

LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究

Phase II QC 結果報告書

2023.02.10

実施者：山影康次

LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究に参加した 16 試験施設の phase II（施設内および施設間再現性確認）の試験資料について、「LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究計画」（Version 2.0、July 19th 2022）および「ヒト三次元培養皮膚 LabCyte EPI-MODEL24 を用いた医療機器抽出物の皮膚刺激性試験 国内 Round Robin Study 本試験用プロトコル Ver.1.1」をもとに quality check (QC) を実施した。

研究計画書に「この試験は非 GLP で実施」と記載されていること、ラウンドロビン研究であることから、試験結果の評価が主題であり、各操作を実施した記録の有無が重要であるという観点から、QC は試験記録の記載不備およびプロトコルからの逸脱の有無等に焦点をあてて確認した。なお、参考までに、QC 実施者として GLP 上の視点から気になった点も記載した。

<このラウンドロビン研究の資料作成に対する QC 実施者からの感想>

1. 研究計画について

Phase II 実施前の 2022.07.19 付けで version 2.0 が発行されているが、内容的にはこの研究開始時に作成したと推定される記載となっており、Phase II の研究計画作成時における時系列が曖昧という印象を持った。なぜなら、Phase II の研究計画作成時に終了している phase I(2021 年 1 月下旬～4 月上旬)の結果が研究計画のスケジュール表に記載されているのみであり、それ以外は計画なのか実施済なのか不明であった。

2. プロトコルについて

各試験施設の記録を確認した結果、気になる点の多くがプロトコルに添付されている記録用紙に関連していると考えられた。以下に確認された具体的事項を示したが、最低限の操作は実施された記録であること、また、時間の許容幅が大きいことから、いずれもプロトコルからの逸脱には該当していないと推察された。しかしながら、各試験施設の記載内容を踏まえると試験施設へのプロトコルの説明が十分であったか疑問が持たれた。

<具体的事項 1>

すべての試験施設がプロトコルの記録用紙と異なる試験記録を使用していた。その差異は最初の記録用紙（プロトコルの 17 ページ）に「実験スケジュール表」追加されている点および前培養の記録用紙以外の操作について、プレート毎に開始時間および終了時間を記載するように変更されている点であった。

研究計画では 2022 年 8 月からこの研究が開始されているが、8 月に実験を開始した 2 施設ではプロトコル通りの記録用紙と上記の点が追加・変更された記録用紙が混在していたことから、試験開

始途中でプロトコルの改定が行われたと考えられる。しかし、その記録がなく、プロトコルの記録管理が十分であったか疑問が持たれた。

<具体的事項 2>

マイクロピペットの点検については、プロトコル 18 ページの記録用紙に「本作業は試験の開始前に毎行行ってください」と記載されているが、毎日、操作前に点検を実施した試験施設は 2 施設のみであり、殆どは、各実験の抽出開始前に 1 度実施するのみであった。

<具体的事項 3>

前培養（15~30 hrs）、曝露（18±1 hr）について、時間範囲がプロトコルに規定されているが、記録用紙に記載されている時刻が施設間で異なっていた。具体的には、実験スケジュール表にはプレート毎（Saline、Sesame oil）に開始時刻と終了時刻を記載する欄があるが、プロトコル 22 ページの記録用紙には「開始日（時間）」と「終了日（時間）」の記入欄が各 1 箇所のためか、22 ページの記録用紙にプレート毎の時刻を記載する試験施設もあれば、実験スケジュールに 2 プレートとも同じ時刻を記載する施設、実験スケジュール表と 22 ページの記録用紙の時刻が一致しない試験施設、アッセイ培地の添加を開始した時刻と添加が終了した時刻と勘違いしたと思われる施設などが認められた。曝露時間についても、モデルに抽出液添加を開始した時刻を記載した試験施設ではプレート毎に異なる開始時刻を記載しているが、プロトコル 23 ページの記録用紙にある培養開始時間を記載した試験施設では、2 プレートとも同じ曝露開始時間を記載していた。また、実験スケジュール表の各操作の実施日欄が 1 つであるため、2 日間にまたがる操作について、日付の記載が施設間でばらばらであった。

