

LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究報告書
Round robin study report to evaluate LabCyte EPI-MODEL24 as an in vitro
irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts

令和6年2月20日

LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究実行委員会

目次	
Appendix リスト.....	1
要旨.....	2
1. まえおき.....	3
2. 目的.....	4
3. ラウンドロビン研究計画.....	4
3.1 実行委員会	
3.2 プロトコル	
3.2.1 試験法の位置づけ	
3.2.2 試験法の原理	
3.2.3 試験手順の概要	
4. 試験試料.....	7
5. 過程と成功基準.....	7
5.1 トレーニング	
5.2 技術移転性	
5.3 施設内再現性	
5.4 施設間再現性	
6. データの品質確認.....	8
7. ラウンドロビン研究の結果.....	8
7.1 ラウンドロビン研究概要	
7.2 試験法の信頼性	
7.2.1 技術移転性	
7.2.2 施設内再現性	
7.2.3 施設間再現性	
7.3 試験法の正確性	
7.4 追加検討	
7.4.1 陽性対照物質である SDS の濃度検討	
7.4.2 ゴマ油の検討（欧州薬局方品および日本薬局方品の比較）	
7.5 品質確認	
8. 考察.....	14
8.1 ラウンドロビンラウンドロビン研究における本委員会の見解	
8.2 追加検討に対する本委員会の見解	
8.3 前報との比較	
8.4 結論	
謝辞.....	16
参考文献.....	17

Appendix リスト

1. 略号集
2. LabCyte _EPI-MODEL ラウンドロビン Phase II 研究計画_ver.2.2
3. 参加施設協力者氏名
4. J-TEC と参加施設で共同研究覚書ひな形
5. 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
6. 試験試料ブラインド化対応表
7. データ入力シート
8. 作業記録用紙
9. LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究 技術移転試験 (Phase I) 報告
10. 各施設からのデータ入力済シートおよび記録用紙
11. 生存率一覧
12. 統計グループ確認結果
13. Phase II で用いられた LabCyte EPI-MODEL の出荷記録
14. LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究 Phase II QC 結果報告書

要旨

医療機器の生物学的安全性評価において、刺激性評価は、生体と直接あるいは間接的に接触するすべての医療機器に必須の評価項目である。従来、医療機器の刺激性はウサギを用いた皮膚一次刺激性試験、皮内反応試験および眼刺激試験等の *in vivo* 試験により評価されていたが、近年、医療機器用の動物実験代替法の一つとして再構築ヒト表皮 (RhE) モデルを利用した *in vitro* 刺激性試験の有用性が示されたことから、国内外のガイダンスに当該試験法が記載された。株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリングが製造販売する LabCyte EPI-MODEL24 は、経済協力開発機構 (OECD) 試験法ガイドライン (TG) 439 (化学物質に対する *in vitro* 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験法) に記載されている RhE モデルの一つであるが、極性および非極性溶媒抽出により調製された試験液を適用する医療機器の評価試験への適用可否は十分には検証されていない。そこで、本研究では、当該モデルの医療機器の刺激性評価への適用可能性の検証を目的として、16 施設でのラウンドロビン研究を非優良試験所規範 (非 GLP) 下で実施した。

LabCyte EPI-MODEL24 の信頼性・正確性を確認するため、国際標準化機構 (ISO) 10993-23 に既に記載されている EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE における国際ラウンドロビン研究で使用された試験試料と同等の性質を有する材料 (1：生理食塩液 (生食) 抽出液およびゴマ油抽出液の両方で非刺激性と判定される材料、2：生食抽出液においてのみ刺激性と判定される材料、3：ゴマ油抽出液においてのみ刺激性と判定される材料、4：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で刺激性と判定される材料) の 4 試験試料を用いて 16 施設でラウンドロビン研究が行われた。各施設で 1 試験試料あたり 3 回試験を行った。このラウンドロビン研究において LabCyte EPI-MODEL24 の施設内再現性は、16 施設中 13 施設で 100%、1 施設で 87.5%であった (2 施設は判定より除外)。また、施設内再現性の基準を満たした 14 施設において、施設間再現性は 100%であった。正確性は、感度 100%、特異度 98.9%、正確度 99.5%であった。これら再現性および正確性の値は、本委員会 で定めた性能基準を満たし、ISO/TC 194 /WG 8 での国際ラウンドロビン研究と同等の性能を示した。

以上より、本委員会は、LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test for Medical Device Extracts は医療機器の抽出液中の刺激性を評価する方法として、再現性、正確性および予測性が高いと結論した。

1. まえおき

医療機器における再構築ヒト表皮（RhE）試験法は、RhE 組織に対する試験試料の細胞毒性を指標に皮膚刺激性を評価する試験法である。当該試験法の内容は、2020年に改訂された医療機器の生物学的安全性試験に関する国内ガイダンスである「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について（薬生機審発 0106 第 1 号）」の別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス、第 5 部 刺激性試験」に記載されている¹⁾。

