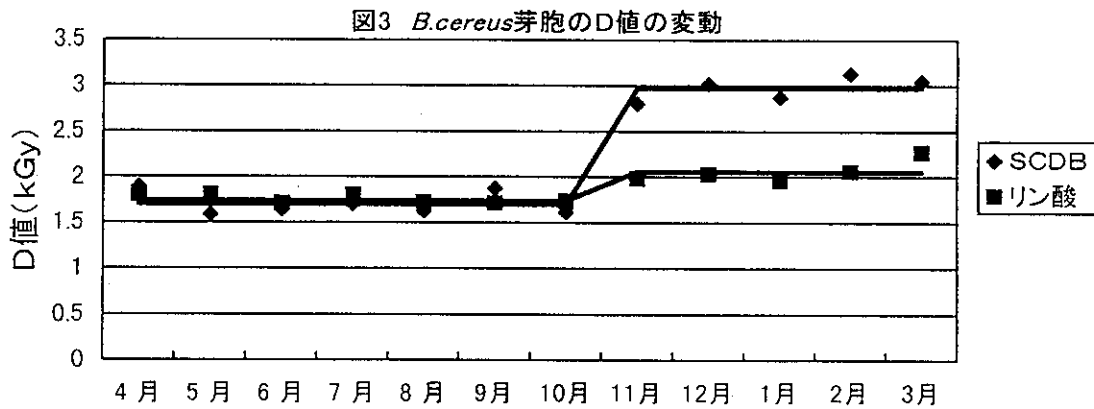


表3 *B.cereus* 芽胞のD値の変動

測定した月	放射線抵抗性値(D値)		測定した月	放射線抵抗性値(D値)	
	SCDB (kGy)	リン酸緩衝液 (kGy)		SCDB (kGy)	リン酸緩衝液 (kGy)
4月	1.89±0.16	1.80±0.06	10月	1.61±0.08	1.73±0.06
5月	1.59±0.11	1.81±0.12	11月	2.80±0.23	1.98±0.10
6月	1.64±0.14	1.71±0.06	12月	3.02±0.10	2.03±0.01
7月	1.70±0.11	1.80±0.10	1月	2.87±0.10	1.95±0.13
8月	1.62±0.19	1.72±0.13	2月	3.13±0.03	2.06±0.02
9月	1.87±0.13	1.71±0.06	3月	3.05±0.10	2.27±0.04



④ *B.megaterium* 芽胞のD値の変動

B.megaterium 芽胞のD値を1ヶ月毎に1年間測定した結果を表4及び図4に示した。SCDB培地懸濁系(乾燥状態)では、4月から10月までのD値はほぼ同じ値(平均D値は2.45 kGy)であったが、11月から3月までのD値は上昇し、ほぼ一定した値を示した(平均D値は3.97 kGy)。

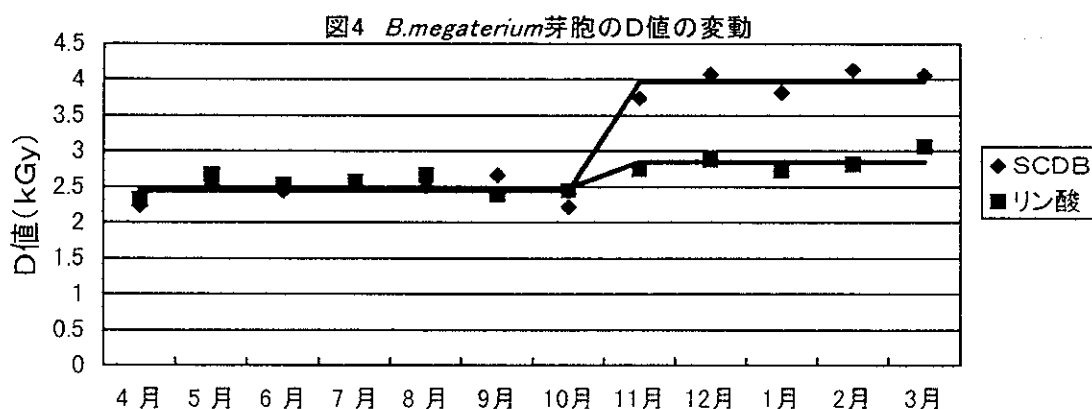
リン酸緩衝液懸濁系(乾燥状態)では、4

月から10月までのD値はほぼ同じ値(平均D値は2.48 kGy)であったが、11月から3月までのD値は僅かに上昇し、ほぼ一定した値を示した(平均D値は2.85 kGy)。

両懸濁系の4月から10月までのD値は、ほぼ同じであったが、11月から3月までのD値はSCDB培地懸濁系では1.62倍、リン酸緩衝液系では1.16倍高い値を示した。

表4 *B.megaterium* 芽胞のD値の変動

測定した月	放射線抵抗性値 (D値)		測定した月	放射線抵抗性値 (D値)	
	S C D B (kGy)	リン酸緩衝液 (kGy)		S C D B (kGy)	リン酸緩衝液 (kGy)
4月	2.24±0.17	2.32±0.13	10月	2.22±0.14	2.45±0.15
5月	2.53±0.14	2.67±0.09	11月	3.74±0.11	2.74±0.07
6月	2.44±0.09	2.53±0.11	12月	4.08±0.06	2.88±0.14
7月	2.54±0.15	2.57±0.15	1月	3.82±0.12	2.73±0.11
8月	2.50±0.09	2.66±0.12	2月	4.14±0.13	2.82±0.13
9月	2.66±0.11	2.39±0.15	3月	4.06±0.09	3.06±0.03



2. D値測定試料の調製での乾燥時の温度

D値の変動要因として測定試料を調製するときの吸引乾燥させる温度により、芽胞懸濁液の粘調度により、形成する菌の人工的なバイオフィルムの厚さの違いが考えられる。

それで、試料作製の吸引乾燥時の温度を測定した結果を表5に示した。乾燥時の

温度は年間を通して21から25℃であり、ほぼ一定であると考えられる(空調設備により)。

冬場(12月から3月)のSCDB懸濁系試料でのD値が上昇する要因は、吸引乾燥時の温度によるバイオフィルムの厚さの違いに起因するものではないと考えられた。

表5 D値測定試料の吸引乾燥時の温度

測定した月	乾燥時の温度(°C)	測定した月	乾燥時の温度(°C)
4月	21	10月	22
5月	23	11月	22
6月	23	12月	25
7月	25	1月	25
8月	25	2月	24
9月	23	3月	23