<具体的事項 4>

抽出温度については、プロトコル 20 ページの試験液の調製の表に CO₂ インキュベータの情報を記載した試験施設については、37°C で抽出したと推察できたが、振盪器を使用した試験施設（試験施設 1、2、3、4、6、7、8、11、12、13）については、抽出温度を記載する欄がなく、抽出温度を確認できなかった。なお、試験施設 5 では振盪器をインキュベータにセットした写真が添付され、試験施設 9、14 および 15 では振盪器による抽出温度データが添付され、試験施設 10 では振盪器の設定温度が記載されていた。試験施設 16 では CO₂ インキュベータを使用し、攪拌による抽出を実施していた。

<具体的事項 5>

Excel の集計表の「Date」が測定日なのか、表作成日（データ入力日）なのか不明確であった。生データである OD 測定結果印刷日よりも前の日付で結果表が作成されている試験施設があり、日付による試験操作のトレースができなかった。

3. GLP 上の観点から

- ・ピペットの点検について、秤量値を入力して作成した表を添付した試験施設があったが、その表の正確性が判断できなかった。また、実際の秤量値ではなく、計算結果である % を表示した試験施設についても結果の正確性が判断できなかった。
- ・洗浄操作について、2 プレートほぼ同時刻に実施されていた試験施設があり、2 人で操作したと考えられたが、実施者の記入欄がなく、プレート毎の洗浄時刻の記載内容の正確性を判断できなかった。GLP の観点から考えると、実施者の記入欄があれば、その判断も容易であると考えられる。

- ・曝露（ 18 ± 1 hr）に関する記録用紙の記入欄は「○○○培養開始時間」および「○○○培養終了時間」となっていたが、実験スケジュール上2日間の作業となることは明確であるが、操作時間の記入欄だけではなく、日付記入欄も必要と思われた。殆どの試験施設は日付を記載していたが、日付の記載のない記録用紙も散見された。
- ・吸光度測定機器による測定結果の印刷データは生データと考えられることから、実行委員会側で作成された Excel 集計結果表以外に印刷データ(生データ)を試験資料に添付する必要があると思われる。添付されていない試験施設はわずかであったが、GLP 上は必須事項である。

<各施設の試験資料の QC 結果>

以下に試験施設毎の QC 結果を示した。なお、プロトコルの記録用紙の問題以外を記載した。

<試験施設 1>

- ・1回目の再試験(2023.01.09 抽出開始)において、使用期限(2022.12)を過ぎたゴマ油が使用されていた。

<試験施設 2>

- ・1回目の試験において、「5-1 前培養」の開始日と終了日が 2022.11.16 と同じ日であった。
- ・2回目の試験の 2022.11.24 に実施したピペット点検において、ポジティブディスプレイメントピペット用のピペット名が記載されているが、秤量値や計算値が記載されていなかった。
- ・2回目の試験の「試験液配置図：Layout」の試験試料名の記載の修正（2022.12.12 付けで“A”を”B”に修正）が3回の試験すべてが終了（2022.12.09）してから行われていた。
- ・1回目の試験の吸光度測定結果（生データ）が添付されていなかった(試験は不成立)。また、2回目および3回目の測定結果（生データ）は添付されていたが、Saline の結果なのか、Sesame oil の結果なのか確認できなかった。

