
- d) 試験材料の準備の詳細
- e) 陽性対照材料及び陰性対照材料の詳細
- f) 陰性対照材料と比較したときの細胞生存率
- g) 評価の結果

## 附属書 C (参考) 歯科用骨内インプラント使用模擬試験

### C.1 一般

この附属書は、巨視的及び微視的パラメータの両方を使用して、骨内に埋植する歯科用インプラントシステムの機能評価を行うための動物試験に関するものである。リスク分析の結果が、動物試験以外からは得ることのできない追加情報の必要性を示している場合に限って、使用することを意図している。

この動物使用試験は、歯科用インプラントシステムに対する宿主応答における機能的ストレスの影響を評価する場合にも有用である。

この附属書は、移植材料自体の機械的強度に関する情報ではなく、むしろインプラント-骨界面の定性的評価に関する情報を提供することを意図している。

**注記** 歯科用インプラントシステムの機械的特性については、ISO 14801に記載されている。

### C.2 試験方法

#### C.2.1 試験手順

各歯科用インプラントシステムに関する試験の実施の前に、製造販売業者又は提供者は、少なくとも次にに関して可能な限り詳細な試験手順を準備する責任がある。

- a) 試験の目的
- b) 動物試験に関する原理及び妥当性並びに ISO 10993-2 を満足するために要求されるその他の情報
- c) 試験対象の歯科用インプラントシステム、化学的組成及び物理的構造（該当する場合は、表面処理を含む。）を含め、臨床的な挿入方法及び使用方法、並びに対照とするインプラントシステム
- d) 選択した動物種、その飼育など、及び選択の妥当性
- e) 遵守する試験手順（動物数、試験体数、選択した試験期間及び適用の妥当性を含む。）
- f) 適用する臨床及び研究施設での評価方法、並びにその妥当性
- g) 適用する臨床及び研究施設データの分析方法、並びに試験結果の決定に用いる基準
- h) 試験報告書に含める情報

異なる歯科用インプラントシステムに関連する設計及び臨床術式には、様々な種類が存在するため、単一の詳細な試験手順として様式化することは不可能である。しかしながら、この附属書では、全ての手順に共通する試験方法の基本的特徴に関する指針を提供する。ヒト以外の動物種における試験手順に関する参考情報は、参考文献に示す。

#### C.2.2 動物及び動物福祉

##### C.2.2.1 動物福祉

動物福祉は、6.4.2 による。

##### C.2.2.2 試験用動物

ヒトにおける状況に関連して、これまでに妥当性が確認されている歯科用インプラントシステム使用模擬試験のための動物モデルは特定されていない。したがって、次の基準を満たす動物種を選択することを推奨する。

- a) 自然的又は人為的に、口くう（腔）衛生の維持が可能である。

- b) 通常の外科処置を施す場合、到達可能であり、ヒトへの使用を意図する形態の歯科用インプラントを埋植する上で、十分な大きさの顎である。
- c) 歯科用インプラントシステムを埋植する部位には、対合歯が存在しなければならない。
- d) 意図する用途が適切な場合、動物は骨格的に成熟していなければならない。
- e) 雑食性のそしゃく（咀嚼）顎運動をもつ動物が望ましい。

### C.2.2.3 動物数

動物数は妥当であり、記載された試験の目的を達成する上で必要最低限でなければならない。

## C.2.3 試験方法

### C.2.3.1 被験試料

ヒトにおける臨床使用を目的とする市販の歯科用インプラントシステムを用いる。何らかの点で、臨床での意図する用途と異なる歯科用インプラントを試験に使用する場合は、その意思決定の妥当性を示さなければならない。

### C.2.3.2 対照試料

その他の同様な試験から得られた結果が利用できない限り、適切な対照試料を設ける。当該試験と既に公表された試験との試験条件が厳密に比較可能であれば、既存データの利用が許容される。歯科用インプラントシステムの対照試料が必要な場合、専門家の査読を受けた臨床データが利用できる歯科用インプラントシステム、又は被験試料となる歯科用インプラントに類似した未使用の歯科用インプラントのいずれかが適切である。