一方、EpiDerm™ 皮膚刺激性試験（EpiDerm™ Skin Irritation Test for Medical Device Extracts: EpiDerm™ SIT）および SkinEthic™ RHE 皮膚刺激性試験（SkinEthic™ RHE Skin Irritation Test for Medical Device Extracts: SkinEthic™ RHE SIT）は、ISO/TC 194/WG 8（irritation, sensitization）が実施した国際ラウンドロビン研究による評価を経て RhE 法の検証済み標準法として ISO 10993-23 に記載されている^{2,3)}。ISO/TC 194/WG 8 は、新規 RhE 組織を用いた試験法を国際標準とするための要件として、1) 経済協力開発機構（OECD）試験法ガイドライン（TG）439 に記載済みの RhE 組織であること、2) 実施機関が 3 施設以上であること、且つ 3) 施設内再現性、施設間再現性および予測性が先述の国際ラウンドロビン研究と同等であることを要求している³⁾。

LabCyte EPI-MODEL24 は、株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング（J-TEC、日本）によって開発された日本製の培養表皮モデルであり、2013 年に OECD TG439 に記載されている⁴⁾。医療機器の場合、極性溶媒および非極性溶媒で抽出された試験液を用いて刺激性を評価することから、化学物質の刺激性試験法である TG439 のプロトコルを医療機器の評価用に改変する必要がある。そのため、既に国際標準化機構（ISO）10993-23 に記載されている EpiDerm™ SIT および SkinEthic™ RHE SIT のプロトコルを参考に LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験のプロトコルも医療機器の評価用に改変され、国際ラウンドロビン研究で使用された試験試料を用いて医療機器用プロトコルの妥当性が検証された⁵⁾。当該プロトコルによる技術移転（Phase I）を経て、施設内および施設間の再現性評価のための試験が実施された（Phase II）。

本報告書は、Phase II のバリデーション結果をもとに、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた医療機器の皮膚刺激性試験の評価を行ったものである。

なお、本ラウンドロビン研究では陽性対照物質である Sodium Dodecyl Sulfate（SDS）の濃度検討および抽出溶媒のゴマ油の検討（欧州薬局方および日本薬局方の比較）も実施した。

2. 目的

ラウンドロビン研究 Phase I の目的は本試験法の技術移転であり、参加施設がリードラボ (J-TEC) と同等の結果が出せるかを判断した。Phase II では、本試験法の施設内および施設間の再現性を評価した。

3. ラウンドロビン研究計画

研究開始にあたり、添付 (Appendix 2) の計画に基づいて、施行した。概要を以下に示す。

3.1 実行委員会

本ラウンドロビン研究の遂行にあたり、以下の組織を置いた。

表 1. LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究管理メンバー

氏名	役割と専門分野	所属
実行委員長 加藤 玲子	ラウンドロビン研究管理 実行委員長	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 (DMD)
リードラボ 畠中 内子 三竹 博道	試験法開発者およびスポンサー	株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング (J-TEC)
小島 肇	刺激性試験専門家	国立医薬品食品衛生研究所 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM)
足利 太可雄	記録管理者	国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM
寒水 孝司	生物統計家	東京理科大学 工学部 情報工学科
宮島 敦子	試験試料管理者	国立医薬品食品衛生研究所 DMD
山本 栄一	スポンサー	国立医薬品食品衛生研究所 DMD

以下に各役割の内容を記す。

1) ラウンドロビン研究実行委員長

ラウンドロビン研究の運営を主導・管理した。計画の立案、予算、スケジュール、実行委員会の管理および記録管理を行い、ラウンドロビン研究報告書を作成した。

2) リードラボ

試験法の標準作業書および記録用紙を提供するとともに、ラウンドロビン研究の Phase 毎の計画案を作成した。

ラウンドロビン研究期間中は、参加施設に対して技術的な支援を行った。

実行委員会に以下のサブグループを組織した。

3) 試験試料管理グループ

Phase 毎の目的に合わせ、リードラボ、試験試料配布者および専門家で協議して試験試料を選択し、作製および配布した。

4) 統計解析グループ

すべてのデータを管理し、統計解析を行った。統計学の専門家および DMD が対応した。

5) 記録管理グループ

すべての試験記録を確認し、保管した。JaCVAM と DMD が対応した。

6) スポンサー

掛かる費用は、DMD とリードラボと参加施設で協議の上、負担した。

7) 参加施設

表 2 に参加施設を示す。すべての参加施設の中で、参加施設の代表のみがラウンドロビン研究実行委員会に含まれる。参加全員の氏名を Appendix 3 に示す。ラウンドロビン研究期間中、J-TEC と参加施設で共同研究覚書を交わした（ひな形：Appendix 4）。

表 2. 参加施設

施設番号	施設名
1	株式会社安評センター
2	SBカワスミ株式会社
3	株式会社LSIM安全科学研究所
4	オリンパスメディカルシステムズ株式会社
5	一般財団法人化学物質評価研究機構
6	株式会社化合物安全性研究所
7	株式会社鎌倉テクノサイエンス
8	シミックファーマサイエンス株式会社
9	一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
10	テルモ株式会社
11	日精バイリス株式会社 滋賀研究所
12	ニプロ株式会社
13	一般財団法人日本食品分析センター
14	株式会社日本バイオリサーチセンター
15	株式会社ボゾリサーチセンター
16	株式会社薬物安全性試験センター

3.2 プロトコル

リードラボが開発した「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」(Appendix 5)を用いた。ラウンドロビン研究の過程で、当該研究実行委員会の協議を経て改訂された。

