

三次バリデーション結果報告書

ウサギ角膜由来細胞株を用いた細胞毒性試験 (SIRC-NR)

960214

試験責任者 ポーラ化成工業(株) 谷 尚子

〈参加施設および研究者 (敬称略)〉

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
ホーユー：宇佐美雅仁、加藤久美子
ポーラ：木下 成美、谷 尚子
理研：大野 忠夫、西條 薫、加藤麻矢子

〈要旨〉

本研究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』により選定された *in vitro* の Draize 眼粘膜刺激性試験代替法の三次バリデーションとして実施した。

1. 被験物質

酸性・アルカリ性物質を含む 14 種類の化粧品原料を用いた (略)。

2. 方法

SIRC細胞を用いたニュートラルレッド取り込み試験 (SIRC-NR) およびオプシオンとしてクリスタルバイオレット染色性試験 (SIRC-CV) …三次バリデーション SOP 参照のこと

なお、2次バリデーション SOP から以下の6点について変更した。①培養液に可溶性粉体および固体の滅菌後のエタノールの多少の残存は良い。また、滅菌により被験物質が変質する場合、滅菌しない場合も検討する。②生存曲線の20～80%に実測点は1点以上とする。また、公比は1.5～1.1の範囲で検討する。③被験物質の最高用量は10000 $\mu\text{g/ml}$ とする。④陽性対照の SL S は最高用量500 $\mu\text{g/ml}$ 、公比1.5で実施する。⑤被験物質の pH 測定は予備試験のみとする。⑥試験管理の一環として細胞検量線を作成する。同じ被験物質を同日に実施しないこととする。

3. 結果

3-1. 各施設における試験結果 (表1)

本試験には6施設が参加した。全被験物質について試験可能であった。全施設で共通して確定した値を得られたのは14被験物質中12物質であった。

3-2. 施設内の比較

施設内変動は本試験結果および追試験結果から算出した変動係数により検討の結果、0.013～0.665であり概ね0.5以下に収まっていることから、良い再現性を認めた。なお、SOPの改訂の結果EC50算出のための条件が緩和されたことから、2次バリデーションに比較し各施設ともに試験回数が減少した (表2、5)。

S3-4 (塩化ステアリルトリメチルアンモニウム) については1施設にて被験物質のエタノール滅菌の有無や調製濃度により調製液が溶解する場合と懸濁する場合があったが、EC50値はどちらの場合もほぼ同値であったため滅菌した場合の値を本試験結果として解析に用いた。本物質については別の1施設も高濃度にて溶解性が変わると報告している。

3-3. 施設間の比較

施設間変動は被験物質毎に各施設の本試験平均値の変動係数を算出し指標とした。その結果、0.096～0.501であり施設間再現性は良好であった。施設間再現性には溶媒の一致性や被験物質の培地に対する溶解性の影響はほとんど認められず、また、酸性・アルカリ性の影響も認められなかった。(表3、図1)

さらに、本試験平均値と各施設平均値との順位相関を検討したところ、相関係数は0.978～1.0であり非常に高い相関を示した (表4)。

3-4. Draize眼刺激性試験結果との対応性

In vivo 10%での評価点と *in vitro* 全施設の平均値との相関性を、*in vitro* にて確定値の得られた12被験物質について回帰式を用いて検討した。また、全被験物質について順位相関性を検討した (図2、3、4、表6)。*In vivo* 観察項目のうち相関係数、順位相関係数ともに良好な値を示したのは最大値総評価点であり、回帰式は $y = -21.628 \times \log(x) + 88.793$ 、相関係数は-0.731、順位相関係数は0.737であった。同回帰式を用い *in vivo* 試験と *in vitro* 試験の対応性を全14被験物質について検討した。*in vivo* に

て角膜損傷の発現の目安値として考えられている Draize Score15点 (DS15) に対応するX軸の交点を求め区分けた結果、false negative としてS3-9 (ブタノール)、false positive としてS3-12 (乳酸) が挙げられた。

なお、最大値総評価点と各施設のEC50平均値との相関性を検討した結果、相関係数は-0.666~-0.748でありどの施設もほぼ同じ様な相関性を示した (図5)。

3-5. SIRC-CVとの比較

オプションとして参加施設の自由選択で実施したSIRC-CVには5施設が参加した。

試験の結果のうち、SOPの逸脱とみなした3被験物質の各1施設の結果は解析から除外した。確定値が得られたのはSIRC-NRと同一の12物質であった (表7)。

施設内および施設間の再現性はSIRC-NRと同様に良好であった (表8、9、11、図6)。また、本試験平均値と各施設平均値との順位相関性においても高い相関を示した (表10)。なお、施設間にてS3-5 (ジイソプロパノールアミン) にややバラツキが認められたが、S3-5に暴露された細胞の形状に一部変形や凝集が認められたことから、刺激が強く出た施設Eでは洗浄操作中の細胞のはがれの可能性が考えられた。

SIRC-CVの本試験結果とSIRC-NRの結果を比較したところ、EC50値の相関係数および順位相関係数はいずれも高く、良い対応性が認められた (図7)。

Draize眼刺激性試験結果との相関性および順位相関性を検討した (図8、9、10、表6)。

SIRC-NRと同様に相関係数および順位相関係数が比較的良好であった最大値総評価点の回帰式は、 $y = -20.677 \log(x) + 85.889$ であり、相関係数は-0.698、順位相関係数は0.662であった。また、同式を用いた対応性を検討した結果、false negative としてS3-9、false positive としてS3-3 (トリエタノールアミン) とS3-12が挙げられた。

SIRC-NRと比較し false positive が一つ増加したが、回帰式の傾きが若干変わったことと S3-3 のEC50値がやや強くなったためであると思われる。

以上のことからSIRC-CVはSIRC-NRとほぼ同傾向の結果を示すものの、in vivo との対応性等にやや違いが認められることから、今後一次から三次バリデーションの結果を合わせさらに解析することが必要であると思われる。

3-6. 各施設間の試験条件の比較

SIRC-NRおよびSIRC-CVともに、各施設の陰性対照と陽性対照SLSの再現性は非常に良好であり、各施設の技術的な水準は同程度に高いものと思われる。(表12)

SIRC-NRについては各施設の機器精度管理データと細胞検量線データより、いずれの施設も適正なデータ範囲で試験実施できていることが示された (図11、12)。

SIRC-CVにて測定時のホルムアミド抽出は各施設で適宜実施したが、S3-5のように細胞の形状が通常と異なる場合は、抽出することによりEC50値が変わる場合が考えられたため、別途3施設にて検討した (表13)。その結果、3施設中2施設は抽出によって本試験のEC50値が減弱した。このことからこのような場合には抽出を併用し、他の要因とともに判断する必要があると思われる。なお、本試験結果には各施設の意思を尊重し、抽出により減弱した施設のうち細胞の凝集が確認された施設Bは抽出データを、凝集の認められなかった施設Dは未抽出のデータを、抽出により刺激に差の無かった施設Aは未抽出のデータを本試験結果とした。

4. その他

今回のバリデーションは二次と比較して操作上簡便になり、かつ、試験精度は同様に高レベルであったことからSOPの変更は妥当であったと考えられる。三次バリデーション参加施設の意見を踏まえ、さらにSOPを理解しやすくするポイントを以下に示す。

①培養液の重曹量はMEMの一般的な作成法にならうこととし、量指定は削除する。

(SOP表記上の最少重曹量で最低pHにて培養液を調製すると緩衝能がやや低下したという報告が1施設からなされたため。)

②高濃度で沈殿が生じる場合の調製法を明記する。

③SIRC-CVにて、被験物質暴露により細胞の形状が変わった場合 (変形や凝集など) 洗浄操作などで剥がれることの無いよう気をつける必要があることと、測定時に抽出した場合の結果を併用することを追記する。

5. まとめ

Draize 眼粘膜刺激性試験代替法の三次バリデーションとして14被験物質についてSIRC-NRの有

・
有用性を検討した。

施設内・施設間ともに再現性は非常に良好であった。in vivo との対応性は Draize 試験最大値総評価点との検討にて false negative と false positive とともに 1 物質ずつでありほぼ良い対応性を示した。よって SIRC-NR は酸・アルカリが被験物質に含まれる場合であっても眼粘膜刺激試験代替法として有用である可能性が示唆された。

なお、今回のバリデーションは二次バリデーションより操作上は簡便になったが、試験精度への影響は無く SOP の変更は妥当であったと考えられる。

今後、一次から三次バリデーション全結果について解析を行い、SIRC-NR の Draize 眼粘膜刺激性試験代替法としての有用性を明らかにするつもりである。

付表1 SIRC-NR および SIRC-CV の二次・三次バリデーションにおける用量反応曲線

SD の施設での結果を引用。

- 1-1. SIRC-NR 用量反応曲線 (二次バリデーション)
- 1-2. SIRC-CV 用量反応曲線 ()
- 1-3. SIRC-NR 用量反応曲線 (三次バリデーション)
- 1-4. SIRC-CV 用量反応曲線 ()

付表2 二次バリデーションのコード開示後の修正内容

- 2-1. SIRC-NR
- 2-2. SIRC-CV

各施設における試験結果

表1 SIRC-NRの各施設における試験結果

被験物質	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F
S3-1	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<
	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<
	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)
S3-2	4.81	11.0	22.0	9.10	12.7	17.5
	5.18	11.8	20.2	5.20	11.8	20.0
	5.00 (M)	11.4 (M)	21.1 (M)	7.15 (M)	12.3 (M)	18.8 (M)
S3-3	1960	2670	3300	3600	3990	3700
	1710	2490	3000	3100	3900	4200
	1835 (M)	2580 (M)	3150 (M)	3350 (M)	3945 (M)	3950 (M)
S3-4	1.54	2.41	1.70	1.00	2.28	2.60
	1.57	2.21	2.20	1.15	2.68	2.20
	1.56 (M)	2.31 (M)	1.95 (P)	1.08 (MS)	2.48 (P)	2.40 (MS)
S3-5	620	1240	1750	1480	1540	1650
	642	1380	1780	1430	1580	1350
	631 (M)	1310 (M)	1765 (M)	1455 (M)	1560 (M)	1500 (M)
S3-6	118	128	120	126	114	160
	105	138	125	97	125	150
	112 (P)	133 (P)	123 (P)	112 (P)	120 (P)	155 (P)
S3-7	2.88	2.98	3.60	1.20	3.80	1.70
	3.60	2.73	3.90	1.10	3.70	1.90
	3.24 (P)	2.86 (M)	3.75 (M)	1.15 (MS)	3.75 (P)	1.80 (E)
S3-8	602	451	740	530	703	670
	612	498	740	390	830	670
	607 (M)	475 (M)	740 (M)	460 (M)	767 (M)	670 (M)
S3-9	10000<	3450	10000<	10000<	10000<	3200
	10000<	4140	10000<	10000<	10000<	3700
	10000< (M)	3795 (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	3450 (M)
S3-10	76.4	72.9	51.0	76.0	138.0	150.0
	80.3	80.1	49.0	68.0	125.0	140.0
	78.4 (D)	76.5 (D)	50.0 (D)	72.0 (D)	131.5 (D)	145.0 (D)
S3-11	9.9	10.9	8.8	5.6	13.8	14.0
	13.6	9.7	7.8	6.2	13.2	16.5
	11.8 (P)	10.3 (P)	8.3 (P)	5.9 (P)	13.5 (P)	15.3 (P)
S3-12	940	763	1500	1000	715	920
	763	814	1500	560	735	1050
	852 (M)	789 (M)	1500 (M)	780 (M)	725 (M)	985 (M)
S3-13	818	642	1130	740	740	500
	885	661	1140	650	690	690
	852 (M)	652 (M)	1135 (M)	695 (M)	715 (M)	595 (M)
S3-14	188	165	158	190	151	170
	205	189	162	170	147	170
	197 (D)	177 (D)	160 (MS)	180 (D)	149 (D)	170 (D)
S L S	173 ± 5.51 n=15	175 ± 4.11 n=7	176 ± 5.12 n=9	136 ± 27.8 n=6	150 ± 5.24 n=6	179 ± 4.41 n=17

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…エタノール)

表 2 S I R C－N Rの本試験および追試験結果の変動係数と試験回数

施設名 被験物質	A	B	C	D	E	F
S3-1	- (2)	- (2)	- (5)	- (2)	- (2)	- (2)
S3-2	0.273 (4)	0.280 (3)	0.193 (4)	- (2)	0.303 (3)	- (2)
S3-3	0.328 (4)	- (2)	0.203 (6)	- (2)	- (2)	- (2)
S3-4	- (2)	- (2)	0.665 (5)	- (2)	- (2)	0.314 (4)
S3-5	0.105 (3)	0.140 (3)	0.085 (4)	- (2)	0.068 (4)	0.105 (3)
S3-6	0.124 (3)	0.109 (5)	0.201 (5)	0.275 (5)	- (2)	0.032 (3)
S3-7	- (2)	- (2)	0.299 (6)	- (2)	- (2)	0.478 (4)
S3-8	0.167 (3)	- (2)	0.543 (5)	- (2)	0.175 (3)	- (2)
S3-9	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)	- (3)	0.258 (4)
S3-10	0.080 (3)	- (3)	0.347 (4)	- (2)	0.325 (3)	0.146 (4)
S3-11	- (2)	0.212 (3)	0.284 (5)	- (2)	- (2)	- (3)
S3-12	- (2)	0.118 (3)	0.013 (4)	- (2)	0.300 (3)	0.214 (4)
S3-13	- (2)	0.110 (4)	0.068 (4)	- (2)	0.044 (3)	0.280 (4)
S3-14	0.116 (3)	0.137 (5)	0.142 (6)	0.098 (5)	- (2)	0.033 (4)

* 試験結果のうち確定値のみ算出に用いた。試験回数が2回の場合の変動係数は算出しなかった。

表3 SIRC-NR 試験結果まとめ

被験物質	施設数N	使用溶媒	EC50最低値 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50最高値 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50平均値 ($\mu\text{g/ml}$)	標準偏差 S D	変動係数 C V	平均順位	備考欄
S3-1	6	M	-	-	10000<	-	-	13	
S3-2	6	M	5.00	21.1	12.6	6.31	0.501	4	アルカリ性
S3-3	6	M	1840	3950	3140	820	0.261	12	アルカリ性
S3-4	2	M	1.56	2.31	1.93	0.534	0.276		
	2	P	1.95	2.48	2.22	0.375	0.169		
	2	MS	1.08	2.4	1.74	0.933	0.536		
	6	M+P+MS	1.08	2.48	1.96	0.552	0.281	1	
S3-5	6	M	631	1770	1370	391	0.286	11	アルカリ性
S3-6	6	P	112	155	126	16.4	0.131	6	最高濃度で沈殿
S3-7	2	M	2.86	3.75	3.30	0.633	0.192		
	2	P	3.24	3.75	3.50	0.361	0.103		
	1	E	1.80	1.80	1.80	-	-		
	1	MS	1.15	1.15	1.15	-	-		
	6	M+P+E+MS	1.15	3.75	2.76	1.07	0.388	2	最高濃度で沈殿
S3-8	6	M	460	767	620	131	0.211	8	酸性
S3-9	2	M	3450	3800	3620	244	0.067		
	4	M	-	-	10000<	-	-		
	6	M	-	-	7870<	-	-	13	
S3-10	6	D	50.0	145	92.2	37.3	0.405	5	最高濃度で沈殿
S3-11	6	P	5.90	15.3	10.8	3.42	0.316	3	最高濃度で沈殿
S3-12	6	M	725	1500	938	289	0.308	10	酸性
S3-13	6	M	595	1140	774	197	0.254	9	酸性
S3-14	5	D	149	197	175	17.3	0.099		
	1	MS	160	160	160	-	-		
	6	D+MS	149	197	172	16.5	0.096	7	最高濃度で沈殿
SLS	6	M	136	179	165	17.8	0.108		

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値が未確定の被験物質は、同一順位とした。

注3：EC50値に確定値と未確定値が混在する場合、10000 $\mu\text{g/ml}$ 以上を10000 $\mu\text{g/ml}$ として平均値を求め「平均値<」と表記した。

注4：酸性・アルカリ性被験物質の変動係数とその他の被験物質の変動係数の間に有意な差は認められなかった(T検定)。

NR順位相関性

表 4 S I R C - N R の各施設のEC50値と平均値との順位相関性

被験物質	平均	施設 A	施設 B	施設 C	施設 D	施設 E	施設 F	S I R C - C V 平均
S3-1	13	13	14	13	13	13	14	13
s3-2	4	3	4	4	4	3	4	3
s3-3	12	12	12	12	12	12	13	12
s3-4	1	1	1	1	1	1	2	1
s3-5	11	9	11	11	11	11	11	8
s3-6	6	6	6	6	6	5	6	6
s3-7	2	2	2	2	2	2	1	2
s3-8	8	8	8	8	8	10	9	9
s3-9	13	13	13	13	13	13	12	13
s3-10	5	5	5	5	5	6	5	5
s3-11	3	4	3	3	3	4	3	4
s3-12	10	10	10	10	10	9	10	11
s3-13	9	10	9	9	9	8	.8	10
s3-14	7	7	7	7	7	7	7	7
平均値との順位 相関係数 (Spearman)		0.981	0.999	1.000	1.000	0.978	0.983	0.969

表5-1 SIRC-NRにおける各施設的全試験結果

施設		予備試験										本試験																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
		溶媒	EC50	pH	最高用量	溶媒	溶解方法	溶解状態	EC50					試験 1					試験 2					過試 1					過試 2					過試 3					過試 4					過試 5					全平均	全平均SD	変動係数																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
									平均値	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
A	N	MEM	10000<	8.02	10000	MEM	37度に加温	溶解	10000≤	10000≤	1.5	10000≤	1.5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

S3-2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

53-3	A	C	MEM	3770.6	9.0	10000	MEM	37度に加温	溶解	1831.3	1956	1.5	1706	1.1	3187	1.5	1733	1.5						2145.683	703.181	0.328
	B	L	MEM	3850	9.21	10000	MEM	変温	溶解	2580	2670	1.5	2490	1.5									2580.000	127.279	-	
	C	O	MEM	3700	9.22	10000	MEM	溶解	3150	3300	1.2	3000	1.2	3900	1.5	4100	1.2	5300	1.2	4200	1.2		3366.667	804.156	0.203	
	D	O	MEM	3900	9.06	10000	MEM	37℃維持	可溶	3350	3600	1.5	3100	1.5									3350.000	353.553	-	
	E	G	MEM	4990	9.69	10000	MEM	変温	溶解	3945	3990	1.5	3900	1.5									3945.000	63.640	-	
	F	L	MEM	1200	9	10000	MEM	溶解	3950	3700	1.5	4200	1.3										3950.000	353.553	-	

S3-4		F	1%EtOH/MEM	1>	8.02	1000																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
------	--	---	------------	----	------	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

