

セルデスク LF1 が細胞毒性試験における 直接接触法用陰性対照材料として適切である根拠データ

山影康次¹, 小林美和子^{1,2}, 又吉裕子², 野田優子², 薮島由二³, 宮島敦子³,
加藤玲子³, 藤巻日出夫³, 坂口圭介⁴, 武田真紀⁴, 岡田真幸⁴, 太田 亮¹

Supporting data that Cell Desk LF1 is suitable as a negative reference material for the direct contact method in cytotoxicity tests

Kohji YAMAKAGE, Miwako KOBAYASHI, Yuko MATAYOSHI, Yuko NODA, Yuji HAISHIMA, Atsuko MIYAJIMA,
Reiko KATO, Hideo FUJIMAKI, Keisuke SAKAGUCHI, Maki TAKEDA, Masayuki OKADA, Ryo OHTA

緒言

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(薬機法)で定められている医療機器を製造販売(承認申請、認証申請及び届出)する場合、その安全性評価の一環として、生物学的安全性評価を実施する必要がある。すなわち、医療機器の接触部位と接触期間に応じた生物学的有害作用(毒性ハザード)を特定するための項目について評価することが求められている。評価項目の一つである細胞毒性は人体と接触するすべての医療機器で必須の評価項目となっている。細胞毒性試験を実施する場合、基本的には国内ガイダンス¹⁾に記載されている方法に準拠して実施される。

国内ガイダンスでは、細胞毒性試験結果の妥当性を示す材料として陰性および陽性の対照材料の使用が推奨されている。しかしながら、直接接触法用の陰性対照材料として推奨されている組織培養用プラスチックシートが販売中止となったことから、その代替品が求められている。ここでは、その候補材料であるセルデスク LF1 の直接接触法用陰性対照材料としての適切性を確認するために、3施設による共同実験として V79 細胞を用いるコローニー形成法による細胞毒性試験を実施した。

共同実験では、セルデスク LF1、対照材料、細胞および血清を秦野研究所から提供し、国内ガイダンスに準拠した共通の試験計画書に従って3回の繰り返し実験を行った。

材料および方法

1. 試験施設

共同実験は、医療機器、歯科材料、細胞組織医療機器およびそれらの材料について、有効性・安全性・品質担保に関する研究を行っている国立医薬品食品衛生研究所の医療機器部、そして、医療機器メーカーで実際に細胞毒性試験を実施しているテルモ株式会社の湘南センターの協力を得て、秦野研究所を加えた3施設で実施した。

2. 試験試料

接着細胞用プラスチック製カバースリップとして販売されているセルデスク LF1 (ロット番号: 811P9012, 製造元製品コード: MS-92132, 直径 13.5 mm, 放射線滅菌済, 秋田住友ベーク) を、直接接触法用の新規陰性対照材料候補として用いた。また、国内ガイダンスで推奨されている対照材料については、直接接触法用の陰性および陽性の対照材料として、それぞれ組織培養用プラスチックシート(ロット番号: ECR0604, 和光純薬工業)および 0.25% Zinc dibutylidithiocarbamate (ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム(RM-B, サイズ: 直径 14 mm, ロット番号: B-174K, 食品薬品安全センター)を用いた。また、培地抽出法用の陰性対照材料として高

- 1 一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 公益事業部, 対照材料管理室
- 2 一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 安全性事業部, 品質試験検査 G
- 3 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
- 4 テルモ株式会社 湘南センター

密度ポリエチレンフィルム(RM-C, ロット番号: C-161, 食品薬品安全センター), 陽性対照材料として0.1% Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 含有ポリウレタンフィルム(RM-A, ロット番号: A-181K, 食品薬品安全センター)および0.25% Zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム(RM-B, サイズ: 約2mm×15mm, ロット番号: B-174K, 食品薬品安全センター)を用いた。

放射線滅菌済みセルデスクLF1およびエチレンオキシドガス滅菌した対照材料を秦野研究所が提供し, それらを試験に用いた。

3. 使用した細胞

チャイニーズ・ハムスター肺由来のV79細胞(ヒューマンサイエンス振興財団 研究資源バンクより入手)を用いた。秦野研究所が提供したV79細胞の凍結アンプル(マイコプラズマの汚染なし)を解凍し, 解凍後継代10代以内の細胞を使用した。

継代および直接接触法による細胞毒性試験には, ウシ胎児血清(ロット番号: 014BS815, Biosera, 秦野研究所提供)を10 vol%含むEagle's MEM培地(MEM10培地)を用いた。培地抽出法による細胞毒性試験では, ピルビン酸ナトリウム(1 mmol/L)およびウシ胎児血清を5 vol%含むEagle's MEM培地(M05培地)を用いた。