3.2.1 試験法の位置づけ

RhE 試験法は、医療機器の抽出液中の刺激性物質を検出するために用いる試験法である。

3.2.2 試験法の原理

RhE 試験法は、ケラチノサイトが刺激性物質に刺激されると細胞が損傷し細胞生存率が低下することを利用し、細胞生存率を指標として刺激性を評価する方法である。RhE 組織は、ヒト正常表皮細胞を重層培養した市販の RhE 組織 (LabCyte EPI-MODEL24) を用いる。陽性対照 (1% SDS)、陰性対照 (Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液 (DPBS))、溶媒対照 (生理食塩液 (生食) もしくはゴマ油)、および試験試料の抽出液 (生食もしくはゴマ油抽出) からなる試験液を LabCyte EPI-MODEL24 に暴露した後、MTT 法により算出した細胞生存率をエンドポイントとして用いる。細胞生存率が陰性対照と比較して 50%を超えた場合、非刺激性と判定する。

3.2.3 試験手順の概要

LabCyte EPI-MODEL24 SIT の手順を以下に示す。使用する RhE 組織 LabCyte EPI-MODEL24 は J-TEC 社より購入した。

1) 試験液 (試験試料の抽出液) の適用

1 試験試料あたり 3 RhE 組織を用いた。試験液は、試験試料を生食もしくはゴマ油を用いて、37°C (±1°C) で 72 時間 (±2 時間) 抽出して調製した。試験液は抽出後、24 時間以内に使用した。LabCyte EPI-MODEL24 に 100 µL の試験液を適用し、37°C で 18 時間 (±1 時間) 培養した。その後、(D)PBS で 10 回以上洗浄して、試験液を除去した。

なお、陽性対照には 1% SDS、陰性対照には DPBS を用いた。

2) 細胞生存率の算出

細胞生存率算出には MTT 法を用いた。洗浄の後、RhE 組織を 0.3 mL の MTT 溶液 (1 mg/mL) 中で 3 時間 (±5 分) 標準培養条件下で反応させた。その後、RhE 組織を 0.5 mL のイソプロパノール溶液に 2 時間以上浸漬してホルマザンを抽出し、OD 測定 (OD 570nm-OD 650nm) を行い定量した。

3) 試験成立条件

以下の条件をすべて満たした場合、試験の成立を承認した。

吸光度値： $0.7 \leq$ 陰性対照の吸光度測定値平均 ≤ 2.5

陽性対照：1% SDS（陽性対照）の生細胞率 < 40%

陰性対照・陽性対照を含む各試験液の生細胞率 SD ≤ 20%

溶媒対照：陰性対照の 80% < 溶媒対照の平均生細胞率 < 陰性対照の 120%

4) 判定基準

生細胞率 ≤ 50% 刺激性

生細胞率 > 50% 非刺激性

4. 試験試料

本ラウンドロビン研究では、目的に準じて以下の表 3 に示す規模の試験試料を用いた。試験試料の選択は、試験試料管理グループで行った。これまでに刺激性を有すると報告されている刺激性物質を含有する材料を試験試料として使用した。なお、刺激性物質は、刺激性の反応性、物性バランス、費用などを考慮して、選択した。試験試料は、DMD で作製し、コード化して参加施設に配布した（Appendix 6）。

表 3. ラウンドロビン研究における各試験での試験計画の概要

研究	試験試料	試験数	取得する情報
Phase I	2 coded	1	施設の技術移転の可否
Phase II	4 coded	3	施設内および施設間の再現性

Phase I の試験試料には、1：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で非刺激性と判定される材料（PVC + 0.9% Genapol X-080 (Y-3)）と 2：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で刺激性と判定される材料（PVC + 5.8% Genapol X-080 (Y-4)）の 2 材料を用いた。なお、Y-3 は先行研究での LabCyte EPI-MODEL24 を用いた生存率を元にした刺激性評価において、生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で陰性対照と同等の結果を与えることが確認されている⁵⁾。よって Y-3 を両溶媒抽出で非刺激性と判定される材料として取り扱った。

Phase II の試験試料には、国際ラウンドロビン研究で使用された試験試料と同等の性質を有する材料（1：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で非刺激性と判定される材料（Polyvinyl Chloride (PVC)）、2：生食抽出液においてのみ刺激性と判定される材料（PVC + 10% SDS）、3：ゴマ油抽出液においてのみ刺激性と判定される材料（PVC + 30% Heptanal）、4：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で刺激性と判定される材料（PVC + 5.8% Genapol X-080 (Y-4)）の 4 材料を用いた。

5. 過程と成功基準

5.1 トレーニング

リードラボは全参加施設が集う日程を決め、本試験法のトレーニングを行った。なお、当該トレーニングはビデオトレーニングで実施された。

5.2 技術移転性

Phase I として、参加施設がリードラボと同等の結果が出せるかを判断した。コード化した 2 試験試料を用いて、設定した基準を満たした場合を成功とした。

5.3 施設内再現性

Phase II では、4 試験試料を 2 つの溶媒で抽出した計 8 試験液、3 回分の計 24 試験液を用いた。試験デザインは試験試料管理グループで決定した。

施設内再現性を満たすと判断する基準は、別々に実施した 3 回の試験で、8 つの試験液の判定（刺激性または非刺激性）の一致率が 87.5% (7/8) 以上とした。

一致率の分母は試験する試験液の数である。一致率の分子は次の手順で計算した。

- 1) 試験液毎に 3 回の判定が 3 回とも一致するとき、その試験液について判定が一致したとした。
- 2) 1) の手順で判定が一致した試験液の数を一致率の分子とした。

