

化粧品安全性評価のための
試験法開発に関する研究

(ドレイズ代替法二次バリデーション)

標準操作手順書

ウサギ角膜由来細胞株を用いた
細胞毒性試験
(SIRC-NR試験)

作成担当者 ポーラ 試験研究部 谷 尚子

哺乳動物細胞株を用いる細胞毒性試験

S I R C細胞を用いるニュートラルレッド染色性 およびクリスタルレッド取り込み試験

I. S I R C細胞を用いるニュートラル・レッド取り込み試験

[1] 実験材料

1. 細胞
2. 培養液及び染色液等
3. 器具類
4. 測定機器

[2] 実験方法

1. 被験物質の秤量・調製
 - 1) 被験物質の秤量および溶解性の検討
 - 2) 予備試験における希釈溶液の調製
 - 3) 本試験における希釈溶液の調製
2. 被験物質の添加
 - 1) 予備試験における希釈溶液の添加
 - 2) 本試験における希釈溶液の添加
3. S I R C細胞浮遊液の播種および培養の手順
 - 1) 細胞浮遊液の調製・添加
 - 2) 培養
4. 測定
 - 1) ニュートラル・レッドの取り込み
 - 2) 洗浄・固定・抽出
 - 3) マイクロプレート・リーダーによる測定

