

# オゾンナノバブル水の 培養細胞を用いる細胞毒性試験

試験機関：一般財団法人 日本食品分析センター

## 【試験目的】

検体について、「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」（令和2年 薬生機審発 0106 第1号）の別途「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」及びISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity に従い、V79細胞を用いて細胞毒性試験を行う。

## 【試験方法】

### 1) 細胞の種類及び培養条件

細胞	細胞名：V79(チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞) 入手先：国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (JCRB細胞バンク)
継代時の培地 (MEM10培地)	Eagle's Minimum Essential Medium カナマイシン(60 mg/L)及び牛胎児血清(10 vol%)含有
培養条件	温度：37℃ CO <sub>2</sub> 濃度：5%

### 2) 試験実施時の培地、血清及び培養容器

培地(M05培地)	Eagle's Minimum Essential Medium 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム(1 mmol/L)、 カナマイシン(50 mg/L)及び牛胎児血清(5 vol%)含有
培養容器	組織培養用プラスチックプレート24穴

### 3) 陽性対照物質

名称	製造元
Zinc dibutyldithiocarbamate(ZDBC)	富士フイルム和光純薬株式会社

#### 4) 試験液の調製

##### ① 細胞毒性試験

検体を10倍濃縮のPBS(-)と9:1の割合(容量)で混合したものを調製し、これを濃度100%の試験原液とした。この試験原液を、PBS(-)を用いて以下のように希釈し、計12濃度の検体試験液を調製した。また、陰性対照試験液としてPBS(-)を、ブランクコントロールとしてM05培地を用いた。

調製した検体試験液の濃度

0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 60, 80及び100%

##### ② 感度確認試験

細胞毒性試験に使用する試験系について、陽性対照物質(ZDBC)を用いた感度の確認試験を同時に行った。

陽性対照物質は、ジメチルスルホキシドを用いて1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に溶解し、陽性対照物質調製液とした。M05培地を用いて陽性対照物質調製液を適宜希釈し、以下の濃度の試験液を調製した。

陽性対照物質：0.5, 1及び2  $\mu\text{g}/\text{mL}$

また、陰性対照試験液として、M05培地に5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ となるようジメチルスルホキシドを添加したものを、ブランクコントロールとしてM05培地を用いた。

#### 5) 試験操作法

単層に増殖したV79細胞を0.05%トリプシン処理によりはく離し、M05培地を用いて100個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プラスチックプレートの各ウェルに0.5 mLずつ播種し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で約6時間培養した後、以下の方法で試験を実施した。

##### ① 細胞毒性試験

培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してからM05培地を除き、各濃度の検体試験液、陰性対照試験液及びブランクコントロールを各々4個のウェルに0.5 mLずつ加え、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で30分間培養した。培養後、すべてのウェルを新しいM05培地に交換し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウェルを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、0.1%メチレンブルー溶液で染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

##### ② 感度確認試験

培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してからM05培地を除き、各濃度の陽性対照物質試験液、陰性対照試験液及びブランクコントロールを各々3個のウェルに0.5 mLずつ加え、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウェルを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、0.1%メチレンブルー溶液で染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

## 【判定基準】

- ・ 最高濃度におけるコロニー形成率が 70%以上：細胞毒性を示さない
- ・ 最高濃度におけるコロニー形成率が 70%以下：細胞毒性を示す

## 【試験結果】

試験結果を表-1, 図-1並びに写真-1及び2に示した。

検体試験液におけるコロニー形成率は、ブランクコントロールに対して特に低下は見られなかった。

以上の結果から、本試験条件下において、検体は細胞毒性を示さないものと考えられた。

なお、陽性対照物質を用いて感度確認試験を行った結果を表-2及び図-2に示した。

## 【参考文献】

- ・ 「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」(平成24年 薬食機発0301第20号)の別添「医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス」.
- ・ ISO 10993-1:2018, Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.
- ・ ISO 10993-12:2012, Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials.
- ・ 千枝桂子ほか：日本歯内療法学会雑誌，32，179-183(2011).

表-1 細胞毒性試験の結果

濃度 (%)	コロニー数/ウェル				平均	コロニー形成率 (%) (ブランクコントロール=100)
0.195	45	52	54	54	51.3	104.7
0.391	48	59	59	52	54.5	111.2
0.781	66	52	66	38	55.5	113.3
1.56	59	48	37	59	50.8	103.7
3.13	62	58	46	55	55.3	112.9
6.25	47	50	57	56	52.5	107.1
12.5	49	37	53	51	47.5	96.9
25	53	50	46	43	48.0	98.0
50	47	55	45	54	50.3	102.7
60	41	59	65	53	54.5	111.2
80	66	49	44	47	51.5	105.1
100	39	50	38	49	44.0	89.8
陰性対照	63	52	55	45	53.8	109.8
ブランクコントロール	68	42	42	44	49.0	100.0

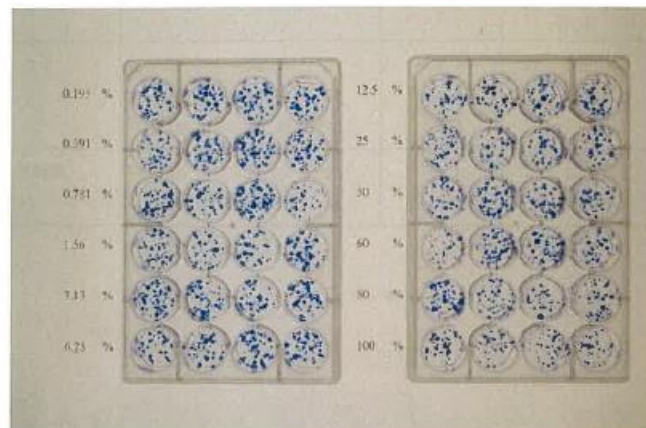
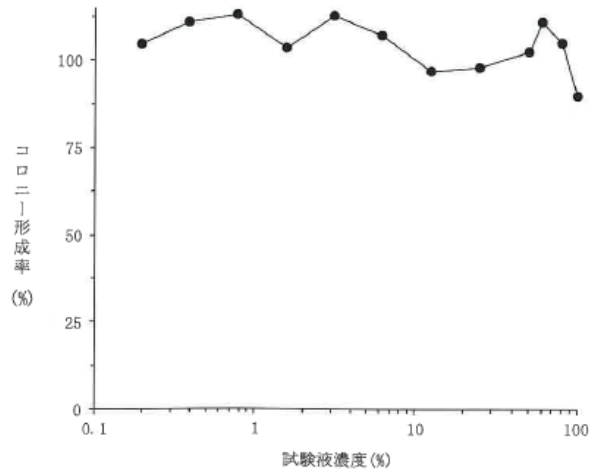


写真-1 コロニーの肉眼像(試験液濃度0.195~100%)

以上