

Evaluation Criterion 3: A detailed test method protocol should be available

- The PRP agreed that a detailed test method protocol is available and appreciated the detail of how to prepare test solutions/dilutions and the protocol update record.
- It is essential to produce a final protocol in addition to the validation protocol (017E), updated throughout the text with the final version of prediction model Criterion 3 and any other necessary changes, e.g., source of FBS.
- The data template and an explanation including examples of how to process the raw data must be included within the protocol.
- In addition to the cell culture time limitations already in the protocol, it could be helpful to characterize the maximum passage number during which the cell line is stable, e.g., based on historical data.
- The rationale for why a separate assessment of cell viability is not required should be made explicitly at the start of the protocol.

Evaluation Criterion 4: The within- and between-laboratory reproducibility of the test method should be demonstrated

- The PRP concluded that the data on within laboratory reproducibility was more limited than comparable validation studies, particularly in respect to the number of chemicals tested.
- The PRP found the occurrence of “grey” conclusions in Phases IIc and III confusing.
- With the elimination of this grey data, the average within laboratory reproducibility met the success criterion of 80%, but unfortunately this reduces the number of test chemicals. Consequently, the PRP recommends additional assessment of within laboratory reproducibility with more and different test chemicals using the final protocol and prediction model. In this respect, paying attention to what was undertaken for other skin-sensitization in vitro test methods may be informative. (See also the comment on X-VIVO under Other Considerations.)
- The PRP concluded that the data on between laboratory reproducibility, with a sufficient number of test chemicals, exceeded the success criterion. The PRP found that the occurrence of grey and undecided conclusions in Phases IIb and III had a lower effect on the assessment of between laboratory reproducibility, but even assuming the grey and undecided conclusions led to discordance, the success criterion would still be met.
- The PRP suggests that an appendix containing results from the within and between laboratory reproducibility trial be presented in a graphical form for each substance.
- The PRP notes that 2,4-dichloronitrobenzene appears twice (P2b05 and P3-01) in Table 3.3-1 on page 13 of the Data Analysis Report (Ver. 4). This should be addressed.
- The PRP notes that the same manufacturing lot of fetal bovine serum was used. The validation report should discuss the potential impact of fetal bovine serum from different manufacturing lots on the reproducibility of the assay.

Evaluation Criterion 5: Demonstration of the test method's performance should be based on testing of representative, preferably coded reference chemicals

- The PRP concludes that the validation study used an appropriate level of test chemical coding to ensure fully blinded evaluation.
- The PRP confirms that a suitable balance of known stronger, weaker, and non-classified test chemicals was selected, with those classifications generally reflecting what is understood of the human health effects of those substances. In addition, it is noted that these test chemicals largely comprise test chemicals from the ECVAM validation study and mostly differ from those used in initial method development.

Evaluation Criterion 6: Predictive capacity should be demonstrated using representative chemicals. The performance of the test method should be evaluated in relation to existing relevant toxicity data as well as information from the relevant target species.

- Regarding predictive capacity, the PRP found the presentation of these results and their analyses with multiple prediction models to be very helpful in delivering transparency, but ultimately problematic in delivering clarity and interpreting results. Accordingly, the PRP suggests the report is edited to focus on results obtained with the final prediction model (Criterion 3) wherever possible with the additional material presented in appropriate appendices.
- The PRP notes that 2,4-dichloronitrobenzene appears twice (P2b05 and P3-01) in Table 3.4-1 on page 15 of the Data Analysis Report (Ver. 4) and Table 9-8-3.1 on page 109 of the Validation Report. It may, therefore, be necessary to adjust the tables of results which depend on this data.
- Nevertheless, the PRP notes that, on this relatively small data set, the overall predicted accuracy does not give any cause for concern, being in the same range as that found with the methods recently adopted into OECD guidelines.
- The PRP notes that, concerning the extended set of 122 chemicals, the predicted performance was a little lower than that found for other assays. Assay performance improved noticeably when detergent substances were removed from the analysis and specific account was taken of human evidence concerning vanillin and ethyl vanillin. However, the PRP notes that the predictive performance of the assay has not been thoroughly compared with human data.
- The PRP is concerned about the difficulty some laboratories had in clearly identifying several known GHS Category 1A substances during the between laboratory trials. (benzoquinone, 1,4-phenolindiamine, glyoxal, beryllium sulphate)
- Overall, the PRP concludes that the predictive performance is not sufficient for use as a stand-alone replacement for existing in vivo methods, but agrees that the method could form part of an integrated testing strategy, e.g., IATA. For example, it was noted that sensitivity was increased when the assay was used in combination with DPRA.

- The PRP notes that the predictive performance of the assay, and in particular its sensitivity, is clearly improved by adoption of X-VIVO, a chemically defined culture medium, in preference to the use of fetal bovine serum.

Evaluation Criterion 7: All data should adequately support the assessment of the validity of the test method for peer review.

- The PRP finds that the data is generally adequate to support the validity of the assay, but subject to the provision of additional information, particularly on within laboratory reproducibility and for the applicability domain.

Evaluation Criterion 8: All data from the validation study supporting the validity of a test method should be obtained in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP)

- The PRP concludes that the study was conducted in the spirit of GLP.

