

化粧品安全性評価のための  
試験法開発に関する研究

(ドレイズ代替法二次バリデーション)

分担研究報告書

ウサギ角膜由来細胞株を用いた  
細胞毒性試験  
(SIRC-NR試験)

試験担当責任者 ポーラ 試験研究部 谷 尚子

(参加施設および協力者)

コーセー : 岡本裕子

サンスター : 小谷麻由美

資生堂 : 板垣 宏、村上賢子

ホーユ : 杉浦秀次、加藤久美子

ポーラ : 木下成美、谷 尚子

メナード : 小島肇夫

理化学研究所 : 大野忠夫、西條 薫、加藤麻矢子



## 1. 序

本試験は厚生科学研究として進められている『化粧品安全性評価のための試験法開発に関する研究』<sup>1)</sup>により選定された *in vitro* の Draize 眼粘膜刺激性試験代替法の二次バリデーションとして実施した。

本バリデーションに用いた SIRC細胞 (CCL60: Statens Serum Institut Rabbit Cornea, *Oryctolagus cuniculus*)<sup>2)~8)</sup> は、ウサギ角膜由来細胞の中で、唯一の樹立細胞であり、ATCC (American type culture collection) から購入でき、取り扱いが容易であることから、眼刺激性試験代替法の研究で汎用されている。

一次バリデーションでは SIRC細胞を用いたニュートラルレッド取り込み試験とクリスタルバイオレット染色性試験を実施し、水溶性の界面活性剤を被験物質として本試験法が眼刺激性試験の代替法として適応可能であるか検討した。その結果、両試験ともに参加施設内で再現性が認められ、施設間の変動が少なく、Draize試験<sup>9)</sup>の観察項目 (総評価点・角膜評価点・虹彩評価点・結膜評価点) との間にも良い対応性が確認され、本試験法が代替法として適応可能であると考えられた<sup>10)</sup>。

今回の二次バリデーションでは、被験物質として培養液に不溶な物質や色素を含むより広範囲の化粧品原料15種を用い、一次バリデーションと同様に眼刺激試験代替法としての適応可能性を検討した。なお、一次バリデーションにおいて2試験法での差が認められなかったことから、今回はニュートラルレッド取り込み試験を必須試験とし、クリスタルバイオレット染色性試験は施設ごとの任意実施とした。

本報告書では SIRC細胞を用いるニュートラルレッド取り込み試験 (SIRC-NR) が広範囲の化粧品原料の眼刺激性試験代替法として適用可能であるかどうかについて、バリデーション結果をもとに報告する。

## 2. 試験方法

### 2-1. 被験物質

15種類の化粧品原料を用いた (表1)。

### 2-2. 細胞、培養液、試薬及び培養器具等

SIRC細胞 (ATCC CCL60, Lot. No. 091492) は大日本製薬株式会社を通じて購入し、国立衛生試験所細胞バンクで増殖させた後、各参加機関に配布した。

培養液は GIBCO 社の MEM 粉末 (Cat. No. 61100-087, Lot. No. 68N3831) に炭酸水素ナトリウムを加えて pH を調製した後、GIBCO 社の仔ウシ血清 (Lot. No. 30P1033) を 10% 濃度になるように添加して用いた。

参加施設内および施設間の変動を考慮して、使用する 96 穴マイクロプレートは Falcon (BECTON DICKINSON 社 (Lot. No. 30531115)) に、陽性対照とした Sodium Lauryl Sulfate (SLS) を和光純薬工業株式会社 (Lot. No. PTH0183) に統一した。

その他の試薬及び培養器具については、製造メーカー及び製造ロットの統一を図らなかった。

表 1. 検体番号及び被験物質

検体番号	被験物質
S-1	ショ糖脂肪酸エステル Sucrose Fatty Acid Ester
S-2	グリセリン Glycerin
S-3	赤色 104 号 Acid Red 92
S-4	モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.O.) Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate(20E.O.)
S-5	チオグリコール酸カルシウム Calcium Thioglycollate
S-6	塩化ジステアリルジメチルアンモニウム Distearyldimethylammonium Chloride
S-7	パラジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシル 2-Ethylhexyl p-Dimethylamino Benzoate
S-8	塩化セチルピリジニウム Cetylpyridinium Chloride
S-9	パラオキシ安息香酸メチル Methyl p-Hydroxybenzoate
S-10	ミリスチン酸イソプロピル Isopropyl Myristate
S-11	ポリエチレングリコール 400 Polyethylene Glycol 400
S-12	無水ケイ酸 Silicic Anhydride
S-13	ベンジルアルコール Benzyl Alcohol
S-14	サリチル酸ナトリウム Sodium Salicylate
S-15	メタフェニレンジアミン m-Phenylenediamine

### 2-3. 試験法プロトコールの要約

使用したプロトコールは別添資料に示す。

本試験は基本的には、一次バリデーションでの『ウサギ角膜由来細胞株 (SIRC) を用いた細胞毒性試験』に従っているものの、以下の変更点がある。①染色法をニュートラルレッド取り込み試験のみとし、クリスタルバイオレット染色性試験を施設ごとの任意実施とし

た。②クリスタルバイオレット染色性試験の操作手順を千葉等が開発した方法（投稿準備中）にならい、一部変更した。③二次バリデーションとして実施している他3法の細胞毒性試験との共通事項として、被験物質を含まないウェル（陰性対照）の吸光度を100%とした際の50%の吸光度を示す濃度（ $EC_{50}$ ）の算出には、用量-反応曲線上の生存率20%~80%の間に実測値が3点入り、かつ50%前後にそのうち1点が入ることが望ましいとした。④③に伴い、本試験時の希釈公比を2から1.1~2と変更した。

基本的な操作概要は以下に示す。被験物質を秤量した後、培養液もしくは適切な溶媒にて溶解もしくは懸濁して被験物質の溶液（被験溶液）を調製する。96穴マイクロプレート上に被験溶液の2倍希釈列を調製した後SIRC細胞浮遊液を添加し72時間培養する。反転により培養液を捨てた後、ニュートラルレッド溶液を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター（5%、37℃）中で3時間培養する。反転によりニュートラルレッド溶液を捨てた後、洗浄・固定液（2%CaCl<sub>2</sub>・2%HCHO水溶液）を添加し室温にて1分間固定する。反転により洗浄・固定液を捨てた後、抽出液を添加し室温にて15分間攪拌し、マイクロプレートリーダーを用いて540nm付近の吸光度を測定し $EC_{50}$ を求める。

任意に実施したクリスタルバイオレット染色性試験では、ニュートラルレッド染色後の同一プレートを用いる。ニュートラルレッド抽出液測定後、反転により抽出液を捨てた後、PBS（-）にてマイクロプレートを2回洗浄する。その後クリスタルバイオレット溶液を添加し30分間染色する。水道水にて洗浄後、風乾し、マイクロプレートリーダーを用いて590 nm付近の吸光度を測定し $EC_{50}$ を求める。

### 3. ニュートラルレッド取り込み試験の試験結果および考察

#### 3-1. 各施設における試験結果

各施設における試験結果を表2に示した。上中段に本試験各2回のデータを下段には本試験の平均値と使用溶媒を記載した。陽性対照SLSを含む各検体の使用溶媒、 $EC_{50}$ 最低値、 $EC_{50}$ 最高値、 $EC_{50}$ 平均値、標準偏差、変動係数<sup>1)</sup> および平均順位を表3に示した。いずれの数値も全て有効数字を上から3ケタとして算出した。平均順位のうち平均 $EC_{50}$ 値が10000  $\mu$ g/ml以上は同一順位とした。

#### 3-2. 各施設内の比較

本試験以外に実施した試験を追試験とし、本試験結果と追試験結果のうち、確定値（用量-反応曲線より算出された $EC_{50}$ 値）が3回以上得られた施設の変動係数を表4に示した。変動係数は0.022~0.640であり概ね0.5以下に収まっていることから、施設内の再現性および施設間の変動性は非常に良いと推察された。このことから本法は習熟しやすく再現性の高い方法であると思われる。

なお、各検体ごとで各施設の検体の調製条件ならびに本試験結果と追試験結果及びそれら全ての平均値・標準偏差・変動係数を表5-1~5-5に示した。

### 3-3. 各施設間の比較

検体ごとの施設間のバラツキを表3と図1に示した。変動係数は0.151~1.55であり、変動係数が0.5以下の検体は12検体であった。変動係数の高かった検体2、7および14のうち、検体2は $EC_{50}$ が高値であるため手技的な影響等でバラツキが大きくなったものと思われる。また、検体7は1施設の $EC_{50}$ のみ他施設より高い値を示したため、検体14は1施設の $EC_{50}$ が他施設より低く、3施設が他施設より高い値を示したためバラツキが大きくなったものと思われる。

被験物質の溶媒の一致性の影響から考えると、15検体のうち溶媒が一致したものは9検体であり、それらの変動係数は0.181~0.518、逆に溶媒が複数である6検体の変動係数は0.151~1.55である。変動係数の振れ幅からみると溶媒が一致した検体のほうがバラツキは小さい。しかし、検討数は少ないものの、溶媒が複数であっても同一溶媒内でのバラツキが溶媒間より大きいことから、溶媒の一致性と施設間のバラツキは無関係であるように思われる。

被験物質の溶解性の影響では、培地に可溶・不溶の検体ともに変動係数にバラツキがあり、溶解性により $EC_{50}$ 値が影響されるとは考えにくい。しかし、操作上は培地に不溶である検体のほうが扱いにくく、一部の施設では培地に不溶な検体が沈殿をおこしたために $EC_{50}$ が算出できなかった。

着色の影響については、今回の検体では細胞致死濃度である高濃度下においても吸光度の上昇はなく、着色による測定の影響は認められなかった。

さらに、平均順位と各施設との順位相関性を表6に示した。Spearmanの方法<sup>12)</sup>では相関係数は0.879~0.980と非常に良い相関を示した。なお、施設Gの検体5および6については確定値が得られなかったため除外して計算した。

### 3-4. 再試験

検体5、7、11および14は各1施設で、検体6は2施設で再試験を実施した。再試験結果は表5-1~5-5に括弧付きで示した。検体5および6で、本試験にて検体の沈殿により $EC_{50}$ が算出できなかった1施設は、再試験にて確定値が算出された。同施設は、吸光度平均値が他施設の平均値と比べほぼ半分であったことより、算出できなかった原因のひとつとしてニュートラルレッドの劣化が考えられた。確認の結果、本試験にて使用したニュートラルレッドは別に用意したニュートラルレッドと比較して吸光度が低く、劣化していた可能性が示唆された。しかし、同施設の他の検体では、吸光度は低いものの、他施設と同様な結果が得られていることから、算出できなかった原因には検体の調製方法や添加方法の違いなど別の要因に関わるものと考えられる。

検体6の他の1施設は $EC_{50}$ の算出法に問題があったため再試験を実施し、他施設と同様の結果を得た。

検体7、11および14は1施設のみ算出された $EC_{50}$ が他施設と比べ約1オーダー異なり、検体の調製方法の違いや投与ミス等が考えられたため再試験を実施した。その結果検体7と11は他施設と同様の結果が得られた。14は他施設に比べやや数値が低いものの、施設内での再現性が認められたことより妥当な数値と考えられた。

なお、再試験は被験物質開示後に実施したため、得られた結果は全てデータ解析から除外した。

#### 4. クリスタルバイオレット染色性試験の試験結果および考察

…本法の実施は任意としたが、参加施設は6施設であった。

##### 4-1. 各施設における試験結果

ニュートラルレッド取り込み試験と同様の書式にて、各施設における試験結果を表7に示した。また、SLSを含む各検体の使用溶媒、 $EC_{50}$ 最低値、 $EC_{50}$ 最高値、 $EC_{50}$ 平均値、標準偏差、変動係数および平均順位を表8に示した。

##### 4-2. 施設内の比較

本試験結果と追試験結果のうち、確定値が3回以上算出された施設の変動係数を表9に示した。変動係数は0.010～0.616であり概ね0.5以下に収まっており施設内の再現性および変動性は非常に良いと推察された。

なお、各検体ごとで各施設の検体の調製条件ならびに本試験結果と追試験結果およびそれら全ての平均値・標準偏差・変動係数を表10-1～10-5に示した。

##### 4-3. 各施設間の比較

検体ごとの施設間のバラツキを表8と図2に示した。変動係数は0.091～1.378であった。表8の変動係数から判断すると検体2、検体7のバラツキが大きかった。

さらに、平均順位と各施設の順位相関性を表11に示す。その結果相関係数は0.891～0.98であり良い相関性を示した。なお、施設Gの検体5については確定値が得られなかったため除外して計算した。