[3] 結果の処理

1. EC_{50} の決定
2. 試験報告書
 - 1) 報告書-1-の作成
 - 2) 報告書-2-の作成
 - 3) 報告書-3-の作成
 - 4) 報告書-4-の作成

II. クリスタル・バイオレット染色性試験 (オプション)

[1] 実験材料

1. 染色液等
2. 器具類
3. 測定機器

[2] 実験方法

1. クリスタル・バイオレットによる染色
2. マイクロプレート・リーダーによる測定

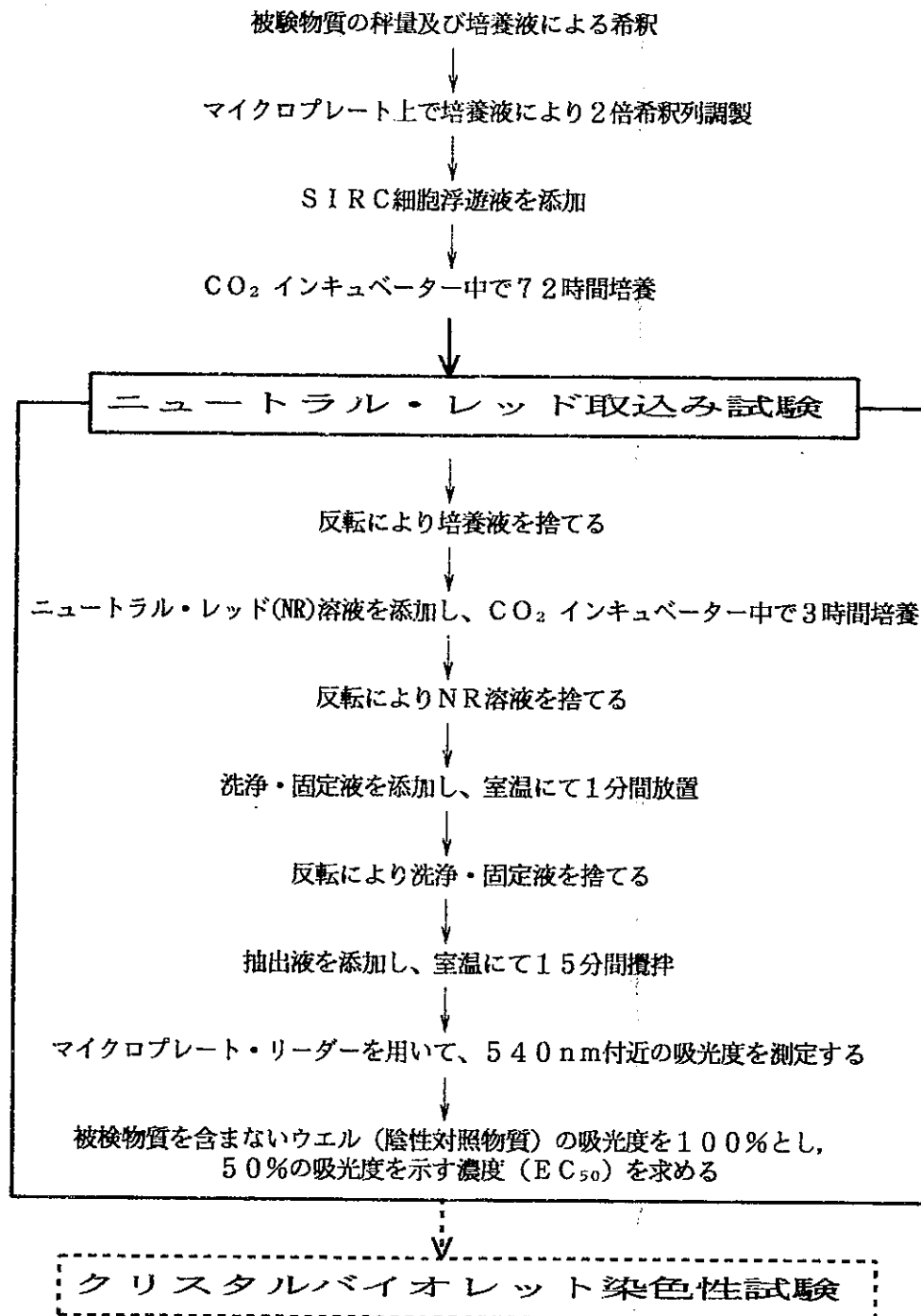
[3] 結果の処理

1. EC_{50} の決定
2. 試験報告書
 - 1) 報告書-1-の作成
 - 2) 報告書-2-の作成
 - 3) 報告書-3-の作成
 - 4) 報告書-4-の作成

III. 関連SOP

1. 試薬調製法
2. 細胞の解凍、継代および凍結保存
3. 細胞倍加時間の測定法
4. マイコプラズマ検査法
5. 染色体モード検査法
6. コロニー形成率測定法

SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験
およびクリスタル・バイオレット染色性試験の操作概要



I. SIRC細胞を用いるニュートラル・レッド取込み試験

[1] 実験材料

1. 細胞

ウサギ角膜由来細胞 (SIRC; Statens Seruminstitut Rabbit Cornea: ATCC No. CCL 60) を ATCC (American Type Culture Collection) から購入する。

なお、本 validation では同一細胞を国立衛生試験所から供給する。

2. 培養液及び染色液等

①培養液：10%仔ウシ血清を添加したMEM培養液^{注1)} (共同購入品 仔ウシ血清：)

GIBCO BRL, lot. No. 30P1033、MEM培地：GIBCO BRL, lot. No. 68N383)

②塩類溶液：HANKS (－) 液^{注2)} またはPBS (－) 液^{注3)}

③トリプシン液：0.05%トリプシン液^{注4)}

④ニュートラル・レッド溶液^{注5)}

⑤洗浄・固定液^{注6)}

⑥抽出液^{注7)}

⑦陽性対照物質：SLS (共同購入品 和光一級 lot. No. PTH0183)

⑧陰性対照物質：培養液のみ

3. 器具類

①96ウェルマイクロプレート (共同購入品 Falcon, lot. No. 30531115)

②8連または4連のディスペンサー及びディスペンサー・トレイ

③マルチチャンネルピペットまたはマイクロピペット

④メスフラスコ (5ml～20ml計量用)

⑤その他、原則として、滅菌済みの使い捨て器具を使用する。

4. 測定機器

①マイクロプレート・リーダー (540nm付近のフィルター)

②マイクロプレート・ミキサー

[2] 実験方法

1. 被験物質の秤量・調製

- ・検体の秤量は滅菌された試験管と薬さじを用い、出来るだけ無菌的に操作できる場所で作業する。本条件にて測定日の微生物汚染検査において異常が認められた場合、もしくは本条件にて実施できない場合は滅菌操作を行い再試験をすること・・・

1) 被験物質の秤量および溶解性の手順 (別紙参照のこと)

①被験物質を100mg 秤量する。

②10%仔ウシ血清を添加した培養液5mlを加える (被検物質濃度2%、20mg/ml)。

③溶解しない場合は超音波分散装置で溶解させる。

④以上の操作でも、沈殿あるいは懸濁が生じる場合は、新たに100mgを秤量し、PBS (－) 5mlを加える。(被検物質濃度2%、20mg/ml) 溶解の際、超音波分散装置を用いても良い。