Evaluation Criterion 9: Applicability domain of the test method should be defined

- The PRP notes that the VMT has proposed that detergents be excluded from the applicability domain. However, “detergents” is a very generic term, and the PRP felt that much greater clarity should be given on this exclusion criterion, and that a mechanistic basis for this exclusion would be helpful in its characterization.
- The PRP notes that there is limited discussion of specific false positive and false negative test chemicals, which might provide further insights into potential applicability domain issues.

Evaluation Criterion 10: Proficiency chemicals should be set up in the proposed protocol

- Upon completion of additional information requested in Criterion 7 of this document, an appropriate list of proficiency chemicals could be suggested (e.g., by the VMT) even before the test method is ready for regulatory use.

Evaluation Criterion 11: Performance standards should be set up with the proposed protocol

- As has been published for the local lymph node assay, the PRP recommends establishment of a set of performance standards, so that the validation of similar or modified test methods can be expedited, especially due to the existence of intellectual property rights.

Evaluation Criterion 12: Advantages in terms of time, cost and animal welfare

- The PRP notes that this method is intended to contribute to the replacement of animal usage for skin sensitization assessment.
- When compared to other in vitro methods which address the same key event in the AOP, the PRP agrees that this method is likely to offer time, throughput, and cost benefits. It would be helpful to

describe these in more detail in the validation report.

- The possible restrictions or costs associated with establishment of the assay, and particularly regarding the proprietary cell line, also must be taken into account.

Evaluation Criterion 13: Completeness of all data and documents supporting the assessment of the validity of the test method.

- Final assessment of completeness can only be made after receiving the information requested in this document. In addition, the PRP requests access to the raw in vitro data, e.g., a link to online data.

Evaluation Criterion 14: Validation Study Management and Conduct

- The PRP concluded that the validation study management and conduct met the criteria set out in OECD GD 34 (2005).
- The PRP appreciated the transparency with which the material was presented, but noted also that modifications to the prediction model during the validation process added complexity to some aspects of the evaluation.
- The PRP was informed about the independency of the VMT chairman from the participating laboratory HRI and recommends that this information be incorporated in the report.
- The PRP recommends that the details of the training phase are described briefly in the report.
- It would be helpful to clarify on page 36 that the validation trials were conducted by three naïve laboratories.

Other considerations

- The consideration of an alternative positive control to cobalt chloride might become necessary if this material is subjected to significant health restrictions, e.g., in the EU.
- Please be sure that the page numbers in the table of contents are correct.
- Test chemicals that interfere with the luciferase enzyme could confound the activity of the luciferase in cell based assays, causing either apparent inhibition or increased luminescence. The PRP requests the VMT to provide any possible comments on how to address this problem.
- Separately from the formal response to the VMT report, the PRP has noted above that X-VIVO allows for an improvement in the sensitivity and hence accuracy of the test method. Although not a requirement, the PRP viewed positively the potential for modification of the protocol using X-VIVO with a minimum of additional data on reproducibility, without necessarily triggering the need for a formal catch up validation. Therefore, when addressing Evaluation Criterion 4 requirements, the VMT may decide to undertake additional testing to confirm the potential benefits of using X-VIVO.

Conclusion

- To be completed once the response to the draft review has been received and considered.

1

2

3

4

5

6

LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験

7

バリデーション研究

8

Phase02 集計報告書

9

(Version 1.1)

10

11

12

13

14

15

16

2014/12/03

大森崇,遠藤麻衣,山下愛未

| | | |
|----|--|----|
| 17 | 目次 | |
| 18 | 1.背景..... | 1 |
| 19 | 1.1 はじめに..... | 1 |
| 20 | 1.2 LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験法の概要..... | 1 |
| 21 | 1.3 陰性対照..... | 2 |
| 22 | 1.3.1 吸光度測定値平均の試験適合基準..... | 2 |
| 23 | 1.3.2 標準偏差の試験適合基準..... | 3 |
| 24 | 1.4 陽性対照..... | 3 |
| 25 | 1.4.1 生細胞率平均の試験適合基準..... | 3 |
| 26 | 1.4.2 標準偏差の試験適合基準..... | 3 |
| 27 | 1.5 被験物質..... | 3 |
| 28 | 1.5.1 標準偏差の試験適合基準..... | 3 |
| 29 | 1.6 結果の解釈(予測モデル)..... | 3 |
| 30 | 2.方法..... | 4 |
| 31 | 2.1 提示されたデータファイルとデータベースの構築..... | 4 |
| 32 | 2.1.1 提示されたデータファイル..... | 4 |
| 33 | 2.1.2 データベースの構築..... | 4 |
| 34 | 2.2 陰性対照..... | 4 |
| 35 | 2.2.1 生細胞率..... | 4 |
| 36 | 2.2.2 吸光度測定値..... | 4 |
| 37 | 2.2.3 吸光度測定値平均の施設内再現性..... | 5 |
| 38 | 2.3 陽性対照..... | 5 |
| 39 | 2.3.1 生細胞率..... | 5 |
| 40 | 2.3.2 吸光度測定値..... | 5 |
| 41 | 2.3.3 吸光度測定値平均の施設内再現性..... | 5 |
| 42 | 2.4 被験物質..... | 5 |
| 43 | 2.4.1 生細胞率..... | 5 |
| 44 | 2.4.2 吸光度測定値..... | 6 |
| 45 | 2.4.3 吸光度測定値平均の施設内再現性..... | 6 |
| 46 | 3.結果..... | 6 |
| 47 | 3.1 提示されたデータファイル..... | 6 |
| 48 | 3.2 陰性対照..... | 7 |
| 49 | 3.2.1 生細胞率..... | 7 |
| 50 | 3.2.1 吸光度測定値..... | 8 |
| 51 | 3.2.3 吸光度測定値平均の施設内再現性..... | 9 |
| 52 | 3.3 陽性対照..... | 10 |