#### 5. ニュートラルレッド取り込み試験とクリスタルバイオレット染色性試験の比較

##### 5-1. 各施設での試験条件の比較

各施設の試験条件を表12に示した。細胞倍加時間には最短の施設Bと最長の施設Cでは約1.8倍の差があった。ニュートラルレッド取り込み試験の本試験陰性対照の吸光度実測値は0.28～1.974と幅が認められたものの変動係数は各施設0.114～0.28と比較的安定した値を得ていた。また、陽性対照SLSの $EC_{50}$ 値は112～217  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で変動係数は0.052～0.115と非常に良い再現性を示した。同様に、クリスタルバイオレット染色性試験の本試験陰性対照を比較したところ吸光度実測値は0.205～1.701と幅が認められたものの変動係数は0.132～0.300と比較的安定していた。また、陽性対照の値は130～223  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で変動係数は0.052～0.103と良い再現性を示した。なお、クリスタルバイオレット染色後に、抽出操作をおこなった施設は6施設中2施設であったが、抽出操作の有無による試験結果への影響はなかったものと思われる。

##### 5-2. ニュートラルレッド取り込み試験とクリスタルバイオレット染色法との比較

本試験ではニュートラルレッド取り込み試験での評価の後にクリスタルレッド染色法により評価する方法を採用し検討した。検体ごとの $EC_{50}$ 値の比較および相関と順位相関について図3に示す。ただし、 $EC_{50}$ 値が $10000\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の検体は全て $10000\mu\text{g}/\text{ml}$ として計算した。両者は検体ごとの $EC_{50}$ 値の比較においてほぼ同値を示し、 $EC_{50}$ 値の相関及び順位相関ともに非常に良い対応性が認められた。なお、クリスタルバイオレット染色法では、高濃度で沈殿を生じる検体の場合に沈殿に色素が付着し用量-反応曲線が二相性を示す場合があった。

## 6. Draize眼刺激性試験結果との対応性の検討

### 6-1. 眼刺激性試験の観察項目との対応性の検討

眼刺激性試験の観察項目とニュートラルレッド取り込み試験結果との対応性は、*in vivo*で10%で実施された12検体のうち、*in vitro*で確定値の算出された9検体について検討した。*in vivo*の結果および*in vitro*で検討に用いた値は表14に、相関係数は表13に示す。相関係数は $-0.883 \sim -0.730$ であり対応性の最も良かったのは最大値での総評価点で相関係数は $-0.883$ であった。また、相関係数が $-0.8$ 以下になったのは24時間およびAUC比の結膜評価点の2項目のみであった。また、これらの順位相関について表13に示す。順位相関係数は $0.580 \sim 0.376$ であり、いずれもあまり良い相関を示さなかったが、その中で最も良かったのは最大での角膜評価点で順位相関係数は $0.580$ であった。

以上の結果より相関係数からは最大総評価点、24時間評価点およびAUC比において全ての部位に良く対応することが考えられた。しかし、実施した9検体のうち1検体のみの刺激が極端に強い結果であったので、この結果のみで*in vivo*との対応性を評価することは困難であると思われる。

クリスタルバイオレット染色性試験との対応性についても相関及び順位相関ともにニュートラルレッド取り込み試験と同様の結果であった。

なお、対応性の検討から除外した6検体（検体5、6、9、10、11および12）のうち検体5、10および11は*in vivo* 10%の結果があるものの*in vitro*で確定値が算出されなかったため、検体6、9、12は*in vivo*で100%のみで検討されたものであったためである。前者の3検体のうち検体10および11の $EC_{50}$ 値は $10000\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と刺激性が弱く、*in vivo* 10%の結果と対応した。後者のうち検体6、12は*in vivo* 100%の結果と*in vitro*の結果がほぼ対応するものの、検体9は*in vivo*ではほとんど発現しなかったにもかかわらず*in vitro*では刺激性が強く発現した。

### 6-2. 総評価点が15前後による対応性

ニュートラルレッド取り込み試験と*in vivo*との対応性について相関関係を検討した。最大の総評価点を一例として直線回帰式を算出したところ、回帰式は $Y = -26.994 \times \log X + 88.705$  ( $r = 0.883$ )であった。*in vivo*のひとつの指標としてYに15を代入した場合のXの値は537.6が算出される。X=537.6、Y=15として区分けした場合の各検体の分布は図4のようになる。



また、図4の結果からDraize試験の最大値総評価点の15前後における対応性を表15にまとめた。15前後でまとめた場合、false positiveと評価されるものが2検体（検体1および15）であり、false negativeと評価されるものが1検体（検体13）であった。

クリスタルバイオレット染色性試験では回帰式は $Y = -26.065 \times \log X + 85.863$  ( $r = 0.882$ ) であり、Yに15を代入した場合のXの値は523.2が推定される。X=523.2、Y=15として区分けした場合の検体の分布は図5のようになる。また、図5の結果から対応性をまとめると、ニュートラルレッド取り込み試験と全く同じ結果になった。

これらの結果より、ニュートラルレッド取り込み試験およびクリスタルバイオレット染色性試験とin vivo 結果にて対応したのは9検体中の6検体であり、false positiveは2検体、false negativeは1検体であった。

## 7. 他細胞毒性試験との比較

本バリデーションではSIRC細胞による毒性試験の他にHeLa-MTT、CHL-CV、CornePackの3法が実施されている。それらの結果を図6にまとめた。また、Draize眼刺激性試験の最大値総評価点と各方法との比較を表16に示した。

結果より、4試験法ともに刺激の発現の仕方はほぼ同じであり、いずれの方法で実施しても細胞毒性試験の結果とDraize眼刺激性試験との対応性は同様になると推測できる。false positiveの検体のうち4試験法に共通していた検体1のin vivo での眼刺激性試験結果は、文献によると10%にてMildであった<sup>13)</sup>。また、false negativeのうち4試験法に共通していた検体13は、文献によるとSevere（試験濃度は不明）であった<sup>14)</sup>。このことより、細胞毒性試験に共通して強く（或いは弱く）判定される検体が存在することが示唆された。本法のfalse positiveおよびfalse negative検体はすべてCornePackと一致したが、この理由として両方法ともにウサギ角膜由来の細胞を用いており他の2法と比べて細胞の感受性が似ていることが推察できる。

なお、本試験法は他試験法と比べ、in vivo との対応性では相関係数が最も良かったが、総評価点15前後による対応性においてもHeLaに次いで良かった。

## 8. プロトコル改定上のポイント

今回の試験ではニュートラルレッド取り込み試験とクリスタルバイオレット染色性試験とともに実施したが、試験結果はいずれもほぼ同じ傾向を示したことから今後は一方のみを実施すれば良いと考える。また、本試験では、一次バリデーションより変更し、EC<sub>50</sub>算出には検体希釈公比1.1~2で用量-反応曲線上の生存率20%~80%に実測値が3点入り、かつ50%前後にそのうち1点が入ることが望ましいとしたため、公比を変えて何度も試験を行い実験量が膨大となってしまった。三次バリデーションではco-cultureのメリットであるマイクロプレート上での検体調製が可能な点を生かし、実測値で用量-反応曲線が描ける範囲で濃度設定をする等に変更することが望ましいと考える。

なお、Quality Controlの一環として今回のデータをもとに各施設ごとの陰性対照と陽性対照のバラツキについてまとめてみたが、今後さらに精度を向上するためには本試験採用デ

一夕の陰性対照の吸光度に有効範囲を設置する等の検討も必要であると考え。

## 9. まとめ

SIRC細胞による細胞毒性試験が眼刺激性試験の代替法として適用可能か否かについて検討する目的で化粧品原料15検体を用いて第二次バリデーションを実施した。今回の試験では被験物質に着色しているものや不溶性のものなどが含まれていたが、結果的には施設内および施設間の再現性が認められ、眼刺激性試験との相関性でも良い対応性が認められた。

この結果より、着色原料や不溶性物質を含む広範囲の化粧品原料の評価であっても、SIRC細胞による細胞毒性試験を眼刺激性試験の代替法として適応できる可能性が示唆された。ただし、false positiveやfalse negativeが存在し、その特性が未解明であることと、今回の in vivo結果に非常に偏りがあったことを考慮すると in vivoとの対応性をこの結果のみにて判断できないことから、結論を出すには更なる検討が必要であると考え。

## <参考文献>

- 1) Y. Ohno, et al, Toxicology in Vitro, (in press) (1994)
- 2) H. North-Root, et al, Toxicology Letters, 14, 207-212 (1982).
- 3) H. North-Root, et al, Food and Chemical Toxicology, 23, 271-273 (1985).
- 4) R. B. Jacaruso, et al, J. Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology, 4, 49-58 (1985).
- 5) C. M. Hutak, et al, J. Toxicology -Cutaneous and Ocular Toxicology, 5, 143-161 (1986).
- 6) 鹿島隆一、池田祐三、中村和博、日本化粧品科学会誌、13, 203-210 (1989).
- 7) 岡本裕子、神崎紀子、田中宜征、日本化粧品技術者会誌、13, 272-279 (1990).
- 8) H. Itagaki, et al, Toxicology in Vitro, 5, 139-143 (1991).
- 9) J. H. Draize, FDA officials of US Austin, TX 46-59 (1959)
- 10) 板垣 宏、第1次バリデーション最終報告書、(1993)
- 11) D. Colquhoun, 生物統計学入門
- 12) 石居進、生物統計学入門
- 13) Toxicology in Vitro, 3(4), 329-334 (1989)
- 14) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances

表2ニュートラルレッド取り込み試験の各施設における本試験のEC50値一覧

検体	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F	施設G
1	250	288	195	290	325	310	230
	260	296	225	288	315	295	230
	255 (MS)	292 (E)	210 (MS)	289 (E)	320 (M)	303 (D)	230 (D)
2	9325	4364	12900	4600	6200	12000	23000
	13082	3916	11800	5400	5000	12000	13000
	11204 (M)	4140 (M)	12350 (M)	5000 (M)	5600 (M)	12000 (M)	18000 (M)
3	240	235	305	390	355	300	380
	270	242	295	380	315	335	385
	255 (M)	238 (M)	300 (M)	385 (M)	335 (M)	318 (M)	383 (M)
4	880	895	1600	1490	1400	1320	1400
	920	870	1450	1300	1200	1400	1400
	900 (M)	883 (M)	1525 (M)	1395 (M)	1300 (M)	1360 (M)	1400 (M)
5	320	600	680	310	485	395	>600 沈殿
	320	578	680	398	600	465	>600 沈殿
	320 (MS)	589 (D)	680 (MS)	354 (MS)	543 (MS)	430 (MS)	>600 (MS)
6	22.0	50.8	30.0	72.0	38.0	60.0	>100 沈殿
	23.0	49.7	33.0	84.0	48.0	69.0	>100 沈殿
	22.5 (E)	50.2 (P)	31.5 (E)	78.0 (E)	43.0 (E)	64.5 (E)	>100 (E)
7	247	587	730	3400	115	220	135
	299	581	580	3700	115	262	140
	273 (MS)	584 (D)	655 (D)	3550 (MS)	115 (MS)	241 (D)	138 (D)
8	0.45	1.45	0.98	2.65	1.20	4.50	3.10
	0.45	1.02	0.90	2.65	1.35	3.90	1.30
	0.45 (M)	1.24 (M)	0.94 (M)	2.65 (M)	1.28 (P)	4.20 (P)	2.20 (M)
9	128	126	194	180	200	305	150
	109	137	170	150	190	144	230
	119 (D)	132 (D)	182 (D)	165 (D)	195 (D)	225 (D)	190 (D)
10	>10000	>10000	>10000	>10000	8000	>10000	>10000
	>10000	>10000	>10000	>10000	8800	>10000	>10000
	>10000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)	8400 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)
11	6940	>50000	32500	49000	44500	27500	28000
	6952	>50000	31000	46000	37500	27500	33000
	6946 (M)	>50000 (M)	31750 (M)	47500 (M)	41000 (M)	27500 (M)	30500 (M)
12	>10000	>10000	>50000	>10000	46000	>10000	>10000
	>10000	>10000	>50000	>10000	40000	>10000	>10000
	>10000 (MS)	>10000 (MS)	>50000 (MS)	>10000 (MS)	43000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)
13	1109	882	1860	1700	1070	610	2100
	1207	696	1700	1650	2100	530	1950
	1158 (M)	789 (M)	1780 (M)	1675 (M)	1585 (M)	570 (M)	2025 (M)
14	630	630	940	1000	1270	140	1700
	670	461	1150	760	1270	190	1150
	650 (M)	546 (M)	1045 (M)	880 (M)	1270 (M)	165 (M)	1425 (M)
15	180	76	375	310	295	265	400
	167	80	420	312	280	296	330
	174 (M)	78 (M)	398 (M)	311 (M)	288 (M)	281 (M)	365 (E)
S L S	174.62 ± 17.93 n=13	170.50 ± 9.63 n=5	149.62 ± 10.71 n=13	176.67 ± 16.07 n=3	194.60 ± 18.94 n=5	152.18 ± 10.84 n=11	169.58 ± 7.53 n=12

上中段：本試験各2回データ

下段：本試験の平均値 (μg/ml)

下段括弧内は使用溶媒 (M…培地 MS…培地懸濁 P…PBS D…DMSO E…Ethanol)