3. SCDB懸濁系試料でのポリエチレン袋包装とアルミラミネート袋包装によるD値の比較〔試料中の湿度のD値への影響〕

SCDB懸濁系試料では冬場(12月から3月)にD値が上昇することが認められた。この要因として、試料を照射するまでの保管状態、即ち、湿度の影響が考えられるの

で、通気性のあるポリエチレン袋に包装した試料と通気性のないアルミラミネート袋に包装した試料についてD値を測定し、比較した。その結果を表6及び図5に示した。

表6 アルミラミネート袋とポリエチレン袋に入れた試料のD値の比較

菌 株	D値 (kGy)			
	<i>B.subtilis</i>	<i>B.pumilus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.megaterium</i>
アルミラミネート	2.33	2.64	2.56	3.05
ポリエチレン	2.82	3.05	2.93	3.95

通気性のないアルミラミネート袋に包装した試料のD値は、通常のD値測定に使用しているポリエチレン袋よりも低いD値を示した。この結果は、冬場(11月から3月)ではデシケータで吸引乾燥した試料が、照射まで室内で保管する間に、通気性のあるポリエチレン袋では、更に乾燥されるものと推察される。冬場での部屋の湿度は40%以下、更に暖房した場合には25%位であ

った。

SCDB懸濁系で測定したD値は、本当の値に比べ、湿度の低い場合には上昇し、反対に湿度の高い場合には下降しているものと推察される。このことを調べるにはアルミラミネート袋に包装した試料の季節的な変動を調べることにより判明すると思われるが、湿度を一定に制御して試料を調製することは難しいと思われる。

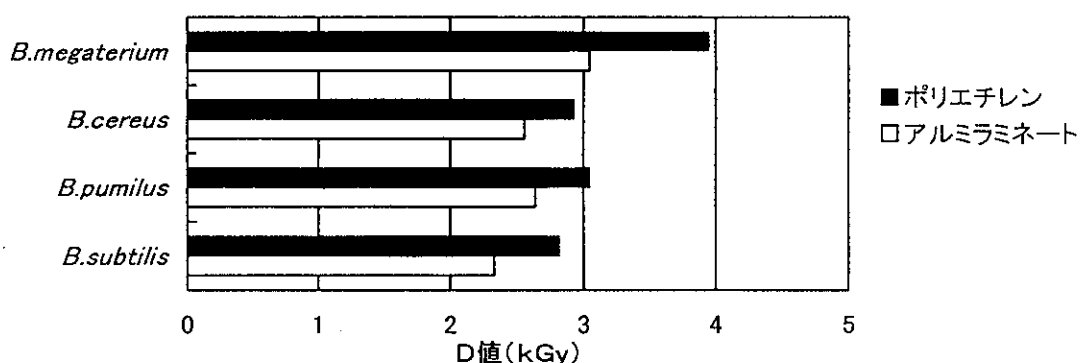


図5 アルミラミネート袋とポリエチレン袋に入れた試料のD値の比較

4. 試料の吸引乾燥条件の検討

試料を吸引乾燥する時間は20分間と設定しているが、D値の変動要因が湿度(試料中の水分含量)に関係しているので、乾

燥時間の検討をした。*B.pumilus*芽胞のSCDB懸濁系試料を用い、10、20及び30分間吸引乾燥し、乾燥後直ちにアルミ

ラミネート袋に包装して、D 値を測定した。10 分間乾燥した試料の D 値は 2.21kGy、20 分間では 2.66kGy、30 分間では 2.68kGy であった。20 分間以上の乾燥

時間では D 値が一定であった。この結果から、ポリエチレン袋包装では試料の保管中に湿度によって試料の水分含量が変化するために D 値が変動すると推察される。

D. 考察

1) SCDB 培地懸濁系での放射線抵抗性の評価

SCDB 培地懸濁系を用いて菌の放射線抵抗性を評価する方法について検討した結果、冬場(11 月から 3 月)の期間に測定した抵抗性値は、4 月から 10 月の期間に測定した D 値に比べ、平均して 1.73 倍(1.62 から 1.85 倍)高い値が得られた。

D 値が上昇する要因として、照射するまでの試料の保管中にポリエチレン袋包装では、通気性があるために試料が更に乾燥することに起因していると考えられる。即ち、試料中の湿度(水分含量)により D 値が変動するものと推察される。D 値が変動する原因は湿度が低い場合には、形成されたバイオフィームが緻密な構造となり、バイオフィーム中への酸素の透過性が抑制されるものと思われ、湿度の違いにより形成されたバイオフィーム中への酸素の透過性の違いに関係しているものと思われる。

SCDB 培地懸濁系の場合、培地は吸湿性であるので、試料の水分含量を一定にして試料を調製することは難しい。試料中の

湿度をある程度一定に制御して、試料を調製する事は困難であり、出来たとしても試料を吸引乾燥して直ちにアルミラミネート袋に包装するしか方法はないと思われる。

固有の菌の抵抗性値は不変でないという評価ができないので、この方法で放射線抵抗性値を評価するのは適していないと思われる。

ISO11137 でバイオバーデンの抵抗性分布を調べた方法もこの方法である。日本の医療用具でのバイオバーデンの抵抗性分布調査もこの方法を採用した。

表 7 に ISO11137 の標準抵抗性分布と表 8 に日本で調査した抵抗性分布を示した。

ISO11137 の標準抵抗性分布と日本で調査した抵抗性分布を比較するとほぼ類似した結果が得られたが、日本の抵抗性分布では D 値の高い菌の存在確率が多い。この理由として抵抗性を測定した時期が 11 月から 3 月に集中していたので、高い D 値が得られたと思われる。