### C.2.3.3 試験対象の歯科用インプラント及び対照試料の埋植部位の外科処置（前処置）

必要であれば、歯科用インプラントの埋植に先立って無歯顎の部位を作製する。

この場合、外科的処置の前に、認知された麻酔法を用いて、実験時に適切とされる実施条件によって決定され、指示されるように動物を麻酔しなければならない。全ての外科処置は無菌下で実施しなければならない。適切な方法を用いて、歯科用インプラントの埋植に要する部位を提供するために、必要な数の歯を抜去する。ヒトでの状況を最もよく模擬するために、動物に対して臨床条件下での感染を防ぐ上で適切な治療を要することがある。さらに、治癒中の組織に対する損傷のリスクを最小限にするために、術後一定期間、動物には適宜、軟かい食餌を与えることが望ましい。試験対象の歯科用インプラントが、即時埋植又は早期埋植ではなく、遅延埋植を目的とする場合、当該インプラントは適切な治癒期間を置いた後に埋植しなければならない。

### C.2.3.4 歯科用インプラントシステムの埋植

歯科用インプラント及びこれに関連するインプラント部品を無菌的に埋植するための外科術式を実行し、正確に試験手順に従う。処置は適切な麻酔下で行わなければならない。歯科補てつ（綴）装置は、試験手順に従って完成しなければならない。術後ケアの方法は、試験の目的及び術後管理として認知された手順を反映していなければならない。

### C.2.3.5 試験期間

歯科用インプラントシステム及びそれを埋植された動物（以下、宿主という。）の反応を、試験の目的に適した試験期間の後に評価する。試験の目的が、歯科用インプラントシステムの臨床適用の妥当性の評価である場合、ベースライン及び荷重負荷後の適切な追跡期間を含む、少なくとも三つの試験期間を設定することが推奨される。これらの追跡期間の開始時点は、術後、動物が通常の食餌を行っていない期間を反映しなければならない。特に必要でない限り、試料の外科的摘出及び顎微鏡分析（鏡検）は、試験期間の最後にだけ実施する。骨吸収及び／又はインプラントの緩みについて評価することが目的である場合、そ

れに適する長期間の評価を行うことが望ましい。

**注記** 組織内へのインプラント埋植期間については、ISO 10993-6 も参照する。

#### C.2.3.6 歯こう（垢）清掃

必要に応じて、動物に対して定期的な歯こう（垢）清掃の処置を行い、詳細を試験手順書に記載する。

#### C.2.3.7 臨床検査及び X 線画像検査

歯肉及び歯周組織の健康状態を適切な間隔で記録する。歯肉組織の視診に加えて、可能な限り、認知された臨床指標を用いて、口こう（腔）衛生、歯こう（垢）及び歯肉炎の状態を記録することが推奨される。医療機器（歯科用インプラント）の初期固定又は動揺度、周辺組織の炎症の存在及び何らかの局所感染の兆候に特に留意する。

動物を麻酔した時に、歯科用インプラント埋植部位、隣接歯・対合歯及び支持骨について、規格 X 線写真を撮影し、試験の終了時まで一連の術前及び術後画像を得る。

#### C.2.3.8 試験期間の終了

必要に応じて、ISO 10993-2 のガイドラインによって、試験期間の終了時に動物を安楽死させる。

### C.2.4 評価

#### C.2.4.0A 概要

試験に関して、必要となる臨床的、X 線画像、組織病理学的、統計学的及びその他の分析方法によって、組織反応を評価する。試験目的のために特に必要でない限り、歯科用インプラントの外科的除去及びその周囲組織の反応に対する組織病理学的評価は、最長又は最終の試験期間に限定することが望ましい。

#### C.2.4.1 臨床評価

体重を含めて、試験中の動物の一般的な健康状態に関連する詳細を提供する。被験試料及び対照試料となる歯科用インプラントシステム周辺、隣接歯・対合歯の周辺、及び顎全体並びに関連する筋肉組織の軟組織の健康状態を評価して、これらの構造が試験期間中に変化したかどうかを判定しなければならない。関連する人工歯を含み、インプラント上部構造のいかなる変化も記録する。