| | | | |
|----|-------|-----------------------|----|
| 53 | 3.3.1 | 生細胞率 | 10 |
| 54 | 3.3.2 | 吸光度測定値 | 12 |
| 55 | 3.2.3 | 吸光度測定値平均の施設内再現性 | 13 |
| 56 | 3.4 | 被験物質 | 14 |
| 57 | 3.4.1 | 生細胞率 | 14 |
| 58 | 3.4.2 | 吸光度測定値 | 18 |
| 59 | 3.4.3 | 吸光度測定値平均の施設内再現性 | 22 |
| 60 | 付録 | 前回の共同研究の結果 | i |
| 61 | | | |
| 62 | | | |

63 1.背景

64 1.1 はじめに

65 LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験法は、株式会社ジャパン・ティッ
66 シュ・エンジニアリングが製造販売している市販の培養角膜上皮モデルである
67 LabCyte CORNEA-MODEL を用いる試験法である。この試験法は、標準化さ
68 れた試験条件において角膜上皮組織の細胞毒性を指標とすることによって眼刺
69 激性を予測する試験法であり、*in vivo* ウサギドレイズ眼刺激試験法を代替する
70 新規 *in vitro* 試験法として開発されたものである。

71 平成25年から平成26年にかけて行われたLabCyte CORNEA-MODEL 眼刺
72 激性試験の技術易転性の確認を目的とした共同研究及びその追加共同研究では、
73 陰性対象吸光度の低下、結果のバラツキの大きさが課題とされた。それらを改
74 善する目的でプロトコルの改訂が提案された。

75 本研究では、WST-8 反応を振とう培養とし、閾値の境界付近の値を示した被
76 験物質について追加試験を実施するとする改訂されたプロトコル Version2.3 を
77 用いて、プロトコル改訂の妥当性を検討することを目的とし、予め設定した達
78 成基準に合致するかを確認する。達成基準は以下の通りである。

- 79 ・陰性対象の吸光度 : 前回共同研究よりも改善 (OD0.7 以上)
- 80 ・陰性対象のバラツキ : 前回共同研究よりも改善

81

82 本報告書は上記のプロトコルの改善の効果を検討するための資料として作成
83 したものである。

84

85 1.2 LabCyte CORNEA-MODEL 眼刺激性試験法の概要

86 被験物質が液体の場合、培養角膜上皮表面に被験物質を 1 分間適用する。被
87 験物質の他に、陰性対照群(PBS)と陽性対照群(Ethanol)を設定する。適用後、
88 被験物質を除去し、培養角膜上皮を洗浄した後、新しい培地を用いて 24 時間後
89 培養を行う。

90 被験物質が固体の場合、培養角膜上皮表面に被験物質を 24 時間適用する。被
91 験物質の他に、陰性対照群(無適用)と陽性対照群(Lauric acid)を設定する。適用
92 後、被験物質を除去し、培養角膜上皮を洗浄する。固体被験物質についてはこ
93 の後に培養を行わない。

94 液体、固体ともに、被験物質 1 物質あたり 3 培養組織を使用する。適用およ
95 び培養終了後に WST-8 試験を行う。WST-8 反応液(cell counting kit-8:PBS=
96 1:10)上に培養角膜上皮モデルを設置し、5 時間反応し、マイクロプレートリー
97 ダーを用いて反応液の吸光度(450nm/650nm)を測定する。この結果から、陰性
98 対照群の 3 組織の測定値の平均値を 100%として 1 組織生細胞率を算出する。
99 なお、測定値は吸光度(450nm)から吸光度(650nm)を差し引いた値とし、以下の
100 ように定義されている。

101

102 測定値 = [450nmOD_{被験物質} - 650nmOD_{被験物質}] - [450nmOD_{ブランク} - 650nmOD_{ブランク}]

103 *96 ウェルマルチプレートリーダーが自動計算する場合は、プレートリーダーの計算値を測定値
104 とする。

105 *本報告の解析では測定値が 0 未満になった場合は 0 として算出した。

106

107 また、1 組織生細胞率を以下のように定義されている。

108

109
$$1 \text{ 組織生細胞率}(\%) = \frac{\text{被験物質の測定値}(1 \text{ 組織})}{\text{陰性対照の測定値平均}} \times 100$$

110

111 各物質について、3 組織の生細胞率の平均値を生細胞率平均とし、40%を閾値
112 として各被験物質の眼刺激性を評価する。生細胞率平均は以下のように定義さ
113 れている。

114

115
$$\text{生細胞率平均}(\%) = \frac{1 \text{ 組織生細胞率}(\%) \times 3 \text{ 組織の合計}}{3}$$