表 7 ISO11137 で使用される医療用具に存在する菌の標準放射線抵抗性分布

D 値 (kGy)	1.0	1.5	2.0	2.5	2.8
存在確率	0.65487	0.22493	0.06302	0.03179	0.01213
D 値 (kGy)	3.1	3.4	3.7	4.0	4.2
存在確率	0.00789	0.00350	0.00111	0.00072	0.00007

表8 日本の医療用具に存在する菌の SCDB 懸濁系の放射線抵抗性分布

D 値 (kGy)	1.0	1.5	2.0	2.5	2.8
存在確率	0.616	0.246	0.066	0.043	0.014

D 値 (kGy)	3.1	3.4	3.7	4.0	4.2
存在確率	0.018	0.024	0.008	0.005	0.000

ISO11137 で使用される医療用具に存在する菌の標準放射線抵抗性分布は、医療用具でのバイオバーデンの付着状態を考えた場合、かなり安全サイドに抵抗性を評価していると考えられる。このことは滅菌線量設定や監査時の検定試験において不合格になる確率は少ないものと思われる。仮に検

定試験で不合格になった場合の要因は、実際に抵抗性の強い菌 (*B.megaterium*、*B.cereus* 等のシグモイド型生残曲線を示す菌種) の存在による場合とバイオバーデン数の評価に妥当性がない場合であり、後者の可能性の方が強いと考えられる。

2) リン酸緩衝液懸濁系での放射線抵抗性の評価

リン酸緩衝液懸濁系を用いて菌の放射線抵抗性を評価する方法について検討した結果、冬場(11月から3月)の期間に測定した抵抗性値は、4月から10月の期間に測定したD値に比べ、平均して1.18倍(1.16から1.19倍)高い値が得られた。冬場に測定したD値が上昇する傾向はリン酸緩衝液系でも観察されたが、SCDB培地懸濁系でのD値の上昇率に比較して約18%であった。菌の放射線抵抗性の評価法としては

リン酸緩衝液懸濁系を適用した測定法の方が、SCDB培地懸濁系よりも優れていることが判明した。

しかしながら、リン酸緩衝液懸濁系を用いた放射線抵抗性測定法においても、冬場にD値の上昇傾向が認められたことより、湿度の影響を受けている。湿度の影響を軽減するためには、試料を吸引乾燥した後にアルミラミネート袋に入れる必要があると思われる。

3) 規格化した菌の抵抗性測定法

菌のD値を評価するには規格化された測定法が必要である。現在、規格化された測定法は存在しないのが現状である。ISOで採用されている方法はSCDB培地懸濁系での測定法であるが、今回の実験結果から季節的なD値変動が認められ、その要因は湿度により試料の乾燥状態が異なること

により、バイオフィilm中への酸素の透過性が異なることに起因しているものと推察される。リン酸緩衝液懸濁系でも湿度による影響を受けるが、その程度は約18%程度であったので、規格化された測定法としてはリン酸緩衝液懸濁系が適している。この方法を適用して規格化する場合、2種類

の以下の方法が考えられる。①従来のポリエチレン袋包装した試料を用いてD値を測定し、4から10月の期間のD値は1.18倍し、安全サイドで抵抗性値を評価する方法と②試料を吸引乾燥した後、直ちにアル

ミラミネート袋に入れて包装し、D値を測定する方法である。

後者の方法が規格化する場合には最適であると思われる。

E. 結論

菌の放射線抵抗性の測定法としてISOで採用されているSCDB培地懸濁系とリン酸緩衝液懸濁系を用いて、D値の季節的な変動について検討した。その結果、SCDB培地懸濁系を用いてD値を測定した場合、11月から3月の期間のD値は4月から10月の期間のD値に比べ、平均して約1.73倍(1.62から1.85倍)高い値が得られた。

同様にリン酸緩衝液懸濁系を用いた測定法でも、冬場(11月から3月)の期間に測定したD値は、4月から10月の期間に測定したD値に比べ、平均して1.18倍(1.16から1.19倍)高い値が得られた。以上の実験結果から、D値は季節的な変動をすると

結論した。

季節的なD値の変動は、試料の包装にポリエチレン袋を用いたため、通気性のあるポリエチレン包装では照射するまでの保管時に湿度の影響を受け、試料の乾燥状態が季節により異なるものと推察された。即ち、冬場(11月から3月)の期間の方が4月から10月の期間よりも試料がより乾燥されていたためにD値が上昇したと考えられる。

リン酸緩衝液懸濁系でのD値変動を基に菌の抵抗性を評価した場合、SCDB培地懸濁系で測定されたISOの標準放射線抵抗性分布は、かなり安全サイドに評価されているものと結論される。

別添 3-3

ISO/TC194 WG5 における細胞毒性試験に用いる標準材料の国際評価試験

1997年4月、英国 York において開催された ISO/TC194 の第5作業部会 (WG5) での合意にそって、日本で開発した細胞毒性試験用の標準材料について、試験機関間の評価試験を実施した。

WG5 で合意したプロトコールに従い、アメリカ、ドイツ、フランス、オーストラリア、イギリス、オーストリア、スウェーデン、日本などから15の試験機関が参加し、わが国がとりまとめを担当した。

本試験の目的は、日本の医療用具ガイドラインに従って用いられている3種の標準材料（陰性材料1種と2種の陽性材料）の細胞毒性に関して、WG5 の統一プロトコールを用いて、その毒性の強さを試験間で評価するものである。試験は抽出法と直接接触法の2つの方法で実施し、直接接触法では陽性の標準材料についてのみ評価した。

抽出法では、10%fc_s 含 MEM 培養液で24時間抽出した抽出液を順次希釈して、細胞にそれぞれ24時間と72時間処理し IC₅₀ 値を求めた。その結果、陽性材料Aで約18%、陽性材料Bでは約40%を示した。陽性材料Aでは、コロニー形成法と同様に陽性材料に比べて強い毒性を示した。24時間処理の結果は72時間処理のそれと同様の傾向を示した。陰性材料Cについては、ほとんどの機関で細胞毒性を示さなかった。直接接触法では、その細胞毒性は材料周辺の細胞の形態観察と生存細胞数のカウントによりおこなった。IC₅₀ 値のプロットは、抽出法の場合に比べ試験機関間で広がりを見せた。しかし、陽性材料の毒性の強さに関しては、抽出法と同様の傾向を示した。