⑤培養液およびPBS (－) にまったく溶解しない場合は、被検物質2gを10mlのメスフラスコに(他のメスフラスコを用いる場合も同割合で) 秤量し、DMSOを加えてメスアップして20%溶液を調製する。

⑥常温にて溶解しない場合は50℃まで加温する。

加温後も溶解しない場合は、同様にエタノールで調製する。

⑦DMSOおよびエタノールに溶解しない場合は培地に2%、およびDMSOに20%の割合で懸濁する。

*1.0%仔ウシ血清を含む培養液、PBS (－) およびエタノールでの溶解時は原則として40℃以上の加温は行わない。

*培養液に添加した時点で、析出あるいは沈殿を生ずる場合があるが、均一な溶液であれば、試験への使用は問題ない。その場合、報告書に記録する。

2) 予備試験における希釈溶液の調製

①被検物質を培地に溶解した場合

2%濃度(20mg/ml(w/v)) 液から公比10で5段階の希釈溶液を調製する。

(最高用量濃度は1%となる)

②被検物質をPBS (－) で溶解した場合

…被検物質を含むPBS (－) は、10%を最高濃度として培養液に添加する。…

0.2%濃度(2mg/ml(w/v)) から公比10で4段階に調製する。残り1段は溶媒対象に用いる。(最高用量濃度は0.1%となる)

③DMSO、エタノールに溶解した場合

…被検物質を含むDMSO、エタノールは、1%を最高濃度として培養液に添加する。…

0.2%濃度(2mg/ml(w/v)) から公比10で4段階に調製する。残り1段は溶媒対象に用いる。(最高用量濃度は0.1%となる)

*エタノールとDMSOが同等の溶解性を示す場合は、DMSOを優先する。

④DMSOおよびエタノールに溶解しない場合

培地に2%濃度、およびDMSOに20%濃度の割合で懸濁し、前者では1%、後者では0.1%を最高用量濃度として培養液に添加し、共に予備試験を実施する。

(この場合、実験結果からより刺激が強く発現した方を本試験の溶媒とする。)

⑤PBS・DMSO・エタノールを溶媒とした場合、溶媒対照として、用いた溶媒の最高濃度添加液も調製する。

⑥陽性対照であるSLSは0.1%濃度(1mg/ml(w/v)) から公比2で4段階に調製する。

⑦最高用量濃度の培養液のpHを被検物質ごとに測定し報告書に記載する。

なお、pHが5以下、あるいは9以上の場合は更に希釈した調製溶液のpH値を測定し、pHが5以上9以下に入る濃度とそのpHを記載する。

3) 本試験における希釈溶液の調製

- ①本試験での被験物質の最高調製濃度は予備試験でブランクの吸光度と有為な差の認められなかった濃度のうち、最低の濃度とする。
- ②予備試験の最高濃度でも陰性対象と有意な差の認められない場合で、
 - (1) 予備試験時に培地を溶媒とした被検物質は、新たに培地にて100mg/mlの溶液または懸濁液を調製し、最高用量濃度が5%となるよう培養液に添加する。
 - (2) 予備試験時にPBS・DMSO・エタノールを溶媒とした被検物質は、新たに培地に40mg/mlの懸濁液を調製し最高用量濃度2%となるよう培養液に添加する。
 - (3) 予備試験時に培地に2%濃度、およびDMSOに20%濃度の割合で懸濁した被検物質はどちらか溶解性の良いほうを選び、同濃度にて懸濁液を調製し、最終用量濃度が5%となるよう培養液に添加する。
- ③陽性対照のSLSは、予備試験の結果から最高調製濃度を決定し、公比1.1以上にて5段階以上調製する。
- ④検体の希釈は最高調製濃度から公比2とする。ただし、用量-反応曲線上で、最大細胞毒性の20%程度および80%程度の間に少なくとも実測値が3点以上とれるように設定することが望ましいため、公比2で3点以上とれない場合は、被検物質濃度を公比1.1以上に調製し、追試すること。
また、その場合は希釈濃度を明記すること。
(もし、公比1.1でも上記の事項が達成されなかった場合には、公比1.1での値を最終結果とする。)

2. 被検物質の添加

1) 予備試験における希釈溶液の添加 (図1参照)