表3 ニュートラルレッド取り込み試験の本試験結果のまとめ

検体	設数 N	溶媒 使用	EC50最低値 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	EC50最高値 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	EC50値平均 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	標準偏差 S D	変動係数 C V	平均順位	備考欄
1	1	M			320				
	2	MS	210	250	230	28.3	0.123		
	2	E	289	292	290	2.1	0.007		
	2	D	230	303	266	51.6	0.193		
	7	M+MS+E+D	210	320	271	41.0	0.151	4	
2	7	M	4140	18000	9760	5060	0.518	12	
3	7	M	238	385	316	57.0	0.181	6	
4	7	M	882	1530	1250	257	0.204	10	
5	5	MS	320	680	465	147	0.317		>600は平均から除外
	1	MS			>600				
	1	D			589				
	7	MS+D	320	>600	486	141	0.290	7	
6	5	E	22.5	78	47.9	23.0	0.473		>100は平均から除外
	1	E			>100				
	1	P			50.2				
	7	E+P	22.5	>100	48.0	21.0	0.438	2	
7	3	MS	115	3550	1310	1940	1.480		
	4	D	138	655	405	253	0.625		
	7	MS+D	115	3550	794	1230	1.550	8	
8	5	M	0.45	2.65	1.40	0.91	0.607		
	2	P	1.28	4.2	2.74	2.06	0.752		
	7	M+P	0.45	4.2	2.00	1.00	0.500	1	
9	7	D	118	224	173	37.0	0.215	3	
10	6	MS			>10000			13	
	1	MS			8400				
11	6	M	6950	47500	30900	13900	0.450	13	
	1	M			>50000				
12	6	MS			>10000			13	
	1	MS			43000				
13	7	M	570	2030	1370	543	0.396	11	
14	7	M	165	1430	856	439	0.512	9	
15	6	M	78	397	255	112	0.441		
	1	E			365				
	7	M+E	78	397	271	111	0.409	4	
SLS	7	M	150	195	170	15.0	0.088		

注1：データはすべて上3ケタを有効数字として処理した。

注2：EC50値が10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上は、同一順位とした。

表4 ニュートラルレッド取り込み試験の本試験および追試験結果の変動係数

施設名 検体	A	B	C	D	E	F	G
1	0.113 ( 7 )	0.111 ( 3 )	0.147 ( 7 )	0.032 ( 3 )	0.157 ( 5 )	0.329 ( 3 )	0.110 ( 5 )
2	0.223 ( 3 )	0.093 ( 3 )	0.122 ( 4 )	- ( - )	0.114 ( 3 )	0.246 ( 5 )	0.442 ( 6 )
3	0.084 ( 4 )	0.339 ( 3 )	0.173 ( 5 )	0.142 ( 4 )	0.097 ( 4 )	0.163 ( 4 )	0.099 ( 5 )
4	0.092 ( 4 )	0.290 ( 5 )	0.158 ( 9 )	- ( - )	0.122 ( 5 )	0.324 ( 8 )	0.036 ( 4 )
5	0.108 ( 5 )	0.205 ( 3 )	0.106 ( 6 )	- ( - )	0.177 ( 3 )	0.292 ( 5 )	- ( - )
6	0.174 ( 6 )	- ( - )	0.279 ( 3 )	- ( - )	0.311 ( 5 )	0.325 ( 4 )	- ( - )
7	0.510 ( 6 )	0.342 ( 6 )	0.524 ( 10 )	0.160 ( 3 )	0.332 ( 4 )	0.638 ( 3 )	0.523 ( 7 )
8	0.022 ( 4 )	- ( - )	0.258 ( 4 )	- ( - )	0.451 ( 4 )	0.378 ( 4 )	0.519 ( 6 )
9	0.164 ( 3 )	- ( - )	0.458 ( 6 )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	0.282 ( 3 )
10	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )
11	0.484 ( 4 )	- ( - )	0.300 ( 8 )	- ( - )	0.096 ( 3 )	0.074 ( 3 )	- ( - )
12	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	0.157 ( 3 )	- ( - )	- ( - )
13	0.082 ( 4 )	0.334 ( 5 )	0.245 ( 8 )	0.182 ( 3 )	0.219 ( 7 )	- ( - )	0.088 ( 4 )
14	0.284 ( 3 )	0.338 ( 4 )	0.288 ( 5 )	- ( - )	0.186 ( 3 )	0.640 ( 3 )	0.245 ( 3 )
15	0.232 ( 6 )	0.288 ( 3 )	0.384 ( 10 )	0.044 ( 3 )	0.210 ( 5 )	0.395 ( 4 )	0.103 ( 6 )

表5-1. 各施設の検体の調製条件ならびにニュートラルレッド取り込み試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 1							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	エタノール	培地	エタノール	DMSO	DMSO	DMSO
選択理由	予備試験DMSOにてEC50>1mg/ml	—	—	—	—	—	—
溶解方法	ラボミキサー	37℃	42℃	—	39℃	—	37℃超音波分散装置
溶解状態	懸濁	溶解	溶解・懸濁	懸濁	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH
	1 mg/ml 7.00	0.6 mg/ml 7.00	0.35 mg/ml 7.50	0.76 mg/ml 7.82	0.5 mg/ml 7.00	0.6 mg/ml 8.01	0.4 mg/ml 7.20
予備試験結果	>1000 (10)	170 (10) 397 (10)	340 (10)	440 (10)	305 (10) 225 (1.4)	320 (10) 320 (10)	>100 (10) 390 (10)
本試験結果	① 250 (**) ② 260 (**)	① 287.8 (1.1) ② 296.1 (1.1)	① 195 (1.1) ② 225 (1.1)	① 290 (**) ② 288 (**)	① 325 (1.1) ② 315 (1.1)	① 310 (1.1) ② 295 (1.1)	① 230 (1.1) ② 230 (1.1)
追加試験結果	③ 220 (**) ④ 270 (**) ⑤ 230 (**) ⑥ 210 (**) ⑦ 200 (**)	③ 351.4 (1.2)	③ 185 (2) ④ 260 (1.2) ⑤ 265 (1.1) ⑥ 195 (1.1) ⑦ 210 (1.1)	③ 305 (**)	③ 245 (1.15) ④ 270 (1.1)	③ 515 (1.3)	③ 250 (1.5) ④ 210 (1.2) ⑤ 280 (1.2) ⑥ 245<x<285(1.1)* ⑦ 220<x<260(1.1)*
平均値	234	312	219	294	276	373	240
標準偏差	26.4	34.6	32.2	9.3	43.4	122.9	26.5
変動係数	0.113	0.111	0.147	0.032	0.157	0.329	0.110

検体No. 2							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	—	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH
	20 mg/ml 7.90	10 mg/ml 8.00	50 mg/ml 7.30	8 mg/ml 7.72	25 mg/ml 7.20	14 mg/ml 7.91	50 mg/ml 7.2or7.4
予備試験結果	>10000 (10)	3470 (10)	>10000 (10)	5500 (10)	4000 (10) 5300 (1.6)	5600 (10)	>10000 (10)
本試験結果	① 9325 (**) ② 13082 (**)	① 4364 (1.2) ② 3916 (1.2)	① 12900 (1.2) ② 11800 (1.3)	① 4600 (**) ② 5400 (**)	① 6200 (1.3) ② 5000 (1.3)	① 12000 (1.2) ② 12000 (1.2)	① 23000 (1.5) ② 13000 (1.5)
追加試験結果	③ 8841 (**)	③ 4725 (1.2)	③ 14800 (2) ④ 15400 (1.3)	—	—	③ 9200 (1.5) ④ 8500 (1.3) ⑤ 6500 (1.3)	③ 8400 (2) ④ 7200 (1.5) ⑤ 21500 (1.5) ⑥ 16000 (1.5)
平均値	10416	4335	13725	5000	5500	9640	14850
標準偏差	2321.5	405.3	1668.1	—	624.5	2371.3	6565.3
変動係数	0.223	0.093	0.122	—	0.114	0.246	0.442

検体No. 3							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	—	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH	最高用量 PH
	1 mg/ml 測定不能	0.5 mg/ml 8.00	0.5 mg/ml 8.60	1 mg/ml 7.90	0.526 mg/ml 8.65	0.4 mg/ml 8.16	0.7 mg/ml 測定不能
予備試験結果	27 (10)	300 (10)	350 (10)	470 (10)	285 (10) 290 (1.4)	295 (10)	260 (10)
本試験結果	① 240 (**) ② 270 (**)	① 234.5 (1.1) ② 241.9 (1.1)	① 305 (1.1) ② 295 (1.1)	① 390 (**) ② 380 (**)	① 355 (1.1) ② 315 (1.1)	① 300 (1.1) ② 335 (1.1)	① 380 (1.1) ② 385 (1.1)
追加試験結果	③ 250 (**) ④ 290 (**)	③ 411.9 (1.2)	③ 295 (1.1) ④ 325 (1.1) ⑤ 430 (2)	③ 350 (**) ④ 280 (**)	③ 355 (1.15)	③ 238 (1.3) ④ >400 (1.1)* ⑤ 350 (1.1)	③ 440 (2) ④ 460 (2) ⑤ 370 (1.1)
平均値	263	296	330	350	329	306	407
標準偏差	22.2	100.4	57.2	49.7	32.0	49.8	40.2
変動係数	0.084	0.339	0.173	0.142	0.097	0.163	0.099

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大偏な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合

表5-2. 各施設の検体の調製条件ならびにニュートラルレッド取り込み試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 4							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	40℃	37℃	37℃ (予備) 超音波破砕器 (本)	—	37℃
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 2 mg/ml PH 7.60	10 mg/ml 7.00	2.5 mg/ml 7.20	6.5 mg/ml 7.75	2.5 mg/ml 6.60	5 mg/ml 8.05	3 mg/ml 7.0or7.2
予備試験結果	1244 (10)	1020 (10)	2900 (10)	3400 (10)	2850 (10) 1100 (1.4)	1450 (10)	2100 (10)
本試験結果	① 880 (**) ② 920 (**) *	① 895 (1.5) ② 870 (1.5)	① 1600 (1.1) ② 1450 (1.1)	① 1490 (**) ② 1300 (**) *	① 1400 (1.2) ② 1200 (1.15)	① 1320 (1.45) ② 1400 (1.45)	① 1400 (1.2) ② 1400 (1.2)
追加試験結果	③ 820 (**) ④ 1020 (**) *	③ 1079 (1.5) ④ 468 (1.5) ⑤ 686 (1.5)	③ 1600 (2) ④ 1350 (1.1) ⑤ 1220 (1.1) ⑥ 1650 (1.15) ⑦ 1750 (1.15) ⑧ 1950 (1.1) ⑨ 1240 (1.15)	③ 2000> (**) *	③ 1350 (1.2) ④ 1500 (1.1)	③ 600 (1.6) ④ 610 (1.6) ⑤ 750 (1.5) ⑥ 910 (1.5) ⑦ 1130 (1.5) ⑧ 1260 (1.5)	③ 1300 (2) ④ 1400 (1.5)
平均値	910	800	1534	1395	1310	998	1375
標準偏差	84.1	231.8	241.8	—	159.7	322.8	50.0
変動係数	0.092	0.290	0.158	—	0.122	0.324	0.036

検体No. 5							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	DMSO	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃ラボミキサー	ラボミキサー	—	超音波	ビベッティング	ビベッティング	よく混和
溶解状態	懸濁	懸濁すぐ沈殿	やや白濁懸濁	懸濁	懸濁	懸濁	懸濁
PH測定	最高用量 1 mg/ml PH 7.50	1 mg/ml 8.78	1 mg/ml 10.50	0.8 mg/ml 8.52	1.05 mg/ml 7.20	0.6 mg/ml 8.67	0.6 mg/ml 7.50
予備試験結果	339 (10)	291 (10)	390 (10)	315 (10)	310 (10) 425 (1.4)	350 (10)	>100 (10) >100は沈殿の為 測定不能
本試験結果	① 320 (**) ② 320 (**) *	① 599.7 (1.2) ② 578.4 (1.2)	① 680 (1.2) ② 680 (1.2)	① 310 (**) ② 398 (**) *	① 485 (1.2) ② 600 (1.2)	① 395 (1.2) ② 465 (1.2)	① >600 (1.1)# ② >600 (1.1)#
追加試験結果	③ 400 (**) ④ 350 (**) ⑤ 310 (**) *	③ 402.6 (1.2) ④ (656) (1.2)# ⑤ (372) (1.2)##  #再試験 ##培地懸濁	③ 740 (1.15) ④ 680 (1.2) ⑤ 670 (2) ⑥ 590 (1.2)	—	—	③ 285 (1.6) ④ 210 (1.4) ⑤ 330 (1.4)	③ >313 (2)## ④ >313 (2)## ⑤ >600 (1.1)# ⑥ 500 (1.1)# ⑦ (>1000) (1.2)## ⑧ (>1000) (1.2)## ⑨ (540) (1.2)## #沈殿 ##再試験
平均値	340	527	663	354	503	337	>500
標準偏差	36.7	108.2	70.0	—	88.9	98.3	—
変動係数	0.108	0.205	0.106	—	0.177	0.292	—