116

117 1.3 陰性対照

118 1.3.1 吸光度測定値平均の試験適合基準

119 WST-8 試験後に測定される陰性対照の吸光度の平均値が下記の基準に合致す
120 ることを確認する。この値は輸送や保存による影響を反映するものである。

121

122 $0.5 \leq \text{陰性対照の吸光度}(A_{450/650}) \text{測定値平均} \leq 2.0$

123 1.3.2 標準偏差の試験適合基準

124 WST-8 試験後に測定、算出される、各 3 組織から得られた陰性対照の生細胞
125 率の試験内変動は、一定の基準以下である必要がある。よって、陰性対照の生
126 細胞率の標準偏差(SD)が下記の基準に合致することを確認する。

127

128 陰性対照の生細胞率の標準偏差 $\leq 20\%$

129

130 1.4 陽性対照

131 1.4.1 生細胞率平均の試験適合基準

132 WST-8 試験後に測定、算出される陽性対照は、正しく眼刺激性と予測されな
133 くてはならない。よって、陽性対照の生細胞率平均が下記の基準に合致するこ
134 とを確認する。

135

136 陽性対照の生細胞率平均 $\leq 40\%$

137

138 1.4.2 標準偏差の試験適合基準

139 WST-8 試験後に測定、算出される、各 3 組織から得られた陽性対照の生細胞
140 率の試験内変動は、一定の基準以下である必要がある。よって、陽性対照の生
141 細胞率の標準偏差(SD)が下記の基準に合致することを確認する。

142

143 陽性対照の生細胞率の標準偏差 $\leq 20\%$

144

145 1.5 被験物質

146 1.5.1 標準偏差の試験適合基準

147 各被験物質の生細胞率の標準偏差が下記の基準に合致することを確認する。

148

149 各被験物質の生細胞率の標準偏差 $\leq 20\%$

150

151 1.6 結果の解釈(予測モデル)

152 *In vivo*における眼刺激性については、国際連合の化学物質の分類および表示
153 に関する国際調和システム(Globally Harmonized System of Classification
154 and Labelling of Chemicals : GHS)によって定義されており、1 秒間閉塞保持し
155 た後に眼表面に可逆的に起きる損傷を示す。

156 本試験法では、GHS 分類(区分外、区分 2、区分 1)に従い、眼刺激性(区分 1、
157 区分 2)を予測する。3 個の培養角膜上皮モデルの生細胞率(陰性対照群を 100%
158 とする)の平均値が 40%以下の被験物質を、眼刺激性と予測する。

159

160 2.方法

161 2.1 提示されたデータファイルとデータベースの構築

162 2.1.1 提示されたデータファイル

163 3つの試験参加施設の4被験物質(刺激性1物質、非刺激性3物質)の試験デー
164 タについて、そのデータの数と結果の数値、特記事項欄の確認を行った。今回
165 用いた陰性対照、陽性対照、被験物質を表1に示す。

166

167 表 1：使用した物質

| | | | |
|----------|---------------------------|---------|--------------------------|
| NC(L) | 液体陰性対照(PBS) | NC(S) | 固体陰性対照(無処置) |
| PC(L) | 液体陽性対照(Ethanol) | PC(S) | 固体陽性対照(Lauric acid) |
| Liquid B | 3-Methoxy-1,2-propanediol | Solid H | Sucrose Fatty Acid Ester |
| Liquid D | Glycerol | Solid I | Silicic acid |

168

169

170 2.1.2 データベースの構築

171 得られた試験データから、SAS を用いてデータベースを作成した。なお、試
172 験データのデータシート上に表されている概数を用いてデータベースを作成し
173 たため、計算結果は実際の値と若干異なることが分かっている。

174

175 2.2 陰性対照

176 2.2.1 生細胞率

177 1組織生細胞率と生細胞率平均、生細胞率の標準偏差をSASを用いて算出し、
178 表にまとめた。

179

180 2.2.2 吸光度測定値

181 測定された液体と固体の陰性対照の吸光度の値から、それぞれの測定値とそ
182 の平均値をSASを用いて算出し、各試験参加施設について試験実施回数ごとに
183 図と表にまとめた。

184 2.2.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

185 この研究では 1 つの物質に対して各施設 3 回の試験を行っている。陰性対照
186 について試験 3 回分の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差を表にまとめた。

187 なお、3 回の実験においてプロトコルの基準を満たせない場合は 4 回目の実験
188 を実施している。

189

190 2.3 陽性対照

191 2.3.1 生細胞率

192 SAS によって算出された液体と固体の陽性対照の 1 組織生細胞率と生細胞率
193 平均を各試験参加施設について試験実施回数ごとに図に、それに生細胞率の標
194 準偏差を加えたものを表にまとめた。

195

196 2.3.2 吸光度測定値

197 測定された液体と固体の陽性対照の吸光度の値から、それぞれの測定値とそ
198 の平均値を SAS を用いて算出し、各試験参加施設について試験実施回数ごとに
199 図と表にまとめた。

200

201 2.3.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

202 この研究では 1 つの物質に対して各施設 3 回の試験を行っている。陽性対照
203 について試験 3 回分の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差を表にまとめた。