S3-5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

表5-2 S I R C-N Rにおける各施設の全試験結果

		予備試験		本試験																	
施設	試験コード	溶媒	EC50	pH	最高用量	溶媒	溶解方法	溶解状態	平均値	試験1	試験2	通試1	通試2	通試3	通試4	通試5	全平均	全平均SD	変動係数		
S3-6																					
A	K	10%PBS(-)MEM	140.59	8.0	1000	10%PBS(-)MEM	37度に加温	懸濁	111.45	117.6	1.3	105.3	1.1	91.57	1.5		104.823	13.036	0.124		
B	F	PBS(-)	335	8.2	1000	PBS(-)	37℃	溶解	133	128	1.2	138	1.2	156	1.5	122	154	1.2	139.600	15.192	0.109
C	M	PBS(-)	600	7.98	1000	PBS(-)		溶解	122.5	120	1.2	125	1.2	105	1.5	175	130	1.2	131.000	26.315	0.201
D	N	PBS(-)	330	8.29	1000	PBS(-)	37℃搅拌	可溶	111.5	126	1.1	97	1.1	72	1.5	100<	130<	1.1	98.333	27.025	0.275
E	O	PBS(-)	234	8.42	1000	PBS(-)	超音波	溶解	119.5	114	1.5	125	1.5				119.500	7.778	-		
F	J	PBS(-)	280	7.2	1000	PBS(-)		培養液に懸濁	155	160	1.3	150	1.2	155	1.3		155.000	5.000	0.032		
S3-7																					
A	L	10%PBS(-)MEM	2.61	7.89	1000	10%PBS(-)MEM	37度に加温	懸濁	3.24	2.88	1.5	3.6	1.5				3.240	0.509	-		
B	O	MEM	1>	7.9	10000	MEM	37℃	溶解	2.855	2.98	1.5	2.73	1.5				2.855	0.177	-		
C	C	MEM	2.2	7.89	10000	MEM		やや白濁	3.75	3.6	1.5	3.9	1.5	3.1	1.5	2.3	5.4	1.5	3.883	1.162	0.299
D	A	MEM	1>	8.02	10000	MEM	37℃搅拌	溶解	1.15	1.2	1.5	1.1	1.5				1.150	0.071	-		
E	N	PBS(-)	3.55	7.98	1000	PBS(-)	超音波	溶解	3.75	3.8	1.5	3.7	1.5				3.750	0.071	-		
F	G	エタノール	1.7	7.4	1000	エタノール	37℃	培養液に懸濁	1.8	1.7	1.3	1.9	1.3	1.5	1.5	3.8	1.3	2.225	1.083	0.478	
S3-8																					
A	M	MEM	1486.1	3.78	10000	MEM	37度に加温	溶解	607.05	602	1.5	612.1	1.5	447.5	1.5		553.863	92.250	0.167		
B	D	MEM	243	3.5	10000	MEM	室温	溶解	474.5	451	1.5	498	1.5				474.500	33.234	-		
C	J	MEM	31	3.7	10000	MEM		溶解	740	740	1.5	740	1.5	1000<	1.5	2150	910	1.5	1026.667	557.447	0.543
D	G	MEM	300	3.88	10000	MEM	37℃搅拌	可溶	460	530	1.5	390	1.5				460.000	98.995	-		
E	B	MEM	243	3.59	10000	MEM	室温	溶解	766.5	703	1.5	830	1.5	583	1.5		705.333	123.517	0.175		
F	N	MEM	280	4	10000	MEM		溶解	670	670	1.3	670	1.3				670.000	0.000	-		
S3-9																					
A	E	MEM	3840.1	8.01	10000	MEM	37度に加温	溶解	10000≤	10000≤	1.5	10000≤	1.5				10000≤	-	-		
B	M	MEM	8520	7.98	10000	MEM	室温	溶解	3795	3450	1.5	4140	1.5				3795.000	487.904	-		
C	G	MEM	10000<	8	10000	MEM		溶解	10000<	10000<	1.5	10000<	1.5	10000<	1.5	10000<	10000<	1.5	10000<	-	-
D	M	MEM	10000<	7.71	10000	MEM	37℃搅拌	可溶	10000<	10000<	1.1	10000<	1.1				10000<	-	-		
E	C	MEM	10000<	7.95	10000	MEM	室温	溶解	10000<	10000<	1.5	10000<	1.5	5100	1.5		5100.000	-	-		
F	E	MEM	10000<	7.2	10000	MEM		溶解	3450	3200	1.5	3700	1.5	5200	1.5	10000<	4033.333	1040.833	0.258		
S3-10																					
A	A	1%DMSO/MEM	64.51	8.05	1000	1%DMSO/MEM	37度に加温	懸濁	78.345	76.4	1.5	80.29	1.5	89.22	1.5		81.970	6.573	0.080		
B	C	DMSO	41.1	7.51	1000	DMSO	室温	溶解	76.5	72.9	1.5	80.1	1.5	100<	1.5		76.500	5.091	-		
C	L	DMSO	42	7.98	1000	DMSO		溶解	50	51	1.5	49	1.5	43	1.5	87	57.500	19.958	0.347		
D	E	DMSO	59	7.76	1000	DMSO	37℃搅拌	可溶	72	76	1.5	68	1.5				72.000	5.657	-		
E	D	DMSO	84	7.92	1000	DMSO	室温	溶解	131.5	138	1.5	125	1.5	70	1.5		111.000	36.097	0.325		
F	M	DMSO	100	7	1000	DMSO		培養液に懸濁	145	150	1.5	140	1.5	135	1.5	105	132.500	19.365	0.146		

表5-3 S I R C - N Rにおける各施設の全試験結果

予備試験										本試験																
施設	試験物質コード	溶媒	EC50	pH	濃度用量	溶媒	溶解方法	溶解状態	EC50 平均値	試験1		試験2		追試1		追試2		追試3		追試4		追試5		全平均	全平均SD	変動係数
										EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比	EC50	公比					
S3-11																										
A	G	10%PBS(-)MEM	4.44	8.09	1000	10%PBS(-)MEM	37℃に加熱	懸濁	11.76	9.9	1.5	13.62	1.5	14.5	1.5									11.760	2.630	-
B	B	PBS(-)	12.5	8.2	1000	PBS(-)	室温	少し懸濁	10.315	10.9	1.5	9.73	1.5	6.1	1.5	10.2	1.5	13	1.5					11.710	2.486	0.212
C	F	PBS(-)	8.3	7.76	1000	PBS(-)	室温	溶解	8.3	8.8	1.5	7.8	1.5		1.5								9.180	2.606	0.284	
D	I	PBS(-)	6.7	7.72	1000	PBS(-)	37℃に加熱	可溶	5.9	5.6	1.5	6.2	1.5										5.900	0.424	-	
E	E	PBS(-)	3.15	8.04	1000	PBS(-)	超音波	溶解	13.5	13.8	1.5	13.2	1.5										13.500	0.424	-	
F	A	PBS(-)	4.6	7.2	1000	PBS(-)	超音波	培養液に懸濁	15.25	14	1.5	16.5	1.5	<19.5	1.5								15.250	1.768	-	
S3-12																										
A	J	MEM	783.24	3.11	10000	MEM	37℃に加熱	溶解	851.5	939.7	1.5	763.3	1.5										851.500	124.748	-	
B	H	MEM	535	2.68	10000	MEM	室温	溶解	788.5	763	1.5	814	1.5	955	1.5								844.000	99.454	0.118	
C	K	MEM	2850	2.82	10000	MEM	室温	溶解	1500	1500	1.3	1500	1.3	1460	1.5	1480	1.3						1485.000	19.149	0.013	
D	K	MEM	560	3.19	10000	MEM	37℃に加熱	可溶	780	1000	1.5	560	1.5										780.000	311.127	-	
E	K	MEM	870	2.69	10000	MEM	室温	溶解	725	715	1.5	735	1.5	1180	1.5								876.667	262.885	0.300	
F	H	MEM	600	4	10000	MEM		溶解	985	920	1.4	1050	1.4	810	1.5	620	1.4						850.000	182.026	0.214	
S3-13																										
A	H -	MEM	375.97	2.99	10000	MEM	37℃に加熱	溶解	851.55	818.1	1.5	885	1.5										851.545	47.242	-	
B	N	MEM	407	2.61	10000	MEM	室温	溶解	651.5	642	1.5	661	1.5	793	1.5	633	1.5						682.250	74.750	0.110	
C	A	MEM	2700	2.76	10000	MEM	室温	溶解	1135	1130	1.2	1140	1.2	980	1.5	1080	1.2						1082.500	73.201	0.068	
D	B	MEM	520	3.02	10000	MEM	37℃に加熱	可溶	695	740	1.5	650	1.5										695.000	63.640	-	
E	I	MEM	783	2.7	10000	MEM	室温	溶解	715	740	1.5	690	1.5	750	1.5								726.667	32.146	0.044	
F	F	MEM	720	3	10000	MEM		溶解	595	500	1.4	690	1.4	780	1.5	1000	1.4						742.500	207.585	0.280	
S3-14																										
A	B	1%DMSO/MEM	371.0	8.07	1000	1%DMSO/MEM	37℃に加熱	懸濁	196.17	187.6	1.5	204.7	1.3	235.4	1.5	179	1.5	183	1.2				209.253	24.234	0.116	
B	K	DMSO	272	8.14	1000	DMSO	室温	溶解	177	165	1.5	189	1.1	131	1.5	152	1.2	185	1.1	198	1.1		169.400	23.212	0.137	
C	H	MEM	300	8.42	10000	MEM	40℃	懸濁	160	158	1.1	162	1.1	133	1.5	152	1.2						164.667	23.407	0.142	
D	C	DMSO	330	7.77	1000	DMSO	37℃に加熱	可溶	180	190	1.1	170	1.1	160	1.5	152	1.3	200<	1.1				168.000	16.411	0.098	
E	A	DMSO	318	7.87	1000	DMSO	室温	溶解	149	151	1.5	147	1.5										149.000	2.828	-	
F	D	DMSO	440	7.2	1000	DMSO	ホルマリン	培養液に懸濁	170	170	1.2	170	1.1	233<	1.2	180	1.2						173.333	5.774	0.033	

表 6 Draize眼刺激性試験との相関性

	SIRC-NR		SIRC-CV	
	一次回帰式からの相関係数*	順位相関係数**	一次回帰式からの相関係数	順位相関係数
最大値総評価点	0.731	0.737	0.698	0.662
最大値角膜評価点	0.705	0.681	0.673	0.633
最大値虹彩評価点	0.704	0.716	0.689	0.716
最大値結膜評価点	0.572	0.646	0.513	0.547
24時間値総評価点	0.708	0.716	0.671	0.645
24時間値角膜評価点	0.612	0.652	0.584	0.612
24時間値虹彩評価点	0.744	0.521	0.768	0.579
24時間値結膜評価点	0.523	0.614	0.456	0.516

* n=12、 ** n=14

表7 SIRC-CVの各施設の本試験結果

被験物質	施設A	施設B	施設D	施設E	施設F
S3-1	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<
	10000<	10000<	10000<	10000<	10000<
	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)
S3-2	4.33	9.6	7.20	9.6	17.5
	4.58	10.0	4.60	11.3	17.5
	4.46 (M)	9.8 (M)	5.90 (M)	10.5 (M)	17.5 (M)
S3-3	1580	1540	1850	1910	3200
	1300	1320	1650	2075	4500
	1440 (M)	1430 (M)	1750 (M)	1993 (M)	3850 (M)
S3-4	1.42	1.25	1.42	0.98	2.80
	0.71	1.68	1.20	1.36	3.00
	1.07 (M)	1.47 (M)	1.31 (MS)	1.17 (P)	2.90 (MS)
S3-5	472	1040	820	170	1300
	437	761	620	170	1200
	455 (M)	901 (M)	720 (M)	170 (M)	1250 (M)
S3-6	107	123	58 *	100	155
	99	110	88 *	120	145
	103 (P)	117 (P)	73 (P)*	110 (P)	150 (P)
S3-7	1.96	3.31	1.28	2.3> *	2.10
	3.94	3.10	2.15	2.3> *	2.90
	2.95 (P)	3.21 (M)	1.72 (MS)	2.3> (P)*	2.50 (E)
S3-8	671	652	700	795 *	850
	691	730	680	1000< *	790
	681 (M)	691 (M)	690 (M)	795 (M)*	820 (M)
S3-9	10000<	5190	10000<	10000<	10000<
	10000<	3600	10000<	10000<	10000<
	10000< (M)	4395 (M)	10000< (M)	10000< (M)	10000< (M)
S3-10	60.9	46.3	78.0	26.0	115.0
	73.5	43.3	57.0	65.5	110.0
	67.2 (D)	44.8 (D)	67.5 (D)	45.8 (D)	112.5 (D)
S3-11	12.1	10.8	7.7	12.9	13.0
	14.7	11.9	7.4	13.9	16.5
	13.4 (P)	11.4 (P)	7.6 (P)	13.4 (P)	14.8 (P)
S3-12	917	992	1380	1240	1450
	1070	971	1250	1330	1700
	994 (M)	982 (M)	1315 (M)	1285 (M)	1575 (M)
S3-13	938	558	880	820	1050
	889	806	900	735	1100
	914 (M)	682 (M)	890 (M)	778 (M)	1075 (M)
S3-14	209	177	190	148	175
	211	186	172	163	175
	210 (D)	182 (D)	181 (D)	156 (D)	175 (D)
S L S	180 ± 5.72 n=15	181 ± 5.64 n=7	141 ± 23.0 n=6	175 ± 3.89 n=6	183 ± 4.29 n=17

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…エタノール)

*：SOPから逸脱のため解析からは除外した。

表 8 S I R C - C V の本試験および追試験結果の変動係数と試験回数

施設名 被験物質	A	B	D	E	F
S3-1	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)
S3-2	0.221 (4)	0.260 (3)	- (2)	0.307 (3)	- (2)
S3-3	0.289 (4)	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)
S3-4	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)	0.165 (4)
S3-5	0.086 (3)	- (2)	- (2)	0.781 (4)	0.047 (3)
S3-6	0.088 (3)	0.106 (5)	- (2)	- (2)	0.038 (3)
S3-7	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)	0.215 (4)
S3-8	0.224 (3)	- (2)	- (2)	- (3)	- (2)
S3-9	- (2)	- (2)	- (2)	- (3)	- (4)
S3-10	0.099 (3)	0.337 (3)	- (2)	0.423 (3)	0.117 (4)
S3-11	- (2)	0.050 (3)	- (2)	- (2)	- (3)
S3-12	- (2)	0.073 (3)	- (2)	0.036 (3)	0.079 (4)
S3-13	- (2)	0.189 (4)	- (2)	0.084 (3)	0.064 (4)
S3-14	0.061 (3)	0.107 (5)	0.100 (5)	- (2)	0.016 (4)

* 試験結果のうち確定値のみ算出に用いた。試験回数が2回の場合の変動係数は算出しなかった。

表9 SIRC-CV 試験結果まとめ

被験物質	施設数N	溶媒使用	EC50最低値 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50最高値 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50平均値 ($\mu\text{g/ml}$)	標準偏差 SD	変動係数 CV	平均順位	備考欄
S3-1	5	M	-	-	10000<	-	-	13	
S3-2	5	M	4.46	17.5	9.62	5.08	0.529	3	
S3-3	5	M	1430	3850	2090	1010	0.483	12	
S3-4	2	M	1.07	1.47	1.27	0.283	0.224		
	1	P	-	-	1.17	-	-		
	2	MS	1.31	2.90	2.11	1.12	0.534		
	5	M+P+MS	1.07	2.90	1.58	0.752	0.476	1	
S3-5	5	M	170	1250	699	414	0.592	8	
S3-6	4	P	103	150	120	20.9	0.174	6	施設D除く
S3-7	1	M	-	-	3.21	-	-		
	1	P	-	-	2.95	-	-		
	1	E	-	-	2.50	-	-		
	1	MS	-	-	1.72	-	-		
	4	M+P+E+MS	1.72	3.21	2.59	0.654	0.252	2	施設E除く
S3-8	4	M	681	820	721	66.5	0.092	9	施設E除く
S3-9	1	M	-	-	4400	-	-		
	4	M	-	-	10000<	-	-		
	5	M	-	-	8880<	-	-	13	
S3-10	5	D	44.8	113	67.6	27.4	0.406	5	
S3-11	5	P	7.55	14.8	12.1	2.81	0.233	4	
S3-12	5	M	982	1580	1230	248	0.202	11	
S3-13	5	M	682	1080	868	148	0.171	10	
S3-14	5	D	156	210	181	19.5	0.108	7	
SLS	5	M	141	141	167	23.2	0.138		

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 $\mu\text{g/ml}$ 以上は、同一順位とした。

注3: EC50値に確定値と未確定値が混在する場合、10000 $\mu\text{g/ml}$ 以上を10000 $\mu\text{g/ml}$ として平均値を求め「平均値<」と表記した。

表10 SIRC-CVの各施設のEC50値と平均値との順位相関性

被験物質	平均	施設 A	施設 B	施設 D	施設 E	施設 F
S3-1	13	14	13	13	13	13
s3-2	3	3	3	3	3	4
s3-3	12	12	12	12	12	12
s3-4	1	1	1	1	1	2
s3-5	8	8	10	9	8	10
s3-6*	6	6	6	6	6	6
s3-7*	2	2	2	2	2	1
s3-8*	9	9	9	8	10	8
s3-9	13	13	13	13	13	13
s3-10	5	5	5	5	5	5
s3-11	4	4	4	4	4	3
s3-12	11	11	11	11	11	11
s3-13	10	10	8	10	9	9
s3-14	7	7	7	7	7	7
平均値との順位 相関係数 (Spearman)		0.999	0.982	0.996	0.996	0.978

*施設DのS3-6はEC50を73 μ g/mlとして、施設EのS3-7は2.3 μ g、
S3-8は765 μ g/mlとして順位を求めた。

予備試験

	溶解A	I	MEM	3.25	10.56	10000	MEM	37℃に加熱	溶解	4.455	4.33	1.5	4.58	1.5	5.51	1.5	3.15	1.5			4.933	0.972	0.221
遊效B	J	MEM	4	10.85	10000	MEM		室温	溶解	9.775	9.55	1.5	10	1.5	5.97	1.5					8.507	2.208	0.260
遊效D	L	MEM	3.35	10.52	10000	MEM		37℃攪拌	可溶	5.9	7.2	1.5	4.6	1.5							5.900	1.838	-
遊效E	H	MEM	13.3	8.89	10000	MEM		室温	溶解	10.45	9.6	1.5	11.3	1.5	17	1.5					12.633	3.876	0.307
遊效F	K	MEM	13	11	10000	MEM			溶解	17.5	17.5	1.5	17.5	1.3							17.500	0.000	-

液體A	C	MEM	3100.05	9.0	10000	MEM	37℃/慢+加溫	溶解	1436.2	1576	1.5	1296	1.1	2402	1.5	1489	1.5	1690.823	488.561	0.289
液體B	L	MEM	2660	9.21	10000	MEM	室溫	溶解	1430	1540	1.5	1320	1.5					1430.000	155.563	-
液體D	O	MEM	3360	9.06	10000	MEM	37℃/慢片	可溶	1750	1850	1.5	1650	1.5					1750.000	141.421	-
液體E	G	MEM	3530	9.69	10000	MEM	室溫	溶解	1929.5	1910	1.5	2075	1.5					1992.500	116.673	-
液體F	L	MEM	2500	9	10000	MEM		溶解	3850	3200	1.5	4500	1.3					3850.000	919.239	-