5.4 施設間再現性

施設内再現性の基準を満たした施設の施設間再現性を満たすと判断する基準は、8 つの試験液の判定（刺激性または非刺激性）の一致率が 75% (6/8) 以上とした。

一致率の分母は試験する試験液の数である。一致率の分子は次の手順で計算した。

- 1) 施設毎に 1 つの試験液に対する 3 回の判定の最頻値（2 回以上の頻度で得られた判定）をその試験液の最終判定とした。
- 2) 試験液毎に、適合施設中の 85%（例えば 16 施設中 14 施設）以上で最終判定が一致するときに、その試験液について判定が一致したとした。
- 3) 2) の手順で最終判定が一致した試験液の数を一致率の分子とした。

6. データの品質確認

当該研究は非優良試験所規範（非 GLP）下で実施されるが、試験に参加した施設は GLP に準じて、試験に関するすべてのデータを残し（Appendix 7）、記録用紙（Appendix 8）を各施設の試験責任者が確認した後、当該研究実行委員長および JaCVAM に提出した。

7. ラウンドロビン研究の結果

7.1 ラウンドロビン研究概要

表 2 に示す 16 施設（受託機関：12 施設、医療機器メーカー：4 施設）で LabCyte EPI-MODEL24 SIT のラウンドロビン研究を実施した。これら 16 施設はラウンドロビン研究の前に技術移転性の確認を行った試験に参加した施設である。すべての試験試料はコード化され各施設に配布された。試験はすべての試験試料について、16 施設で 3 回実施された。

7.2 試験法の信頼性

7.2.1 技術移転性

技術移転性については、ラウンドロビンの実施前に行われた 16 施設が参加した試験で検討され、すべての施設において、試験成立条件を満たした上で、1：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で非刺激性と判定される材料および 2：生食抽出液およびゴマ油抽出液の両方で刺激性と判定される材料のそれぞれの試験試料に対し、期待される判定結果を得ることができた。抽出操作も含め、一連の技術移転は完了したと結論した。

詳細な結果は、LabCyte EPI-MODEL24 ラウンドロビン研究 技術移転試験（Phase I）報告（Appendix 9）に示す。

7.2.2 施設内再現性

4 物質の 16 施設における結果を図 1-4 に示す。以下の結果は、各施設の結果（Appendix 10）をもとに、一覧化（Appendix 11）され、統計解析グループで確認された総括（Appendix 12）をもとに作成された。