204 なお、3 回の実験においてプロトコルの基準を満たせない場合は 4 回目の実験
205 を実施している。

206

207 2.4 被験物質

208 2.4.1 生細胞率

209 SAS によって算出された被験物質の 1 組織生細胞率と生細胞率平均を各試験
210 参加施設について試験実施回数ごとに、陽性対照の生細胞率平均とともに図に
211 表した。また、それに被験物質の生細胞率の標準偏差を加えたものを表にまと
212 めた。

213 2.4.2 吸光度測定値

214 被験物質の吸光度測定値と吸光度測定値平均を各試験参加施設について試験
215 実施回数ごとに図と表にまとめた。この時、陽性対照の測定値平均と、陰性対
216 照の測定値平均に、刺激性の判定基準値となる 0.4(40%)を乗じた値も同じ図に
217 表した。これによって、被験物質の測定値平均と陰性対照の測定値平均×0.4の
218 相対的位置関係によって被験物質の眼刺激予測性の判定を行うことができる。
219 一方、この図で描かれた陰性対照の測定値平均のばらつきと各被験物質の測定
220 値平均のばらつきを視覚的に比較すべきではない。この目的のためには
221 2.2.2 で説明した図の陰性対照のばらつきとここで説明している図の被験物
222 質のばらつきとを比較すべきである。

223

224 2.4.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

225 この研究では 1 つの被験物質に対して各施設 3 回の試験を行っている。各被
226 験物質について、試験 3 回分の吸光度の測定値平均の平均値と標準偏差を表に
227 まとめた。

228 なお、3 回の試験においてプロトコルの基準を満たせない場合は 4 回目の実験
229 を実施している。

230

231 3.結果

232 3.1 提示されたデータファイル

233 3 つの試験参加施設(Lab.B, Lab.C, Lab.D)のうち、2 施設からは陰性対照、陽
234 性対照、各被験物質について試験 3 回分のデータが得られた。試験参加施設を
235 表 2 に示す。

236 Lab.C からは 4 回分の試験データが得られた。これは Lab.C は 2 回目の試験
237 で Liquid D の SD はデータシート上では 20.9 となり、規定の 20 を超えてしま
238 ったためである。本報告書では 4 回全ての試験結果を示した。

239

240 表 2 : 試験参加施設

| | |
|-------|----------------|
| Lab.B | (株)薬物安全性試験センター |
| Lab.C | 富士フイルム(株) |
| Lab.D | 日本コルマー(株) |

241

242 3.2 陰性対照

243 3.2.1 生細胞率

244 SAS を用いて算出した 1 組織生細胞率と生細胞率平均、生細胞率の標準偏差
 245 を表 3、表 4 に示す。

246

247 表 3：液体の陰性対照の 1 組織生細胞率、生細胞率平均、標準偏差

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|-------|------|
| B | 1 | 100.6 | 102.2 | 97.2 | 100.0 | 2.6 |
| | 2 | 93.5 | 102.0 | 104.5 | 100.0 | 5.8 |
| | 3 | 95.8 | 104.5 | 99.7 | 100.0 | 4.4 |
| C | 1 | 86.3 | 101.7 | 112.0 | 100.0 | 13.0 |
| | 2 | 81.6 | 109.2 | 109.2 | 100.0 | 15.9 |
| | 3 | 93.8 | 98.7 | 107.6 | 100.0 | 7.0 |
| D | 1 | 90.9 | 103.7 | 105.4 | 100.0 | 7.9 |
| | 2 | 88.4 | 105.8 | 105.8 | 100.0 | 10.0 |
| | 3 | 93.3 | 100.8 | 105.9 | 100.0 | 6.3 |

248

249

250 表 4：固体の陰性対照の 1 組織生細胞率、生細胞率平均、標準偏差

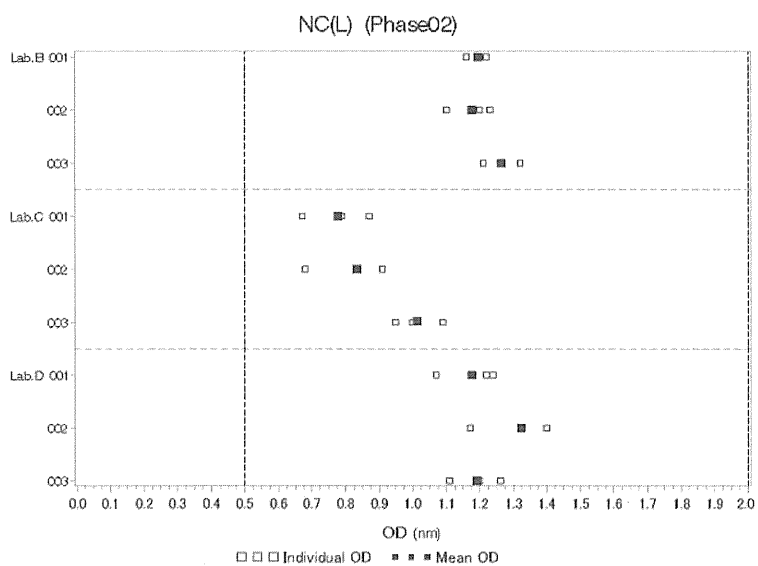
| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|-------|------|
| B | 1 | 84.9 | 110.9 | 104.2 | 100.0 | 13.5 |
| | 2 | 106.0 | 90.7 | 103.3 | 100.0 | 8.2 |
| | 3 | 102.5 | 95.8 | 101.7 | 100.0 | 3.6 |
| C | 1 | 94.2 | 107.0 | 98.8 | 100.0 | 6.5 |
| | 2 | 94.6 | 102.7 | 102.7 | 100.0 | 4.7 |
| | 3 | 86.9 | 101.3 | 111.8 | 100.0 | 12.5 |
| D | 1 | 91.2 | 105.7 | 103.1 | 100.0 | 7.7 |
| | 2 | 94.0 | 103.4 | 102.6 | 100.0 | 5.2 |
| | 3 | 92.0 | 103.5 | 104.5 | 100.0 | 6.9 |