[illegible][illegible]

予備試験

*SOPから逸脱のため(SIRC-NRと同一のプレートを用いていない) 解析からは除外した。

0%PBS(-)M

*SOPから逸脱のため（本試験2回に確定した値が得られなかったため）解析からは除外した。

MEM:

*SOPから逸脱のため（本試験2回に確定した値が得られなかったため）解析からは除外した。

MEM

% DMSO/MI

表11-3 SIRC-CVにおける各施設の全試験結果

表11-3 SIRC-CVにおける各濃度の空白血球結果

子備試験										本試験									
S3-11										S3-12									
施設	検体	溶媒	EC50	pH	最高用量	溶媒	溶解方法	溶解状態	平均値	試験1	試験2	追試1	追試2	追試3	追試4	追試5	全平均	全平均SD	変動係数
施設A	G	10%PBS(-)/MEM	4.9	8.09	1000	10%PBS(-)/MEM	37度に加温	懸濁	13.39	12.1	1.5	14.68	1.5	11.6	1.5		13.390	1.824	-
施設B	B	PBS(-)	15.4	8.2	1000	PBS(-)	室温	少し懸濁	11.35	10.8	1.5	11.9	1.5	11.6	1.5		11.433	0.569	0.050
施設D	I	PBS(-)	8.4	7.72	1000	PBS(-)	37℃攪拌	可溶	7.55	7.7	1.5	7.4	1.5				7.550	0.212	-
施設E	E	PBS(-)	3.7	8.04	1000	PBS(-)	超音波	溶解	13.4	12.9	1.5	13.9	1.5				13.400	0.707	-
施設F	A	PBS(-)	14	7.2	1000	PBS(-)		培養液に懸濁	14.75	13	1.5	16.5	1.5	19.5>	1.5		14.750	2.475	-

S3-12										S3-13									
施設A	J	MEM	2327.59	3.11	10000	MEM	37度に加温	溶解	992.19	917.4	1.5	1067	1.5				992.190	105.797	-
施設B	H	MEM	1090	2.68	10000	MEM	室温	溶解	981.5	992	1.5	971	1.5	1110	1.5		1024.333	74.929	0.073
施設D	K	MEM	1500	3.19	10000	MEM	37℃攪拌	可溶	1315	1380	1.5	1250	1.5				1315.000	91.924	-
施設E	K	MEM	1875	2.69	10000	MEM	室温	溶解	1285	1240	1.5	1330	1.5	1270	1.5		1280.000	45.826	0.036
施設F	H	MEM	2100	4	10000	MEM		溶解	1575	1450	1.4	1700	1.4	1600	1.5	1450	1550.000	122.474	0.079

S3-13										S3-14									
施設A	H	MEM	450.96	2.99	10000	MEM	37度に加温	溶解	913.64	938.4	1.5	888.9	1.5				913.640	35.002	-
施設B	N	MEM	500	2.61	10000	MEM	室温	溶解	682	558	1.5	806	1.5	877	1.5	851	773.000	146.303	0.189
施設D	B	MEM	580	3.02	10000	MEM	37℃攪拌	可溶	890	880	1.5	900	1.5				890.000	14.142	-
施設E	I	MEM	2220	2.7	10000	MEM	室温	溶解	777.5	820	1.5	735	1.5	870	1.5		808.333	68.252	0.084
施設F	F	MEM	2000	3	10000	MEM		溶解	1075	1050	1.4	1100	1.4	1200	1.5	1050	1100.000	70.711	0.064

S3-14										S3-15									
施設A	B	1%DMSO/MEM	460.51	8.07	1000	1%DMSO/MEM	37度に加温	懸濁	209.83	208.6	1.5	211.1	1.3	232.9	1.5		217.507	13.362	0.061
施設B	K	DMSO	272	8.14	1000	DMSO	室温	溶解	181.5	177	1.5	186	1.1	141	1.5	181	173.600	18.515	0.107
施設C	C	DMSO	440	7.77	1000	DMSO	37℃攪拌	可溶	181	190	1.1	172	1.1	162	1.5	150	168.500	16.921	0.100
施設E	A	DMSO	423	7.87	1000	DMSO	室温	溶解	155.5	148	1.5	163	1.5				155.500	10.607	-
施設F	D	DMSO	400	7.2	1000	DMSO	ホルテックス	培養液に懸濁	175	175	1.2	175	1.1	233<	1.2	180	176.667	2.887	0.016

表12 SIRC-NRおよびCVにおける各施設間の試験条件の比較

	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F
細胞倍加時間	21時間9分(P425)	23時間23分(P421)	-	-	-	-
測定機器名	Model3550	MPR-A4i	MTP-32	NJ-2000	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	東ソー (株)	東ソー (株)
測定波長(nm)	540	540	540	540	540	540
NRの製造元	和光純薬工業 (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)
本試験陰性対照 吸光度実測値						
測定回数	28	28	28	28	28	28
最高値	1.499	1.588	1.003	1.271	1.333	1.393
最低値	1.034	1.001	0.694	0.768	0.837	0.878
平均値	1.278	1.298	0.832	1.077	1.088	1.170
標準偏差	0.106	0.149	0.080	0.108	0.164	0.138
変動係数	0.083	0.115	0.096	0.100	0.151	0.118
陽性対照SLSの EC50値						
測定回数	15	7	9	6	6	17
最高値	181	183	180	170	155	185
最低値	162	171	165	94	142	170
平均値	173	175	176	136	150	179
標準偏差	5.51	4.11	5.12	27.78	5.24	4.41
変動係数	0.032	0.023	0.029	0.205	0.035	0.025
測定波長(nm)	588	570		590	570	590
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)	ナカライテスク (株)	和光純薬工業 (株)
本試験陰性対照 吸光度実測値						
測定回数	28	28		28	28	28
最高値	1.237	1.35		0.937	1.148	1.669
最低値	0.504	0.53		0.585	0.429	0.97
平均値	0.771	0.901		0.750	0.845	1.325
標準偏差	0.190	0.175		0.094	0.187	0.180
変動係数	0.246	0.194		0.125	0.221	0.136
陽性対照SLSの EC50値						
測定回数	15	7		6	6	17
最高値	190	190		168	177	195
最低値	169	172		108	169	175
平均値	180	181		141	175	182
標準偏差	5.64	5.64		23.04	3.89	5.32
変動係数	0.031	0.031		0.164	0.022	0.029

表13 S3-5本試験結果における各試験条件でのEC50値

施設	NR ($\mu\text{g/ml}$)	CV ($\mu\text{g/ml}$)	
		ホルムアミド抽出なし	抽出あり
A	620	472	498
	642	437	520
B	1240	672	1040
	1380	628	761
C	1750	-	-
	1780	-	-
D	1480	820	1120
	1430	620	980
E	1540	-	170
	1580	-	170
F	1650	-	1300
	1350	-	1200
平均	1370	608	776
SD	380	140	417
変動係数	0.28	0.23	0.54

<参考>S3-5暴露下の細胞の形状
高濃度下（一部施設のみ確認）

陰性対照

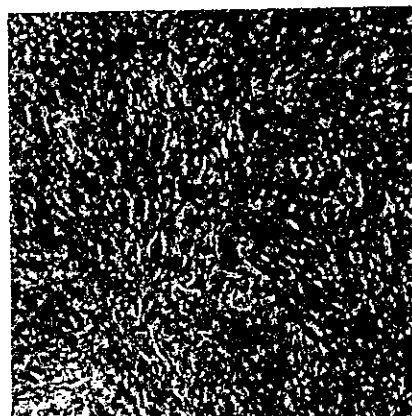
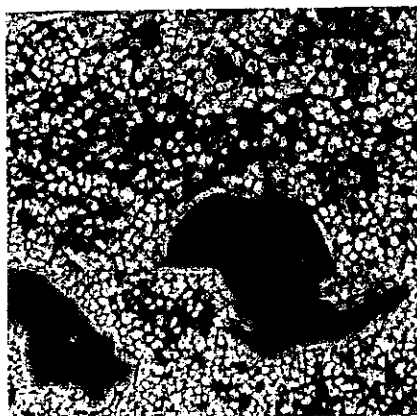
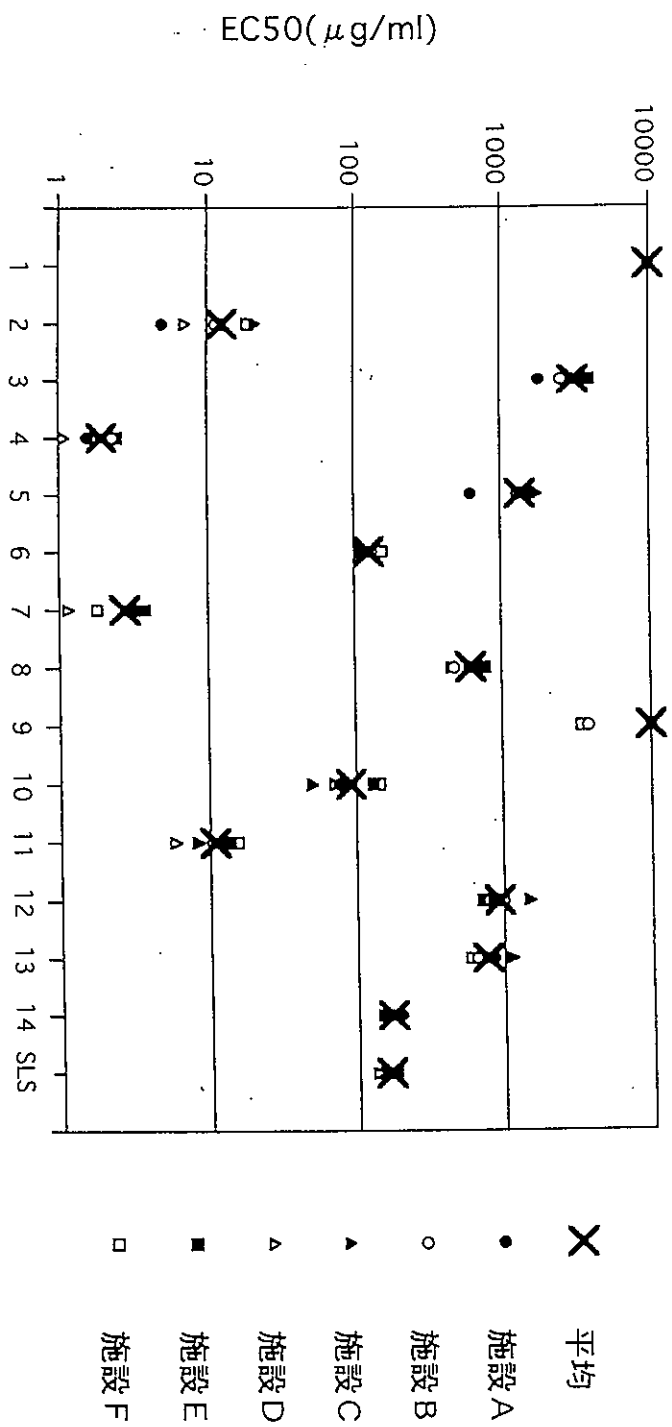
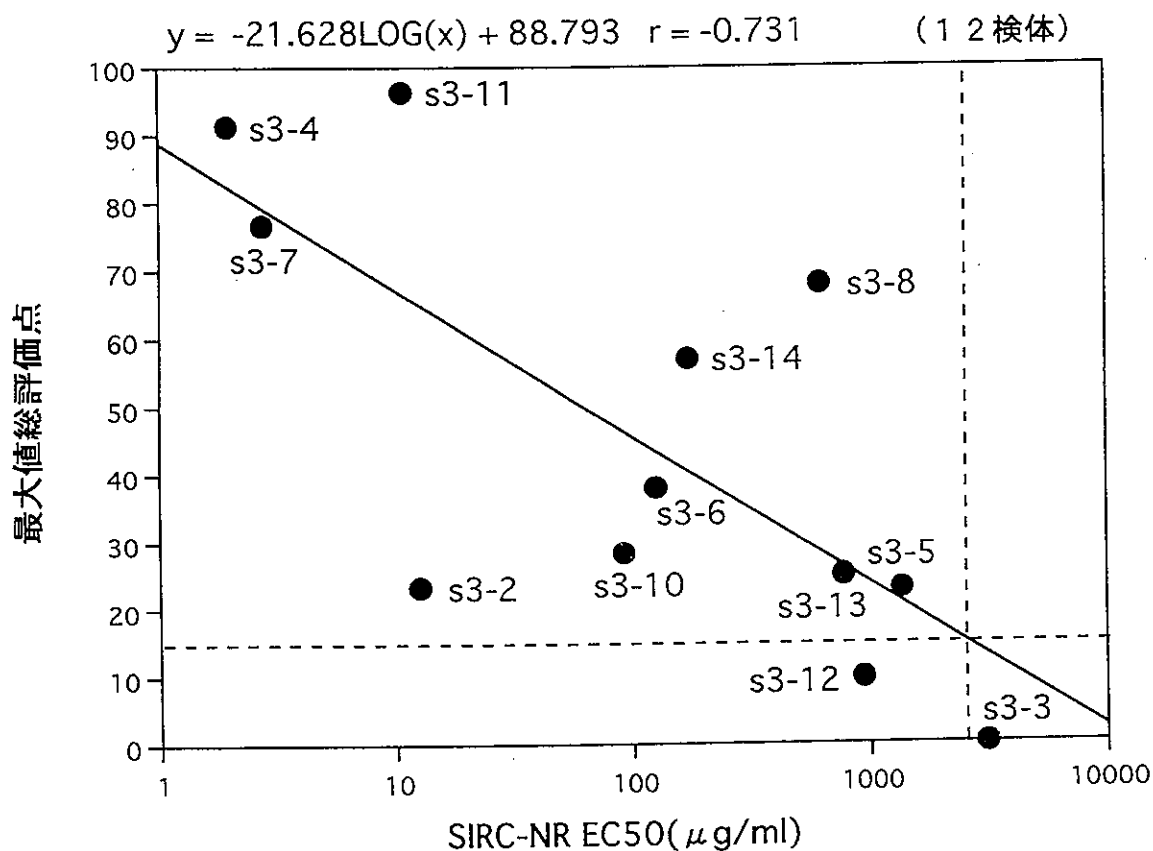


図1 SIRC-NR施設間の比較



*EC50値が10000 μg/ml以上は10000 μg/mlとして表記した。
 S3-2,3,5はアルカリ性、S3-8,12,13は酸性。

図2 Draize 眼刺激性試験の最大値総評価点と
S I R C - N R のEC50の相関性



Draize試験の最大値総評価点15前後における対応性
(14検体)

		S I R C - N R 試験結果	
		2582*未満	2582*以上
in vivo 試験結果	15点以上	S3-2,4,5,6,7,8, 10,11,13,14	<false negative> S3-(9 (ブタノール))
	15点未満	<false positive> S3-12 (乳酸)	S3-(1),3