以上の結果より、日本のガイドラインで用いられている細胞毒性試験用の標準材料は、ISO/TC194/WG5 の国際評価試験においても、同程度の毒性を示す事が明らかにされた。

SUMMARY REPORT

**The TC194/WG5 Validation Study for
the Japanese Reference Materials
on Cytotoxicity Testing**

*Test Period
1997 June - 1998 May*

SUMMARY REPORT

The TC194/WG5 Validation Study for Reference Materials on Cytotoxicity Testing

Management Members: Dr. M-F Harmond (WG5 convener)
Dr. A. Nakamura (Sponsorship from MHW)
Dr. N. Tanaka (Project Leader)

According to the agreement of TC194/WG5 meeting in York (April 1997), we conducted an inter-laboratory validation study, «round robin test» on the Japanese Reference Materials using the protocol agreed in WG5 members. At present, 15 laboratories have submitted results for the Reference Materials. The purpose of this study is to assess the cytotoxicity of each Reference Material by using a protocol in compliance with ISO 10993-5.

These Positive and Negative RMs have been used for the cytotoxicity tests of medical materials and devices under the Japanese guidelines. The study was carried out by extract method and direct contact method. In the direct contact method, only Positive RMs were evaluated.

The results of both extract and direct contact methods were shown in Table 1-2 and Fig. 1-2. Raw data submitted from each laboratory were plotted in Fig. 3-5. In the extract method, the extract with MEM (10% fcs) for 24h were diluted stepwise and treated cells for 24h and 72h. IC₅₀ values obtained with Positive RM-A were about 18% and those of Positive RM-B were about 40% (Table 1 and Fig. 1). Positive RM-A showed more severe cytotoxicities than RM-B. The values of 24h treatment agreed with those obtained by 72h treatment. There was no cytotoxicity for Negative RM-C in the data from most laboratories.

In direct contact method, cytotoxicity was measured by the observation of cell morphology around test sample and by viable cell counting. As shown in Table 2 and Fig. 2, IC₅₀ values plots were spreaded more widely depending on the test laboratories than in the case of extract method. Nevertheless, the Positive RM-A and B showed severe and mild toxicities, respectively, in direct contact method, too.

The overall results of this round robin test showed that two Positive RMs which are containing different cytotoxic chemicals gave the given levels of cytotoxicities (severe and moderate in extract method, moderate and weak in direct method, respectively). Also, Negative RM showed no cytotoxicities.

Other optional assays have been reported. More details will be presented in ISO/TC 194, WG5 meeting in Alexandria.

The Reference materials tested are as follows

1. Positive Reference Materials (RM) - A:

Polyetherurethane film containing 0.1% zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC)
(Lot No. 96011A)

2. Positive Reference Materials (RM) - B:

Polyetherurethane film containing 0.25% zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC)
(Lot No. 96011B)

3. Negative Reference Materials (RM) C:

High density polyethylene sheet (Lot No. 96001C)

The name of participants and the test systems used

Labo. No.	Name	Institution	Test systems reported		
			Extract	Direct	Other
1	Dieter Dannhorn	mdt medical device testing GmbH	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Growth inhibition test
2	Michael Doser	ITV	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	MTT
3	Jaisri Giridhar	Becton Dickinson and Company	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
4	Gun Rydhög	GAMBRO GROUP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
5	Anita Sawyer	Cordis Corporation	-	-	Agarose Overlay
6	Mel E. Straymeyer	FDA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
7	Akitada Nakamura	NIHS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
8	Paul J. Upman	NAmSA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
9	Donald F. Gibbons	3M Life Sciences Sector	<input type="radio"/>	-	ATP bioluminescent Agarose Overlay
10	Gavin Mellow	Univ. Newcastle upon Tyne	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
11	Andreas Czich	Cytotest Cell Research GmbH&Co.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	XTT
12	Marie-Françoise Harmand	LEMI	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
13	Andreas Schedle	Univ. Vienna	-	<input type="radio"/>	
14	Noriho Tanaka	Hatano Res. Inst., FDSC	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Colony formation CV, MTT, NR
15	Gerda Mark	Therapeutic Goods Administration	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Table 1 IC₅₀ values obtained by extract method treated with the extracts of Positive and Negative Reference Materials

Reference Materials	Treatment (h)	Lab. No.													Mean
		1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	14	15	
A (Positive)	24	18.8	65.4	13.8	18.4	21.5	18.4	21.4	24.4	15.9	1.5	0.8	13.0	7.7	19.4
	72	18.8	76.4	19.1	21.9	10.8	17.8	18.8	22.9	21.4	1.0	0.8	18.8	6.0	20.7
B (Positive)	24	35.8	>100	29.5	29.7	48.7	40.8	32.1	46.7	42.2	>50	59.0	25.5	30.5	39.0
	72	35.7	>100	37.2	37.8	41.7	44.9	29.2	46.7	35.7	31.1	49.1	36.1	34.7	38.7
C (Negative)	24	>100	>100	45.7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>100	>100
	72	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>100	>100