<試験施設 3>

- ・ピペット点検の表に測定した蒸留水の重量ではなく、%が記載されていた。

<試験施設 4>

- ・プロトコルの記録用紙の指摘以外は特になし。

<試験施設 5>

- ・ピペット点検結果が表にまとめられていた。

<試験施設 6>

- ・冷蔵庫の温度が記録用紙(プロトコル、22 ページ)では「 $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 」となっているが、この施設では「 $1 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 」と記載されていた。
- ・ピペット点検において、2 mL の点検が実施されていなかった。また、ポジティブディスプレイメントピペットについては、900 μL および 300 μL 以外の 2 mL、200 μL 、100 μL について点検が実施

されていなかった。

- ・ 2 回目の試験以外の陽性対照の調製に関する記録用紙(プロトコル、21 ページ)において、調製液量が印字のみとなっており、調製が実施された記録であることが確認できなかった。
- ・ MTT 試験の plate1 と plate2 のインキュベート時間が同じ開始時刻、同じ終了時刻であった。

<試験施設 7>

- ・ 1 回目の試験の記録用紙(プロトコル、23 ページ)の培養開始時刻および培養終了時刻のチェック欄「□」がチェックされていなかった。
- ・ 2 回目の試験の記録用紙(プロトコル、20 ページ)の抽出前後の外観に「細胞が半透明」と記載されており、抽出液調製後の変化ではなく、曝露後の変化と思われる内容が記載されていた。
- ・ 再試験(1 回目)の記録用紙(プロトコル、20 ページ)の試験試料名に「'」がついないが、他の記録用紙の試験試料名にはそれが記載されており整合性がとれていなかった。
- ・ 各プレートの吸光度測定値の印刷結果(生データ)には 3 つのデータが存在していたが、それらがどの結果(570 nm、650 nm、換算値)を示しているか判断できなかった。

<試験施設 8>

- ・ 1 回目の試験の記録用紙(プロトコル、26 ページ)の 96 ウェルプレートの配置図に試験試料名が記載されておらず、結果表の入力値の正確性が確認できなかった。
- ・ 2 回目の試験の記録用紙(プロトコル、20 ページ)の試験液の調製の表に試験試料名が記載されていなかった。
- ・ 2 回目の記録用紙(プロトコル、23 ページ)の PLATE2 培養終了時間のチェック欄「□」がチェックされていなかった。
- ・ 吸光度測定結果(生データ)が添付されていなかったが、後日、3 回分の生データが提出された。

<試験施設 9>

- ・ プロトコルの記録用紙の指摘以外は特になし

<試験施設 10>

- ・ ポジティブディスプレイメントピペット用のピペット点検が行われていなかった。
- ・ MTT 試験の plate1 と plate2 のインキュベート時間が同じ開始時刻、同じ終了時刻であった。

<試験施設 11>

- ・ 試験液配置図の記録用紙(プロトコル、23 ページ)の培養開始時間および培養終了時間の日付および時刻は記載されていたが、チェック欄「□」のチェックがされていなかった。
- ・ 1 回目の記録用紙(プロトコル、24 ページ)の洗浄前の準備のチェック欄「□」がチェックされていなかった。
- ・ 3 回目の記録用紙(プロトコル、18 ページ)の B19 ピペットの 2 mL の秤量値の平均値に誤りがあった(2004.3 mg→2000.4 mg)。

<試験施設 12>

- ・1回目の試験以外の MTT 試験の plate1 と plate2 のインキュベート時間が同じ開始時刻、同じ終了時刻であった。

<試験施設 13>

- ・ピペット点検結果が表にまとめられていた。
- ・2回目の試験の記録用紙(プロトコル、24 ページ)の 18 ± 1 時間曝露後の外観異常がないのチェック欄「□」がチェックされていたが、備考欄に外観異常が記載されていた。
- ・MTT 試験の plate1 と plate2 のインキュベート時間が同じ開始時刻、同じ終了時刻であった。

<試験施設 14>

- ・1回目の試験の試験液配置図、PLATE2 の NC および VC のチェック欄「□」がチェックされていなかった。
- ・吸光度測定結果が添付されていたが、plate1(saline)と plate2(sesame oil)の識別ができなかった。