* 外挿式y に15を代入した場合のEC50
() 確定値の得られなかった被験物質

図3 Draize眼刺激性試験の最大値角膜評価点、虹彩評価点、及び結膜評価点とニュートラルレッド取り込み試験との対応性

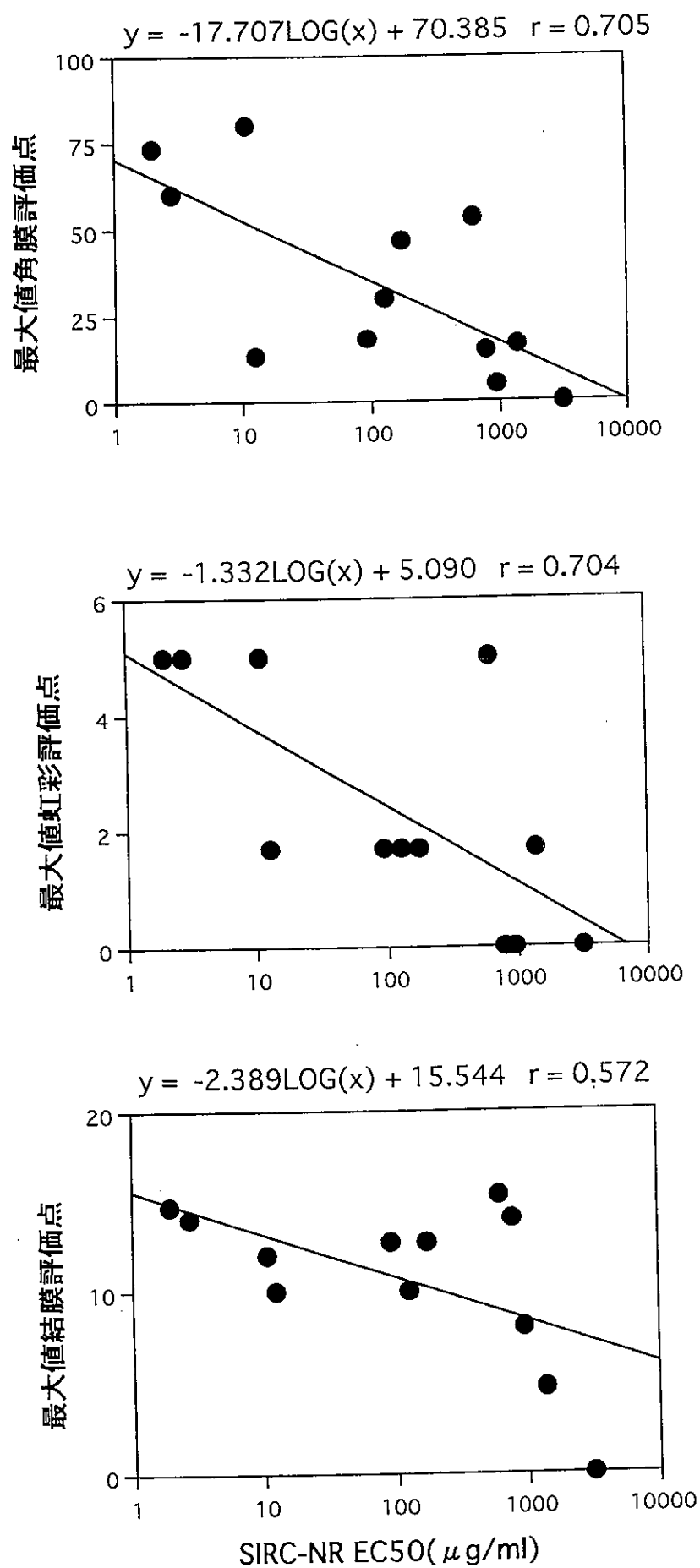


図4 Draize 眼刺激性試験の24時間値総評価点、角膜評価点、虹彩評価点、及び結膜評価点とニュートラルレット取り込み試験のlogEC50値の相関性

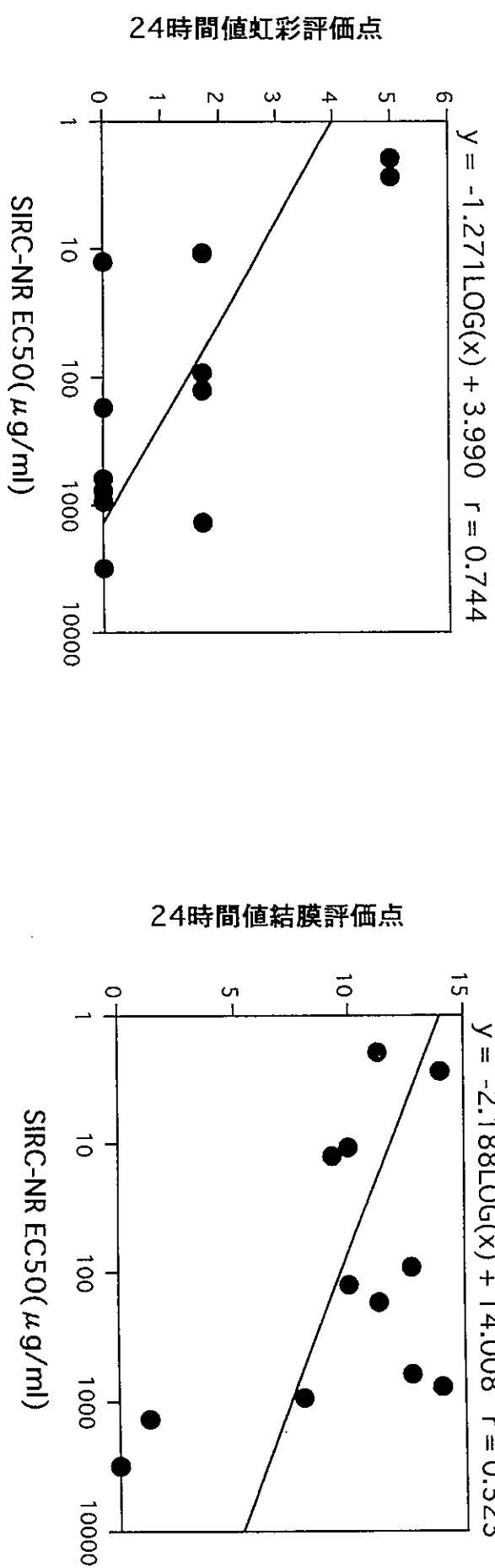
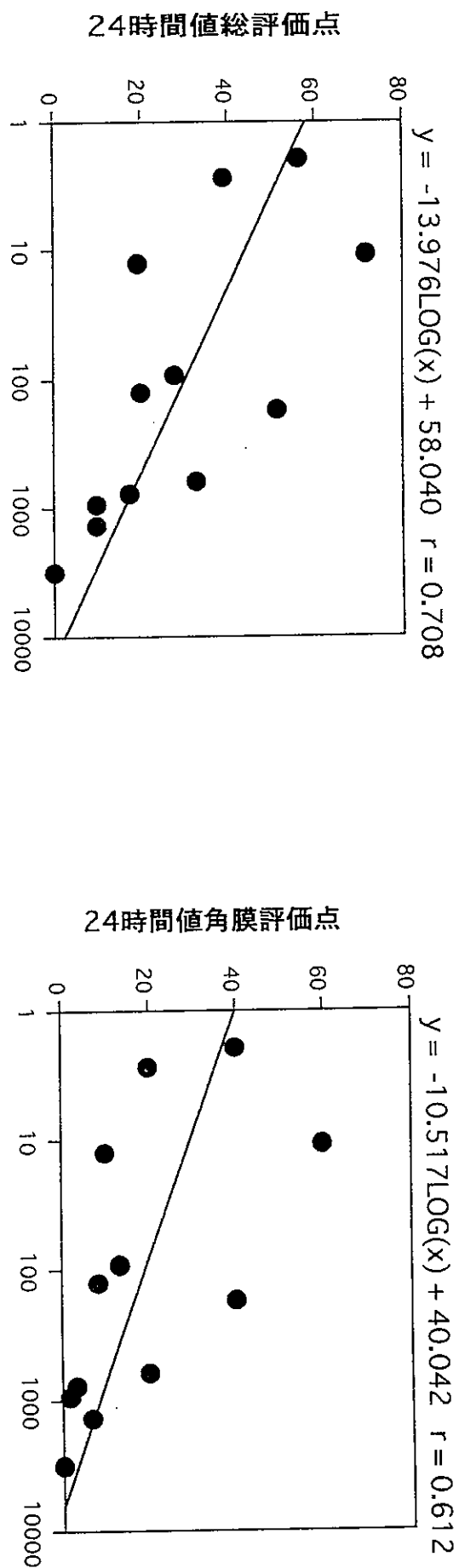


図5 Draize眼刺激性試験の最大値総評価点とS I R C-N R
施設毎のEC50値の相関性

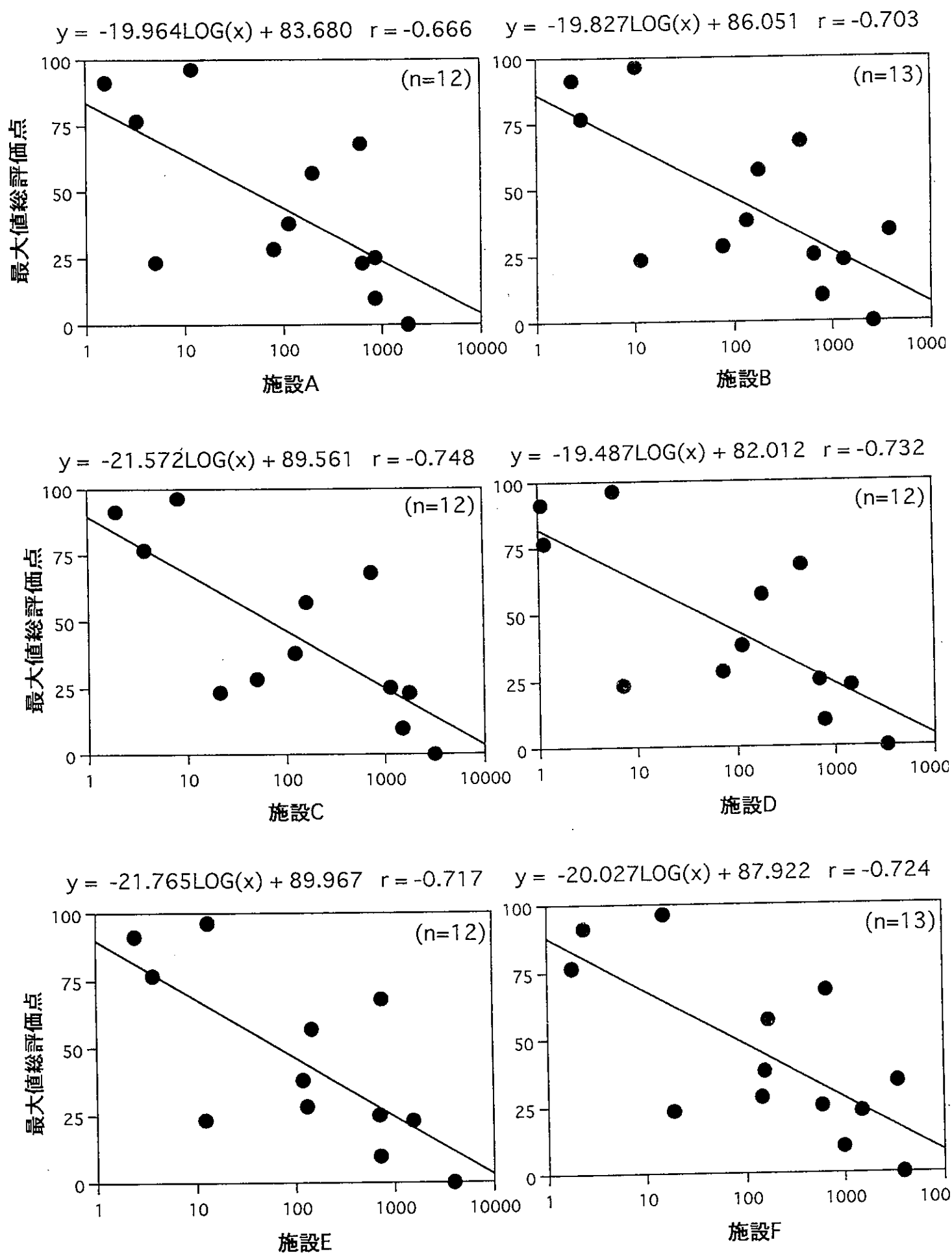
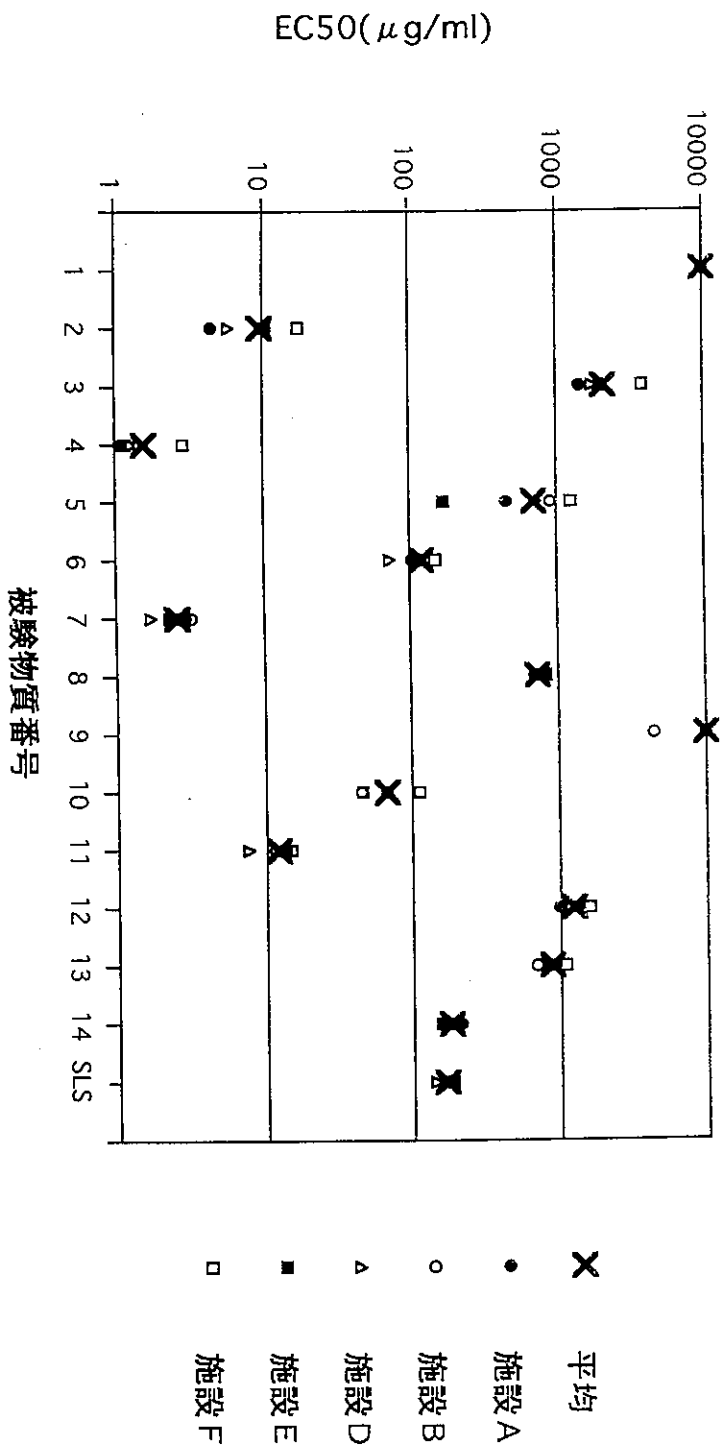
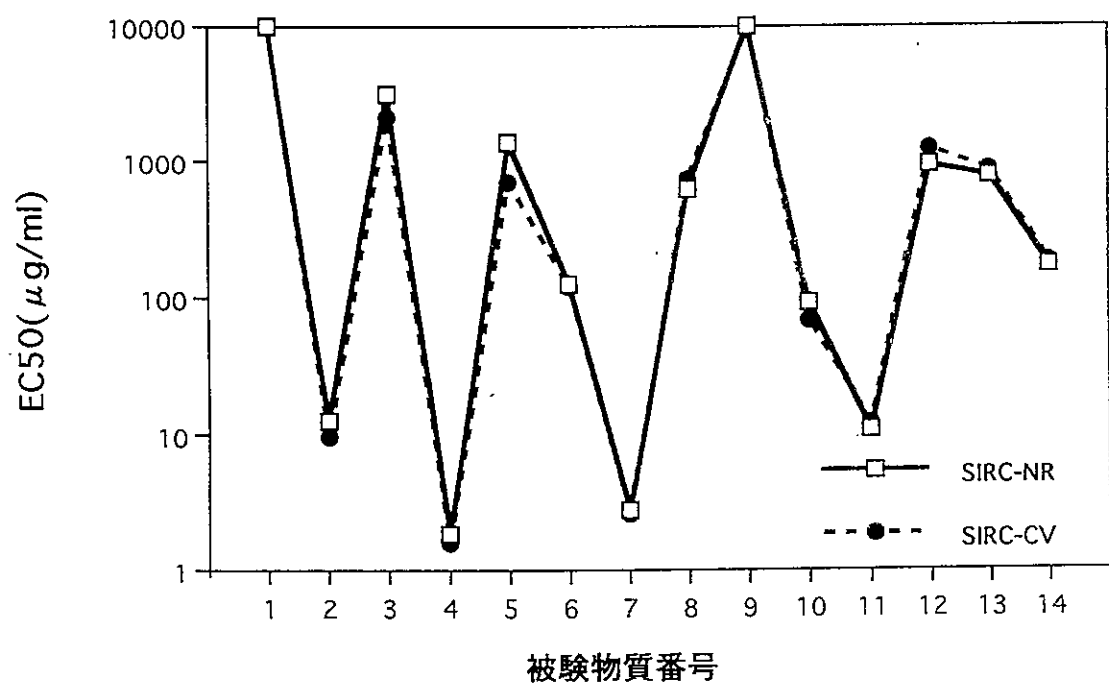


図 6 S I R C - C V 施設間の比較



*EC50値が10000 μg/ml以上は10000 μg/mlとして表記した。
 施設DのS3-6はEC50を73 μg/mlとして、施設EのS3-7は2.3、S3-8は765 μg/mlとして比較した。
 S3-2,3,5はアルカリ性、S3-8,12,13は酸性。

図7 SIRC-NRとSIRC-CVのEC50値の比較



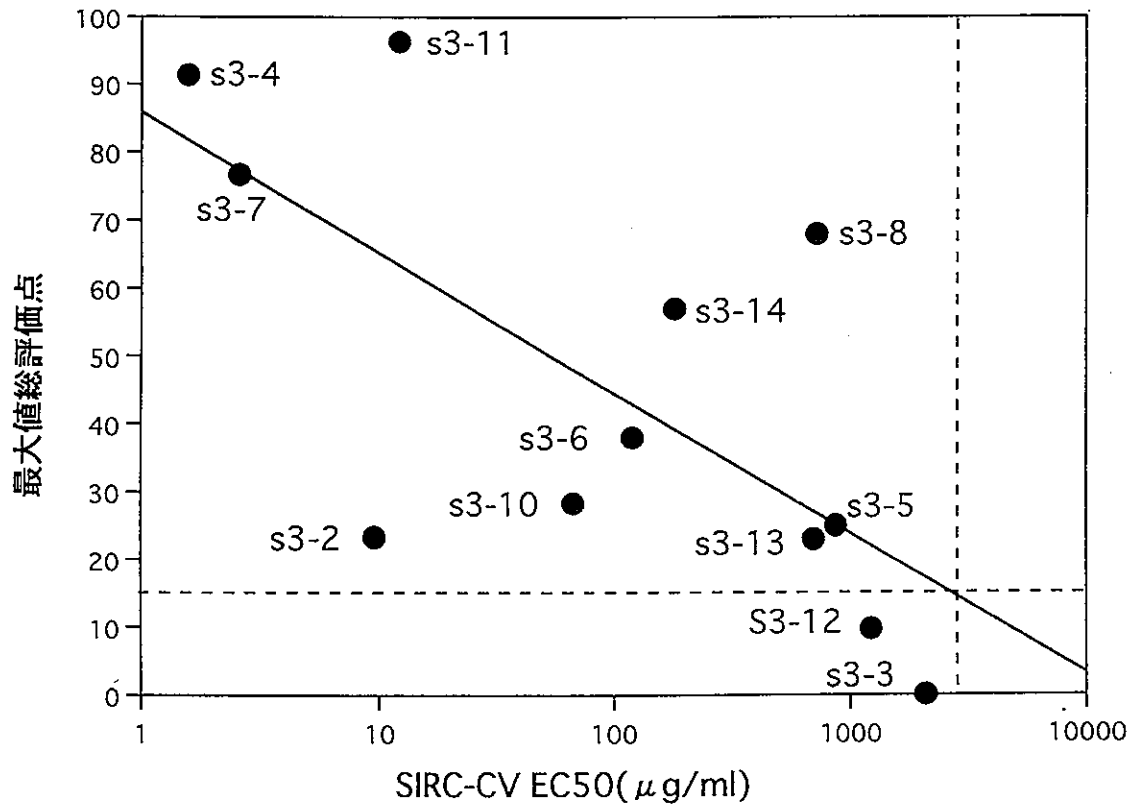
SIRC-NRおよびCVのEC50値の相関係数 $r=0.995$

順位相関係数 $r=0.969$

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

図8 Draize 眼刺激性試験の最大値総評価点と
SIRC-CVのEC50の相関性

$$y = -20.677\text{LOG}(x) + 85.889 \quad r = -0.698 \quad (12 \text{ 検体})$$



Draize試験の最大値総評価点15前後における対応性

(14 検体)

		SIRC-CV試験結果	
		2667*未満	2667*以上
in vivo試験結果	15点以上	S3-2,4,5,6,7,8, 10,11,13,14	<false negative> S3-(9)
	15点未満	<false positive> S3-3,12	S3-(1)