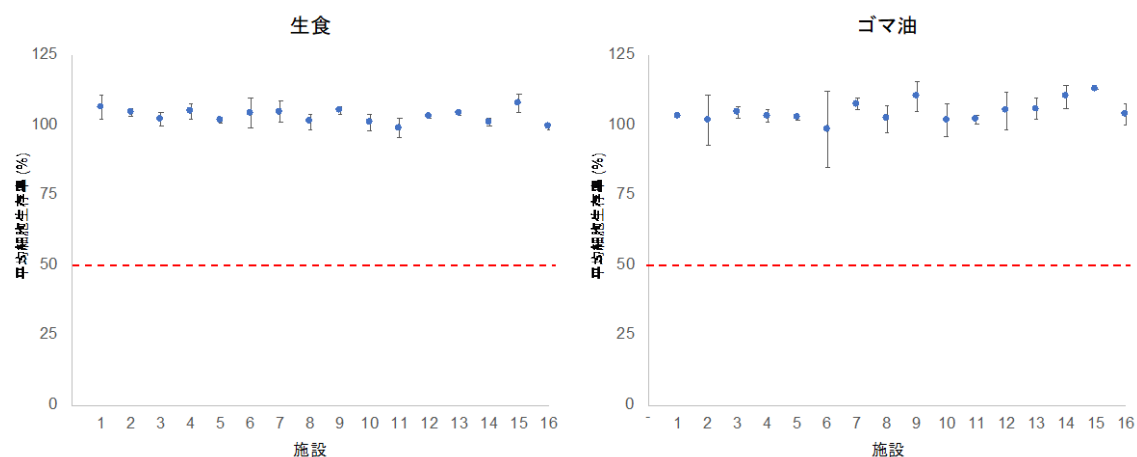


図 1. PVC の結果

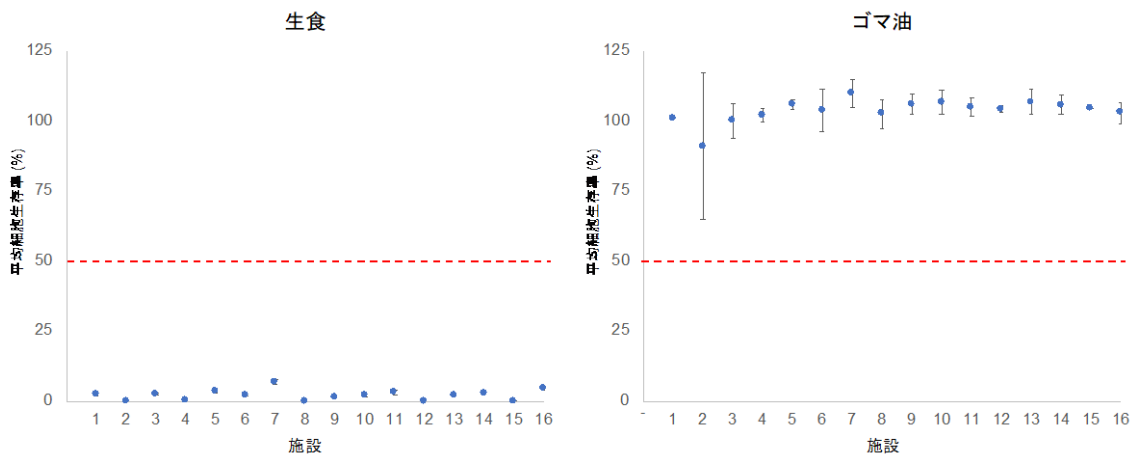


図 2. PVC + 10% SDS の結果

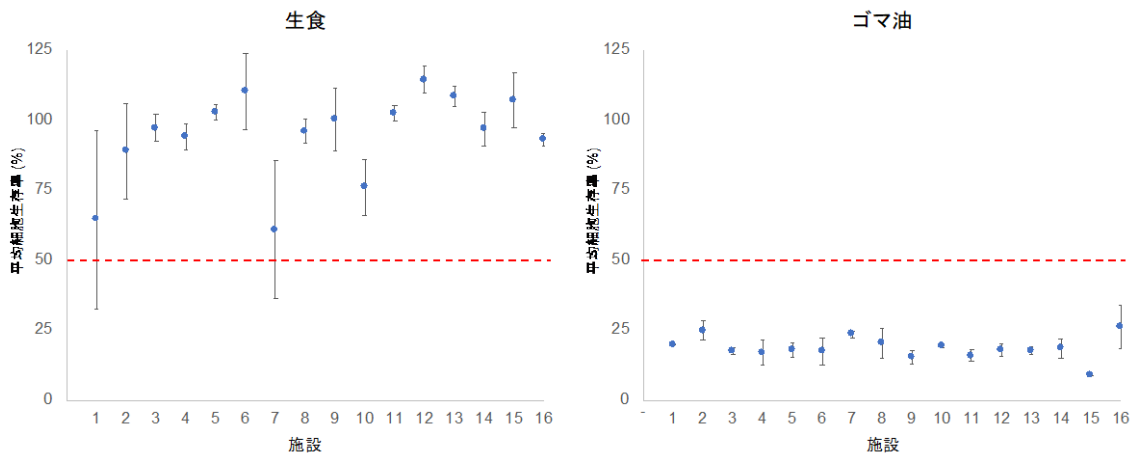


図 3. PVC + 30% Heptanal の結果

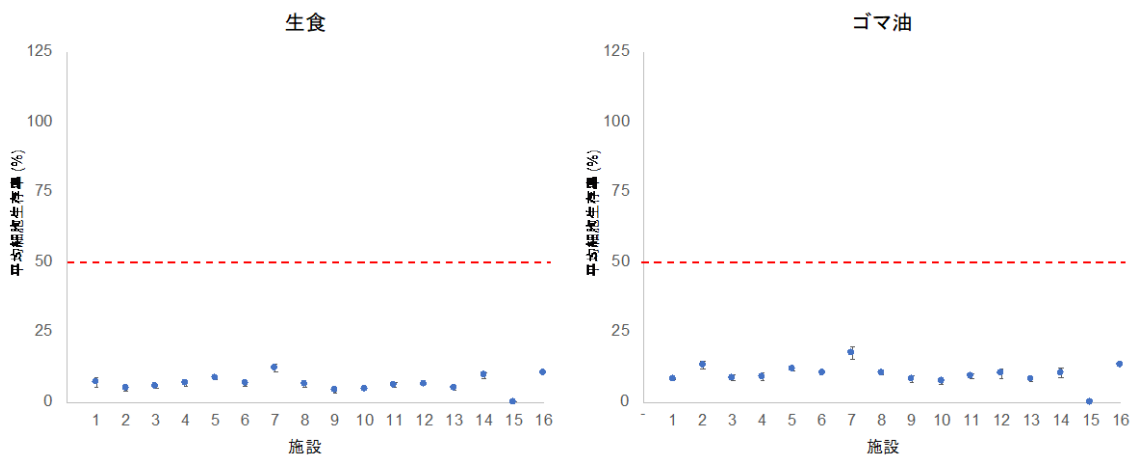


図 4. Y-4 の結果

施設毎の施設内再現性を表 4 に示す。施設 1 と施設 15 の 3 回目の試験において、1：定めていた試験期間内（2022.12）に終了できなかったこと、そのため 2：両施設に配布されていた欧州薬局方品のゴマ油の品質保証期限（2022.12）を超えたことから、結果の判定から除外した。なお、両施設のゴマ油抽出の試験結果はすべて期待される判定と一致していた。それ以外の 14 施設においては、設定していた施設内再現性を満たすと判断する基準である 87.5%（7/8）を満たしていた。また、14 施設の一致率の平均は 99.1%であった。

なお、国際ラウンドロビン研究における EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE における一致率の平均は、それぞれ 92.2%、94.7%であった²⁾。