**注記** インプラントの不成功例及びその失敗内容

#### C.2.4.2 X 線画像評価

試験期間中に骨構造が変化したかどうかを判定するために、被験試料及び対照試料となる歯科インプラントシステムについて、それらを取り囲む骨及び隣接歯・対合歯を含み、X 線写真画像を評価する。

#### C.2.4.3 摘出試料（回収）

病理組織学的検査及び／又はその他の検査のために、必要であれば、試験終了後、顎及び関連する筋肉組織を示す組織のブロック、及び試験対象並びに対照となる歯科用インプラントシステムを含む組織の特定のブロックを、隣接する歯、骨及び口こう（腔）軟組織とともに、あるがままの状態を回収する。試験の特定の目的に応じて、他の組織ブロックを回収及び／又はその他の方法によってそれらを検査することが必要な場合がある。

#### C.2.4.4 病理組織学的検査のための試料作製

組織ブロックを回収した場合、必要に応じて組織病理学的検査のためにそれらを処理する。実施する組織病理学的評価の特定のパラメータによって、非脱灰切片及び脱灰切片の両方が必要になることがある。インプラント・組織及びインプラント・口こう（腔）界面の評価には、堅固にプラスチック包埋された非脱灰試片の顕微鏡検査を推奨する。

#### C.2.4.5 顕微鏡による微視的評価

歯科用インプラントシステム又は対照インプラントと周囲の硬組織及び軟組織との相互作用の性質（特

徴) を評価するために、十分な数の切片を調べる。少なくとも、質的及び量的に特に注意を払うべきものは次のとおりである。

- a) 骨・インプラント直接接触面積
- b) 新生骨及び／又は線維組織
- c) 骨吸収
- d) 炎症、感染、のう（膿）瘍形成及びえ（壊）死
- e) 顎及び関連筋肉組織量における何らかの変化
- f) 可能な場合、歯科用インプラントに対する何らかの変化

隣接歯及び対合歯のブロックからの十分な数の切片を検査して、それらの状態及び周囲組織の状態を判定しなければならない。

#### C.2.4.6 統計分析

統計分析の分野を扱う多くの国際規格がある。関連する国際規格を使用する場合はそれを、そうでない場合は使用する分析技術を明記する。

#### C.2.5 試験報告書

試験報告書に記載する内容は、少なくとも、次による。

- a) C.2.1 に記載のように、試験手順書の全ての詳細及び元の手順書からの逸脱。
- b) C.2.4 に記載のように、臨床及び検査における観察及び測定に関する詳細及び適切な分析。
- c) 試験の目的が充足された程度に関する結論、特に試験対象の歯科用インプラントシステムの生体適合性に関する結論における対照試料との比較を含む、試験から得られたデータの全体的な分析。

## 参考文献

- [1] **ISO 10993-7**, Biological evaluation of medical devices—Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals
- [2] **ISO 10993-9**, Biological evaluation of medical devices—Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products
- [3] **ISO 10993-13**, Biological evaluation of medical devices—Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices
- [4] **ISO 10993-14**, Biological evaluation of medical devices—Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics
- [5] **ISO 10993-15**, Biological evaluation of medical devices—Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys
- [6] **ISO 10993-16**, Biological evaluation of medical devices—Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables
- [7] **ISO 10993-17**, Biological evaluation of medical devices—Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances
- [8] **ISO/TR 10993-22**, Biological evaluation of medical devices—Part 22: Guidance on nanomaterials
- [9] **ISO 14801**, Dentistry—Implants—Dynamic fatigue test for endosseous dental implants
- [10] **ISO/IEC 17025**, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [11] ANSI/ADA Specification No. 41, Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials
- [12] OECD 420: *OECD Guidelines for Testing Chemicals—Acute Oral Toxicity. Fixed Dose Procedure*, Organisation for Economic Co-operation and Development, 75775 Paris Cedex 16, France
- [13] OECD 423: *OECD Guidelines for Testing Chemicals—Acute Oral Toxicity. Acute Toxic Class Method*, Organisation for Economic Co-operation and Development, 75775 Paris Cedex 16, France
- [14] OECD 425: *OECD Guidelines for Testing Chemicals—Acute Oral Toxicity. Up-and-Down Procedure*, Organisation for Economic Co-operation and Development, 75775 Paris Cedex 16, France
- [15] Barka T., & Anderson P.J. *Histochemistry. Theory, practice and bibliography*, Chapter XIII, Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, New York, 1963
- [16] Bendall D.S., Ranson S.L., Walker D.A. Effects of carbon dioxide on the oxidation of succinate and reduced diphosphopyridine nucleotide by Ricinus mitochondria, *Biochem J*, 1960, **76**: 221-5
- [17] Berbert F.L., Leonardo M.R., Silva L.A., Tanomaru Filho M., Bramante C.M. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2002, **93**, pp. 184-189
- [18] Browne R.M. Animal tests for biocompatibility of dental materials: relevance, advantages and limitations, *J. Dent.* 1994, **22**, pp. 21-24
- [19] Franz A., König F., Skolka A., Sperr W., Bauer P., Lucas T., Watts D.C., Schedle A. Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area, *Dent. Mater.* 2007, **23**, pp. 1438-1446
- [20] Hanks C.T., Diehl M.L., Craig R.G., Makinen P.L., Pashley D.A. Characterization of the “in vitro pulp chamber” using the cytotoxicity of phenol, *J. Oral Pathol.*, 1989, **18**, pp. 97-107