<試験施設 15>

- ・1回目の試験において、実験スケジュール表の前培養の実施日が 2022.12.14 日のみの記載であり、かつ、前培養の記録用紙(プロトコル、22 ページ)の開始時間および終了時間とも異なり、前培養における操作時刻の確認・推定ができなかった。
- ・ポジティブディスプレイメントピペット用のピペット点検が行われていなかった。
- ・1回目の記録用紙(プロトコル、22 ページ)の試験液の暴露のチェック欄「□」がチェックされていなかった。
- ・1回目の試験において、抽出時の Code name が「A583」であったが、試験液配置図および測定時のプレート配置図では「A538」となっていた。
- ・1回目の試験において、PLATE 2 の試験液配置図に記載された Code name が「A576-1」、「A938-1」となっており、ゴマ油抽出時の試験試料名と異なる Code name が記載されていた。また、測定時の PLATE 2 の配置図においても Code name が「A576-1」、「A938-1」、「A538-1」となっていた。
- ・1回目と2回目の試験において、MTT 試験の plate1 と plate2 のインキュベート時間が同じ開始時刻、同じ終了時刻であった。
- ・2回目の試験において、抽出時の試験試料名の Code name が生理食塩液およびゴマ油ともに「B442-1」、「B537-1」、「B972-2」であったが、生理食塩液の試験液の配置図では「B972-1」、ゴマ油の試験液の配置図では「B442-2」、「B537-2」、「B972-1」であった。さらに、測定時のプレート配置図では、「○○○○-1」、「○○○○-2」の記載ではなく、「○○○○」のみの記載であった。しかし、集計結果のエクセル表の配置図では、生理食塩液は「○○○○-1」、ゴマ油は「○○○○-2」と入力されていた。
- ・2回目の試験において、アッセイ培地のロット No.および使用期限の記載がなかった。また、その外観の異常の有無のチェックも行われていなかった。
- ・3回目の試験(2023.01.23 抽出開始)において、使用期限(2022.12)を過ぎたゴマ油が使用されていた。
- ・3回目の試験の測定時のプレート配置図において、PLATE 1 の Code name が抽出時の「C137-1」で

はなく「C173-1」と記載されていた。

<試験施設 16>

- ・吸光度測定結果が添付されていたが、(570 nm の吸光度－650 nm 吸光度)と思われる計算値のみであった。

<試験判定結果確認>

試験施設番号	試験 1	試験 2	試験 3	再試験 1
1 (安評)	×	○	○	ゴマ油使用期限切れ
2 (川澄)	×	○	○	○
3 (LSIM)	○	○	○	
4 (OLYMPUS)	○	○	○	
5 (SERI)	○	○	○	
6 (化合物安研)	○	○	○	
7 (鎌倉テクノ)	×	○	○	○
8 (シミック)	○	○	○	
9 (食薬センター)	○	○	○	
10(テルモ)	○	○	○	
11(日精バイリス)	○	○	○	
12(ニプロ)	○	○	○	
13(日本食品分析)	○	○	○	
14(日本バイオリ)	○	○	○	
15(ボゾリサーチ)	○	○	ゴマ油使用期限切れ	
16(薬物安全セ)	○	○	○	

<今後の提言>

今回の QC を踏まえ、今後の活動への提言を以下に示すので、参考にされたい。

- ・非 GLP で行うにしても、バリデーションにおいては記録の正確性が必要であり、GLP 精神で対応すべきと考える。一例として、試験結果に大きく影響を与える可能性のある機器については開発者より明示され、校正記録を取るべきである。
- ・試験実施に必要な器具等については、リストに挙げるだけでなく、参加施設に事前に使用方法を十分に説明すべきである。
- ・記録紙の記載方法についても、参加施設に事前に十分に説明し、あいまいな点があれば試験実施中でも修正するよう努めるべきである。その際修正履歴を残すべきである。

以上