* 外挿式y に15を代入した場合のEC50

() 確定値の得られなかった被験物質

図9 Draize 眼刺激性試験の最大値角膜評価点、虹彩評価点、及び結膜評価点と
クリスタルバイオレット染色性試験のEC50値との対応性

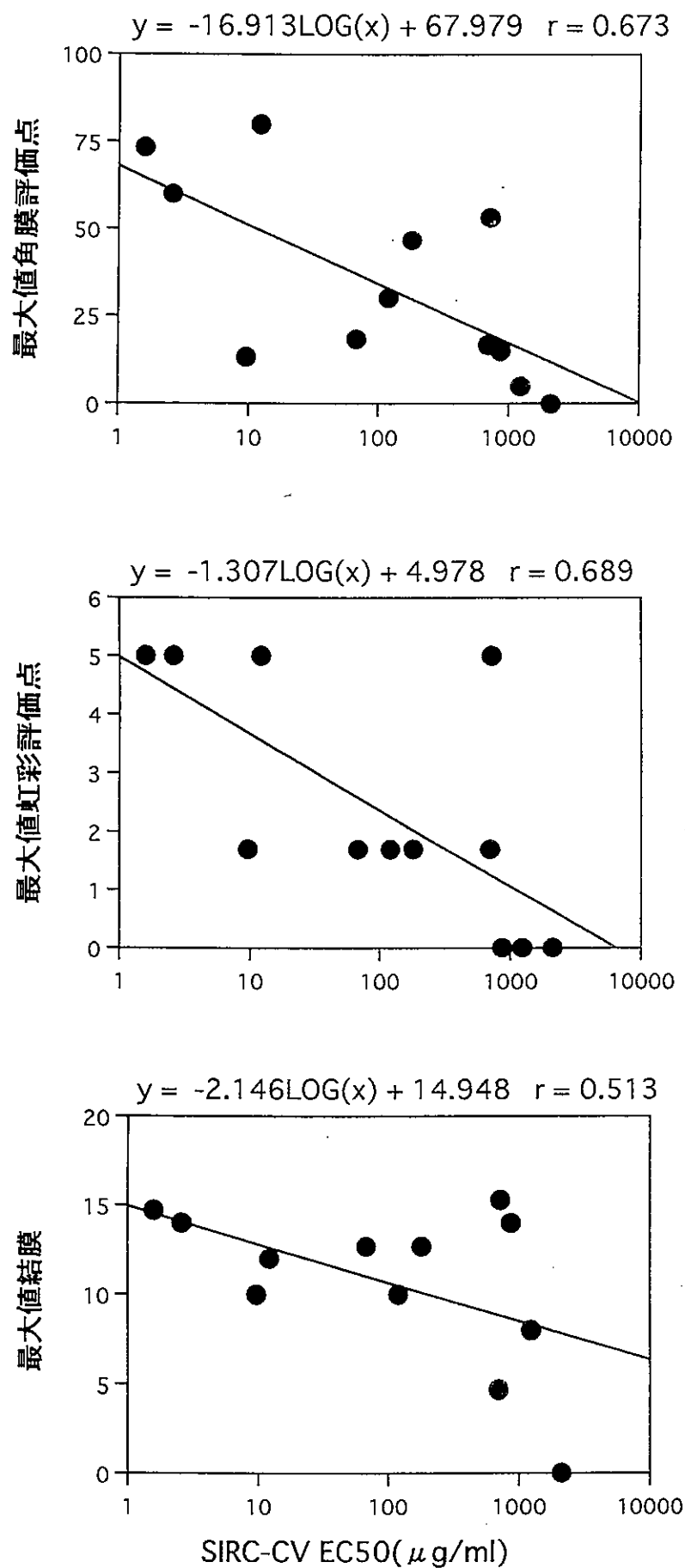


図10 Draize 眼刺激性試験の24時間値総評価点、角膜評価点、虹彩評価点、及び結膜評価点とクリスタルバイオレット染色性試験のlogEC50値の相関性

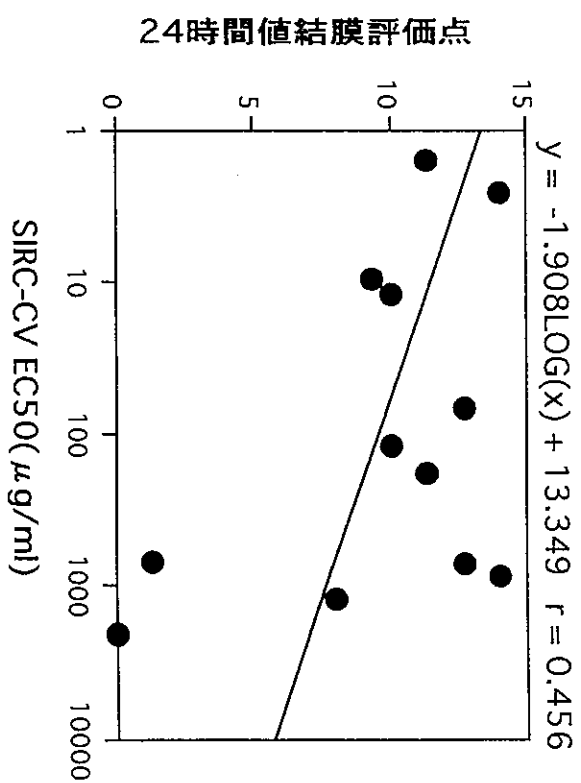
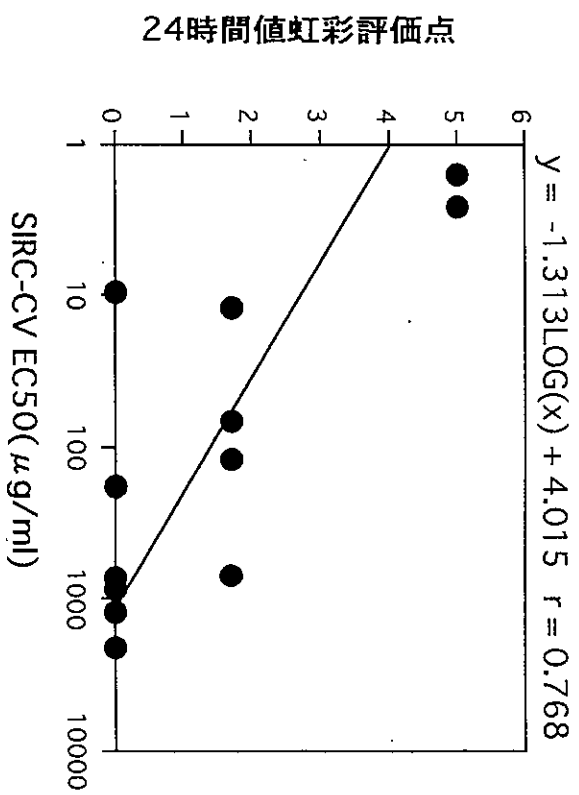
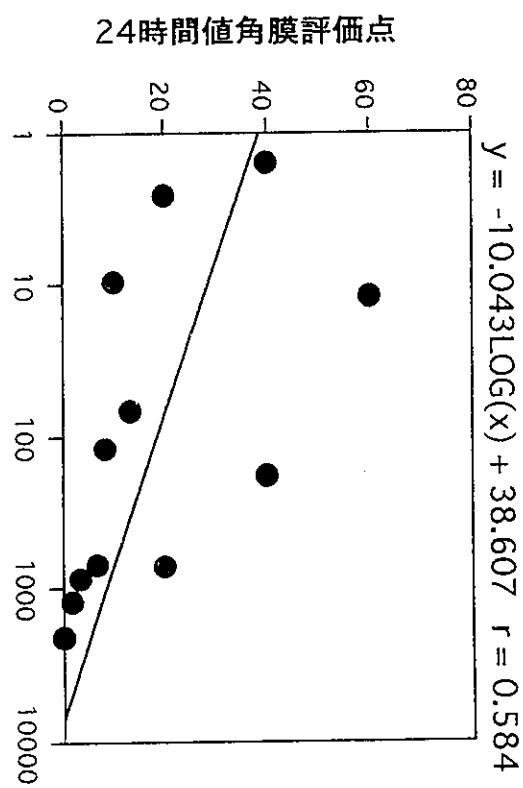
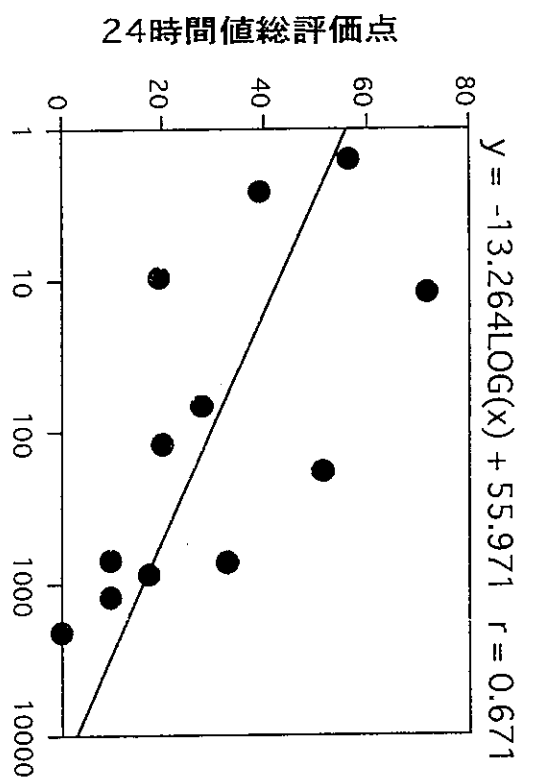


図11 SIRC-NRにおける機器精度管理

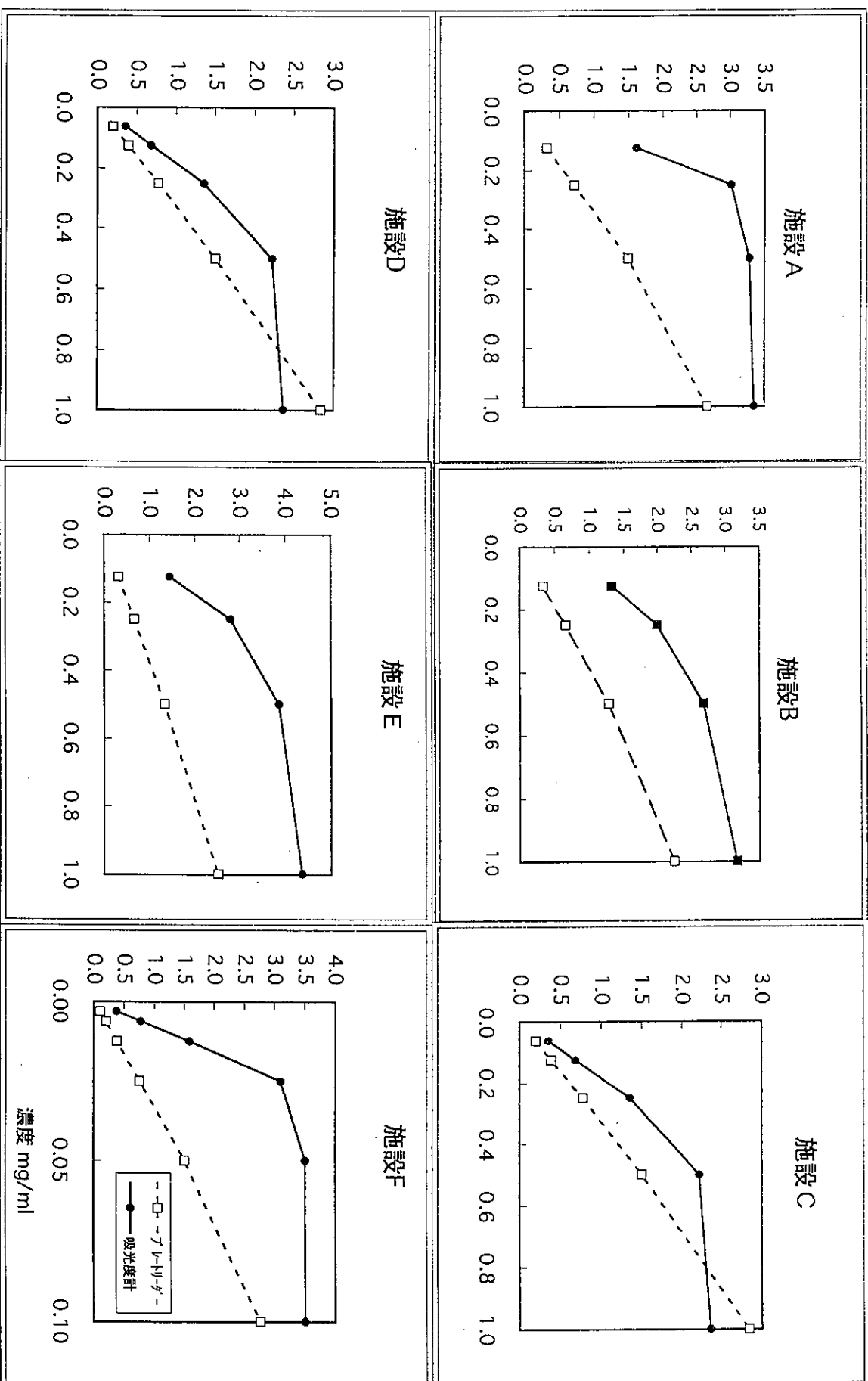
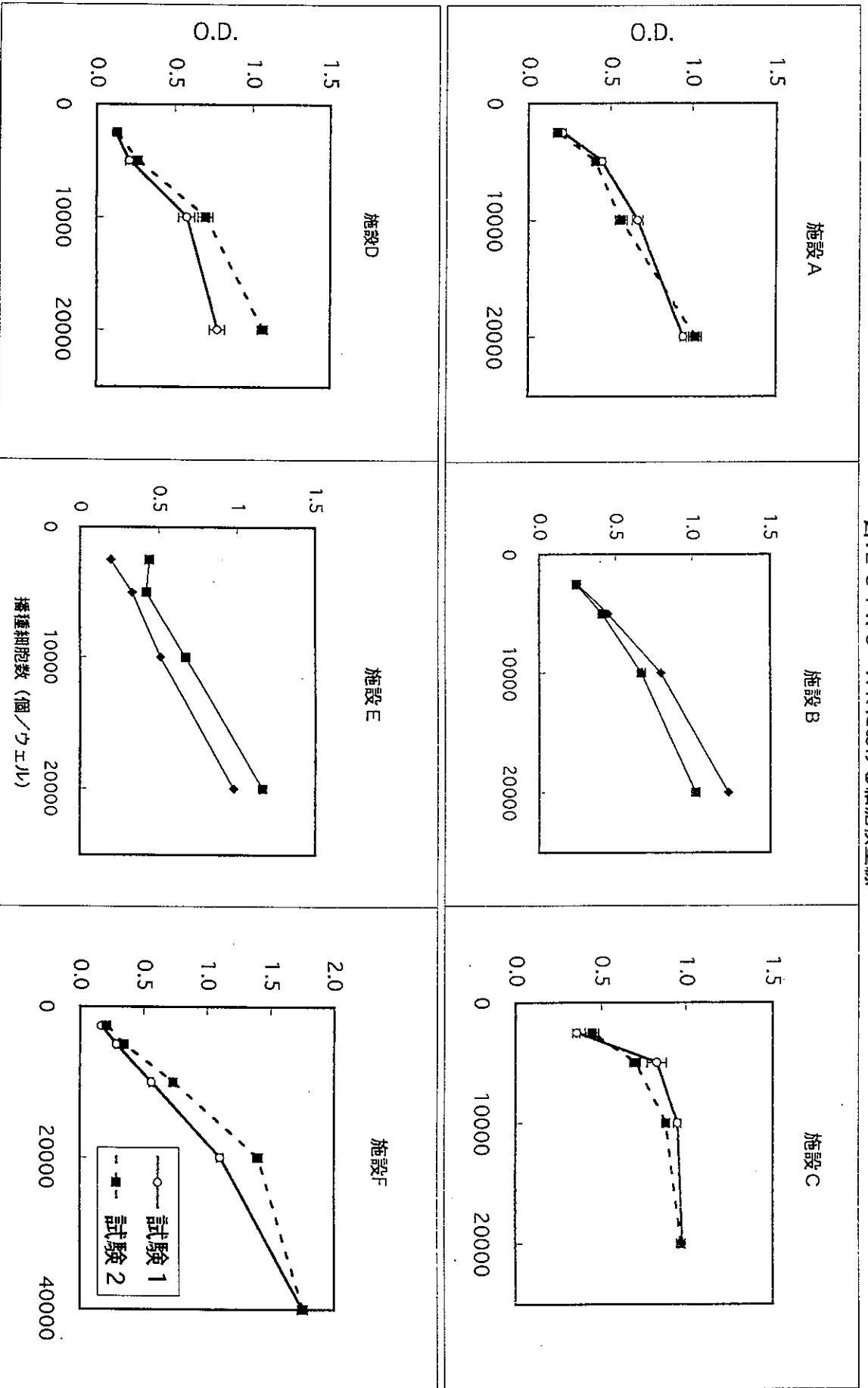
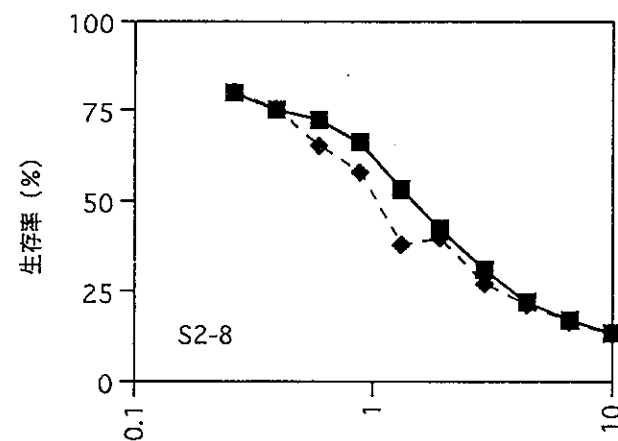
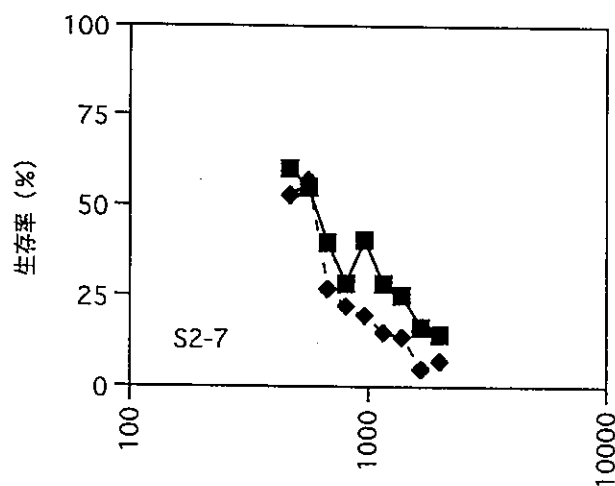
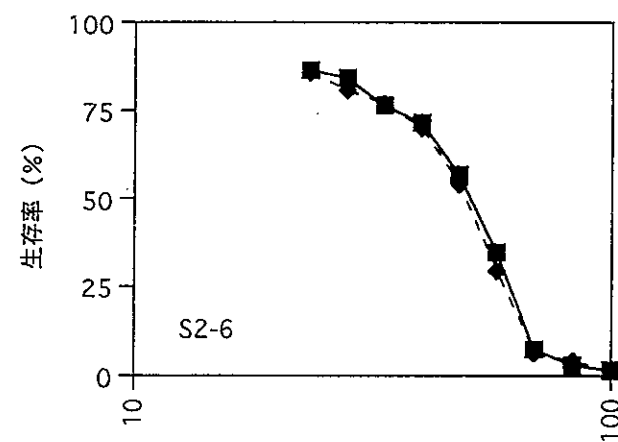
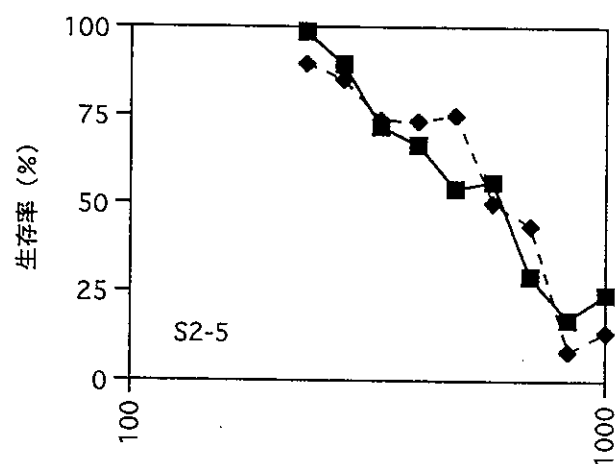
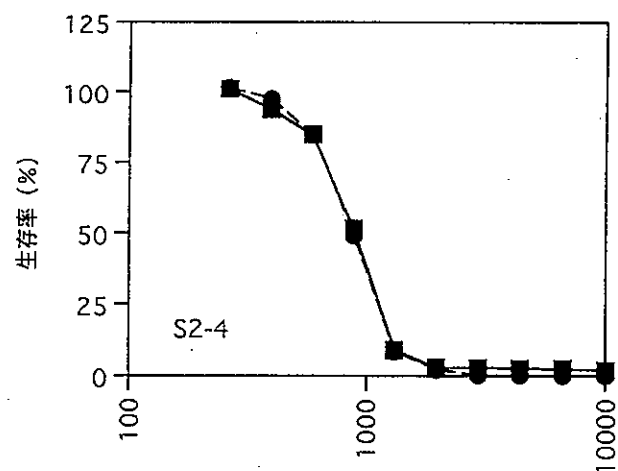
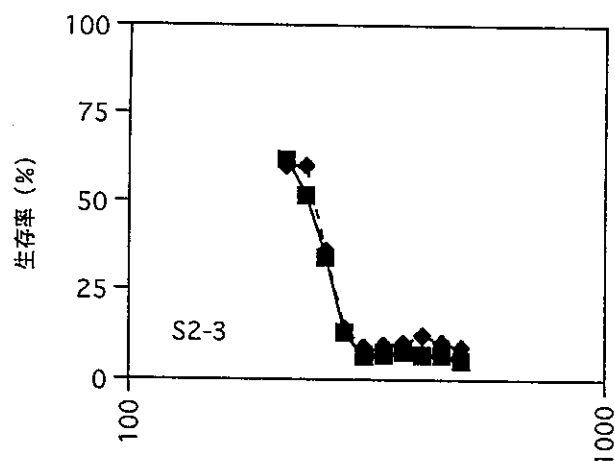
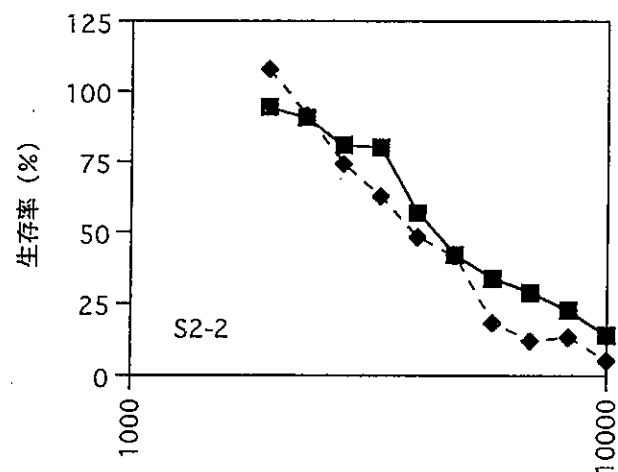
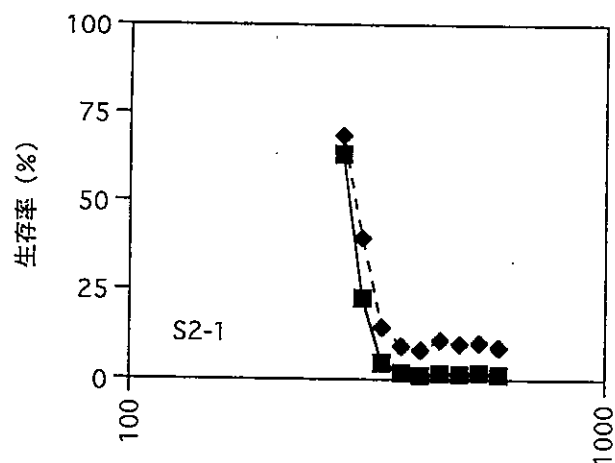