- [21] Magloire H., Joffre A., Bleicher F. An in vitro model of human dental pulp repair. *J. Dent. Res.*, 1996, **75**, pp. 1971-1978
- [22] Meryon S.D. The model cavity method incorporating dentine, *Int. Endod. J.*, B, pp. 79-84, 1988
- [23] Murray P.E., Hafez A.A., Smith A.J., Windsor L.J., Cox C.F. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure, *Int. Endod. J.*, 2003, **36**, pp. 106-116
- [24] Murray P.E., Lumley P.J., Ross H.F., Smith A.J. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials, *Biomaterials*, 2000, **21**, pp. 1711-1721
- [25] Pameijer C.H., & Stanley H.R. Pulp reaction to a dentin bonding agent, *Am. J. Dent.*, 1995, **8**, pp. 140-114
- [26] Pascon E.A., Leonardo M.R., Safavi K., Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1991, **72**, pp. 222-237. Erratum in: *Oral Surg. Oral Med.*, **73**, p. 347, 1992
- [27] Schmalz G. Agar overlay method, *Int. Endod. J.*, 1988, **21**, pp. 59-66
- [28] Schmalz G., Garhammer P., Schweikl H. A commercially available cell culture device for dentin barrier tests, *J. Endod.*, 1996, **22**, pp. 249-252
- [29] Schmalz G., Hiller K. - A., Dörter-Aslan F. New developments in the filter test system for cytotoxicity testing, *J. Mat. Sci., Materials in Medicine*, 1994, **5**, pp. 43-51
- [30] Schmalz G., & Schweikl H. Characterization of an in vitro barrier test using a standard toxicant, *J. Endod.*, 1994, **20**, pp. 592-594
- [31] Schuster U., Schmalz G., Thonemann B., Mendel N., Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells, *J. Endod.*, 2001, **27**, pp. 259-265
- [32] Wennberg A., Hasselgreen G., Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1979, **13**, pp. 109-120
- [33] Schmalz G., Hiller K. - A., Seidenader C., Schweikl H. Interlaboratory testing of a new cytotoxic reference dental restorative material. *J Dent Res.*, **90**, Spec Issue A, 2011 ([www.dentalresearch.org](http://www.dentalresearch.org)), Abstract # 273, <http://iadr.confex.com/iadr/2011sandiego/webprogram/schedule/Paper146565.html>
- [34] Parr G.R., Gardner L.K., Steflik D.E., Sisk A.L. Comparative implant research in dogs: A prosthodontic model, *J. Prosthet. Dent.* 1992, **68** (3) pp. 509-514
- [35] Sisk A.L., Steflik D.E., Parr G.R., Hanes P.J. A light and electron microscopic comparison of osseointegration of six implant types. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1992, **50** (7) pp. 709-716
- [36] De Lange G.V., & De Putter C. Structure of the bone interface to dental implants in vivo. *J. Oral Implantol.* 1993, **19** (2) pp. 123-135
- [37] Sagara M., Akagawa Y., Nikai H., Tsuru H. The effects of early occlusal loading on one-stage titanium alloy implants in beagle dogs: A pilot study. *J. Prosthet. Dent.* 1993, **69** (3) pp. 281-288
- [38] Piattelli A., Ruggeri A., Franchi M., Romasco N., Trisi P. A histologic and histomorphometric study of bone reactions to unloaded and loaded non-submerged single implants in monkeys: A pilot study. *J. Oral Implantol.* 1993, **19** (4) pp. 314-320
- [39] Steflik D.E., White S.L., Parr G.R., Sisk A.L., Schoen S.P., Lake F.T., Hanes P.J. Clinical evaluation data from a comparative dental implant investigation in dogs. *J. Oral Implantol.* 1993, **19** (3) pp. 199-208
- [40] Akagawa Y., Ichikawa Y., Nikai N., Tsuru H. Interface histology of unloaded and early loaded partially