251

252 3.2.1 吸光度測定値

253 各試験参加施設の液体と固体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均
 254 を図 1、図 2 と表 5、表 6 に示す。

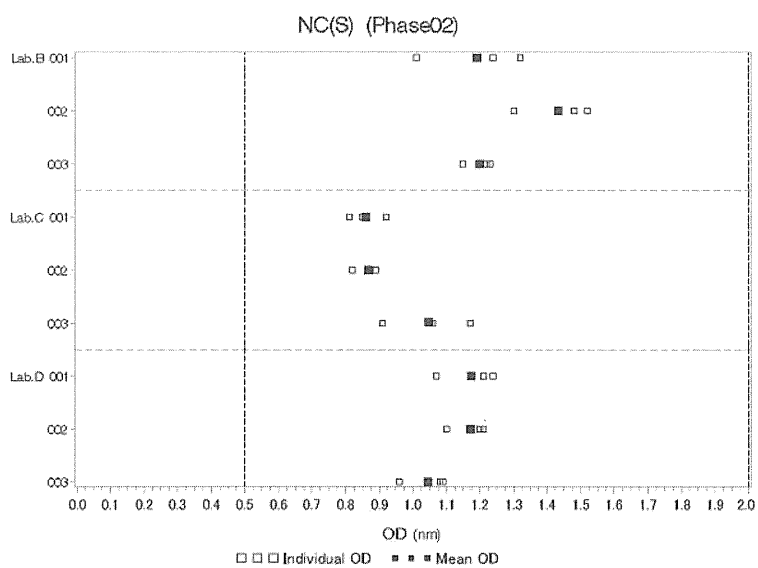
255



256

257 図 1 : 液体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

258



259

260 図 2 : 固体の陰性対照の測定値と吸光度測定値平均

261 表 5 : 液体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| B | 1 | 1.20 | 1.22 | 1.16 | 1.19 | 0.03 |
| | 2 | 1.10 | 1.20 | 1.23 | 1.18 | 0.07 |
| | 3 | 1.21 | 1.32 | 1.26 | 1.26 | 0.06 |
| C | 1 | 0.67 | 0.79 | 0.87 | 0.78 | 0.10 |
| | 2 | 0.68 | 0.91 | 0.91 | 0.83 | 0.13 |
| | 3 | 0.95 | 1.00 | 1.09 | 1.01 | 0.07 |
| D | 1 | 1.07 | 1.22 | 1.24 | 1.18 | 0.09 |
| | 2 | 1.17 | 1.40 | 1.40 | 1.32 | 0.13 |
| | 3 | 1.11 | 1.20 | 1.26 | 1.19 | 0.08 |

262

263

264 表 6 : 固体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| B | 1 | 1.01 | 1.32 | 1.24 | 1.19 | 0.16 |
| | 2 | 1.52 | 1.30 | 1.48 | 1.43 | 0.12 |
| | 3 | 1.23 | 1.15 | 1.22 | 1.20 | 0.04 |
| C | 1 | 0.81 | 0.92 | 0.85 | 0.86 | 0.06 |
| | 2 | 0.82 | 0.89 | 0.89 | 0.87 | 0.04 |
| | 3 | 0.91 | 1.06 | 1.17 | 1.05 | 0.13 |
| D | 1 | 1.07 | 1.24 | 1.21 | 1.17 | 0.09 |
| | 2 | 1.10 | 1.21 | 1.20 | 1.17 | 0.06 |
| | 3 | 0.96 | 1.08 | 1.09 | 1.04 | 0.07 |

265

266

267

268 3.2.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

269 試験 3 回分(Lab.C は 4 回分)の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差を表 7、
270 表 8 にまとめた。

271

272 表 7 : 液体の陰性対照の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

| Lab. | Mean (R=1) | Mean (R=2) | Mean (R=3) | Mean of Mean | SD of Mean |
|------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| B | 1.19 | 1.18 | 1.26 | 1.21 | 0.05 |
| C | 0.78 | 0.83 | 1.01 | 0.87 | 0.12 |
| D | 1.18 | 1.32 | 1.19 | 1.23 | 0.08 |

273

274 表 8 : 固体の陰性対照の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

| Lab. | Mean (R=1) | Mean (R=2) | Mean (R=3) | Mean of Mean | SD of Mean |
|------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| B | 1.19 | 1.43 | 1.20 | 1.27 | 0.14 |
| C | 0.86 | 0.87 | 1.05 | 0.92 | 0.11 |
| D | 1.17 | 1.17 | 1.04 | 1.13 | 0.07 |