- ①96ウエルマイクロプレートの周辺部は使用せず、縦10列・横6列の計60ウエルを使用する。なお、周辺部には培養液を0.1mlずつ分注するが、四隅には何も添加しないブランクを置く。
なお、予備試験では、96ウエルマイクロプレート1枚で、 $n=5$ で、2被験物質または陽性対照物質を評価するため、縦10列を左右分割して使用する。
- ②96ウエルマイクロプレート1枚の左右それぞれ横1列(5ウエル)に調製した最高濃度の被験物質を含む培養液を0.1mlずつ分注する。
- ③同様にして、次の横1列の左右それぞれ5ウエルに、次濃度の被験物質を含む培養液を0.1mlずつ分注する。
- ④この操作を続け、 $2\mu\text{g/ml}$ の希釈溶液を分注する。
- ⑤最後の横1列の左右それぞれ5ウエルに、陰性対照として培養液を0.1mlずつ分注する。
- ⑥被験物質の調製に培養液以外の溶媒を用いた場合、溶媒対照として用いた溶媒の最高濃度を添加した培養液を横5列目(5ウエル)に0.1mlずつ添加する。この場合、最高濃度の被検物質を含む培養液の添加を削除し、次濃度に希釈された溶液を横1列目の5ウエルに添加し、横4列目までの4段階濃度系とする(プレートBを参照。)

2) 本試験における希釈溶液の添加 (図2 参照)

- ① 96 ウェルマイクロプレートの周辺部は使用せず、縦10列・横6列の計60ウェルを使用する。なお、周辺部には培養液を0.1mlずつ分注するが、四隅には何も添加しないブランクを置く。
- ② 96 ウェルマイクロプレートの縦10列を左右2分して、マイクロピペット等を用いて、横1列目 (左5ウェル) 及び2列目 (左5ウェル) の計10ウェルに、被験物質または陽性対照物質を溶解した培養液を0.1mlずつ分注する。
- ③ 8連のディスペンサー等を用いて、96 ウェルマイクロプレートの横1列目 (右5ウェル) および横2列目以降のウェルに、培養液を0.1mlずつ分注する。
- ④ マルチチャンネルピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの横2列目 (左5ウェル) の被検物質または陽性対照物質を溶解した培養液をよく混合し、その混合液のうち0.1mlを取り出し横3列目 (左5ウェル) に加える。
- ⑤ マルチチャンネルピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの横3列目 (左5ウェル) の培養液をよく混合し、その混合液のうち0.1mlを取り出し横4列目 (左5ウェル) に加える。

この操作を繰り返すことにより、横5列目まで 5段階の2倍希釈列を調製し、6段階目の濃度溶液からは、右横1列目から調製する。

- ⑥ 濃度溶液の最後列 (横5列目 (右5ウェル)) では、混合液のうち0.1mlを取り除く。

なお、この操作によって、最高10段階の濃度希釈が可能である (6段階濃度以上実施すれば良い。)

- ⑦ 横6列目には陰性対照として培養液を0.1mlずつ添加する。
- ⑧ 被検物質の調製に培養液以外の溶媒を用いた場合、溶媒対照として用いた溶媒の最高濃度を添加した培養液を横5列目 (右5ウェル) に0.1mlずつ添加する (プレートBを参照)

3. SIRC細胞浮遊液の播種および培養の手順

1) 細胞浮遊液の調製・添加

- ① SIRC細胞を培養している培養フラスコから、培養液を取り除く。
- ② HANKS (-) 液またはPBS (-) 液を約5ml培養フラスコに加え、細胞表面を軽く洗浄した後、取り除く。本洗浄操作は2度繰り返す。
- ③ 0.05%トリプシン液約0.5mlを培養フラスコに加え、SIRC細胞が培養フラスコから剥離するのを待つ。この時加温すると剥離が速まる。
- ④ SIRC細胞の剥離後、培養液約5mlを培養フラスコに加え、単細胞化するようによくピペティングする。
- ⑤ 血球計算盤等を用いて、細胞数を計測する。
- ⑥ 培養液を用いて、 2×10^5 細胞/mlの細胞浮遊液を調製する。

なお、96 ウェルマイクロプレート1枚につき約1.1mlの細胞浮遊液が必要である。

- ⑦ 8連のディスペンサー等を用いて、96ウエルマイクロプレートの縦10列・横6列の計60ウエルに、細胞浮遊液を0.1mlずつ分注する。
- ⑧ 96ウエルマイクロプレートをそのまま20分間室温で放置する。