- stabilized zirconia endosseous implants in initial bone healing. *J. Prosthet. Dent.* 1993, **69** (6) pp. 599-604
- [41] Stefflik D.E., Sisk A.L., Parr G.R., Gardner L.K., Hanes P.J., Lake F.T., Brewer P. Osteogenesis at the dental implant interface: High-voltage electron microscopic and conventional transmission electron microscopic observations. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, **27** (6) pp. 791-800
- [42] Stefflik D.E., Parr G.R., Sisk A.L., Hanes P.J., Berkery D.J., Brewer P. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: Transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J. Periodontol.* 1994, **65** (5) pp. 404-413
- [43] Stefflik D.E., Sisk A.L., Parr G.R., Lake F.T., Hanes P.J., Berkery D.J., Brewer P. Transmission electron and high-voltage electron microscopy of osteocyte cellular processes extending to the dental implant surface. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, **28** (9) pp. 1095-1107
- [44] Stefflik D.E., Corpe R.S., Lake F.T., Sisk A.L., Parr G.R., Hanes P.J., Buttle K. Composite morphology of the bone and associated support-tissue interfaces to osseo-integrated dental implants: TEM & HVEM analyses. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1997, **12** (4) pp. 443-453
- [45] Caulier H., Hayakawa T., Naert I., Van Der Waerden J.P., Wolke J.G., Jansen J.A. An animal study on the bone behaviour of Ca—P-coated implants: influence of implant location. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1997, **8** (9) pp. 531-536
- [46] Overgaard S., Lind M., Glerup H., Grundvig S., Bunger C., Søballe K. Hydroxyapatite and fluorapatite coatings for fixation of weight loaded implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1997, (336) pp. 286-296
- [47] Stefflik D.E., Corpe R.S., Lake F.T., Young T.R., Sisk A.L., Hanes P., Berkery D.J. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, **39** (4) pp. 611-620
- [48] Miyata T., Kobayashi Y., Araki H., Ohto T., Shin K. The influence of controlled occlusal overload on peri-implant tissue. Part 3: A histologic study in monkeys. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2000 May—Jun., **15** (3) pp. 425-431
- [49] Assenza B., Scarano A., Petrone G., Iezzi G., Thams U., San Roman F., Piattelli A. Osteoclast activity around loaded and unloaded implants: a histological study in the beagle dog. *J. Oral Implantol.* 2003, **29** (1) pp. 1-7
- [50] Ko C.C., Douglas W.H., DeLong R., Rohrer M.D., Swift J.Q., Hodges J.S., An K.N., RITMAN E.L. Effects of implant healing time on crestal bone loss of a controlled-load dental implant. *J. Dent. Res.* 2003, **82** (8) pp. 585-591
- [51] Xiropaidis A.V., Qahash M., Lim W.H., Shanaman R.H., Rohrer M.D., Wikesjö U.M., Hanes P., Hall J. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. *Clin. Oral Implants Res.* 2005, **16** (5) pp. 532-539
- [52] Bousdras V.A., Walboomers F., Jansen J.A., Cunningham J.L., Blunn G., Petrie A., SINDET—PEDERSEN S., GOODSHIP A.E. Immediate functional loading of single-tooth TiO<sub>2</sub> grit-blasted implant restoration. A controlled prospective study in a porcine model. Part II: Histology and histomorphometry. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2007, **9** (4) pp. 207-216
- [53] Cochran D.L., Bosshardt D.D., Grize L., Higginbottom F.L., Jones A.A., Jung R.E., Wieland M., Dard M. Bone response to loaded implants with non-matching implant-abutment diameters in the canine mandible. *J. Periodontol.* 2009, **80** (4) pp. 609-617