検体No. 6							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	エタノール	PBS	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	37℃	—	37℃超音波	ビベッティング	—	超音波分散装置
溶解状態	懸濁	溶解	懸濁	懸濁	懸濁	溶解	白濁懸濁
PH測定	最高用量 0.1 mg/ml PH 7.50	0.1 mg/ml 7.50	0.05 mg/ml 9.20	0.08 mg/ml 7.93	0.105 mg/ml 7.00	0.1 mg/ml 7.89	0.1 mg/ml 7.0or7.2
予備試験結果	34 (10)	32 (10)	29 (10)	49 (10)	21.5 (10) 50 (1.5)	31 (10)	72 (10)
本試験結果	① 22 (**) ② 23 (**) *	① 50.79 (1.2) ② 49.7 (1.2)	① 30 (1.2) ② 33 (1.2)	① 72 (**) ② 84 (**) #	① 38 (1.2) ② 48 (1.3)	① 60 (1.3) ② 69 (1.3)	① >100 (1.2)# ② >100 (1.2)#
追加試験結果	③ 20> (**) * ④ 26 (**) ⑤ 27 (**) ⑥ 30 (**) ⑦ 18 (**) *	—	③ 18.6 (2)	③ (54) (**) ##  #最高試験濃度 80=EC53 ##再試験	③ 27 (1.25) ④ 65 (1.4)	③ 29 (1.3) ④ 53 (1.3)	③ 42 (1.5)# ④ 41 (1.3)# ⑤ (90) (1.3)##  #沈殿 ##再試験
平均値	24	50	27	78	46	53	>41
標準偏差	4.2	—	7.6	—	14.2	17.1	—
変動係数	0.174	—	0.279	—	0.311	0.325	—

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合

表5-3. 各施設の検体の調製条件ならびにニュートラルレッド取り込み試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 7							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	DMSO	DMSO	培地	培地	DMSO	DMSO
選択理由	予備試験DMSOにてEC50>1mg/ml	—	—	予備試験DMSOにてEC50>1mg/ml	予備試験DMSOにてEC50>1mg/ml	—	—
溶解方法	37℃ラボミキサー	37℃	—	37℃超音波	超音波洗浄器	—	—
溶解状態	懸濁	溶解	懸濁	懸濁	懸濁	溶解	白濁懸濁
PH測定	最高用量 PH	1 mg/ml 7.50	2 mg/ml 8.00	1 mg/ml 7.30	10 mg/ml 7.83	1 mg/ml 7.20	3 mg/ml 8.12
予備試験結果	>1000 (10)	335 (10)	760 (10)	>1000 (10) 370 (10)##	D 630 (10) 培 228 (2)	470 (10)	340 (10)
本試験結果	① 247 (**) ② 299 (**)	① 587 (1.2) ② 581 (1.2)	① 730 (1.5) ② 580 (1.25)	① 3400 (**) ② 3700 (**)	① 115 (1.4) ② 115 (1.2)	① 220 (1.7) ② 262 (1.7)	① 135 (1.2) ② 140 (1.2)
追加試験結果	③ 465 (2) ④ 119 (**) ⑤ 143 (**) ⑥ 442 (**)	③ 842 (1.2) ④ 1356 (1.2) ⑤ 754 (1.2)# ⑥ 961 (1.2)# ⑦ (751) (1.2)## ⑧ (742) (1.2)###	③ 260 (1.5) ④ 165 (1.5) ⑤ 780 (1.5) ⑥ 380 (1.2) ⑦ 1700 (2)## ⑧ 800 (1.5)## ⑨ 460 (1.5)## ⑩ 490 (1.5)##	③ 4600 (**) ④ (630) (**)# ⑤ (255) (**)#	③ 128 (1.3) ④ 133 (1.4)	③ 660 (1.7)	③ 340 (1.5) ④ 180 (1.5) ⑤ 370 (1.5) ⑥ 233> (1.1)* ⑦ 166> (1.2)* ⑧ 115 (1.3) ⑨ 140 (1.2) ⑩ 58.1> (1.2)*
平均値	286	847	635	3900	144	381	203
標準偏差	145.9	289.4	431.1	624.5	47.7	242.8	106.1
変動係数	0.510	0.342	0.679	0.160	0.332	0.638	0.523

検体No. 8							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	PBS(-)	PBS(-)	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	—	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 PH	0.01 mg/ml 8.20	0.01 mg/ml 8.00	0.005 mg/ml 7.40	0.008 mg/ml 7.81	0.02 mg/ml 7.80	0.01 mg/ml 7.70
予備試験結果	1 (10)	1> (10)	1> (10)	1.55 (10)	1.85 (10) 0.37 (2)	1 (10) 0.05 (10)	4.2 (10)#
本試験結果	① 0.45 (**) ② 0.45 (**)	① 1.452 (1.5) ② 1.02 (1.5)	① 0.98 (1.4) ② 0.9 (1.4)	① 2.65 (**) ② 2.65 (**)	① 1.2 (2) ② 1.35 (2)	① 4.5 (1.5) ② 3.9 (1.5)	① 3.1 (2)# ② 1.3 (2)#
追加試験結果	③ 0.43 (**) ④ 0.45 (**)	—	③ 1.08 (2) ④ 1.55 (1.25)	—	③ 1.45 (2) ④ 2.57 (1.5)	③ 1.85 (1.5) ④ 2.57 (1.5)	③ 1.15 (**)# ④ 4.6 (**)# ⑤ 3.4 (**)# ⑥ 2 (**)# #高濃度にのみ沈殿
平均値	0.45	1.24	1.13	2.65	1.09	3.21	2.59
標準偏差	0.010	—	0.291	—	0.493	1.211	1.345
変動係数	0.022	—	0.258	—	0.451	0.378	0.519

検体No. 9							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	—	—	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 PH	0.3 mg/ml 6.7	1 mg/ml 7.5	0.5 mg/ml 7.96	0.5 mg/ml 7	0.4 mg/ml 7.48	1 mg/ml 7
予備試験結果	484 (10)	92 (10)	235 (10)	380 (10)	250 (10) 155 (1.5)	85 (10) 180 (10)	300 (10)
本試験結果	① 128 (**) ② 109 (**)	① 126.1 (1.5) ② 137.3 (1.5)	① 194 (1.4) ② 170 (1.4)	① 180 (**) ② 150 (**)	① 200 (1.5) ② 190 (1.5)	① 305 (1.4) ② 144 (1.4)	① 150 (1.5) ② 230 (1.5)
追加試験結果	③ 200> (**)* ④ 82 (**)	—	③ 130 (2) ④ 90 (1.4) ⑤ 340 (1.4) ⑥ 195 (1.4)	③ 250> (**)*	—	③ 14> (1.4)*	③ 270 (1.5)
平均値	109.7	131.7	186.5	165.0	181.7	224.5	216.7
標準偏差	18.01	—	85.40	—	—	—	61.10
変動係数	0.164	—	0.458	—	—	—	0.282

単位…μg/ml

( )…希釈公比

EC50値…調かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調製ミス、公比の大偏差、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*…希釈率が公比以外の場合

表5-4. 各施設の検体の調製条件ならびにニュートラルレッド取り込み試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 10							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	171-6で予備 NR50>1mg/mlの為	171-6で予備 NR50>1mg/mlの為	—	—	171-6で予備 NR50>1mg/mlの為	171-6で予備 NR50>1mg/mlの為	171-6で予備 NR50>1mg/mlの為
溶解方法	37℃ ラボミキサー	—	37℃	37℃	超音波洗浄 超音波破砕	超音波	ボルテックス
溶解状態	懸濁	懸濁	懸濁	分散	懸濁	懸濁	懸濁
PH測定	最高用量 10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	47.8 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
	PH 7.00	7.00	7.00	7.75	7.20	7.58	7.40
	予備試験結果 >1000 (10)	>1000 (10)	>1000 (10)	>1000 (10)	① >1000 (10) ② >10000 (1.4)#	>1000 (10)	>100 (10) >1000 (10)
	本試験結果 ① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (1.5) ② >10000 (1.5)	① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① 8000 (1.15) ② 8800 (1.4) ③ 38500 (1.2)# ④ >50000 (1.15)* ⑤ 8500 (1.3) ⑥ >10000 (1.3)* #懸濁法により データ差有り	① >10000 (1.3) ② >10000 (1.3)	① >10000 (2)# ② >10000 (2)#
	追加試験結果 —	—	—	—	—	—	—
	平均値 >10000	>10000	>10000	>10000	15950	>10000	>10000
	標準偏差 —	—	—	—	—	—	—
	変動係数 —	—	—	—	—	—	—

検体No. 11							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	超音波破砕器	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量 20 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml
	PH 7.6	8	7.4	7.82	7.2	7.77	7.4or7.2
	予備試験結果 >10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10) 44500 (1.2)	>10000 (10)	>10000 (10)
	本試験結果 ① 6940 (**) ② 6952 (**)	① >50000 (1.2) ② >50000 (1.2)	① 32500 (1.2) ② 31000 (1.2)	① 49000 (**) ② 46000 (**)	① 44500 (1.15)^ ② 37500 (1.15)^	① 27500 (1.2) ② 27500 (1.2)	① 28000 (2) ② 33000 (1.5)
	追加試験結果 ③ 16262 (**) ④ 7558 (**) ⑤ 5000> (**)* ⑥ (16442) (**)# #再試験	③ 36317 (2)	③ 32000 (2) ④ 33000 (1.2) ⑤ 27800 (1.2) ⑥ 24000 (1.15) ⑦ 16500 (1.2) ⑧ 12500 (1.5)	—	—	③ 31200 (1.2)	—
	平均値 9428	36317	26163	47500	42167	28733	30500
	標準偏差 4565.1	—	7853.8	—	4041.5	2136.2	—
	変動係数 0.484	—	0.300	—	0.096	0.074	—

検体No. 12							
施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	ラボミキサー	ピペッティング	振とう	37℃	スターラー	ピペッティング	よく混和
溶解状態	懸濁	懸濁	懸濁	沈殿	懸濁	懸濁	懸濁
PH測定	最高用量 10 mg/ml	10 mg/ml	50 mg/ml	10 mg/ml	50 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
	PH 7.50	8.50	7.30	8.01	7.20	8.09	7.40
	予備試験結果 >10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10) 33500 (1.2)	>10000 (10)	>10000 (10)
	本試験結果 ① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >50000 (2) ② >50000 (2)	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① 46000 (1.15) ② 40000 (1.15)	① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (2)# ② >10000 (2)# ③ >10000 (2)#
	追加試験結果 —	—	—	—	—	—	—
	平均値 >10000	>10000	>50000	>10000	39833	>10000	>10000
	標準偏差 —	—	—	—	6251.7	—	—
	変動係数 —	—	—	—	0.157	—	—

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大規模な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*…\*希釈率が公比以外の場合

#沈殿の高濃度の  
測定値なし



表5-5. 各施設の検体の調製条件ならびに本試験結果と追試験結果

検体No. 13

施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	増地	増地	増地	増地	増地	増地	増地
選択理由	—	—	—	—	予備試験DMSOにてEC50>1mg/ml	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	超音波洗浄器	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量	10 mg/ml	10 mg/ml	2.5 mg/ml	6 mg/ml	2.5 mg/ml	5 mg/ml
	PH	7.60	7.00	7.40	7.76	7.20	8.18
	予備試験結果	498 (10)	729 (10)	1000 (10)	3600 (10)	D >1000 (10) 増 1500 (1.5)	500 (10)
	本試験結果	① 1109 (**) ② 1207 (**)	① 882 (1.5) ② 696 (1.5)	① 1860 (1.2) ② 1700 (1.15)	① 1700 (**) ② 1650 (**)	① 1070 (1.2) ② 2100 (1.3)	① 2100 (1.1) ② 1950 (1.1)
	追加試験結果	③ 1306 (**) ④ 1333 (**)	③ 1208 (1.5) ④ 563 (1.5) ⑤ 1650 (1.5)	③ 1030 (2) ④ 1320 (1.2) ⑤ 1900 (1.2) ⑥ 2300 (1.1) ⑦ 2250 (1.2) ⑧ 1700 (1.2)	③ 1200 (**) ④ 1770 (1.2) ⑤ 1920 (1.1) ⑥ 1750 (1.1) ⑦ 1320 (1.15)	—	③ 1700 (2) ④ 2000 (1.3)
	平均値	1239	1000	1758	1517	1633	570
	標準偏差	102.1	436.8	430.1	275.4	357.2	—
	変動係数	0.082	0.437	0.245	0.182	0.219	—