表 4. 施設毎の施設内再現性

施設番号	結果の一致		
	生食抽出 サンプル	ゴマ油抽出 サンプル	合計
1*	(3/4)	(4/4)	(7/8)
2	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
3	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
4	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
5	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
6	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
7	3/4 (75%)	4/4 (100%)	7/8 (87.5%)
8	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
9	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
10	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
11	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
12	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
13	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
14	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
15*	(3/4)	(4/4)	(7/8)
16	4/4 (100%)	4/4 (100%)	8/8 (100%)
平均	55/56 (98.2%)	56/56 (100%)	111/112 (99.1%)

* 施設 1 と施設 15 は施設内再現性の基準を満たしていないことにより評価から除外した

7.2.3 施設間再現性

施設内再現性の基準を満たした 14 施設において、施設間再現性は 100%（8/8）であった（表 5）。なお、国際ラウンドロビン研究における EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE の施設間再現性はそれぞれ、92.8%、94.6%であった²⁾。加えて、LabCyte EPI-MODEL24 の判定の予測性は 100%であった（表 5）。なお、国際ラウンドロビン研究における EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE の予測性はそれぞれ、95.5%、100%であった。

表 5. 施設毎の最終判定と各試験試料の判定

施設番号	生食抽出															
	PVC				PVC + 10% SDS				PVC + 30% Heptanal				PVC + 5.8% Genapol X-080 (Y-4)			
	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定
1	102.82	105.38	111.32	非刺激性	2.42	1.62	3.09	刺激性	101.01	41.54	51.01	非刺激性	8.54	5.22	7.63	刺激性
2	102.87	104.87	106.03	非刺激性	0.00	0.05	0.03	刺激性	101.83	95.67	69.60	非刺激性	4.58	4.36	6.31	刺激性
3	103.56	103.46	99.22	非刺激性	2.04	2.56	2.44	刺激性	102.55	93.60	95.48	非刺激性	6.17	5.47	4.89	刺激性
4	108.27	102.57	103.88	非刺激性	1.14	0.00	0.00	刺激性	95.47	88.93	97.81	非刺激性	7.69	6.23	5.82	刺激性
5	101.34	100.88	102.40	非刺激性	4.12	2.98	3.04	刺激性	99.58	105.09	103.67	非刺激性	8.69	8.12	8.80	刺激性
6	99.67	110.00	103.47	非刺激性	1.66	2.32	1.94	刺激性	97.79	124.97	108.78	非刺激性	5.50	6.76	7.45	刺激性
7	107.32	106.25	100.45	非刺激性	7.88	6.54	6.06	刺激性	87.51	38.67	56.38	非刺激性	12.98	12.93	10.47	刺激性
8	98.67	103.89	101.21	非刺激性	0.01	0.00	0.00	刺激性	100.61	91.94	95.67	非刺激性	5.20	6.75	6.69	刺激性
9	104.91	106.71	104.04	非刺激性	1.39	1.27	1.77	刺激性	95.65	92.28	112.83	非刺激性	3.09	4.68	4.39	刺激性
10	101.00	98.10	104.04	非刺激性	1.36	1.98	2.37	刺激性	69.67	87.47	70.97	非刺激性	5.01	4.45	4.45	刺激性
11	94.99	101.22	100.41	非刺激性	2.01	3.78	3.17	刺激性	103.22	105.06	99.39	非刺激性	6.15	6.98	5.35	刺激性
12	102.57	104.00	102.86	非刺激性	0.00	0.00	0.00	刺激性	109.36	118.92	115.15	非刺激性	6.18	6.10	6.46	刺激性
13	104.98	104.48	103.36	非刺激性	1.90	2.16	1.96	刺激性	105.21	108.27	112.14	非刺激性	4.15	4.97	5.24	刺激性
14	101.00	102.60	99.80	非刺激性	2.42	2.96	3.12	刺激性	92.61	103.61	94.63	非刺激性	10.00	8.59	9.85	刺激性
15	110.13	105.61	ND*	非刺激性	0.00	0.00	0.19	刺激性	101.26	118.48	101.89	非刺激性	0.15	0.00	0.05	刺激性
16	98.70	99.35	100.60	非刺激性	3.71	5.06	5.10	刺激性	94.65	90.55	93.91	非刺激性	10.14	11.23	10.08	刺激性
				一致				一致				一致				一致