附属書 JA  
(参考)  
JIS と対応国際規格との対比表

JIS T 6001:9999 歯科用医療機器の生体適合性の評価		ISO 7405:2018, Dentistry—Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry					
(I) JIS の規定		(II) 国際規格番号	(III) 国際規格の規定		(IV) JIS と国際規格との技術的差異の箇条ごとの評価及びその内容		(V) JIS と国際規格との技術的差異の理由及び今後の対策
箇条番号及び題名	内容		箇条番号	内容	箇条ごとの評価	技術的差異の内容	
3 用語及び定義			3	ISO 及び IEC のデータベース情報	削除	データベース情報を削除した。	データベースの情報は、国内では不要なため削除した。
	3.6 象牙質スライス		3.6	—	追加	“以下、象牙質スライスという。”を追加した。	使用者の利便性を考慮して追加した。ISO 規格改訂時に提案する。
4 医療機器のカテゴリ分類	4.1.2 この規格及び JIS T 0993-1		4.1.2	JIS T 0993-1	変更	“JIS T 0993-1”を“この規格及び JIS T 0993-1”に変更した。	記載漏れと思われる。ISO 規格改訂時に提案する。
	4.2.4 長期的接触機器		4.2.4	永久接触機器	変更	“永久”を“長期的”に変更し、関連する注記を削除した。	JIS T 0993-1 の表記に合せた。ISO 10993-1 でも“永久”は使用していない。ISO 規格改訂時に提案する。
	—		4.2.4	複数回接触	削除	複数回接触の関する記載を削除した。	4.1.1 の記載内容と重複している。ISO 規格改訂時に提案する。
6 歯科材料のための試験手順	6.2.2 細胞系		6.2.2	注りの同等の細胞株	変更	“同等の細胞株で同じ結果が得られることを示すことができる場合には、その細胞株を用いてもよい。”を注から本文へ変更した。	許容事項であるため本文に移動した。
	6.3.7 注記		6.3.7	陰性対照試料の下のフィルタ及び細胞だけの対照フィルタ	変更	本文の記載を注記に変更した。	対応国際規格では本文となっているが、追加情報であり、旧 JIS に合わせて注記とした。

著作権法により無断での複製、転載等は禁止されております。

(I) JIS の規定		(II) 国際規格番号	(III) 国際規格の規定		(IV) JIS と国際規格との技術的差異の箇条ごとの評価及びその内容		(V) JIS と国際規格との技術的差異の理由及び今後の対策
箇条番号及び題名	内容		箇条番号	内容	箇条ごとの評価	技術的差異の内容	
6 歯科材料のための試験手順（続き）	6.4.1 —		6.4.1	抜歯予定のヒトの歯を用いること	削除	抜歯予定のヒトの歯を用いることを削除した。	ヒトの便宜抜去歯を試験に使用することは日本国内で認められない。
	6.4.3.5 —		6.4.3.5.1	抜歯予定のヒトの歯（便宜抜去歯）を用いる場合の手順	削除	抜歯予定のヒトの歯（便宜抜去歯）を用いる場合の手順を削除した。	ヒトの便宜抜去歯を試験に使用することは日本国内で認められない。

<p><b>JIS と国際規格との対応の程度の全体評価：ISO 7405:2018, MOD</b></p> <p><b>注記 1</b> 箇条ごとの評価欄の用語の意味は、次による。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— 削除 …………… 国際規格の規定項目又は規定内容を削除している。</li> <li>— 追加 …………… 国際規格にない規定項目又は規定内容を追加している。</li> <li>— 変更 …………… 国際規格の規定内容を変更している。</li> </ul> <p><b>注記 2</b> JIS と国際規格との対応の程度の全体評価欄の記号の意味は、次による。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— MOD …………… 国際規格を修正している。</li> </ul>
--

JIS DRAFT 2020/08/05