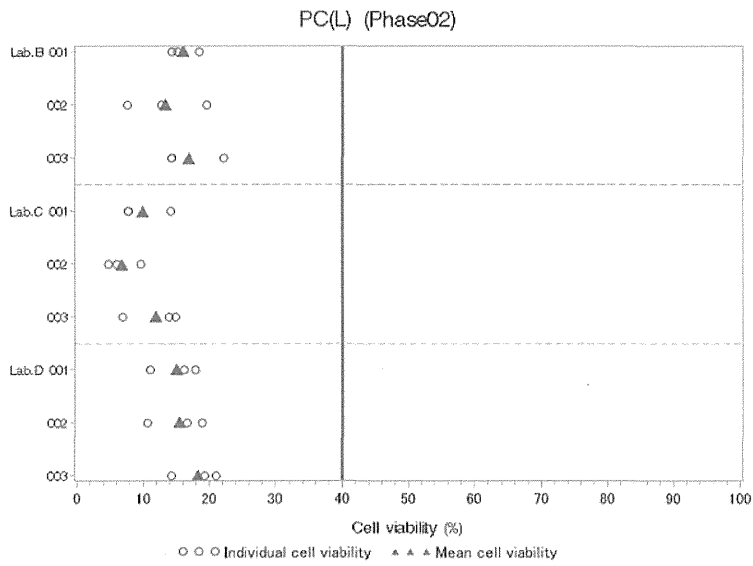
275

276 3.3 陽性対照

277 3.3.1 生細胞率

278 SAS を用いて算出した 1 組織生細胞率と生細胞率平均を図 3、図 4 に示す。
 279 また、それに生細胞率の標準偏差を加えたものを表 9、表 10 に示す。

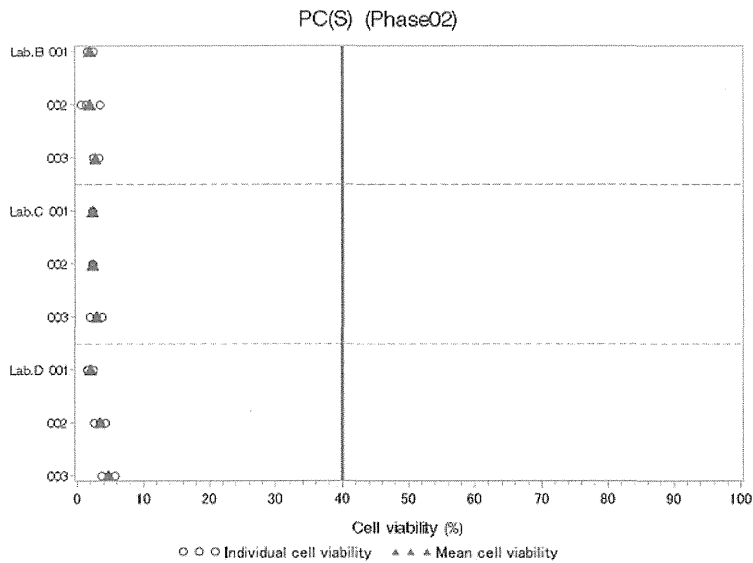
280



281

282 図 3 : 液体の陽性対照の 1 組織生細胞率と生細胞率平均

283



284

285 図 4 : 固体の陽性対照の 1 組織生細胞率と生細胞率平均

286 表 9 : 液体の陽性対照の 1 組織生細胞率、生細胞率平均、標準偏差

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|-----|
| B | 1 | 18.4 | 15.1 | 14.2 | 15.9 | 2.2 |
| | 2 | 12.7 | 7.6 | 19.5 | 13.3 | 6.0 |
| | 3 | 14.2 | 14.2 | 22.2 | 16.9 | 4.6 |
| C | 1 | 7.7 | 7.7 | 14.2 | 9.9 | 3.7 |
| | 2 | 6.0 | 9.6 | 4.8 | 6.8 | 2.5 |
| | 3 | 14.8 | 13.8 | 6.9 | 11.8 | 4.3 |
| D | 1 | 16.1 | 17.8 | 11.0 | 15.0 | 3.5 |
| | 2 | 10.6 | 18.9 | 16.6 | 15.4 | 4.3 |
| | 3 | 14.3 | 21.0 | 19.3 | 18.2 | 3.5 |