検体No. 14

施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	増地	増地	増地	増地	増地	増地	増地
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	—	—	37℃	—	—	—
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	3.5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
	PH	7.30	8.50	7.00	7.81	7.20	8.13
	予備試験結果	586 (10)	507 (10)	1600 (10)	2100 (10)	1950 (10)	370 (10)
	本試験結果	① 630 (**) ② 670 (**)	① 630 (1.5) ② 461 (1.5)	① 940 (2) ② 1150 (2)	① 1000 (**) ② 760 (**)	① 1270 (1.5) ② 1270 (1.5)	① 140 (1.8) ② 190 (1.8)
	追加試験結果	③ 1000> (**)* ④ 1030 (**)	③ 266 (1.5) ④ 595 (1.5) ⑤ (1649) (1.5)#	③ 820 (2) ④ 490 (2) ⑤ 780 (2)	—	—	③ 450 (1.8) ④ (247) (1.8)# ⑤ (230) (1.8)#
	平均値	777	488	836	880	1147	260
	標準偏差	220.3	165.0	241.1	—	213.6	166.4
	変動係数	0.284	0.338	0.288	—	0.186	0.640

検体No. 15

施設	A	B	C	D	E	F	G
溶媒	増地	増地	増地	増地	増地	増地	エタノール
選択理由	—	—	—	—	—	—	—
溶解方法	37℃	37℃	—	37℃	—	—	超音波分散装置
溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解	溶解
PH測定	最高用量	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	5.5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml
	PH	8.20	7.50	7.80	8.07	7.20	7.83
	予備試験結果	292 (10)	227 (10)	300 (10)	470 (10)	400 (10)	225 (1.4)
	本試験結果	① 180 (**) ② 167 (**)	① 75.7 (1.5) ② 80.1 (1.5)	① 375 (1.2) ② 420 (1.2)	① 310 (**) ② 332 (**)	① 295 (1.15) ② 280 (1.1)	① 265 (1.2) ② 296 (1.2)
	追加試験結果	③ 162 (**) ④ 147 (**) ⑤ 267 (**) ⑥ 178 (**)	③ 124.3 (1.5)	③ 380 (2) ④ 265 (1.1) ⑤ 430 (1.15) ⑥ 540 (1.1) ⑦ 720 (1.1) ⑧ 910 (1.25) ⑨ 390 (1.2) ⑩ 540 (1.1)	③ 1000> (**)* ④ 335 (**)	③ 385 (1.2) ④ 365 (1.2)	③ 162 (1.3) ④ 440 (1.2)
	平均値	184	93	497	319	310	291
	標準偏差	42.6	26.9	191.0	13.9	65.2	114.8
	変動係数	0.232	0.288	0.384	0.044	0.210	0.395

単位…μg/ml

( )…希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率%が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合

図1 ニュートラルレッド取り込み試験での施設間比較

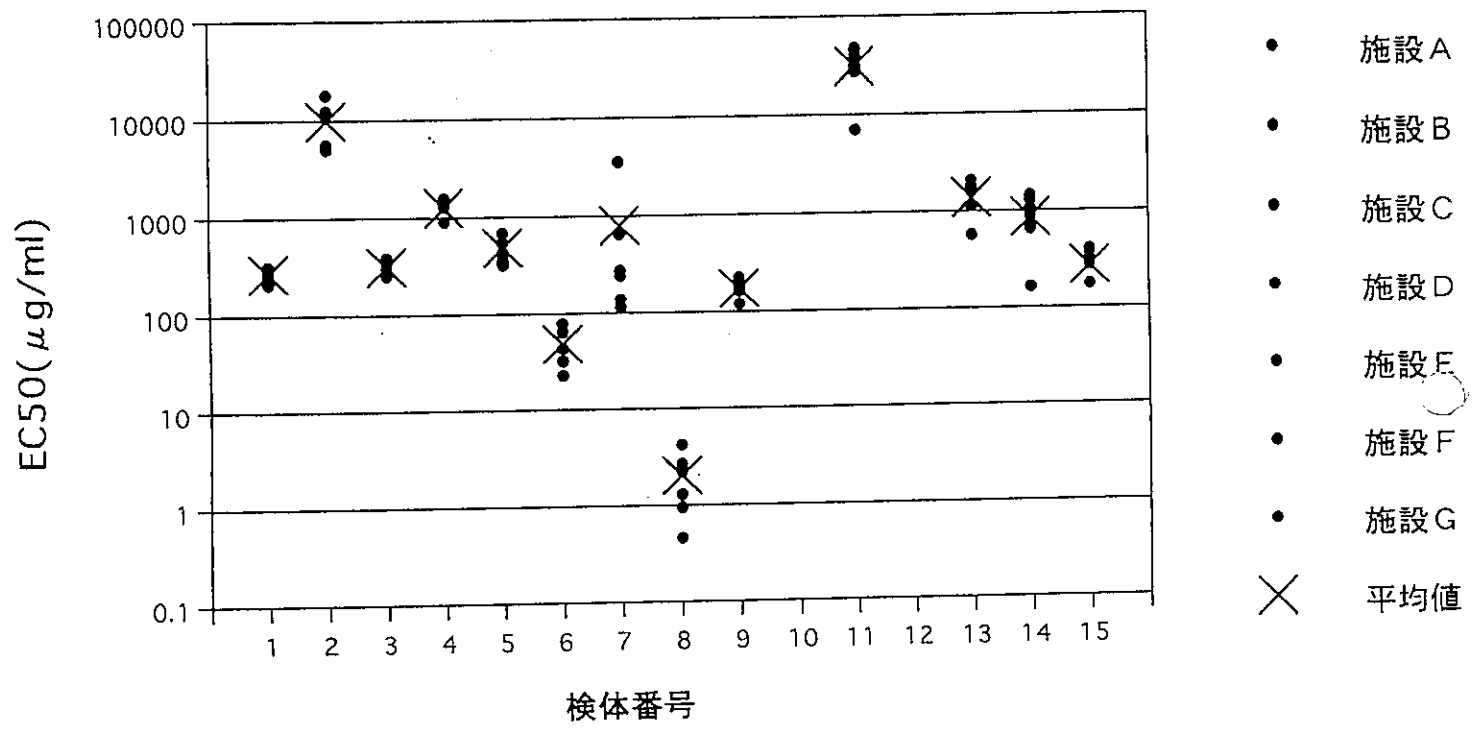


表6 ニュートラルレッド取り込み試験の各施設の順位相関性

検体	平均	施設 A	施設 B	施設 C	施設 D	施設 E	施設 F	施設 G	クリスタルバイオレット 染色性試験平均
1	5	5	6	4	4	6	7	4	5
2	12	13	12	12	12	12	12	10	12
3	6	5	5	5	7	7	8	6	6
4	10	10	11	10	9	10	11	7	9
5	7	8	9	8	6	8	9	10	7
6	2	2	2	2	2	2	2	10	2
7	8	7	8	7	11	3	5	2	10
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	3	3	4	3	3	4	4	3	3
10	13	13	13	12	13	13	12	10	12
11	13	12	13	12	13	13	12	10	12
12	13	13	13	12	13	13	12	10	12
13	11	11	10	11	10	11	10	9	11
14	9	9	7	9	8	9	3	8	8
15	4	4	3	6	5	5	6	5	4
平均値との順位 相関係数 (Spearman)		0.981	0.975	0.980	0.971	0.946	0.879	0.924* (0.631)	0.984

\*…検体5・6を除いて相関値を求めたもの

( ) …上記順位で相関値を求めたもの

表7 クリスタルバイオレット染色性試験の各施設における本試験のEC50値一覧

検体	施設A	施設B	施設D	施設E	施設F	施設G
1	240	301.2	290	315	300	255
	260	306.4	295	315	289	260
	250 (MS)	303.8 (E)	292.5 (E)	315 (M)	294.5 (D)	257.5 (D)
2	10343	5579	4900	7200	12100	32000
	15148	5116	5800	6300	12900	22000
	12746 (M)	5347.5 (M)	5350 (M)	6750 (M)	12500 (M)	27000 (M)
3	220	220.5	340	360	252	380
	240	240.6	340	305	285	380
	230 (M)	230.55 (M)	340 (M)	332.5 (M)	268.5 (M)	380 (M)
4	660	757	1150	1100	745	900
	830	767	1000	1050	675	1900
	745 (M)	762 (M)	1075 (M)	1075 (M)	710 (M)	1400 (M)
5	250	621.7	245	380	265	>600 沈殿
	350	697.9	330	460	320	>600 沈殿
	300 (MS)	659.8 (D)	287.5 (MS)	420 (MS)	292.5 (MS)	>600 (MS)
6	20	42.4	57	35	33.2	54<X<74 沈殿
	17	45.25	57	36	31	64 沈殿
	18.5 (E)	43.825 (P)	57 (E)	35.5 (E)	32.1 (E)	64 (E)
7	284	1407.1	2900	95	643	140
	478	978.7	4400	100	325	100
	381 (MS)	1192.9 (D)	3650 (MS)	97.5 (MS)	484 (D)	120 (D)
8	0.59	0.952	1.8	0.94	2.6	2.3
	0.46	0.962	3.3	0.82	1.89	3.4
	0.525 (M)	0.957 (M)	2.55 (M)	0.88 (P)	2.245 (P)	2.85 (M)
9	140	238.4	275	240	235	220
	66	190.1	239	150	196	290
	103 (D)	214.25 (D)	257 (D)	195 (D)	215.5 (D)	255 (D)
10	>10000	>10000	>10000	6000	>10000	>10000 沈殿
	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000 沈殿
	>10000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)	6000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)
11	6522	>50000	48000	36000	35000	40000
	7187	>50000	47000	29500	34000	40000
	6854.5 (M)	>50000 (M)	47500 (M)	32750 (M)	34500 (M)	40000 (M)
12	>10000	>10000	>10000	45000	>10000	>10000
	>10000	>10000	>10000	32500	>10000	>10000
	>10000 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)	38750 (MS)	>10000 (MS)	>10000 (MS)
13	1038	800	1700	800	810	1950
	1258	977	1270	1400	850	1400
	1148 (M)	888.5 (M)	1485 (M)	1100 (M)	830 (M)	1675 (M)
14	770	579	790	1100	365	1700
	910	539	1600	800	905	1350
	840 (M)	559 (M)	1195 (M)	950 (M)	635 (M)	1525 (M)
15	170	62.1	290	255	114	390
	163	83.6	290	212<X<256.6	220	320
	166.5 (M)	72.85 (M)	290 (M)	255 (M)	167 (M)	355 (E)
S L S	176.00 ± 16.42 n=13	174.78 ± 9.55 n=5	177.67 ± 15.04 n=3	196.60 ± 20.74 n=5	155.00 ± 12.04 n=11	172.08 ± 8.65 n=12

\*施設CはCV法未実施

上中段：本試験各2回データ 下段：本試験の平均値 (μg/ml)

下段括弧内は使用溶媒 (M…培地 P…PBS D…DMSO E…Ethanol)

表8 クリスタルバイオレット染色性試験の本試験結果のまとめ

検体	設数 N	溶媒 使用	EC50最低値 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	EC50最高値 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	EC50値平均 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	標準偏差 S D	変動係数 C V	平均順位	備考欄
1	1	M			315				
	1	MS			250				
	2	E	293	304	298	7.99	0.027		
	2	D	258	295	276	26.2	0.095		
	6	M+MS+E+D	250	315	286	26	0.091	5	
2	6	M	5350	27000	11600	8260	0.712	12	
3	6	M	230	380	297	62.7	0.211	6	
4	6	M	710	1400	963	272	0.282	9	
5	4	MS	288	420	325	63.4	0.195		
	1	MS			>600				
	1	D			660				
	6	MS+D	288	>600	392	159	0.406	7	>600は平均から除外 二相性(4/6)
6	5	E	18.5	64	41.4	18.7	0.452		
	1	P			43.8				
	6	E+P	18.5	64	41.8	16.8	0.402	2	理研のデータの内 54<X<74は除外 二相性(1/6)
7	3	MS	98	3650	1380	1970	1.428		
	3	D	120	1190	598	544	0.91		
	6	MS+D	98	3650	987	1360	1.378	10	
8	4	M	0.525	2.85	2	1.2	0.6		
	2	P	0.88	2.24	1.56	0.97	0.622		
	6	M+P	0.525	2.85	1.67	0.99	0.593	1	
9	6	D	103	257	207	56.4	0.272	3	
10	5	MS			>10000				
	1	MS			6000			12	
11	5	M	6850	47500	32300	15353	0.475		
	1	M			>50000			12	
12	5	MS			>10000				
	1	MS			38800	0		12	
13	6	M	830	1680	1190	335	0.282	11	
14	6	M	559	1530	952	364	0.382	8	
15	5	M	73	290	190	85.1	0.448		
	1	E			355				
	6	M+E	73	355	218	102	0.468	4	メナードのデータの内 212<X<256.6は除外
SLS	7	M	155	197	176	13.4	0.076		