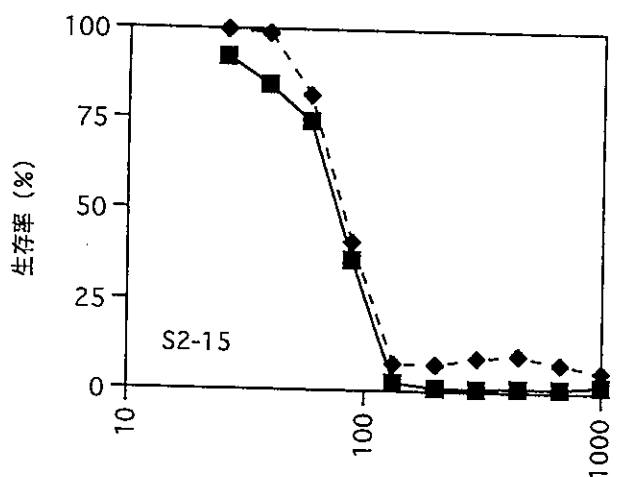
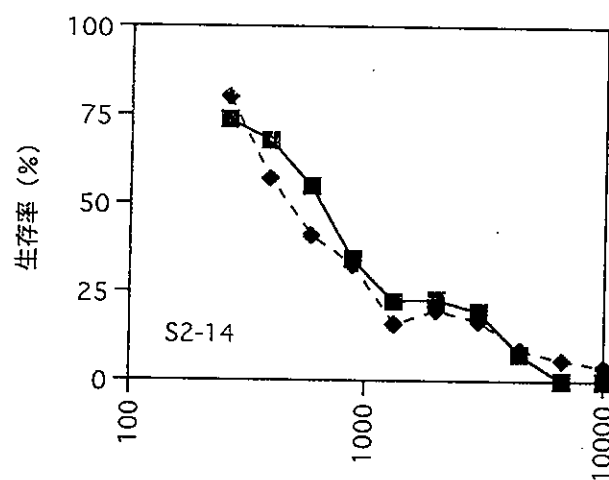
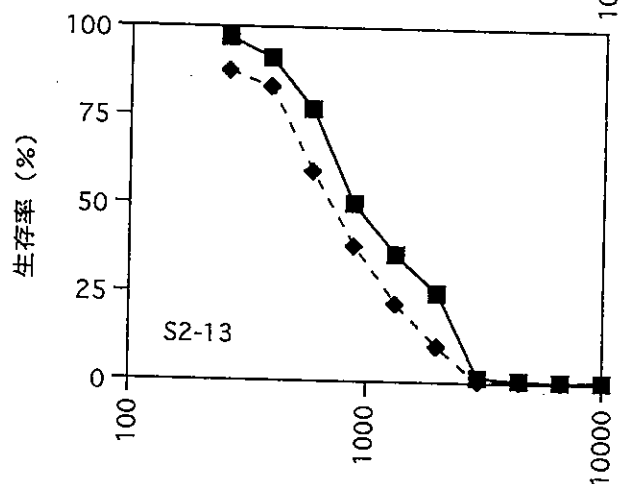
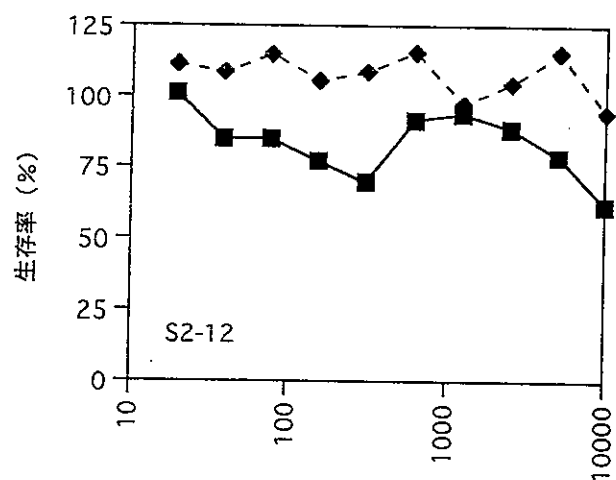
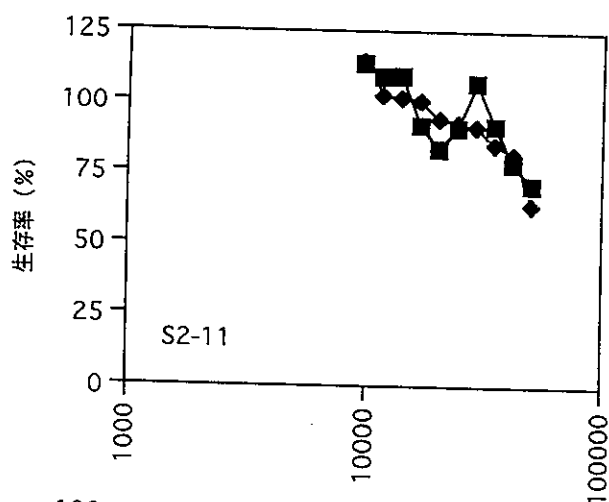
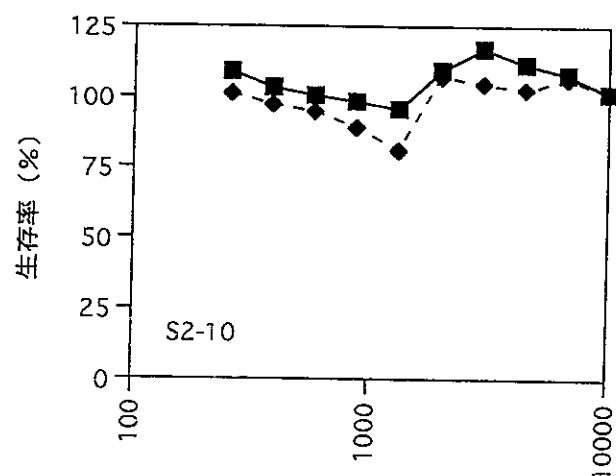
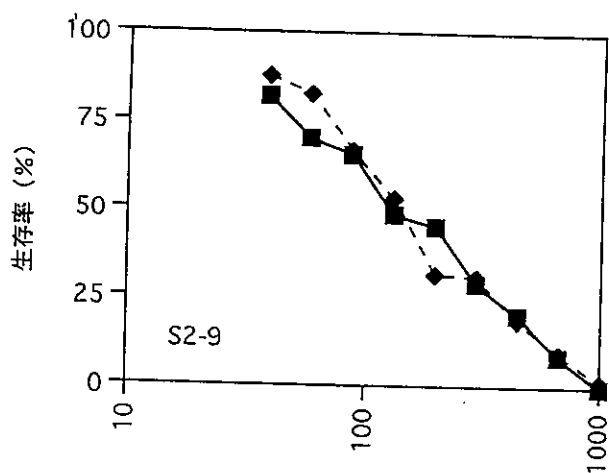
図12 SIRC-NRにおける細胞検量線



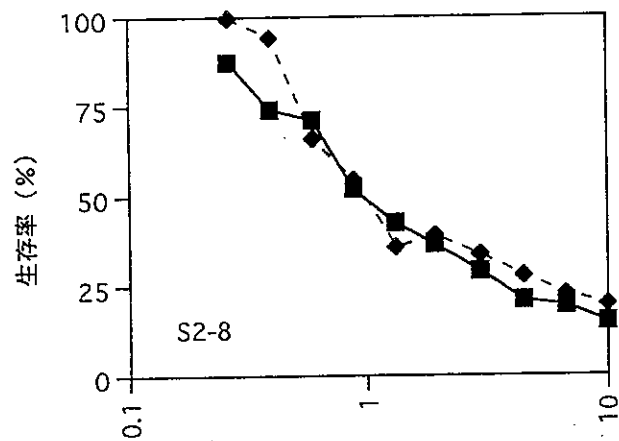
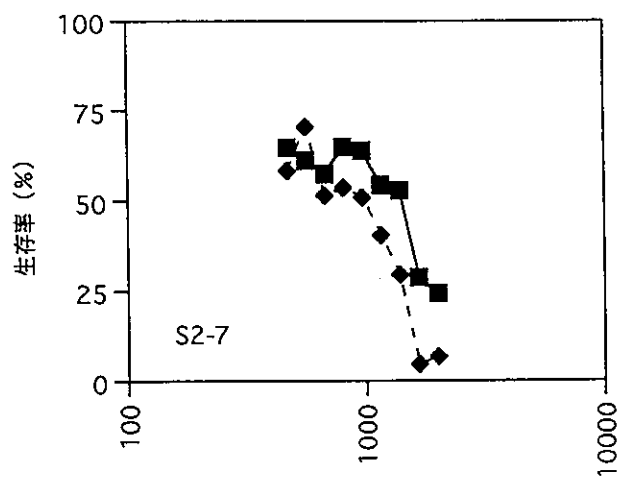
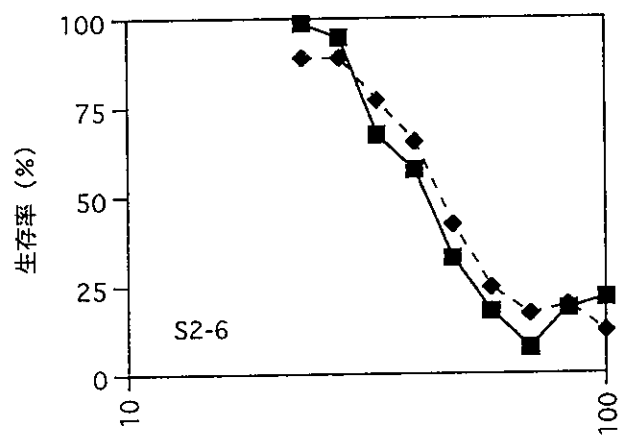
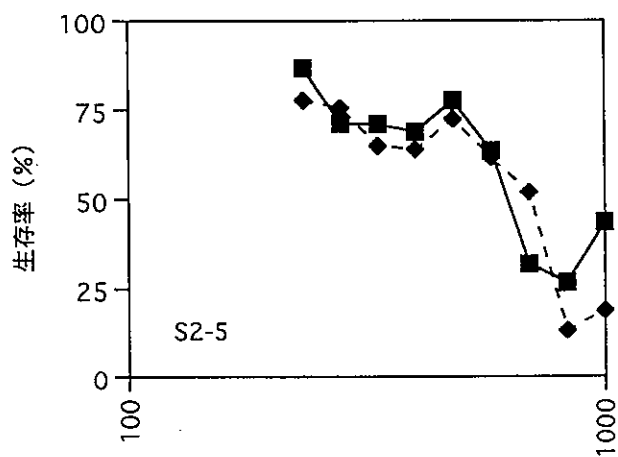
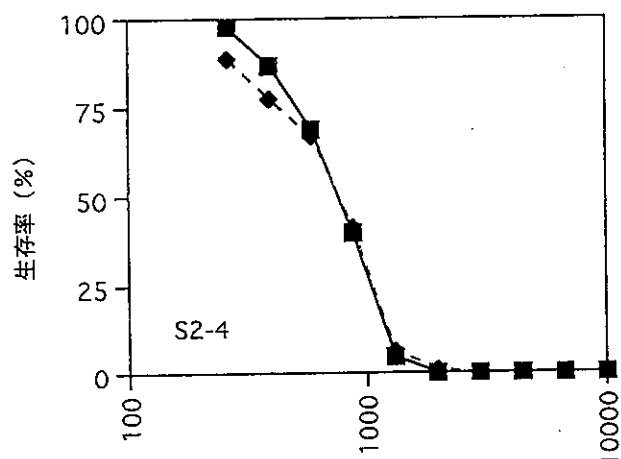
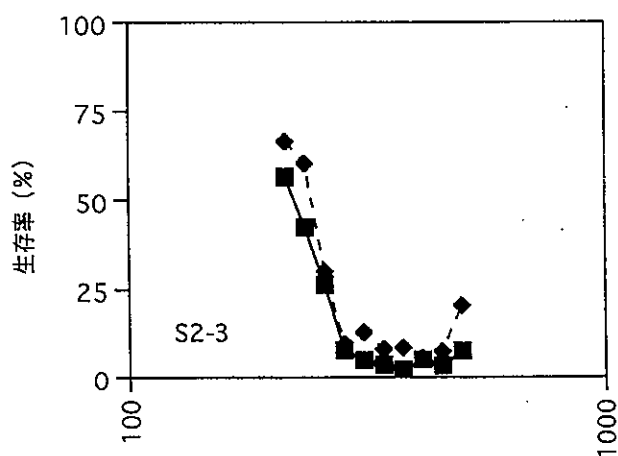
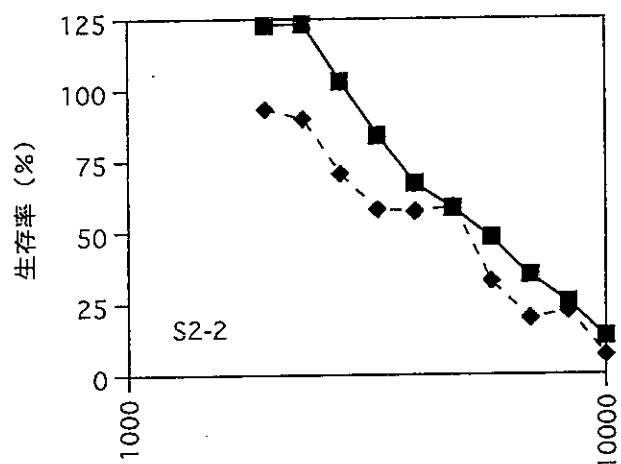
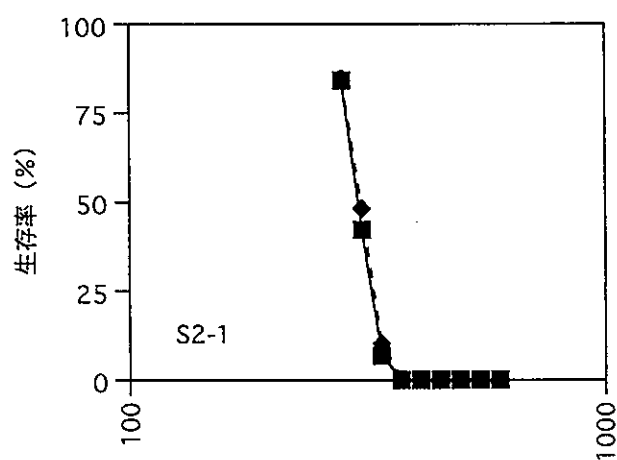
付表1-1. SIRC-NR 用量反応曲線 (S2-1~8)