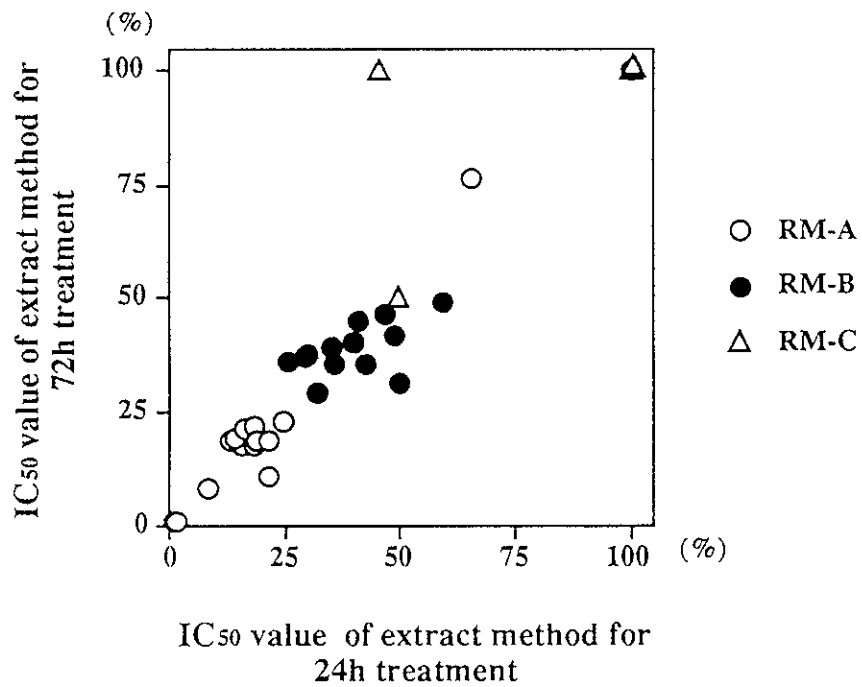


Fig.1 Concentration of IC₅₀ between 24h and 72h treatments with the extracts of Reference Materials

Table 2 Relative survivals obtained by direct contact method treated with Positive and Negative Reference Materials

Reference Materials	Treatment (h)	Lab. No.												Mean
		1	2	3	4	6	7	10	11	12	13	14	15	
A (Positive)	24	31	1.92	113	47	0.53	66.3	67.2	54.4	42	22.7	42.2	13.5	41.8
	72	40	0.88	93.1	34	3.9	50.7	29	31.5	40	22.8	46.7	7.6	
B (Positive)	24	71	71.6	101	69	45.9	104	81.6	77.8	68	61.9	48.4	72.3	72.8
	72	71	5.26	70.3	59	24.8	120	42.8	71.8	86	68.6	50.3	62.9	

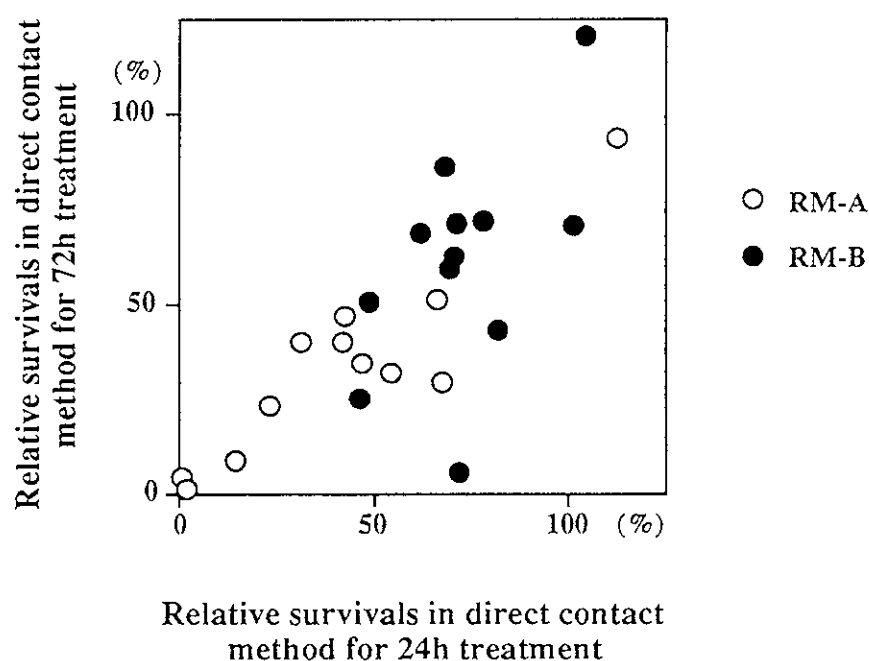


Fig.2 Relative survivals between 24h and 72h treatments with the Positive Reference Materials