細胞は, CO₂インキュベーター(37°C, 5%CO₂)内で培養した。

4. 細胞毒性試験

各試験施設は, 直接接触法および培地抽出法によるコロニー形成試験をそれぞれ3回, 異なる日に実施した。

4.1 直接接触法

24ウェルプレートのウェル底面に陰性対照材料(組織培養用プラスチックシート), セルデスクLF1および陽性対照材料(RM-B)をそれぞれ密着させ, MEM10培地に懸濁したV79細胞(10²個/mL)を各ウェルに0.5 mL(50個/ウェル)加えた。なお, 陰性対照として何も置かないウェルを無材料対照群とした。各群3ウェル用いた。

6日間培養後, 細胞をメタノールで固定し, ギムザ液で染色した。各ウェルのコロニー数を目視により計数し, コロニー数の平均値から無材料対照群のコロニー形成能(コロニー数/播種細胞数)および無材料対照群に対する各処理

群の相対コロニー形成率(%)を算出した。

4.2 培地抽出法

対照材料の重量に対し0.1 g/mLの割合になるようにM05培地を加え, CO₂インキュベーター中に24時間静置し, 得られた抽出液を抽出濃度100%の培地抽出原液とした。

抽出原液(100%)を新鮮なM05培地で希釈して種々の濃度の試験液(RM-A:0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10%, RM-B:20, 40, 50, 60, 80, 100%, RM-C:25, 50, 75, 100%)を調製し, 試験に用いた。なお, 培地抽出液は抽出終了後すみやかに試験に用いた。

抽出開始日にV79細胞をウェルあたり100個播種した。ウェルあたりのM05培地量は約2 mLとし, 各群3ウェル用いた。

播種翌日, 培地を除き, 各濃度の試験液(試験液濃度0%の陰性対照群については新鮮なM05培地)2 mLとそれぞれ交換し, 6日間培養した。

培養終了後, メタノールで固定し, ギムザ液で染色した。各ウェルのコロニー数を, 目視または多目的高速画像解析装置(型式: PCA-11, システムサイエンス)を用いて計測した。コロニー数の平均値から陰性対照群のコロニー形成能および陰性対照群に対する各処理群の相対コロニー形成率(%)を算出した。

RM-AおよびRM-Bについては, 50%を挟む2点の試験液濃度と相対コロニー形成率から回帰直線式を用いてIC₅₀値(コロニー形成を50%阻害する濃度)を算出した。

5. 実験成立条件

以下を満たした実験データのみを採用することとした。

- 1) 無材料対照群/陰性対照群のコロニー形成能が0.8~1.2である。
- 2) 陰性対照材料(培地抽出法の場合は100%濃度の試験液)の相対コロニー形成率が80~120%である。
- 3) 直接接触法の陽性対照材料RM-Bの相対コロニー形成率が0%で, 培地抽出法の陽性対照材料RM-AおよびRM-BのIC₅₀値がそれぞれ7%未満および80%未満である。

表1 セルデスクLF1 および 対照材料の直接接触法による V79 細胞を用いるコロニー形成試験結果

試験施設	実験No.	材料名	コロニー/ウェル					相対コロニー 形成率 (%)
			1	2	3	平均 ±	S.D.	
A	1	無材料対照(MEM10培地のみ)	37	50	38	41.7 ±	7.2	100.0
		陰性対照材料	43	46	46	45.0 ±	1.7	107.9
		セルデスク LF1	39	38	43	40.0 ±	2.6	95.9
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	2	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	47	44	48	46.3 ±	2.1	100.0
		陰性対照材料	49	43	42	44.7 ±	3.8	96.5
		セルデスク LF1	47	45	46	46.0 ±	1.0	99.4
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	3	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	57	57	56	56.7 ±	0.6	100.0
		陰性対照材料	47	54	53	51.3 ±	3.8	90.5
		セルデスク LF1	53	56	51	53.3 ±	2.5	94.0
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
B	1	無材料対照(MEM10培地のみ)	47	42	46	45.0 ±	2.6	100.0
		陰性対照材料	52	46	51	49.7 ±	3.2	110.4
		セルデスク LF1	47	54	47	49.3 ±	4.0	109.6
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	2	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	51	51	52	51.3 ±	0.6	100.0
		陰性対照材料	47	39	46	44.0 ±	4.4	85.8
		セルデスク LF1	46	48	53	49.0 ±	3.6	95.5
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	3	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	43	48	46	45.7 ±	2.5	100.0
		陰性対照材料	40	46	47	44.3 ±	3.8	96.9
		セルデスク LF1	46	49	53	49.3 ±	3.5	107.9
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
C	1	無材料対照(MEM10培地のみ)	48	46	50	48.0 ±	2.0	100.0
		陰性対照材料	49	46	47	47.3 ±	1.5	98.5
		セルデスク LF1	47	50	46	47.7 ±	2.1	99.4
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	2	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	54	49	51	51.3 ±	2.5	100.0
		陰性対照材料	50	50	47	49.0 ±	1.7	95.5
		セルデスク LF1	47	51	51	49.7 ±	2.3	96.9
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0
	3	無(陰性対照、MEM10培地のみ)	50	47	48	48.3 ±	1.5	100.0
		陰性対照材料	49	50	48	49.0 ±	1.0	101.4
		セルデスク LF1	51	50	49	50.0 ±	1.0	103.5
		陽性対照材料(RM-B)	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0