注1: データはすべて上3ケタを有効数字として処理した。

注2: EC50値が10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上は、同一順位とした。

表9 クリスタルバイオレット染色性試験の本試験および追試験結果の変動係数

施設名 検体	A	B	D	E	F	G
1	0.128 ( 7 )	0.086 ( 3 )	0.044 ( 3 )	0.180 ( 5 )	0.342 ( 3 )	0.090 ( 5 )
2	0.275 ( 3 )	0.148 ( 3 )	- ( - )	0.084 ( 3 )	0.281 ( 4 )	0.466 ( 6 )
3	0.118 ( 4 )	0.274 ( 3 )	0.127 ( 4 )	0.177 ( 4 )	0.234 ( 4 )	0.121 ( 5 )
4	0.146 ( 4 )	0.339 ( 4 )	- ( - )	0.222 ( 4 )	0.275 ( 7 )	0.316 ( 4 )
5	0.129 ( 5 )	0.375 ( 3 )	- ( - )	0.101 ( 3 )	0.168 ( 4 )	- ( - )
6	0.208 ( 6 )	- ( - )	- ( - )	0.372 ( 5 )	0.216 ( 4 )	- ( - )
7	0.451 ( 6 )	0.307 ( 3 )	0.248 ( 3 )	0.456 ( 5 )	0.494 ( 3 )	0.616 ( 8 )
8	0.263 ( 4 )	- ( - )	- ( - )	0.454 ( 3 )	0.497 ( 4 )	0.278 ( 6 )
9	0.352 ( 3 )	- ( - )	- ( - )	0.278 ( 3 )	0.099 ( 3 )	0.185 ( 3 )
10	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )	- ( - )
11	0.491 ( 4 )	- ( - )	- ( - )	0.111 ( 3 )	- ( - )	- ( - )
12	- ( - )	- ( - )	- ( - )	0.321 ( 3 )	- ( - )	- ( - )
13	0.117 ( 4 )	0.134 ( 4 )	0.151 ( 3 )	0.247 ( 7 )	- ( - )	0.184 ( 4 )
14	0.174 ( 3 )	0.575 ( 4 )	- ( - )	- ( - )	0.488 ( 3 )	0.366 ( 3 )
15	0.220 ( 6 )	0.219 ( 3 )	0.010 ( 3 )	0.262 ( 4 )	0.571 ( 4 )	0.326 ( 6 )

表10-1. 各施設のクリスタルバイオレット染色性染色性試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 1							
施設	A	B	D	E	F	G	
予備試験結果	>1000 (10)	271 (10)	450 (10)	275 (10) 205 (1.4)	355 (10) 340 (10)	360 (10)	
本試験結果	① 240 (**)	① 301.2 (1.1)	① 290 (**)	① 315 (1.1)	① 300 (1.1)	① 255 (1.1)	
	② 260 (**)	② 306.4 (1.1)	② 295 (**)	② 315 (1.1)	② 289 (1.1)	② 260 (1.1)	
追加試験結果	③ 230 (**)	③ 351.4 (1.2)	③ 315 (**)	③ 240 (1.15)	③ 512 (1.3)	③ 270 (1.5)	
	④ 270 (**)			④ 260 (1.1)		④ 250 (1.2)	
	⑤ 220 (**)					⑤ 310 (1.2)	
	⑥ 220 (**)					⑥ 331>x>226*	
	⑦ 180 (**)					⑦ 301>x>205*	
平均値	231	320	300	267	367	269	
標準偏差	29.7	27.6	13.2	48.0	125.7	24.1	
変動係数	0.128	0.086	0.044	0.180	0.342	0.090	

検体No. 2							
施設	A	B	D	E	F	G	
予備試験結果	>10000 (10)	5150 (10)	5300 (10)	5000 (10) 7400 (1.6)	>10000 (10)	>10000 (10)	
本試験結果	① 10343 (**)	① 5579 (1.2)	① 4900 (**)	① 7200 (1.3)	① 12100 (1.2)	① 32000 (1.5)	
	② 15148 (**)	② 5116 (1.2)	② 5800 (**)	② 6300 (1.3)	② 12900 (1.2)	② 22000 (1.5)	
追加試験結果	③ 9139 (**)	③ 6789 (1.2)	—	—	③ 10500 (1.5)	③ 13000 (2)	
					④ 6300 (1.3)	④ 12000 (1.5)	
						⑤ 42000 (1.5)	
						⑥ 32000 (1.5)	
平均値	11543	5828	5350	6967	10450	25500	
標準偏差	3179.2	863.8	—	585.9	2941.1	11895.4	
変動係数	0.275	0.148	—	0.084	0.281	0.466	

検体No. 3							
施設	A	B	D	E	F	G	
予備試験結果	21 (10)	315 (10)	480 (10)	300 (10) 240 (1.4)	280 (10)	300 (10)	
本試験結果	① 220 (**)	① 220.5 (1.1)	① 340 (**)	① 360 (1.1)	① 252 (1.1)	① 380 (1.1)	
	② 240 (**)	② 240.6 (1.1)	② 340 (**)	② 305 (1.1)	② 285 (1.1)	② 380 (1.1)	
追加試験結果	③ 260 (**)	③ 359 (1.2)	③ 270 (**)	③ 355 (1.15)	③ 187 (1.3)	③ 450 (2)	
	④ 290 (**)		④ 275 (**)		④ 335 (1.1)	④ 480 (2)	
						⑤ 370 (1.1)	
平均値	253	273	306	315	265	412	
標準偏差	29.9	74.9	39.0	55.8	62.1	49.7	
変動係数	0.118	0.274	0.127	0.177	0.234	0.121	

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合

表10-2. 各施設のクリスタルバイオレット染色性試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 4

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	378 (10)	333 (10)	3250 (10)	1330 (10) 720	390 (10)	3200 (10)
本試験結果	① 660 (**) ② 830 (**)	① 757 (1.5) ② 767 (1.5)	① 1150 (**) ② 1000 (**)	① 1100 (1.2) ② 1050 (1.15)	① 745 (1.45) ② 675 (1.45)	① 900 (1.2) ② 1900 (1.2)
追加試験結果	③ 600 (**) ④ 770 (**)	③ 1064 (1.5) ④ 436 (1.5) (1.5)	③ 2000>(**)*	③ 1270 (1.2) ④ 1350>x>1110	③ 550 (1.6) ④ 580 (1.5) ⑤ 337 (1.5) ⑥ 825 (1.5) ⑦ 850 (1.5)	③ 1300 (2) ④ 1200 (1.5)
平均値	715	756	1075	1035	652	1325
標準偏差	104.1	256.5	—	230.1	179.4	419.3
変動係数	0.146	0.339	—	0.222	0.275	0.316

検体No. 5

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	466 (10)	359 (10)	550 (10)	440 (10) 400 (1.4)	860 (10)	>100 (10) >100は沈殿の為 測定不能
本試験結果	① 250 (**) ② 350 (**)	① 621.7 (1.2) ② 697.9 (1.2)	① 245 (**) ② 330 (**)	① 380 (1.2) ② 460 (1.2)	① 265 (1.2) ② 320 (1.2)	① >600 (1.1)# ② >600 (1.1)#
追加試験結果	③ 330 (**) ④ 340 (**) ⑤ 300 (**)	③ 313 (1.2)	—	—	③ 295 (1.6) ④ 213 (1.4)	③ >313 (2)* ④ >313 (2)* ⑤ >600 (1.1)# ⑥ >600 (1.1)# ⑦ (>1000) (1.2)## ⑧ (>1000) (1.2)## ⑨ (>1000) (1.2)## #沈殿 ##再試験
平均値	314	544	288	413	273	>600
標準偏差	40.4	203.8	—	41.6	46.0	—
変動係数	0.129	0.375	—	0.101	0.168	—

検体No. 6

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	34 (10)	>100 (10)#	48 (10)	14 (10) 27 (1.5)	29 (10)	88 (10)
本試験結果	① 20 (**) ② 17 (**)	① 42.4 (1.2) ② 45.25 (1.2)	① 57 (**) ② 57 (**)	① 35 (1.2) ② 36 (1.3)	① 332 (1.3) ② 310 (1.3)	① 54 (1.2)# ② 74 (1.2)#
追加試験結果	③ 20 (**) ④ 26 (**) ⑤ 24 (**) ⑥ 30 (**)	—  #最高濃度沈殿	③ (37.5) (**)#  #再試験	③ 16.8 (1.25) ④ 50 (1.4)	③ 216 (1.3) ④ 226 (1.3)	③ 44.4>x>100#* ④ 35>x>100#* ⑤ (86) (1.3)## #沈殿 ##再試験
平均値	23	44	57	33	271	64
標準偏差	4.8	—	—	12.3	58.6	—
変動係数	0.208	—	—	0.372	0.216	—

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*…\*希釈率が公比以外の場合

表10-3. 各施設のクリスタルバイオレット染色性試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 7

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	>1000 (10)	>1000 (10)	>1000 (10) 410 (10)#	820 (10) 培 255 (2)	590 (10)	360 (10)
本試験結果	① 284 (**) ② 478 (**)	① 1407.1 (1.2) ② 979 (1.2)	① 2900 (**) ② 4400 (**)	① 95 (1.4) ② 100 (1.2)	① 643 (1.7) ② 325 (1.7)	① 140 (1.2) ② 100 (1.2)
追加試験結果	③ 589 (2) ④ 284 (**) ⑤ 160 (**) ⑥ 582 (**)	③ >1000 (1.2) ④ >1000 (1.2) ⑤ 1843.3 (1.2)# ⑥ >2000 (1.2)#	③ 4800 (**) ④ (670) (**)# ⑤ (470) (**)#	③ 120 (1.3) ④ 150 (1.4)	③ 960 (1.7)	③ 340 (1.5) ④ 200 (1.5) ⑤ 360 (1.5) ⑥ 233> (1.1)* ⑦ 116> (1.2)* ⑧ 125 (1.3) ⑨ 120 (1.2) ⑩ 62 (1.2)
平均値	396	1410	4033	144	643	181
標準偏差	178.5	432.3	1001.7	65.7	317.5	111.4
変動係数	0.451	0.307	0.248	0.456	0.494	0.616

検体No. 8

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	— (10)	0.001> (10)	1.8 (10)	1.55 (10) 0.34 (2)	1> (10) 0.077 (10)	3 (10)#
本試験結果	① 0.59 (**) ② 0.46 (**)	① 0.952 (1.5) ② 0.962 (1.5)	① 1.8 (**) ② 3.3 (**)	① 0.94 (2) ② 0.82 (2)	① 2.6 (1.5) ② 1.89 (1.5)	① 2.3 (2)# ② 3.4 (2)#
追加試験結果	③ 0.54 (**) ④ 0.83 (**)	—	—	—	③ 0.84 (1.5) ④ 1.1 (1.5)	③ 2.7 (**)# ④ 3.4 (**)# ⑤ 4 (**)# ⑥ 1.8 (**)#
平均値	0.61	0.96	2.55	0.70	1.61	2.93
標準偏差	0.16	—	—	0.32	0.80	0.81
変動係数	0.263	—	—	0.454	0.497	0.278

検体No. 9

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	— (10)	113 (10)	400 (10)	240 (10) 155 (1.5)	125 (10) 68 (10)	280 (10)
本試験結果	① 140 (**) ② 66 (**)	① 238.4 (1.5) ② 190.1 (1.5)	① 275 (**) ② 239 (**)	① 240 (1.5) ② 150 (1.5)	① 235 (1.4) ② 196 (1.4)	① 220 (1.5) ② 290 (1.5)
追加試験結果	③ 20> (**)* ④ 112 (**)	—	③ 250> (**)*	—	③ 233 (1.4)*	③ 320 (1.5)
平均値	106	214	257	182	221	277
標準偏差	37.4	—	25.5	50.6	22.0	51.3
変動係数	0.352	—	0.099	0.278	0.099	0.185

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合

表10-4. 各施設のクリスタルバイオレット染色性試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 10

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	>10000 (10)	>1000 (10)	>1000 (10)	エ >1000 (10) 増 >10000 (1.4)#	>1000 (10)	>100 (10) >1000 (10)
本試験結果	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① >10000 (1.5) ② >10000 (1.5)	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① 6000 (1.15) ② >10000 (1.4)*	① >10000 ② >10000	① >10000 (2)# ② >10000 (2)#
追加試験結果	—	—	—	③ 43500 (1.2)# ④ >50000 (1.15)#* ⑤ 10000 (1.3) ⑥ >10000 (1.3)*  #懸濁法により データ差有り	—	—  #高濃度で沈殿
平均値	>10000	>10000	>10000	19833	>10000	>10000
標準偏差	—	—	—	—	—	—
変動係数	—	—	—	—	—	—

検体No. 11

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10) 36000 (1.2)	>10000 (10)	>10000 (10)
本試験結果	① 6522 (**) ② 7187 (**)	① >50000 (1.2) ② >50000 (1.2)	① 48000 (**) ② 47000 (**)	① 36000 (1.15)^ ② 29500 (1.15)^	① 35000 (1.2) ② 34000 (1.2)	① 40000 (2) ② 40000 (1.5)
追加試験結果	③ 16404 (**) ④ 7787 (**)	③ 43433 (2)	—	—	—	—
平均値	9475	43433	47500	33833	34500	40000
標準偏差	4648	—	707	3753	707	0
変動係数	0.491	—	0.015	0.111	0.020	0.000