Positive RM-A

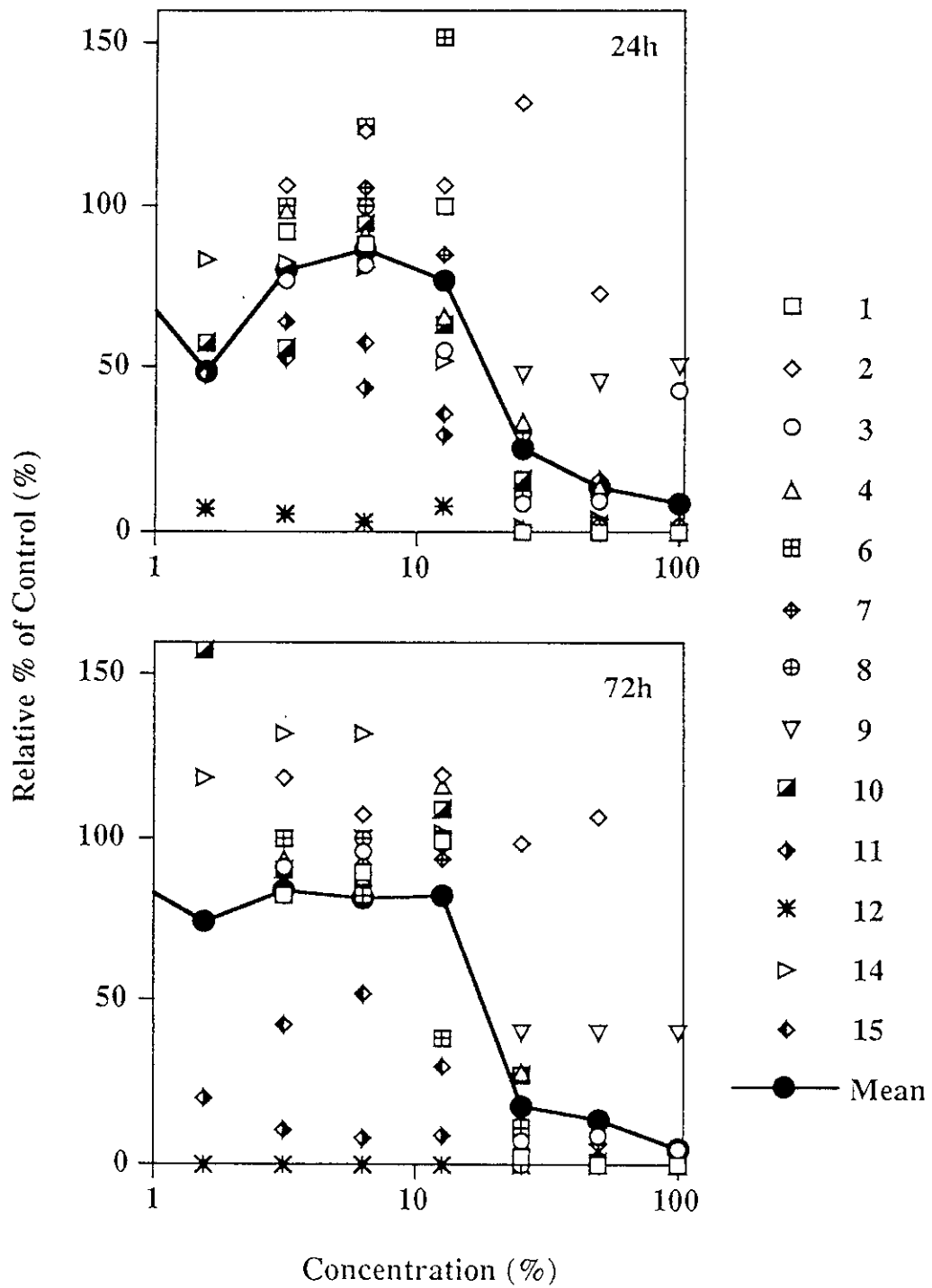


Fig. 3 Profiles of cytotoxicities by extract method for Positive RM-A

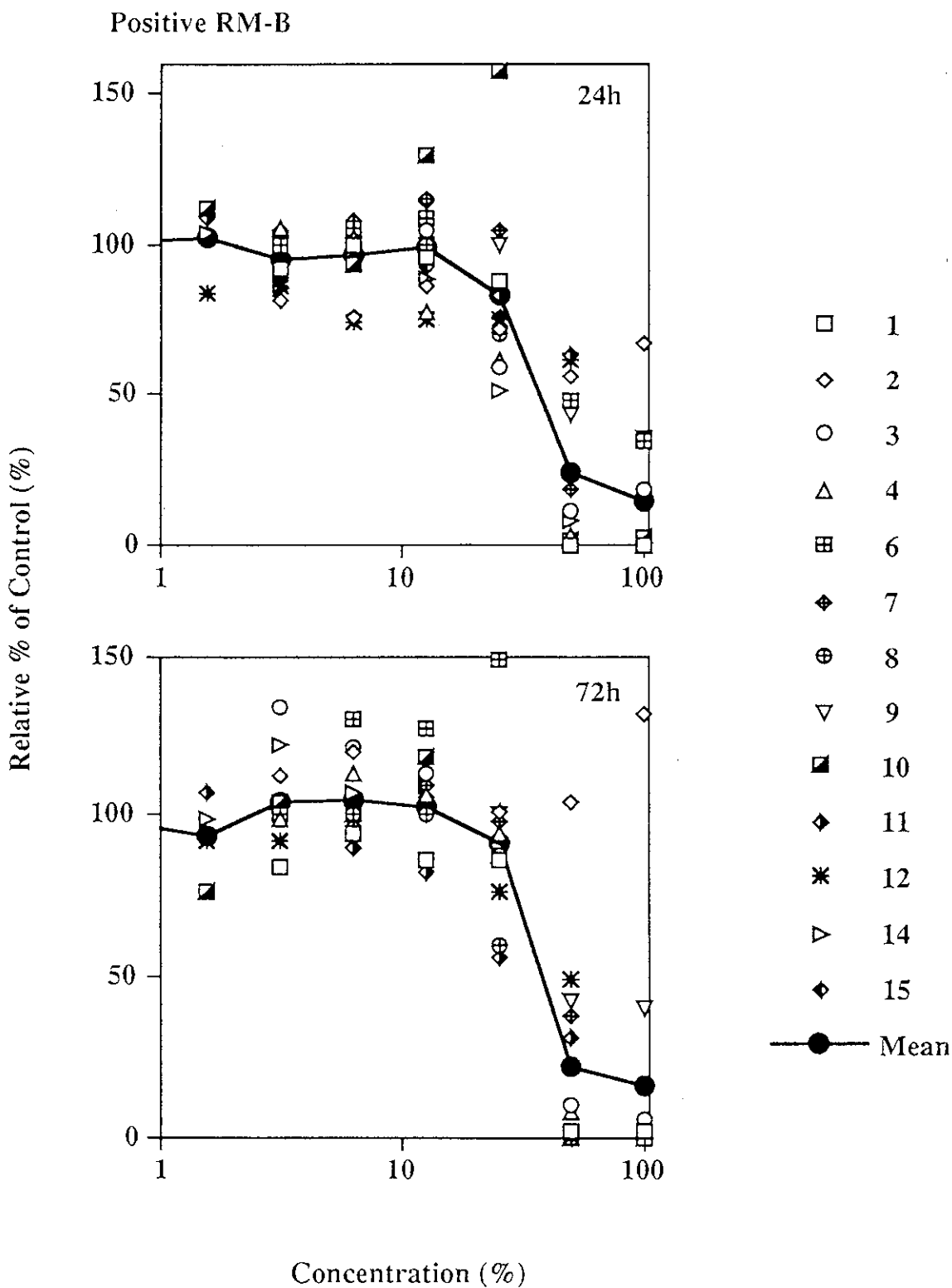


Fig. 4 Profiles of cytotoxicities by extract method for Positive RM-B

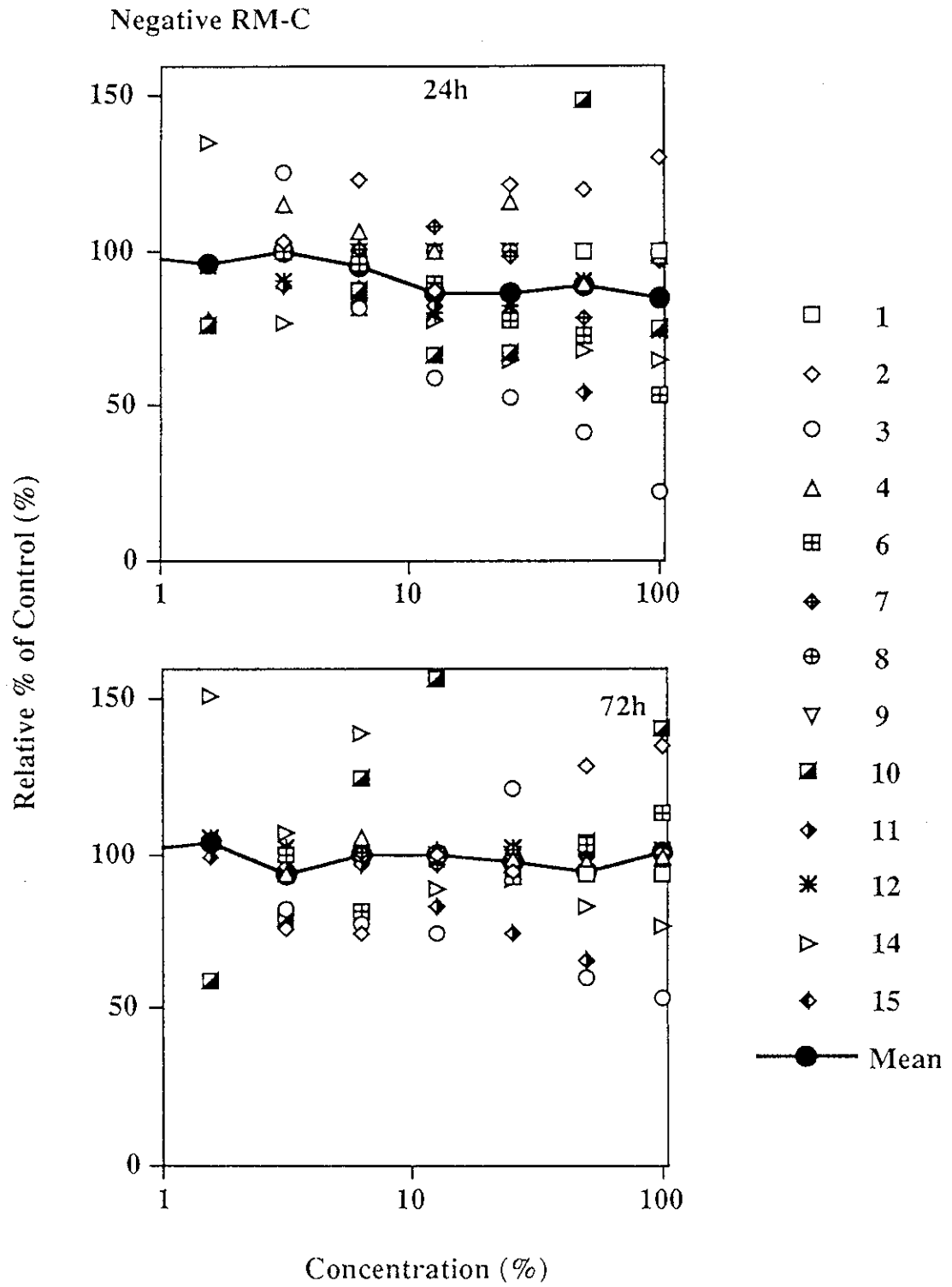


Fig. 5 Profiles of cytotoxicities by extract method for Negative RM-C

Results of Morphological Observation in the Direct Contact Test - 1

Lab	h	%	Morphology
No.1			
A	24	31	More than 70% of the cells are rounded and/or are lysed
	72	40	More than 70% of the cells are rounded and/or are lysed
B	24	71	Less than 50% of the cells are round, extensive cell lysis and empty areas between cells
	72	71	Between 20 and 50% of the cells are round, extensive cell lysis and empty areas between cells
C	24	91	<i>Confluent cell layer, no cell lysis</i>
	72	94	<i>Confluent cell layer, no cell lysis</i>
No. 3			
A	24	112.53	Cells in the dishes did not look different from the cells in the blank dish. Again the SRM-A was found to be floating in the media and was not in direct contact with the cells.
	72	93.13	
B	24	101.38	There were pockets of empty spaces in the dish where no cells could be seen. It appeared that these pockets were formed where the edges of the SRM-B piece contacted the cells. Once again the SRM-B was found to be floating in the media and was not in direct contact with the cells.
	72	70.33	
No. 6			
A	24	0.53	The cells exposed to RM-A were rounded with little cell attachment in any of the well. RM-A was cytotoxic to the whole culture
	72	3.9	
B	24	45.9	There were no cells at or under material, there were some rounded cells in the culture, however the cells at the edges of the well showed good fibroblast morphology.
	72	24.8	
C	24	66.7	The cells were growing at the material with good fibroblast morphology.
	72	78.9	