2) 培養

- ① 20分間の室温放置後、96ウエルマイクロプレートを炭酸ガスインキュベーター中に移し、約72時間培養する。

4. 測定

1) ニュートラル・レッドの取込み

- ① 約72時間培養後、ニュートラル・レッドの添加前に倒立顕微鏡下で細菌の有無を確認し、その結果を報告書に記録する。
- ② 96ウエルマイクロプレートを静かに反転することにより、ウエル内の培養液等を捨て、ペーパータオル上にプレートを押し付けて残った液滴を取り除く。
ウエルが乾燥しないように手早く行う。
- ③ ブランクのウエルを除いた96ウエルマイクロプレートの全てのウエルに、8連のディスペンサー等を用いて、ニュートラル・レッド溶液を0.25mlずつ分注する。
- ④ ブランクのウエルには培養液のみを0.25mlずつ分注する。
- ⑤ 96ウエルマイクロプレートを炭酸ガスインキュベーター中で3時間培養する。

2) 洗浄・固定・抽出

- ・・・以降のステップはマイクロプレート1枚毎に行う。
- ① 培養3時間後、96ウエルマイクロプレートを静かに反転することにより、ニュートラル・レッド溶液を捨て、ペーパータオル上にプレートを数回押し付けて残った溶液を除く。
- ② 8連のディスペンサー等を用いて、96ウエルマイクロプレートの全てのウエルに、洗浄・固定液を0.25mlずつ分注する。
- ③ 室温に1分間放置（注意：長く放置すると、色素の抽出が悪くなる）。
- ④ 1分間放置後、96ウエルマイクロプレートを反転して、洗浄・固定液を捨て、ペーパータオル上にプレートを数回押し付けて残った液滴を除く。
- ⑤ 8連のディスペンサー等を用いて、96ウエルマイクロプレートの全てのウエルに、抽出液を0.1mlずつ分注する。
- ⑥ 室温中、蓋をしてマイクロプレート・ミキサー等で15分間攪拌する。

3) マイクロプレート・リーダーによる測定

- ① マイクロプレート・リーダーを用いて、540nm付近の波長で96ウエルマイクロプレートの各ウエルの吸光度を測定する。
- ② マイクロプレート・リーダーの機種名・製造メーカー名及び使用したフィルターの波長を記録する。

[3] 結果の処理

1. EC_{50} の決定

- ①被験物質を含まない陰性対照物質のウェルの吸光度を100%とした場合の各ウェルの吸光度を算出する。
- ②手書きまたは解析ソフトを用いて、方対数グラフに用量－反応曲線を作成し、コントロールの吸光度の50%となる被験物質濃度(EC_{50})を求める。
なお、グラフは報告書に添付すること。(手書き・解析ソフトの両方で共にデータを求めた場合はどちらか一方のグラフのみ提出すれば良い。)また、解析ソフトを用いた場合は使用ソフト名を報告書に記載すること。

2. 試験報告書の作成

1) 報告書－1－の作成

- ①試験全般に関する事項については、書式1の報告書を提出する。
- ②細胞倍加時間と細菌汚染の有無については必須事項とし、染色体モード、コロニー形成率、マイコプラズマ検査はオプションとする。
- ③試験に関する全般的な意見・感想について記入する。

2) 報告書－2－の作成

- ①被検物質ごとに予備試験について必要事項を記入し、提出する。
- ②試験は原則として1回行い本試験での調製濃度を決定するが、追試験を行った場合は、その結果についても提出する。また、その際の変更点(溶媒を変更した等)は、必ず、報告書に記入すること。
- ③各試験ごとに各ウェルの平均値±SDを求め、被験物質の調製濃度も記録する。
- ④陽性対照のSLSの EC_{50} 値は、試験ごとに記載する。

3) 報告書－3－の作成

- ①被検物質ごとに本試験について必要事項を記入し、提出する。
- ②試験は原則として2回行い、 EC_{50} 値を算出するが、追試験を行った場合は、その結果についても提出する。各試験ごとに各ウェルの平均値±SDと EC_{50} 値を求め、被験物質の調製濃度も記録する。
- ③陽性対照のSLSの EC_{50} 値は、試験ごとに記載する。

4) 報告書－4－の作成

- ①細胞倍加時間の測定結果を記入し、提出する。
- ②提出の際には増殖曲線グラフを添付すること。

II. クリスタル・バイオレット染色性試験

(本試験法に関してはオプションとし、余裕のある場合に実施する。)