施設番号	ゴマ油抽出															
	PVC				PVC + 10% SDS				PVC + 30% Heptanal				PVC + 5.8% Genapol X-080 (Y-4)			
	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定	1回目	2回目	3回目	最終判定
1	101.63	104.86	ND**	非刺激性	98.82	103.22	ND**	非刺激性	27.83	11.24	ND**	刺激性	8.16	8.30	ND**	刺激性
2	109.93	103.22	91.95	非刺激性	107.62	104.75	60.84	非刺激性	28.71	23.09	22.51	刺激性	12.08	12.72	14.74	刺激性
3	102.26	106.36	104.96	非刺激性	106.94	94.14	99.20	非刺激性	17.52	16.45	18.61	刺激性	9.73	7.96	8.26	刺激性
4	105.85	102.91	101.17	非刺激性	104.94	101.61	99.92	非刺激性	12.35	21.51	16.97	刺激性	10.21	7.75	8.96	刺激性
5	103.53	101.84	102.75	非刺激性	105.01	104.78	108.07	非刺激性	20.20	15.19	18.03	刺激性	12.16	11.35	11.44	刺激性
6	93.66	113.98	87.94	非刺激性	97.68	112.27	101.46	非刺激性	13.04	16.47	22.65	刺激性	10.48	10.31	10.53	刺激性
7	106.17	106.79	109.86	非刺激性	105.44	109.29	115.45	非刺激性	24.81	22.71	23.00	刺激性	19.62	15.41	17.18	刺激性
8	107.69	97.87	101.22	非刺激性	108.32	98.17	101.49	非刺激性	14.63	21.20	25.47	刺激性	9.76	11.06	10.10	刺激性
9	111.25	115.06	104.61	非刺激性	101.75	107.75	108.20	非刺激性	13.46	18.01	14.43	刺激性	7.09	9.02	8.88	刺激性
10	96.50	100.73	108.30	非刺激性	103.50	105.35	111.50	非刺激性	18.88	20.04	19.23	刺激性	7.57	8.14	6.25	刺激性
11	102.44	103.24	100.15	非刺激性	108.61	103.54	102.55	非刺激性	14.29	15.06	18.07	刺激性	8.78	10.20	9.31	刺激性
12	97.98	110.70	106.70	非刺激性	104.90	105.08	102.91	非刺激性	15.33	18.96	19.47	刺激性	9.43	11.89	9.18	刺激性
13	101.59	106.48	109.15	非刺激性	103.37	105.27	111.85	非刺激性	18.05	16.30	18.61	刺激性	7.33	8.53	8.78	刺激性
14	107.87	115.06	107.84	非刺激性	107.76	107.75	101.76	非刺激性	15.17	18.01	22.13	刺激性	12.32	9.02	10.18	刺激性
15	114.17	111.88	ND**	非刺激性	118.56	90.92	ND**	非刺激性	18.16	0.00	ND**	刺激性	0.00	0.00	ND**	刺激性
16	102.44	100.65	108.51	非刺激性	98.89	104.13	106.14	非刺激性	28.10	17.30	33.09	刺激性	12.80	13.88	13.42	刺激性
				一致				一致				一致				一致

施設 1 と施設 15 は施設内再現性の基準を満たしていないことにより評価から除外した

* 施設 15 の PVC の 3 回目の生食抽出は SD が 20.08 であった

**施設 1 と施設 15 は 3 回目の試験のゴマ油の使用期限が切れていた

7.3 試験法の正確性

正確性の評価には 16 施設で行われた全試験のデータを用いた。その結果、感度 100%、特異度 98.9%、正確度 99.5%であった。なお、国際ラウンドロビン研究における EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE の総合正確度は 97.4%であった²⁾。

表 6. 感度、特異度および正確度

施設番号	生食抽出						ゴマ油抽出						総合					
	感度		特異度		正確度		感度		特異度		正確度		感度		特異度		正確度	
1*	6/6	100%	5/6	83.3%	11/12	91.7%	4/4	100%	4/4	100%	8/8	100%	10/10	100%	9/10	90.0%	19/20	100%
2	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
3	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
4	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
5	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
6	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
7	6/6	100%	5/6	83.3%	11/12	91.7%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	11/12	91.7%	23/24	100%
8	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
9	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
10	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
11	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
12	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
13	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
14	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
15 ^{*,#}	6/6	100%	5/5	100%	11/11	100%	4/4	100%	4/4	100%	8/8	100%	10/10	100%	9/9	100%	19/19	100%
16	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	6/6	100%	6/6	100%	12/12	100%	12/12	100%	12/12	100%	24/24	100%
平均	96/96	100%	93/95	97.9%	189/191	99.0%	92/92	100%	92/92	100%	184/184	100%	188/188	100%	185/187	98.9%	373/375	99.5%

*施設 1 と施設 15 はゴマ油の使用期限が切れていた 3 回目の試験結果を除外した

#施設 15 における 3 回目の PVC の生食抽出の SD が 20.08 であることから試験結果を除外した

7.4 追加検討

7.4.1 陽性対照物質である SDS の濃度検討

国際ラウンドロビン研究では陽性対照物質（平均細胞生存率 < 40%）として 1% SDS が使用されていたことから、ISO 10993-23 においても 1% SDS が陽性対照物質として記載されている。しかしながら、当該方法での 18 時間暴露では RHe 組織が過度に損傷し、形態を保持できないことから、より低濃度で陽性対照としての基準を満たす濃度を探ることを目的とし、1% SDS に加えて、0.5%および 0.3% SDS 処理の検討を実施した。その結果、図 5 に示すように 0.3% SDS も 1% SDS と同等の細胞生存率であることが示され、LabCyte EPI-MODEL24 SIT では、陽性対照物質を 0.3% SDS に変更しても支障がない、と本委員会では考える。