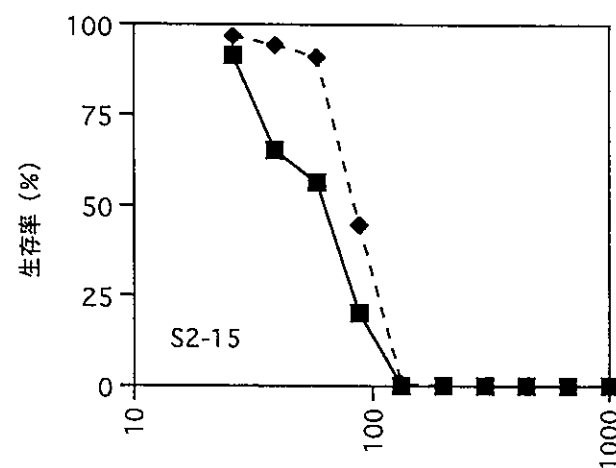
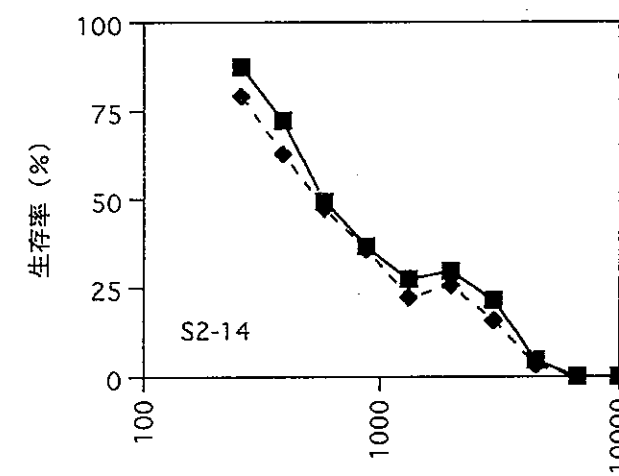
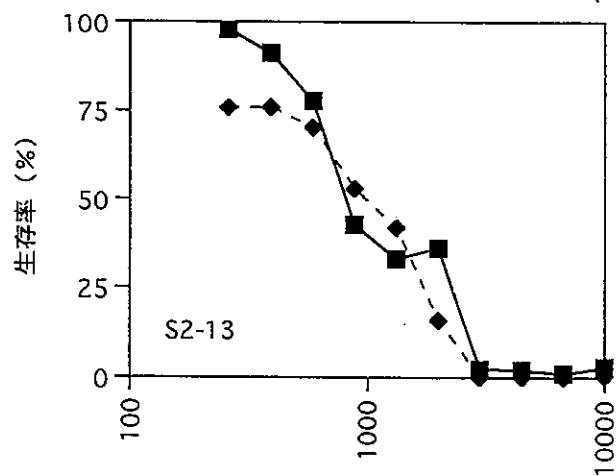
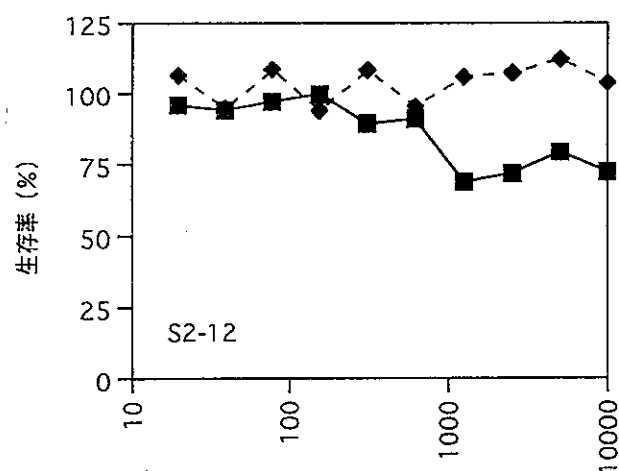
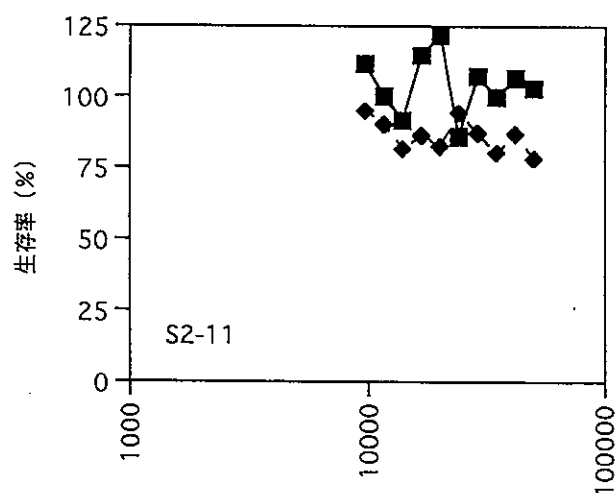
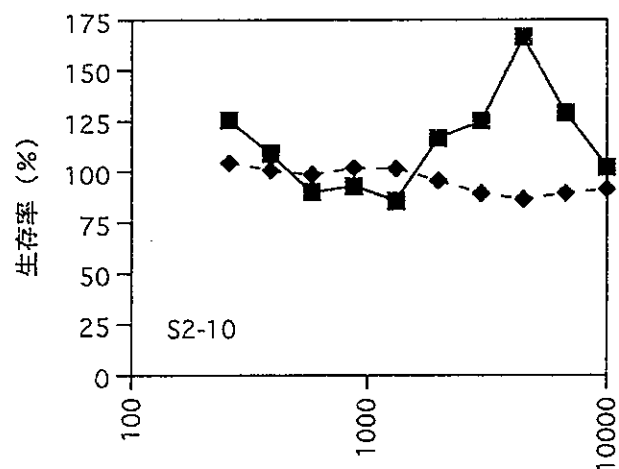
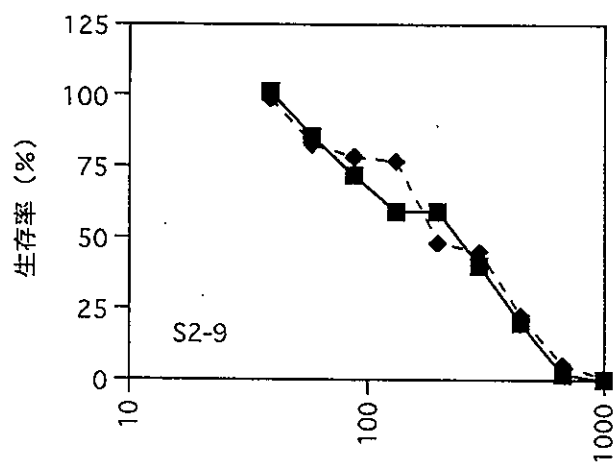
・SIRC-NR 用量反応曲線 (S2-9~15)



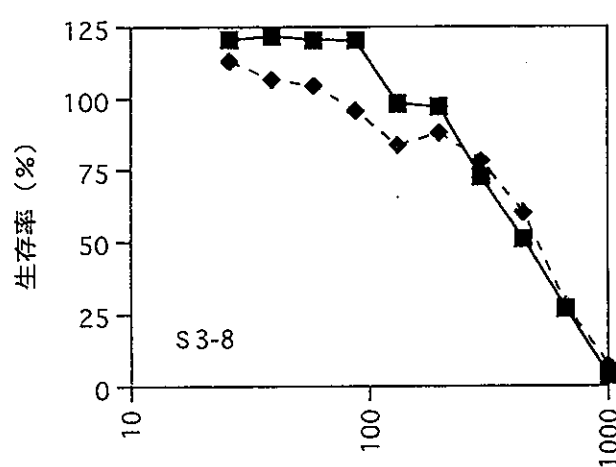
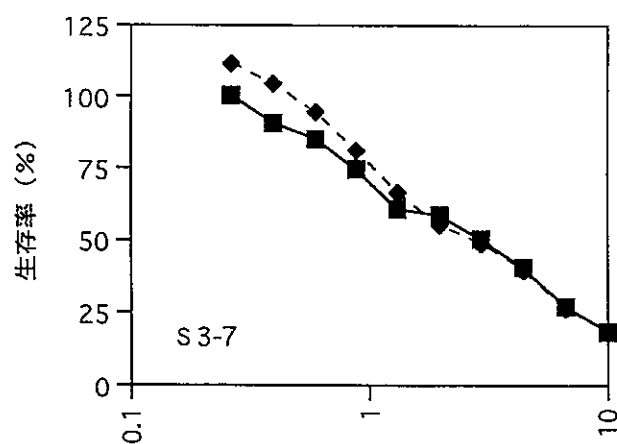
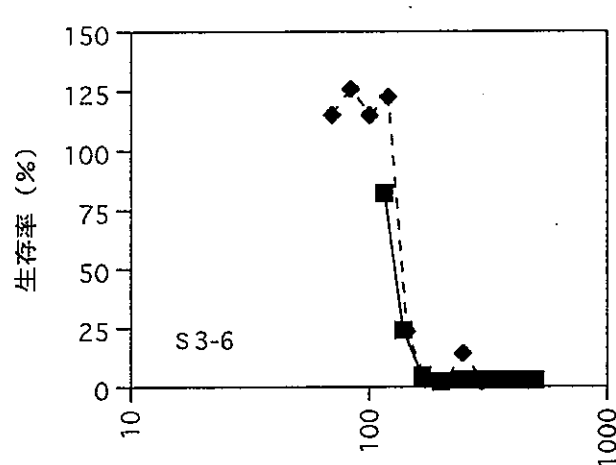
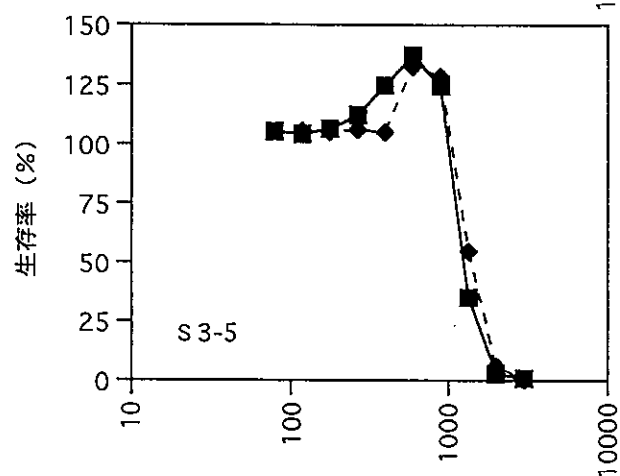
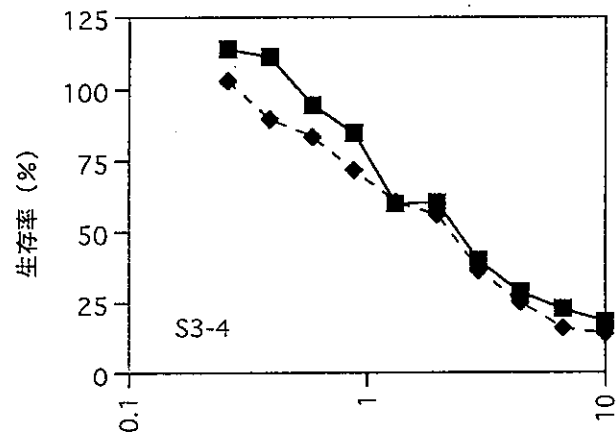
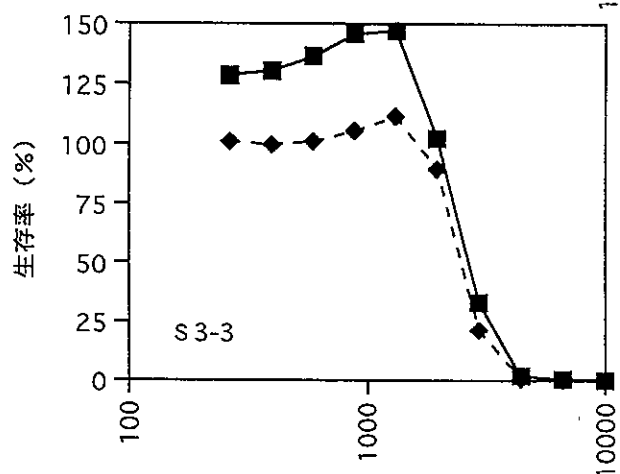
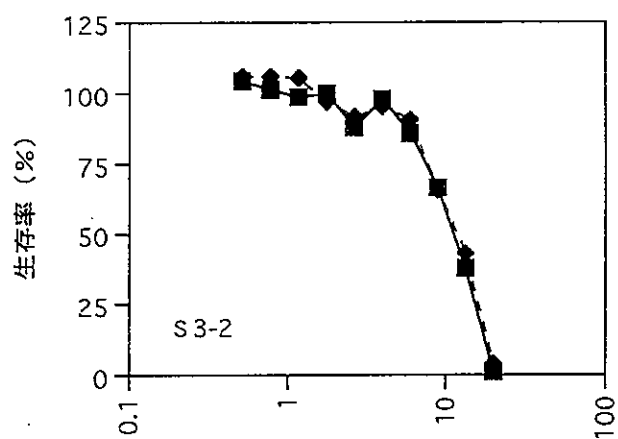
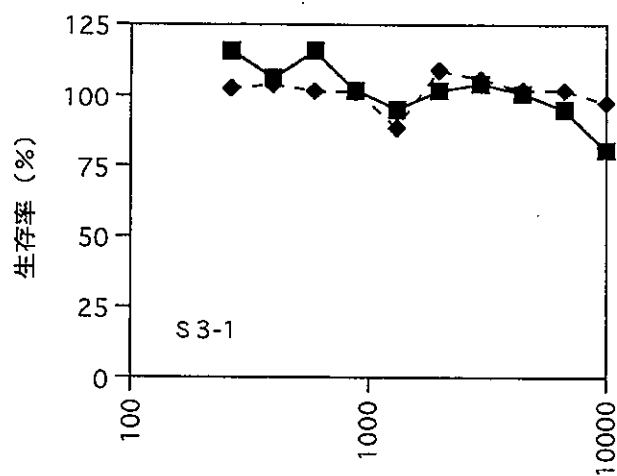
付表1-2. SIRC-CV 用量反応曲線 (S2-1~8)



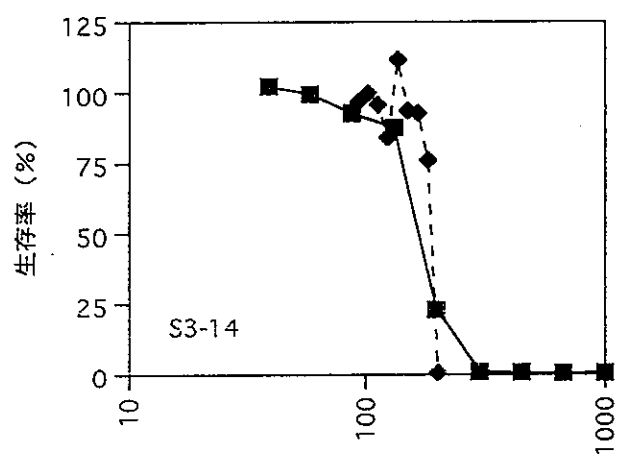
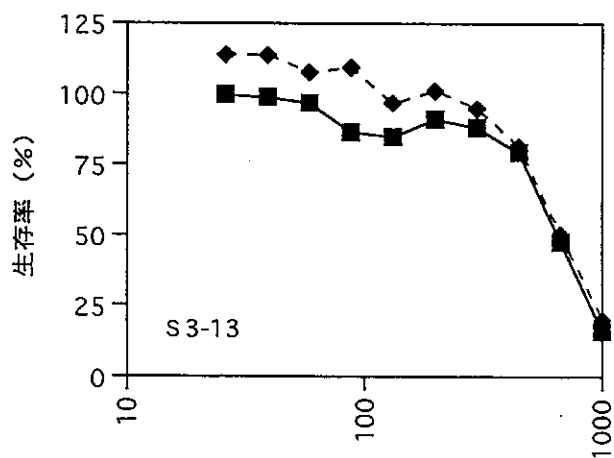
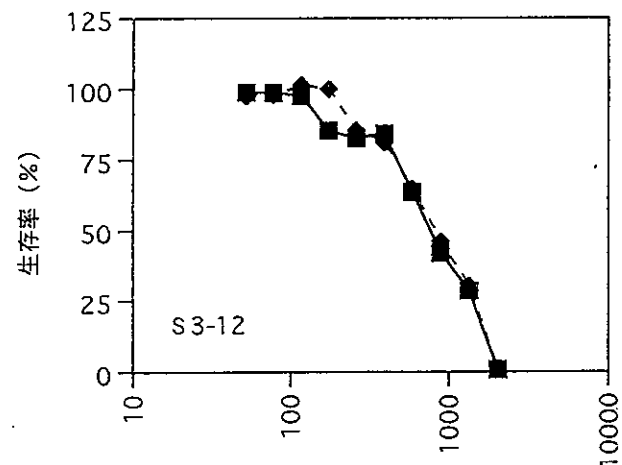
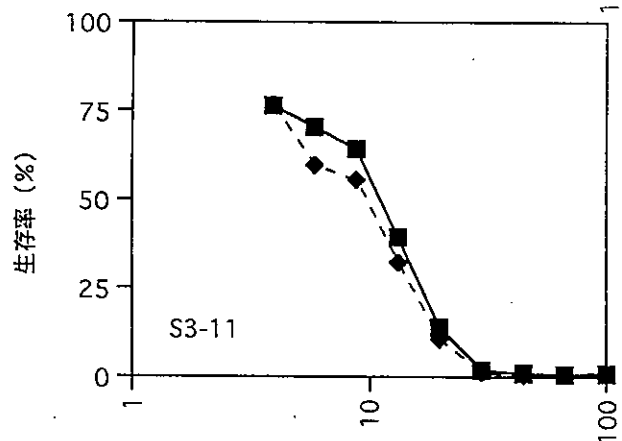
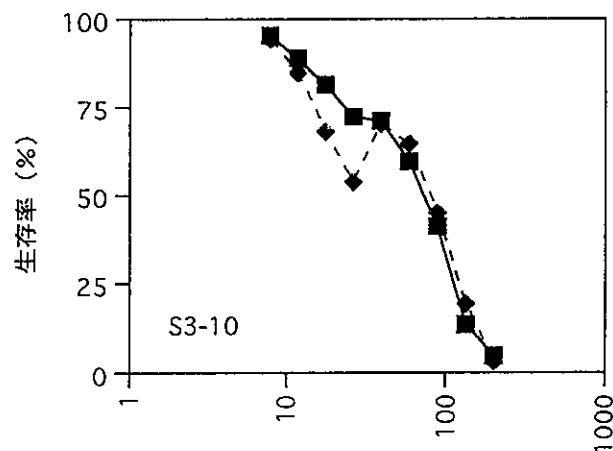
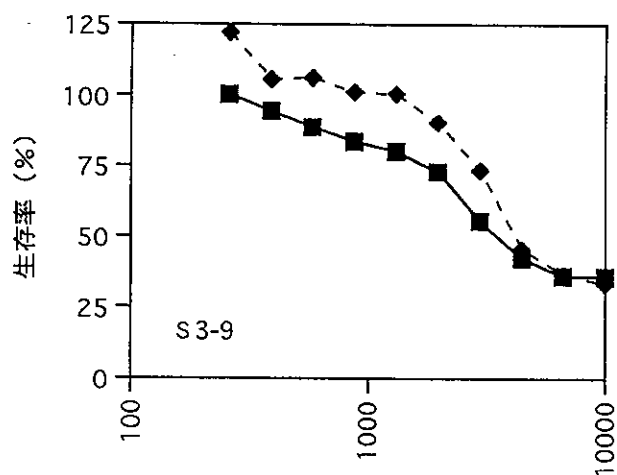
SIRC-CV 用量反応曲線 (S2-9~15)