陰性対照材料：組織培養用プラスチックシート
 陽性対照材料(RM-B)：0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム
 S.D.：標準偏差

結果および考察

3試験施設による直接接触法の3回の実験結果を表1に示した。

新規陰性対照材料候補であるセルデスク LF1

の相対コロニー形成率は、3試験施設ともに陰性対照材料の実験成立条件である80~120%の範囲内の値を示し、各試験施設における3実験の平均値±標準偏差は、試験施設Aでは96.4±2.7%、

表2 対照材料の培地抽出法による V79 細胞を用いるコロニー形成試験結果

試験施設	群	実験成立の指標(基準)	実験No.			平均	±	S.D.
			1	2	3			
A	陰性対照(M05培地)	PE(0.8~1.2)	0.9	1.0	1.0	1.0	±	0.1
	陰性対照材料(RM-C)	RPE at 100%(80~120%)	103.9	92.6	85.3	93.9	±	9.4
	陽性対照材料(RM-A)	IC ₅₀ (7%未満)	1.5	1.7	1.2	1.5	±	0.3
	陽性対照材料(RM-B)	IC ₅₀ (80%未満)	54	52	45	50.3	±	4.7
B	陰性対照(M05培地)	PE(0.8~1.2)	1.0	1.0	1.0	1.0	±	0.0
	陰性対照材料(RM-C)	RPE at 100%(80~120%)	102.2	94.0	94.4	96.9	±	4.6
	陽性対照材料(RM-A)	IC ₅₀ (7%未満)	3.3	3.0	3.1	3.1	±	0.2
	陽性対照材料(RM-B)	IC ₅₀ (80%未満)	55	54	56	55.0	±	1.0
C	陰性対照(M05培地)	PE(0.8~1.2)	0.9	0.9	1.0	0.9	±	0.0
	陰性対照材料(RM-C)	RPE at 100%(80~120%)	111.4	108.0	95.8	105.1	±	8.2
	陽性対照材料(RM-A)	IC ₅₀ (7%未満)	1.5	1.5	0.7	1.2	±	0.5
	陽性対照材料(RM-B)	IC ₅₀ (80%未満)	54	45	45	48.0	±	5.2

陰性対照材料(RM-C)：高密度ポリエチレンフィルム

陽性対照材料(RM-A)：0.1% ZDEC 含有ポリウレタンフィルム

陽性対照材料(RM-B)：0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム

PE：コロニー形成能

RPE at 100%：100%試験液での相対コロニー形成率

S.D.：標準偏差

試験施設Bでは104.3 ± 7.7%，試験施設Cでは99.9 ± 3.3%であった。

また、各施設ともにすべての実験において、陰性対照材料であるRM-Cはコロニー形成を阻害せず、陽性対照材料であるRM-Bのコロニー形成率は0%となり、いずれも実験成立条件を満たした。

国内ガイダンスでは、直接接触法による細胞毒性試験は、抽出時に失活することが予想される材料および眼粘膜に接触する材料について、抽出法による細胞毒性試験に加えて実施すると記載されている。そこで、直接接触法に加え、抽出法による細胞毒性試験も実施した。

培地抽出法による対照材料の結果を表2にまとめた。

陰性対照材料であるRM-Cは85.3~111.4%の相対コロニー形成率を示し、3試験施設のいずれの実験においてもコロニー形成阻害作用は認められなかった。陽性対照材料であるRM-AおよびRM-B

のIC₅₀値は、それぞれ0.7~3.3%および45~56%であり、いずれも実験成立条件(RM-A：7%未満、RM-B：80%未満)、すなわち国内ガイダンスの基準を満たした。また、国内ガイダンスの参考情報に記載されているIC₅₀値の幅(RM-A：1~3%、RM-B：50~60%)と同程度の結果であった。

以上の結果から、3試験施設による3回の繰り返し実験は、国内ガイダンスで要求されている試験精度・感度で行われ、それらの試験施設で行われたすべての実験でセルデスクLF1は直接接触法でV79細胞のコロニー形成を阻害しなかった。したがって、セルデスクLF1は直接接触法の陰性対照材料として適切であることが示された。

文献

- 厚生労働省医薬食品局：「医療機器の製造販売承認申請等に必要生物学的安全性評価の基本的考え方について」, 2012