検体No. 12

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10)	>10000 (10) 23500 (1.2)	>10000 (10)	>10000 (10)
本試験結果	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (**) ② >10000 (**)	① 45000 (1.15) ② 32500 (1.15)	① >10000 (2) ② >10000 (2)	① >10000 (2)# ② >10000 (2)# ③ >10000 (2)#
追加試験結果	—	—	—	—	—	—  #沈殿の高濃度の 測定値なし
平均値	>10000	>10000	>10000	33667	>10000	>10000
標準偏差	—	—	—	10797	—	—
変動係数	—	—	—	0.321	—	—

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合。

\*\*…希釈率が公比以外の場合



表10-5. 各施設のクリスタルバイオレット染色性試験の本試験結果と追試験結果

検体No. 13

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	484 (10)	507 (10)	2200 (10)	D >1000 (10) 培 1300 (1.5)	460 (10)	1800 (10)
本試験結果	① 1038 (**) ② 1258 (**)	① 800 (1.5) ② 977 (1.5)	① 1700 (**) ② 1270 (**)	① 800 (1.2) ② 1400 (1.3)	① 810 (1.6) ② 850 (1.6)	① 1950 (1.1) ② 1400 (1.1)
追加試験結果	③ 1148 (**) ④ 1365 (**)	③ 767 (1.5) ④ 716 (1.5)	③ 1400 (**)	③ 1630 (1.2) ④ 1450 (1.1) ⑤ 1230 (1.1) ⑥ 860 (1.15)	—	③ 1300 (2) ④ 1600 (1.3)
平均値	1202	848	1457	1239	830	1563
標準偏差	140.9	113.4	220.5	306.5	—	286.9
変動係数	0.117	0.134	0.151	0.247	—	0.184

検体No. 14

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	879 (10)	1280 (10)	2000 (10)	1100 (10) 580>x>260	540 (10)	1400 (10)
本試験結果	① 770 (**) ② 910 (**)	① 579 (1.5) ② 539 (1.5)	① 790 (**) ② 1600 (**)	① 1100 (1.5) ② 800 (1.5)	① 365 (1.8) ② 905 (1.8)	① 1700 (1.5) ② 1350 (1.5)
追加試験結果	③ 1000> (**)* ④ 1090 (**)	③ 395 (1.5) ④ 1297 (1.5)	—	—	③ 1120 (1.8) ④ (430) (1.8)# ⑤ (610) (1.8)# #再試験	③ 2700 (2)
平均値	923	703	1195	950	797	1917
標準偏差	160.4	404.1	—	—	389.0	700.6
変動係数	0.174	0.575	—	—	0.488	0.366

検体No. 15

施設	A	B	D	E	F	G
予備試験結果	318 (10)	139 (10)	400 (10)	180 (10) 200 (1.4)	190 (10)	370 (10)
本試験結果	① 170 (**) ② 163 (**)	① 62.1 (1.5) ② 83.6 (1.5)	① 290 (**) ② 290 (**)	① 255 (1.15) ② 256.6>x>212	① 114 (1.2) ② 220 (1.2)	① 390 (1.1) ② 320 (1.1)
追加試験結果	③ 135 (**) ④ 131 (**) ⑤ 233 (**) ⑥ 168 (**)	③ 55.5 (1.5)	③ 1000> (**)* ④ 295 (**)	③ 360 (1.2) ④ 235 (1.2)	③ 161 (1.3) ④ 408 (1.2)	③ 240 (2)#* ④ 125 (1.5)#* ⑤ 270 (1.5) ⑥ 320 (1.5) #高濃度の沈殿 溶媒増地
平均値	167	67	292	263	226	278
標準偏差	36.6	14.7	2.9	68.9	129.0	90.5
変動係数	0.220	0.219	0.010	0.262	0.571	0.326

単位…μg/ml

( ) …希釈公比

EC50値…網かけは、細胞生存率が20～80%の間にEC50値を挟んで3点以上取れている場合

\*…本試験と溶媒系が異なる、調整ミス、公比の大幅な違い、EC50が出ない等の理由でデータを棄却した場合、

\*\*…希釈率が公比以外の場合

図2 クリスタルバイオレット取り込み試験での施設間比較

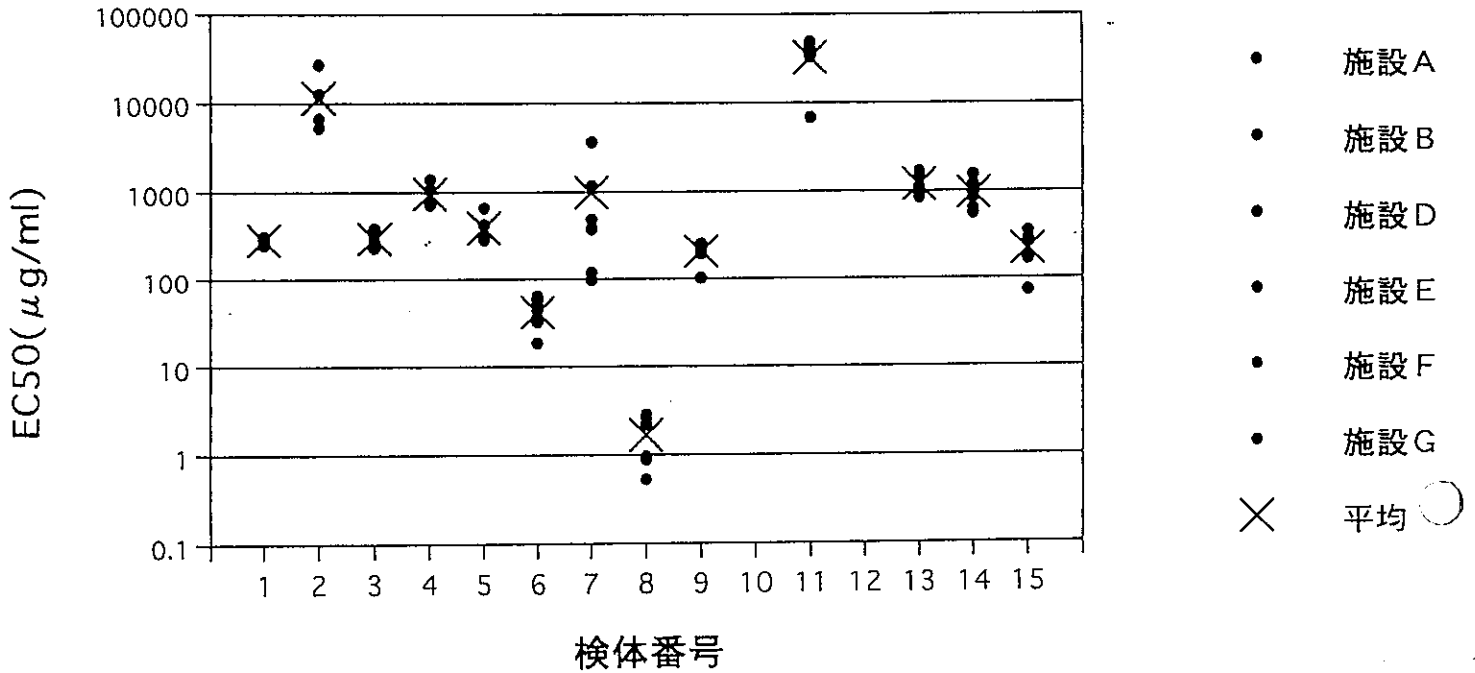


表11 クリスタルバイオレット染色性試験の各施設の順位相関性

検体	平均	施設A	施設B	施設D	施設E	施設F	施設G
1	5	6	6	6	6	7	5
2	12	13	12	12	13	12	11
3	6	5	5	7	7	5	7
4	9	9	9	8	10	10	8
5	7	7	8	4	8	6	11
6	2	2	2	2	2	2	2
7	10	8	11	11	3	8	3
8	1	1	1	1	1	1	1
9	3	3	4	3	4	4	4
10	12	13	13	13	12	12	11
11	12	12	13	13	14	12	11
12	12	13	13	13	14	12	11
13	11	11	10	10	11	11	10
14	8	10	7	9	9	9	9
15	4	4	3	5	5	3	6
平均値との順位 相関係数 (Spearman)		0.977	0.980	0.966	0.891	0.975	0.897* (0.826)

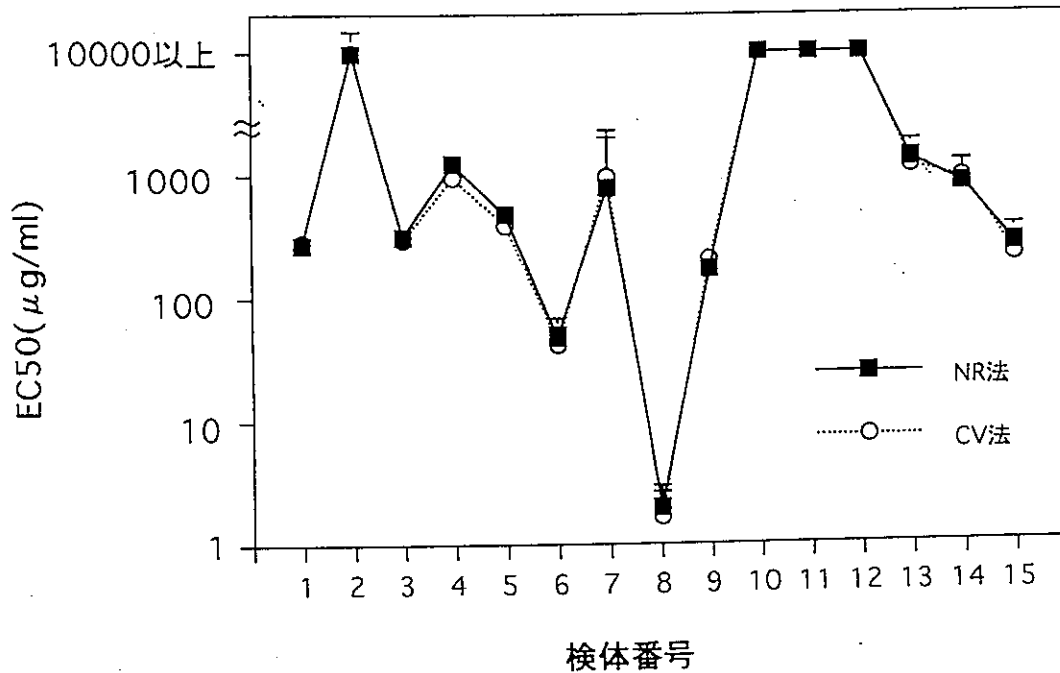
\*…検体5を除いて相関値を求めたもの

( ) …上記順位で相関値を求めたもの

表12 各施設の試験条件の比較

	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F	施設G
細胞増加時間	17.3時間(P420)	16.4時間(P419)	29.2時間(P421)	17時間(P421)	20.3時間(P421)	20.3時間(P419)	23.0時間(P418)
染色体モード	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested
コロニー形成率	not tested	not tested	not tested	31%	not tested	8%	not tested
細菌汚染の有無	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
マイコプラズマ汚染の有無	not tested	not tested	not tested	not tested	(-)	not tested	(-)
# の確認方法					Vero細胞を用いる DNA蛍光染色法		ヘキスト蛍光染色法
測定機器名	Model3550	MPR-A4	MTP-32	NJ-2000	Emax	MPR-A4i	MPR-A4i
製造元	Bio-Rad	東ソー (株)	コロナ電機 (株)	日本インターメッド	Molecular Devices	東ソー (株)	(一部 Biomek) 東ソー(株) (一部 BECKMAN)
測定波長(nm)	540	540/415	540	540	540	540	540
NRの製造元	ナカライテスク (株)	和光純薬工業 (株)	GIBCO	片山化学工業 (株)	和光純薬工業 (株)	和光純薬工業 (株)	SIGMA
本試験陰性対照							
吸光度実測値							
測定回数	30	30	30	30	30	30	30
最高値	1.463	1.424	1.37	1.422	1.37	1.974	0.947
最低値	0.785	0.54	0.779	0.779	0.886	0.778	0.28
平均値	1.160	1.137	1.008	1.188	1.025	1.180	0.566
標準偏差	0.177	0.239	0.171	0.135	0.125	0.224	0.159
変動係数	0.152	0.210	0.170	0.114	0.122	0.190	0.280
陽性対照SLSの							
EC50値 (μg/ml)							
測定回数	15	6	16	3	7	13	21
最高値	195	179	164	195	217	162	180
最低値	142	159	112	165	160	121	150
平均値	173	171	148	177	186	149	167
標準偏差	17.10	8.83	14.06	16.07	21.36	13.14	9.16
変動係数	0.099	0.052	0.095	0.091	0.115	0.088	0.055
測定波長(nm)	588	570/620		590	590	570	570
CVの製造元	和光純薬工業 (株)	和光純薬工業 (株)		片山化学工業 (株)	片山化学工業 (株)	ナカライテスク (株)	和光純薬工業 (株)
測定時の抽出の有無	抽出しない	抽出した		抽出しない	抽出しない	抽出しない	抽出した
本試験陰性対照							
吸光度実測値							
測定回数	30	30		30	30	30	30
最高値	1.357	0.628		0.913	0.391	0.744	1.701
最低値	0.441	0.205		0.408	0.216	0.4	0.492
平均値	0.825	0.411		0.754	0.300	0.562	1.010
標準偏差	0.205	0.123		0.115	0.040	0.105	0.291
変動係数	0.249	0.300		0.152	0.134	0.188	0.289
陽性対照SLSの							
EC50値 (μg/ml)							
測定回数	15	6		3	7	12	21
最高値	194	183		195	223	166	185
最低値	145	159		168	170	130	150
平均値	176	176		178	191	155	170
標準偏差	16.18	9.15		15.04	19.72	11.54	9.42
変動係数	0.092	0.052		0.085	0.103	0.075	0.055