287

288

289 表 10 : 固体の陽性対照の 1 組織生細胞率、生細胞率平均、標準偏差

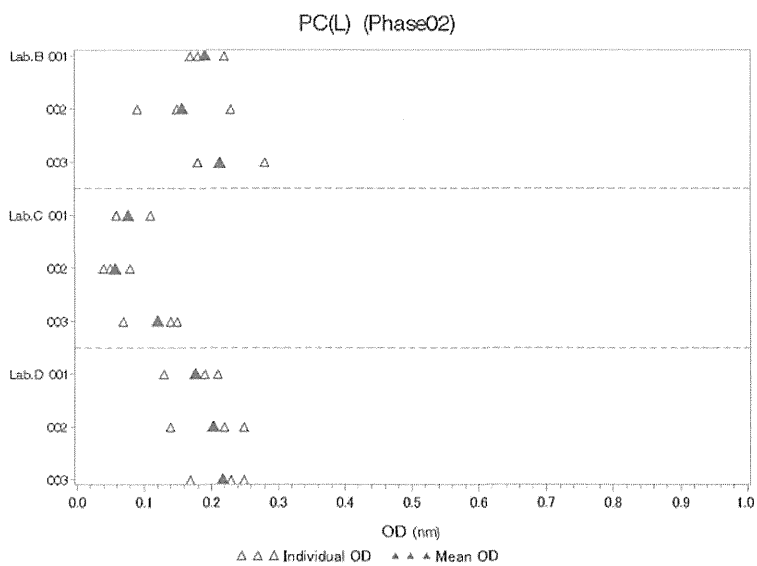
| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|-----|
| B | 1 | 1.7 | 2.5 | 1.7 | 2.0 | 0.5 |
| | 2 | 3.5 | 0.7 | 1.4 | 1.9 | 1.5 |
| | 3 | 3.3 | 2.5 | 2.5 | 2.8 | 0.5 |
| C | 1 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 0.0 |
| | 2 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 0.0 |
| | 3 | 3.8 | 2.9 | 1.9 | 2.9 | 1.0 |
| D | 1 | 1.7 | 1.7 | 2.6 | 2.0 | 0.5 |
| | 2 | 2.6 | 4.3 | 3.4 | 3.4 | 0.9 |
| | 3 | 3.8 | 5.8 | 4.8 | 4.8 | 1.0 |

290

291 3.3.2 吸光度測定値

292 各試験参加施設の液体と固体の陽性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均
293 を図 5、図 6 と表 11、表 12 に示す。

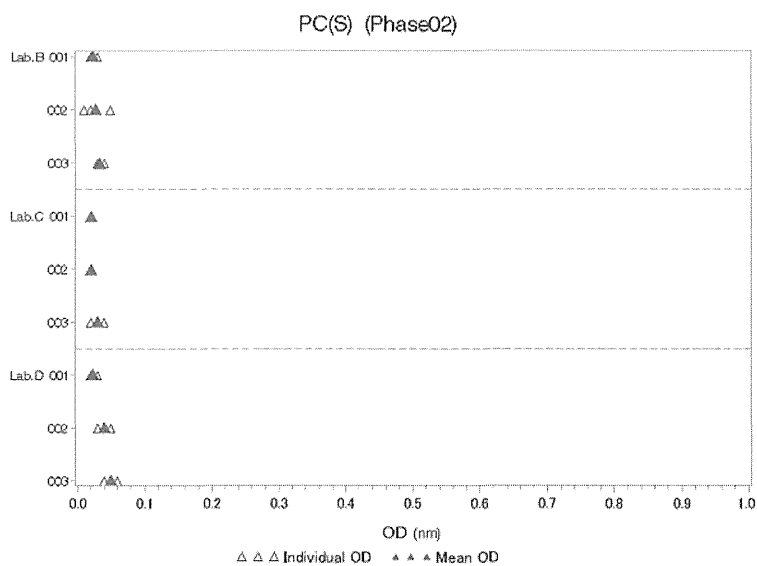
294



295

296 図 5 : 液体の陽性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

297



298

299 図 6 : 固体の陰性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

300 表 11：液体の陽性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| B | 1 | 0.22 | 0.18 | 0.17 | 0.19 | 0.03 |
| | 2 | 0.15 | 0.09 | 0.23 | 0.16 | 0.07 |
| | 3 | 0.18 | 0.18 | 0.28 | 0.21 | 0.06 |
| C | 1 | 0.06 | 0.06 | 0.11 | 0.08 | 0.03 |
| | 2 | 0.05 | 0.08 | 0.04 | 0.06 | 0.02 |
| | 3 | 0.15 | 0.14 | 0.07 | 0.12 | 0.04 |
| D | 1 | 0.19 | 0.21 | 0.13 | 0.18 | 0.04 |
| | 2 | 0.14 | 0.25 | 0.22 | 0.20 | 0.06 |
| | 3 | 0.17 | 0.25 | 0.23 | 0.22 | 0.04 |

301

302

303 表 12：固体の陽性対照の吸光度測定値と吸光度測定値平均

| Lab. | Repeat | Individual (1) | Individual (2) | Individual (3) | Mean | SD |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|------|
| B | 1 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |
| | 2 | 0.05 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |
| | 3 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.01 |
| C | 1 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.00 |
| | 2 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.00 |
| | 3 | 0.04 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.01 |
| D | 1 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 |
| | 2 | 0.03 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.01 |
| | 3 | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.01 |

304

305

306

307 3.2.3 吸光度測定値平均の施設内再現性

308 試験3回分(Lab.Cは4回分)の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差を表13、
309 表14にまとめた。

310

311 表 13：液体の陽性対照の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

| Lab. | Mean (R=1) | Mean (R=2) | Mean (R=3) | Mean of Mean | SD of Mean |
|------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| B | 0.19 | 0.16 | 0.21 | 0.19 | 0.03 |
| C | 0.08 | 0.06 | 0.12 | 0.08 | 0.03 |
| D | 0.18 | 0.20 | 0.22 | 0.20 | 0.02 |

312

313 表 14：固体の陽性対照の吸光度測定値平均の平均値と標準偏差

| Lab. | Mean (R=1) | Mean (R=2) | Mean (R=3) | Mean of Mean | SD of Mean |
|------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| B | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.01 |
| C | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 |
| D | 0.02 | 0.04 | 0.05 | 0.04 | 0.01 |

314