Continued

Results of Morphological Observation in the Direct Contact Test - 2

Lab	h	%	Morphology
No. 8			
A	24	3/Moderate	The test article showed evidence of causing cell lysis or toxicity greater than a grade 2 (mild reactivity). the test article was moderately cytotoxic.
B	24	2/Mild	The test article showed evidence of causing cell lysis or toxicity. It was mildly cytotoxic.
C	24	0/None	The test article showed no evidence of causing cell lysis or toxicity. It was not cytotoxic.
No. 10			
A	24	67.2	More rounded, non-adherent cells than any of the control dishes but there appeared to be more normal looking, adherent cells than another dish. The cells present appeared to have normal morphology and were adherent. However, there was a large area of no cell growth around the material.
	72	29	All cells rounded and many non-adherent but quite evenly spread through out the culture media Many cells of normal, adherent, fibroblastic appearance but with larger areas of no cell growth compared to the control dishes. However, these areas of no cell growth did not seem to necessarily correspond to being in the direct proximity of the material. Possibly more cells of rounded appearance than in the control dishes but these cells were still adherent. There were some large areas of the dish with no apparent cell growth.
B	24	81.6	Most cell adherent with normal morphology but more sparsely populated than the control dishes. Some rounded, non-adherent cells floating in the culture media. Many rounded and non-adherent cells but also many adherent cells with normal morphology. Most areas of the dish had normal cellular growth but there was an area towards one edge of the dish with very little cell growth.
	72	42.8	Most areas of the dish contained normal cellular growth but there was an area of the dish with very little cellular growth All cells adherent and normal in appearance. Evenly spread in a monolayer, even in close proximity to the material. Most cells adherent but with a number of floating, rounded and non-adherent cells. Cells more sparsely populated in close proximity to the material. A distinct area of rounded, mainly adherent cells close to material. However, most other areas of the dish contained normal, adherent, fibroblastic cells. Many cells of normal, fibroblastic, adherent appearance but there was a large area of rounded non-adherent and crenated cells close to one edge of the material.

Continued

Results of Morphological Observation in the Direct Contact Test - 3

Lab	h	%	Morphology
No. 11			
A	24	54.4	Heavy damaged cells were found under and about 8-10 mm around the specimen. These cells showed cell lysis, cytoplasmic granulation and morphologic alteration.
	72	31.5	Heavy damaged cells were found under and about 10-11 (9-12) mm around the specimen. These cells showed cell lysis, cytoplasmic granulation and morphological alteration.
B	24	77.8	Heavy damaged cells were found under and about 5-7 (4-6) mm around the specimen (very enregular). These cells showed cell lysis, cytoplasmic granulation and morphological alteration.
	72	71.8	Heavy damaged cells were found under and about 6-9 mm around the specimen (very unregular). These cells showed cell lysis, cytoplasmic granulation and morphological alteration. Heavy damaged cells were found under and about 5-7 mm around the specimen. These cells showed cell lysis, cytoplasmic granulation and morphological alteration.
C	24	91.9	Some cells under the specimen were damaged, the other cells showed a normal cell morphology and no indication of cell damage. The cells showed a normal cell morphology and there were no indication of cell damage
	72	107.9	80% of the cells under the specimen were damaged , the other cells showed a normal cell morphology and no indication of cell damage. Some cells under the specimen were damaged, the other cells showed a normal cell morphology and no indication of cell damage.

Results of optional studies - 1

Laboratory	IC50 value			Methods
	A (0,1 ZDEC)	B (0.25 ZDBC)	C (nega)	
1 Dr. Dieter Dannhorn mdt GmbH, Germany	2.2%	30%	-(non-tox)	Growth inhibition test, CV, OD580 (ref. 660) 72h extract, 72h test period 4,000 cells/96 well for 4h, then replaced the medium
2 Dr. Michael Doser ITV, Germany	36.4%	- (> 90%)	- (> 90%)	MTT, extract 10,000 cells/96well for 24h, then medium was replaced
5 Dr. Anita Sawyer Cordis Corporation, USA	Grade 2	Grade 2	Grade 0	Agar-Overlay ETO sterilized, confluent Tissue culture agar was overlaid on monolayer of L929 1x10 mm ² pieces of samples were put on and incubated fro 24h.
6 Dr. Mel E. Stratmeyer FDA, USA	Extraction method			Used RPMI 1640 medium
	24h 1/32 (15.7%)	25-50%	-(129.2%)	
	72h 1/32 (6.2%)	25-50%	-(84.2%)	
	Direct method			All samples had coverglass weights to hold them in place Each material was not removed from the culture before trypsinization. Material C showed some toxicity. The presence of coverglass might have caused some damage.
24h 3.1%	49%	60.4%		
72h 2.4%	55.3%	59.4%		
9 Dr. Donald F. Gibbons 3M Life Sciences Sector, USA	72 < 6.25%	25-50%	-	ATP bioluminescent assay, medium extract Extracted by basal medium, Eagle, for 3 days at 37C ATCC CCL1, clone 929 50,000-100,000 cells/ml, 2 ml/glasstube, incubated for 24 h. Replace medium to test sample then incubated for 72h. Measured ATP amount
	24h Index 1/nega	-	-	PBS Agarose Overlay Assay
	24h -	-	-	CSO Extracted by PBS or cottonseed oil (37C, 6d) 3x10 ⁵ cells/35 mm dish, After cells made monolayer, aga was replaced. Sample was put on the agar and second layer of agar was poured over. Incubated for 24h w/o CO2
11 Dr. Andreas Czich Cytotest Cell Research GmbH & Co. KG, Germany	24h <1/64 (40.1%)	-1/2 (50.2%)	>1/2 (86.9%)	XTT (XTT was used instead of the cell count on extract method) OD450 (ref.690 nm)
	72h <1/64 (40.0%)	>1/2 (57.7%)	>1/2 (78.7%)	

Continued

Results of optional studies - 2

Laboratory	IC50 value			Methods
	A (0.1 ZDEC)	B (0.25 ZDBC)	C (nega)	
14 Dr. Noriho Tanaka FDSC	1.5	47.0	22.2	Crystal Violet assay, HeLa.S3 (sc)
	2.7	> 50	> 50	Crystal Violet assay, L929
	3.0	> 50	> 50	Crystal Violet assay, CHL
	1.7	> 50	> 50	Neutral Red assay, HeLa.S3 (sc)
	11.4	41.0	> 50	Neutral Red assay, L929
	34.4	NT	NT	Neutral Red assay, BALB 3T3 A31-1-1
	1.1	79.1	>100	MTT assay, HeLa.S3 (sc)
	17.8	59.0	>100	MTT assay, L929
	36.6	66.25	>100	MTT assay, SQ5