図3 NR法とCV法でのEC50値の比較 (n=15)



NR法とCV法のEC50値の相関係数  $r=0.999$

順位相関係数  $r=0.984$

ただしEC50が10000  $\mu\text{g/ml}$ 以上はすべて10000  $\mu\text{g/ml}$ として計算した。

表1-3 SIRC試験結果とin vivo 結果との相関 (n=9)

		相関係数		順位相関係数	
		vs NR法	vs CV法	vs NR法	vs CV法
最大値	総点	-0.883	-0.882	0.577	0.566
	角膜	-0.873	-0.871	0.580	0.577
	虹彩	-0.852	-0.849	0.487	0.447
	結膜	-0.730	-0.734	0.544	0.533
24時間	総点	-0.864	-0.863	0.507	0.496
	角膜	-0.864	-0.862	0.376	0.347
	虹彩	-0.875	-0.869	0.550	0.548
	結膜	-0.760	-0.764	0.577	0.566
AUC比	総点	-0.871	-0.869	0.577	0.566
	角膜	-0.873	-0.870	0.577	0.566
	虹彩	-0.842	-0.842	0.376	0.347
	結膜	-0.862	-0.862	0.507	0.496

表 1 4 Draize眼刺激性試験結果との対応性検討に用いたデータおよび順位一覧  
データ一覧

検体NO.	NR法			CV法			最大			24時間			AUCIt		
	EC50	logEC50	In vitro rank	EC50	logEC50	In vitro rank	総評価点	角膜評価点	虹彩評価点	結膜評価点	総評価点	角膜評価点	虹彩評価点	結膜評価点	総評価点
1	271	2.433	2	286	2.456	3	11	1.7	1.7	9.3	5.7	1.7	0	4	1.6
2	9760	3.989	9	11600	4.064	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	316	2.500	4	297	2.473	4	25	20	1.7	10	20.3	11.7	0	8.7	15.6
4	1250	3.097	7	961	2.983	6	0	0	0	0	0	0	0	0	11.6
7	794	2.900	5	988	2.995	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2	0.301	1	1.67	0.223	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1370	3.137	8	1190	3.076	8	94.7	80	5	15.3	93	73.3	5	14.7	79.5
14	856	2.932	6	951	2.978	5	23	15	1.7	10	23	15	0	8	14.3
15	271	2.433	2	218	2.338	2	4.3	1.7	0	2.7	0.7	0	0	0.7	0.4

順位一覧

検体NO.	NR法		CV法		最大			24時間			AUCIt		
	In vitro rank	In vitro rank	総評価点	角膜評価点	虹彩評価点	結膜評価点	総評価点	角膜評価点	虹彩評価点	結膜評価点	総評価点	角膜評価点	虹彩評価点
1	2	3	4	4	2	4	4	4	4	2	4	4	4
2	9	9	6	6	5	6	6	5	5	2	6	6	5
3	4	4	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3
4	7	6	6	6	5	6	6	5	2	6	6	6	5
7	5	7	6	6	5	6	6	5	2	6	6	6	5
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	8	8	3	3	2	3	2	2	2	3	3	3	2
14	6	5	6	6	5	6	6	5	2	6	6	6	5
15	2	2	5	4	5	5	5	5	2	5	5	5	5

図4 Draize 眼刺激性試験の最大値総評価点と  
ニュートラルレット取り込み試験のlogEC50の相関性  
(確定値9検体)

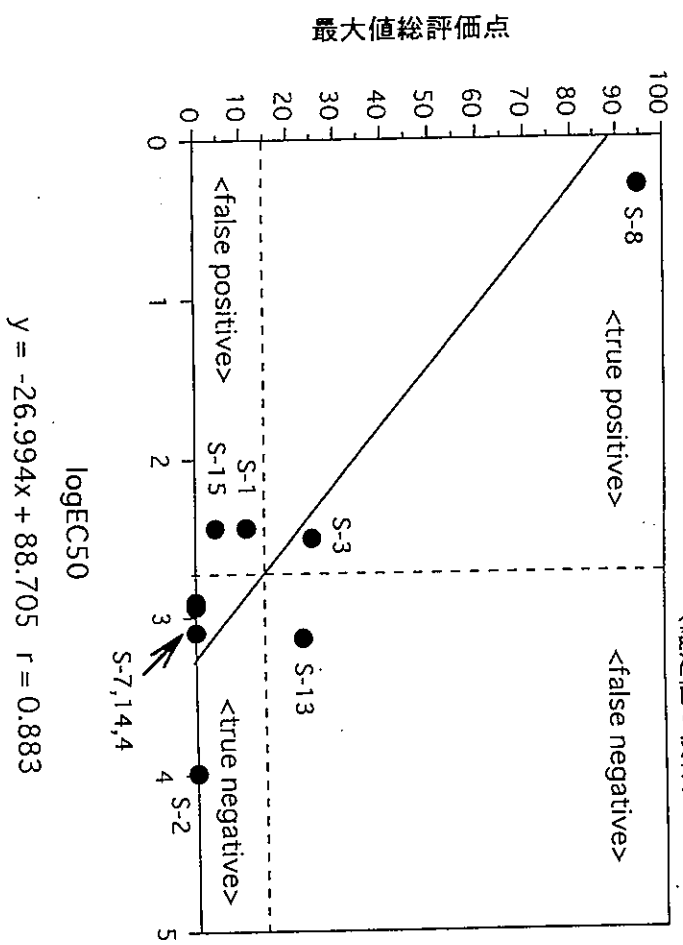


図5 Draize 眼刺激性試験の最大値総評価点と  
クリスタルバイオレット染色性試験のlogEC50の相関性  
(確定値9検体)

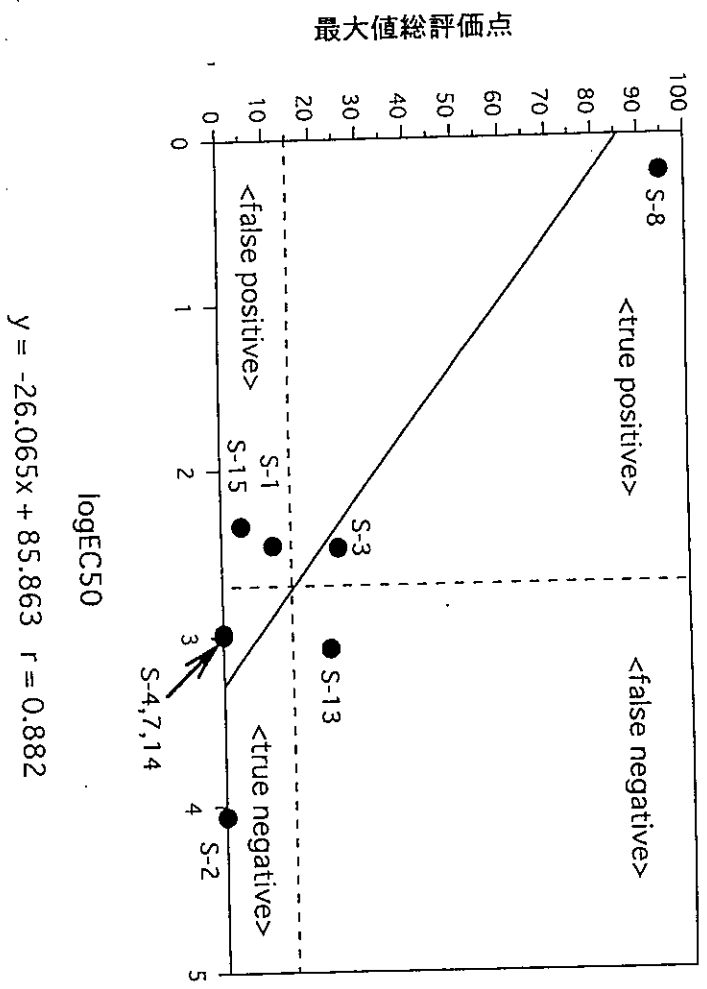


表15 Draize試験の最大値総評価点15前後における対応性

	インビトロ試験結果からの推定値	
	15点未満	15点以上
インビトロ試験結果	15点未満	2,4,7,14
	15点以上	1,15
		false positive
		13
		false negative
		3,8

図6 細胞毒性試験法のまとめ

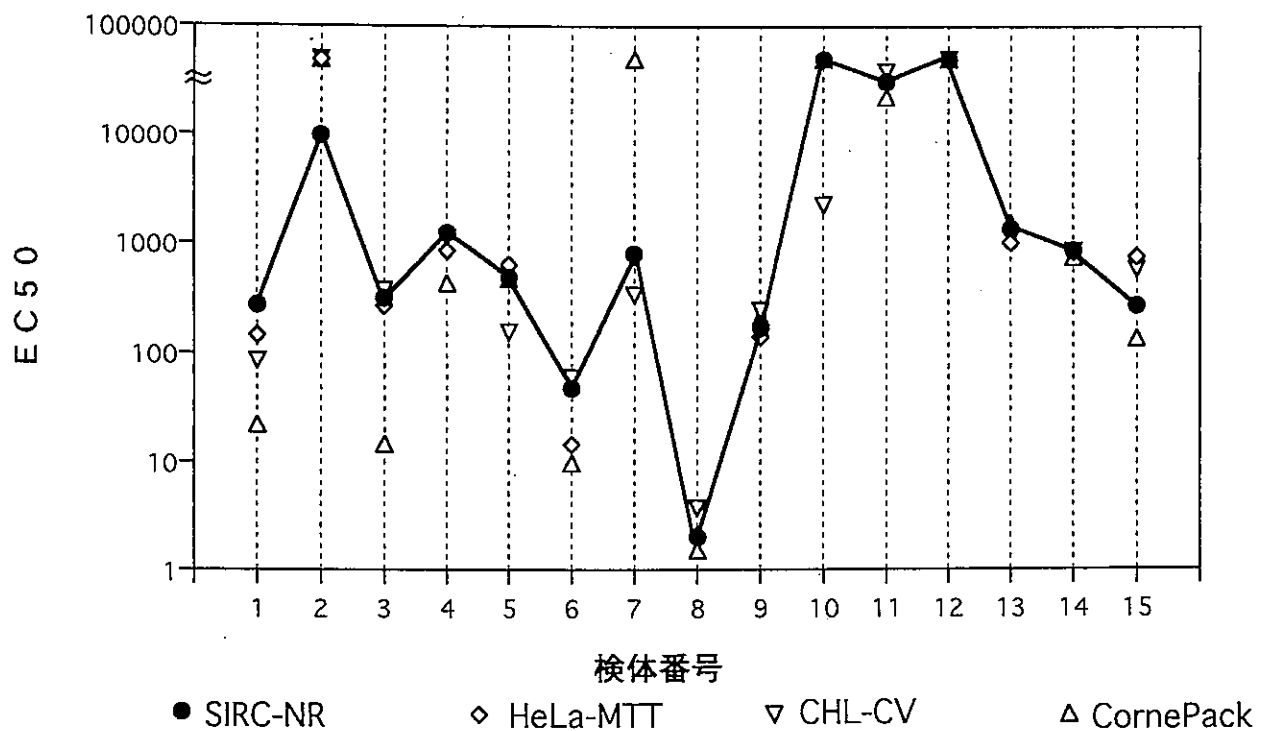


表16 EC50値と最大値総評価点との比較

試験法	確定検体数	相関係数	順位相関係数	FalsePositive	FalseNegative
SIRC-NR	9	-0.883	0.577	2 (検体1, 15)	1 (検体13)
HeLa-MTT	10	-0.843	0.650	1 (検体1)	1 (検体13)
CHL-CV	9	-0.832	0.433	2 (検体1, 5)	2 (検体3, 13)
CornePack	9	-0.715	0.678	2 (検体1, 15)	1 (検体13)