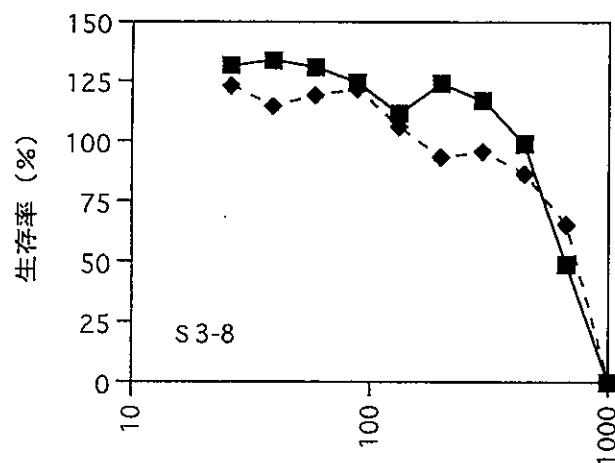
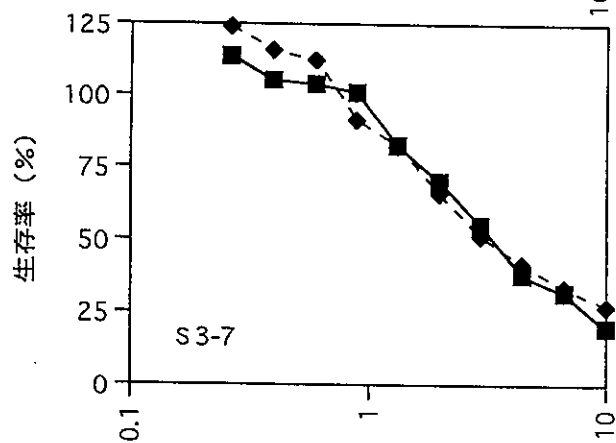
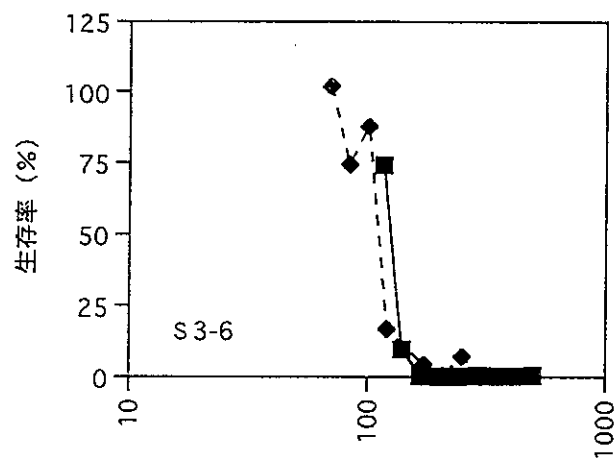
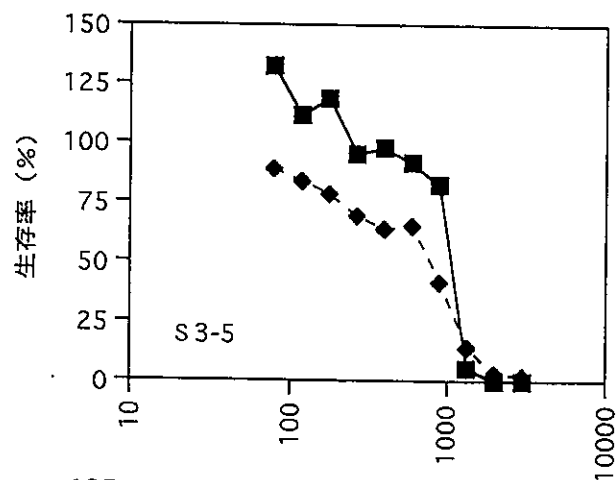
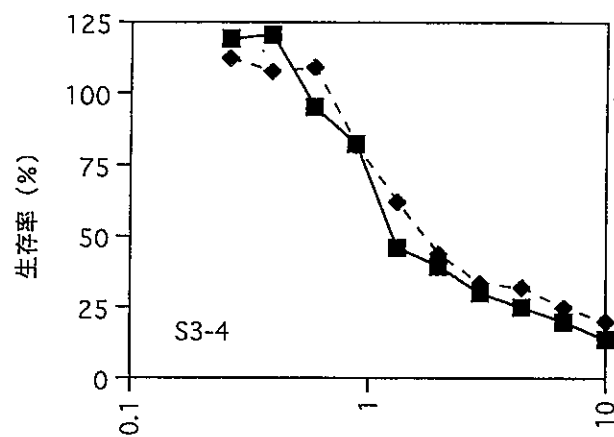
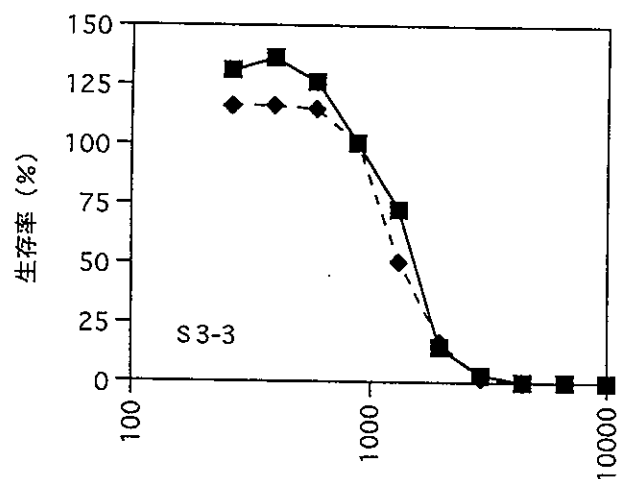
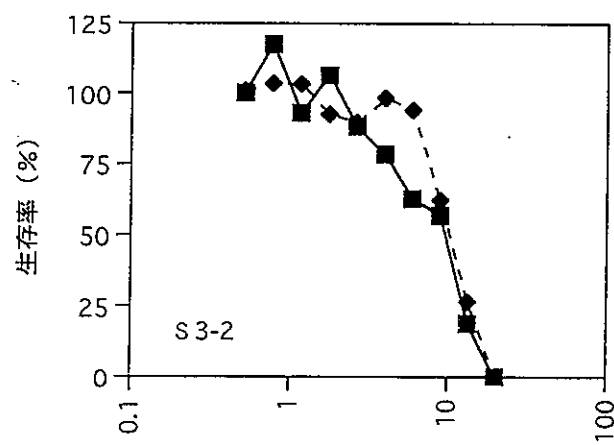
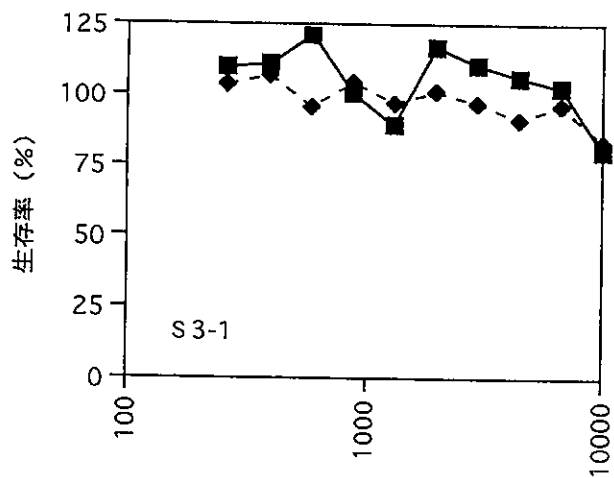
付表1-3. SIRC-NR 用量反応曲線 (S3-1~8)



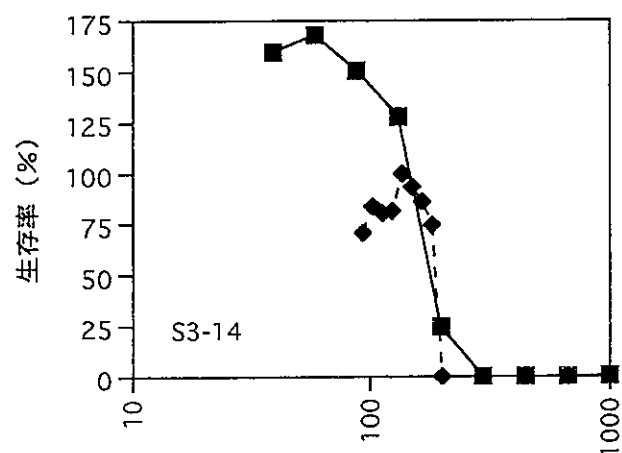
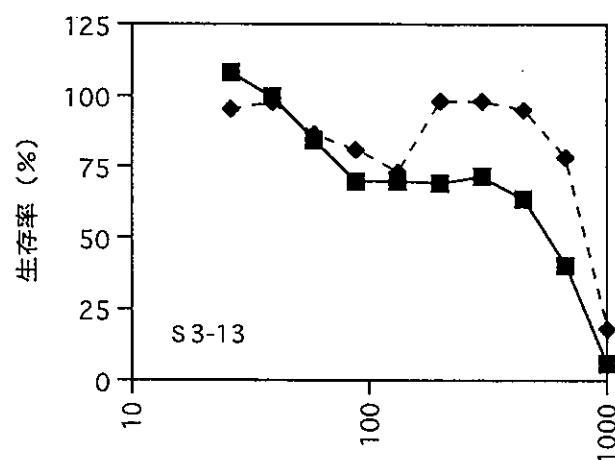
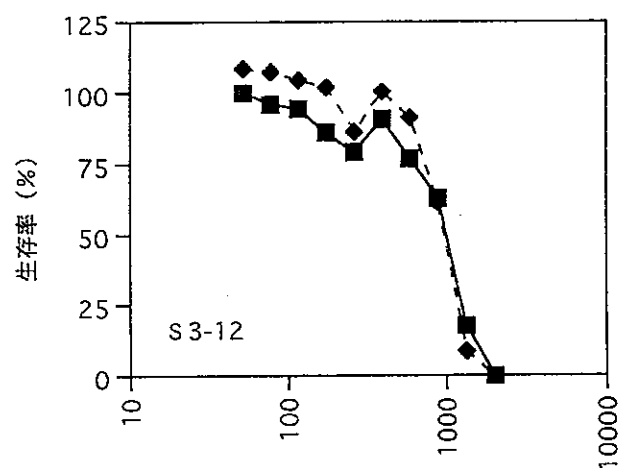
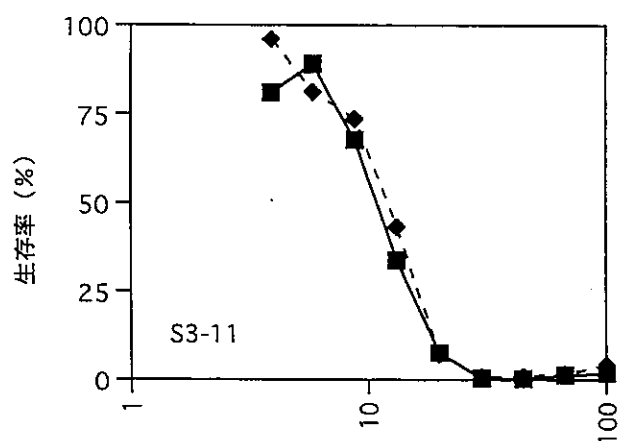
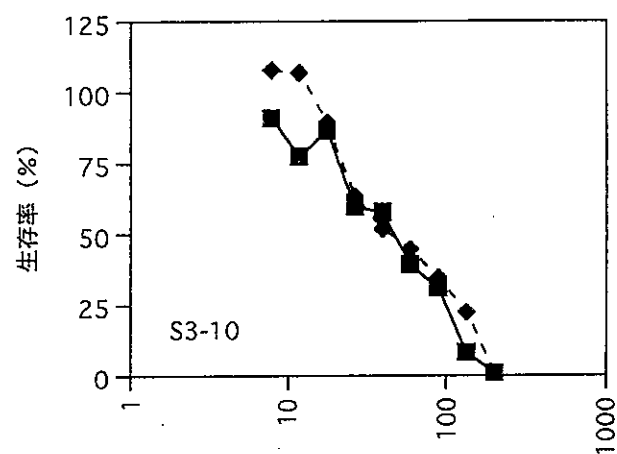
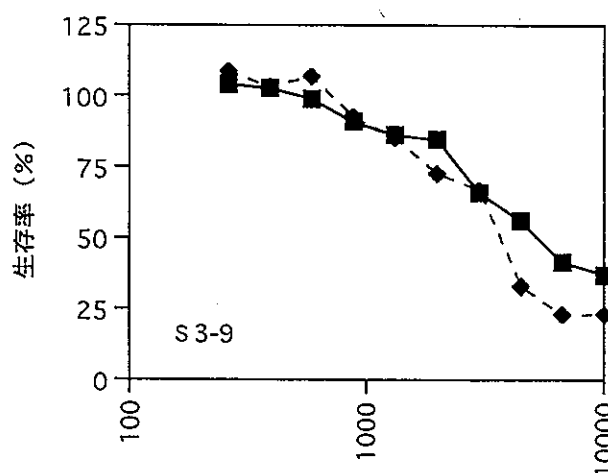
SIRC-NR 用量反応曲線 (S3-9~14)



付表1-4. SIRC-CV 用量反応曲線 (S3-1~8)



SIRC-CV 用量反応曲線 (S3-9~14)



付表2-1. SIRC-NRでの二次バリデーションコード開示後の修正内容

S2-5,6,7について、開示後の再試験結果を踏まえ本試験結果を置換した。

□…開示後の再試験以後1st~3rd最終報告書に採用した結果

採用理由:

S2-5: 本試験および追加試験ではEC50値の決定濃度での沈殿の影響と思われる測定阻害が認められ、EC50値が確定する場合としない場合があった。

再試験の結果、開示前の確定値と再現性のある値を得た。手技上の影響が考えられたことからこの結果を解析結果とした。

S2-6: 確定値に再現性が認められたためコード開示前の確定値を本試験結果として用いた。

S2-7: 本試験結果にて濃度調製のエラーが考えられた。

S2-5,6,7に関する各施設の試験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・追加試験・再試験結果

検体No. 5																																
施設	A				B				C				D				E				F				G							
溶媒	増地				DMSO				増地				増地				増地				増地				増地							
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				懸濁すく沈殿				やや白濁懸濁				懸濁				懸濁				懸濁				懸濁							
PH測定	最高用量				1 mg/ml				1 mg/ml				1 mg/ml				0.8 mg/ml				1.05 mg/ml				0.6 mg/ml				0.6 mg/ml			
	PH				7.50				8.78				10.50				8.52				7.20				8.67				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 (**)				① 599.7 (1.2)				① 680 (1.2)				① 310 (**)				① 485 (1.2)				① 385 (1.2)				① >600 (1.1)##			
					② 320 (**)				② 578.4 (1.2)				② 680 (1.2)				② 398 (**)				② 600 (1.2)				② 465 (1.2)				② >600 (1.1)##			
	追加試験結果				③ 400 (**)				③ 402.6 (1.2)				③ 740 (1.15)				—				—				③ 285 (1.6)				③ >313 (2)##			
					④ 350 (**)				④ (656) (1.2)##				④ 680 (1.2)				—				—				④ 210 (1.4)				④ >313 (2)##			
					⑤ 310 (**)				⑤ (372) (1.2)##				⑤ 670 (2)				—				—				⑤ 330 (1.4)				⑤ >600 (1.1)##			
													⑥ 530 (1.2)				—				—				⑥ 500 (1.1)##				⑥ (>1000) (1.2)##			
																									⑦ (>1000) (1.2)##				⑦ (>1000) (1.2)##			
																									⑧ 540 (1.2)##				⑧ 540 (1.2)##			
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				—							

付表 2-2. SIRC-CVでの二次バリデーションコード開示後の修正内容

S2-5,6,7について、開示後の再試験結果を踏まえ本試験結果を置換した。

☐ …開示後の再試験以後1st~3rd最終報告書に採用した結果

採用理由：SIRC-NRの修正に合わせ、同一のプレートの結果を採用した。

S2-5,6,7に関する各施設の調製条件ならびにクリスタルバイオレット染色性試験の本試験・追試験・再試験結果

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 (**)	① 621.7 (1.2)	① 245 (**)	① 380 (1.2)	① 265 (1.2)	① >600 (1.1)#	
	② 350 (**)	② 697.9 (1.2)	② 330 (**)	② 460 (1.2)	② 320 (1.2)	② >600 (1.1)#	
追加試験結果	③ 330 (**)	③ 313 (1.2)	—	—	③ 295 (1.6)	③ >313 (2)#*	
	④ 340 (**)	—	—	—	④ 213 (1.4)	④ >313 (2)#*	
	⑤ 300 (**)	—	—	—	—	⑤ >600 (1.1)#	
	—	—	—	—	—	⑥ >600 (1.1)#	
	—	—	—	—	—	⑦ (>1000) (1.2)##	
平均値	314	544	288	413	273	>600	#沈殿 ##再試験
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 (**)	① 42.4 (1.2)	① 57 (**)	① 35 (1.2)	① 332 (1.3)	① 54 (1.2)#	
	② 17 (**)	② 45.25 (1.2)	② 57 (**)	② 36 (1.3)	② 310 (1.3)	② 74 (1.2)#	
追加試験結果	③ 20 (**)	—	③ (37.5) (**)#	③ 16.8 (1.25)	③ 216 (1.3)	③ 44.4 ##	
	④ 26 (**)	—	—	④ 50 (1.4)	④ 226 (1.3)	④ 35.0 ##	
	⑤ 24 (**)	—	—	—	—	⑤ 86 (1.3)##	
	⑥ 30 (**)	—	—	—	—	—	
	—	#最高濃度沈殿	#再試験	—	—	#沈殿 ##再試験	
平均値	23	44	57	33	271	59	
標準偏差	4.8	—	—	12.3	58.6	21.0	
変動係数	0.208	—	—	0.372	0.216	0.358	

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) 255 (2)	590 (10)	360 (10)	
本試験結果	① 284 (**)	① 1407 (1.2)	① 2900 (**)	① 95 (1.4)	① 643 (1.7)	① 140 (1.2)	
	② 478 (**)	② 979 (1.2)	② 4400 (**)	② 100 (1.2)	② 325 (1.7)	② 100 (1.2)	
追加試験結果	③ 589 (2)	③ >1000 (1.2)	③ 4800 (**)	③ 120 (1.3)	③ 960 (1.7)	③ 340 (1.5)	
	④ 284 (**)	④ >1000 (1.2)	④ 670 (**)#	④ 150 (1.4)	—	④ 200 (1.5)	
	⑤ 160 (**)	⑤ 1643 (1.2)#	⑤ 470 (**)#	—	—	⑤ 360 (1.5)	
	⑥ 582 (**)	⑥ >2000 (1.2)#	—	—	—	⑥ 233> (1.1)*	
	—	#培地懸濁	#再試験、DMSO	—	—	⑦ 116> (1.2)*	
平均値	396	1410	2648	144	643	181	
標準偏差	178.5	432.3	2026.1	65.7	317.5	111.4	
変動係数	0.451	0.307	0.765	0.456	0.494	0.616	

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