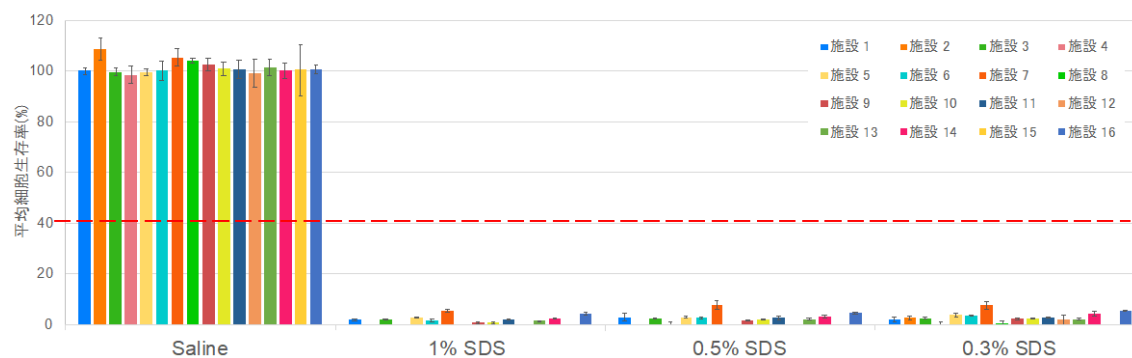


図 5. SDS 濃度検討

7.4.2 ゴマ油の検討（欧州薬局方品および日本薬局方品の比較）

国際ラウンドロビン研究では欧州薬局方品であるシグマ社製 Sesame oil（Cat No.850667）を使用していたが、本研究では国内研究であることから日本薬局方品である小塚製薬株式会社製のゴマ油との比較検討を実施した。その結果、図 6 および表 7 に示すように、どの試験試料においても両者の細胞生存率に有意な差は認められなかった。故に、LabCyte EPI-MODEL24 SIT では、抽出溶媒としてのゴマ油は欧州薬局方品もしくは日本薬局方品のどちらを使用しても支障がない、と本委員会は考える。

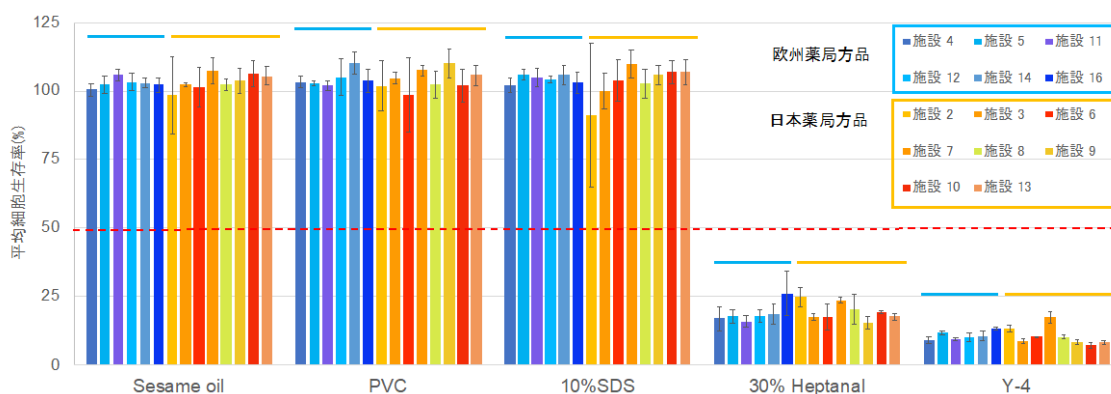


図 6. ゴマ油の検討（欧州薬局方品および日本薬局方品の比較）

表 7. ゴマ油の検討（欧州薬局方品および日本薬局方品の比較）

試験試料	平均細胞生存率 (%)	
	欧州薬局方品	日本薬局方品
Sesame oil	102.9	103.4
PVC	104.5	104.1
PVC + 10% SDS	104.4	103.4
PVC + 30% Heptanal	18.8	19.5
PVC + 5.8% Genapol X-80	10.7	10.5

7.5 品質確認

記録管理者はすべての記録用紙を確認し、不明な点があれば問い合わせ、相互で確定したデータのみを解析に用いた（Appendix 10-13）。よって、データの質は確保されていると判断した（Appendix 14）。

8. 考察

8.1. ラウンドロビン研究に対する本委員会の見解

LabCyte EPI-MODEL24 SIT のラウンドロビン研究の結果、本試験法の再現性、正確性および予測性は、本委員会が定めた性能基準を満たし、ISO/TC 194/WG 8 における国際ラウ

ンドロビン研究と同等の性能が示された。以上の結果より、LabCyte EPI-MODEL24 SIT も他の2つの RhE モデルを利用した方法と同様に医療機器の抽出液中の刺激性物質検出する方法として活用できる、と本委員会は考える。

8.2. 追加検討に対する本委員会の見解

今回の追加研究により、LabCyte EPI-MODEL24 は、1) 0.3% SDS を陽性対照物質として利用可能である、2) 抽出溶媒に用いるゴマ油として、欧州薬局方品および日本薬局方品は共に利用可能である、と本委員会は結論づける。

8.3. 前報との比較

今回の LabCyte EPI-MODEL24 の結果より、国際ラウンドロビン研究で検証された EpiDerm™ および SkinEthic™ RHE と同等であることが示された。

8.4 結論

LabCyte EPI-MODEL24 SIT は医療機器の抽出液中の刺激性を評価する方法として、再現性、正確性および予測性が高いと結論した。

謝辞

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成（助成番号 18mk0102116）、厚生労働科学研究費補助金（助成番号 22KC5003, 23KC5001）の助成を受けた。

参考文献

1. 令和2年1月6日付け薬生機審発0106第1号：厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について」 別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス、第5部 刺激性試験」
2. H. W. De Jong et al., *Toxico. in Vitro.* 50, 439–447 (2018)
3. ISO 10993-23:2021 Biological evaluation of medical devices. Part 23: Tests for irritation
4. OECD (2021) Test Guideline 439. In vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method.
5. R. Kato et al., *Toxico. in Vitro.* 68, 104919 (2020)