本法はニュートラルレッド取り込み試験終了後に、同プレートでひき続き実施する。

[1] 実験材料

1. 染色液等

- ①塩類溶液：HANKS (-) 液^{註2)} またはPBS (-) 液^{註3)}
- ②クリスタル・バイオレット染色液：0.4%クリスタル・バイオレット溶液^{註8)}

2. 器具類

- ①ニュートラルレッド取り込み試験終了後の同プレート
- ②8連または4連のディスペンサー及びディスペンサー・トレイ
- ③マルチチャンネルピペットまたはマイクロピペット
- ④その他、原則として、滅菌済みの使い捨て器具を使用する。

3. 測定機器

- ①マイクロプレート・リーダー (590nm付近のフィルター)

[2] 実験方法

1. クリスタル・バイオレットによる染色

- ①ニュートラルレッド取り込み試験終了後に、96ウェルマイクロプレートを静かに反転することにより、ウェル内の染色液等を捨てる。
- ②8連のディスペンサー等を用いて、96ウェルマイクロプレートの全てのウェルにHANKS (-) 液またはPBS (-) 液を0.2mlずつ分注する。
- ③96ウェルマイクロプレートを穏やかに攪拌した後、静かに反転することにより、ウェル内のHANKS (-) 液またはPBS (-) 液を捨てる。
- ④上記②③の洗浄操作を2度繰り返す。
- ⑤8連のディスペンサー等を用いて、96ウェルマイクロプレートの全てのウェルに0.4%クリスタル・バイオレット溶液を0.1mlずつ分注し、30分間染色する。
- ⑥30分間染色後、96ウェルマイクロプレートを水洗する。
- ⑦水洗した96ウェルマイクロプレートを風乾する。

2. マイクロプレート・リーダーによる測定

- ①マイクロプレート・リーダーを用いて、590nm付近の波長で96ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度を測定する。

なお、細胞の増殖が不均一で結果がバラつく場合には、メタノール（抽出時間：約5～10分間以内）またはホルムアミド（抽出時間：10分間以上）を用いて抽出した後、測定してもよい。その場合には、8連のディスペンサー等を用いて、96ウェルマイクロプレートの全てのウェルに抽出溶媒を0.2mlずつ分注し、マイクロプレートミキサー等を用いて攪拌・溶解した後、マイクロプレート・リーダーを用いて測定する。

- ②マイクロプレート・リーダーの機種名・製造メーカー名、使用したフィルターの波長、さらに抽出溶媒を使用した場合は、製造メーカー名・グレード・製造ロット番号等を記録する。

[3] 結果の処理

1. EC_{50} の決定

- ①被験物質を含まない陰性対照物質のウェルの吸光度を100%とした場合の各ウェルの吸光度を算出する。
- ②手書きまたは解析ソフトを用いて、方対数グラフに用量-反応曲線を作成し、コントロールの吸光度の50%となる被験物質濃度 (EC_{50}) を求める。
なお、グラフは報告書に添付すること。(手書き・解析ソフトの両方で共にデータを求めた場合はどちらか一方のグラフのみ提出すれば良い。) また、解析ソフトを用いた場合は使用ソフト名を報告書に記載すること。

試験報告書の作成

1) 報告書-1-の作成

- ①試験全般に関する事項については、書式1の報告書を提出する。
- ②細胞倍加時間と細菌汚染の有無については必須事項とし、染色体モード、コロニー形成率、マイコプラズマ検査はオプションとする。
- ③試験に関する全般的な意見・感想について記入する。

2) 報告書-2-の作成

- ①被検物質ごとに予備試験について必要事項を記入し、提出する。
- ②試験は原則として1回行い本試験での調製濃度を決定するが、追試験を行った場合は、その結果についても提出する。また、その際の変更点(溶媒を変更した等)は、必ず、報告書に記入すること。
- ③各試験ごとに各ウェルの平均値 \pm SDを求め、被験物質の調製濃度も記録する。
- ④陽性対照のSLSの EC_{50} 値は、試験ごとに記載する。

3) 報告書-3-の作成

- ①被検物質ごとに本試験について必要事項を記入し、提出する。
- ②試験は原則として2回行い、 EC_{50} 値を算出するが、追試験を行った場合は、その結果についても提出する。各試験ごとに各ウェルの平均値 \pm SDと EC_{50} 値を求め、被験物質の調製濃度も記録する。
- ③陽性対照のSLSの EC_{50} 値は、試験ごとに記載する。

(資料)

被験物質の調製手順

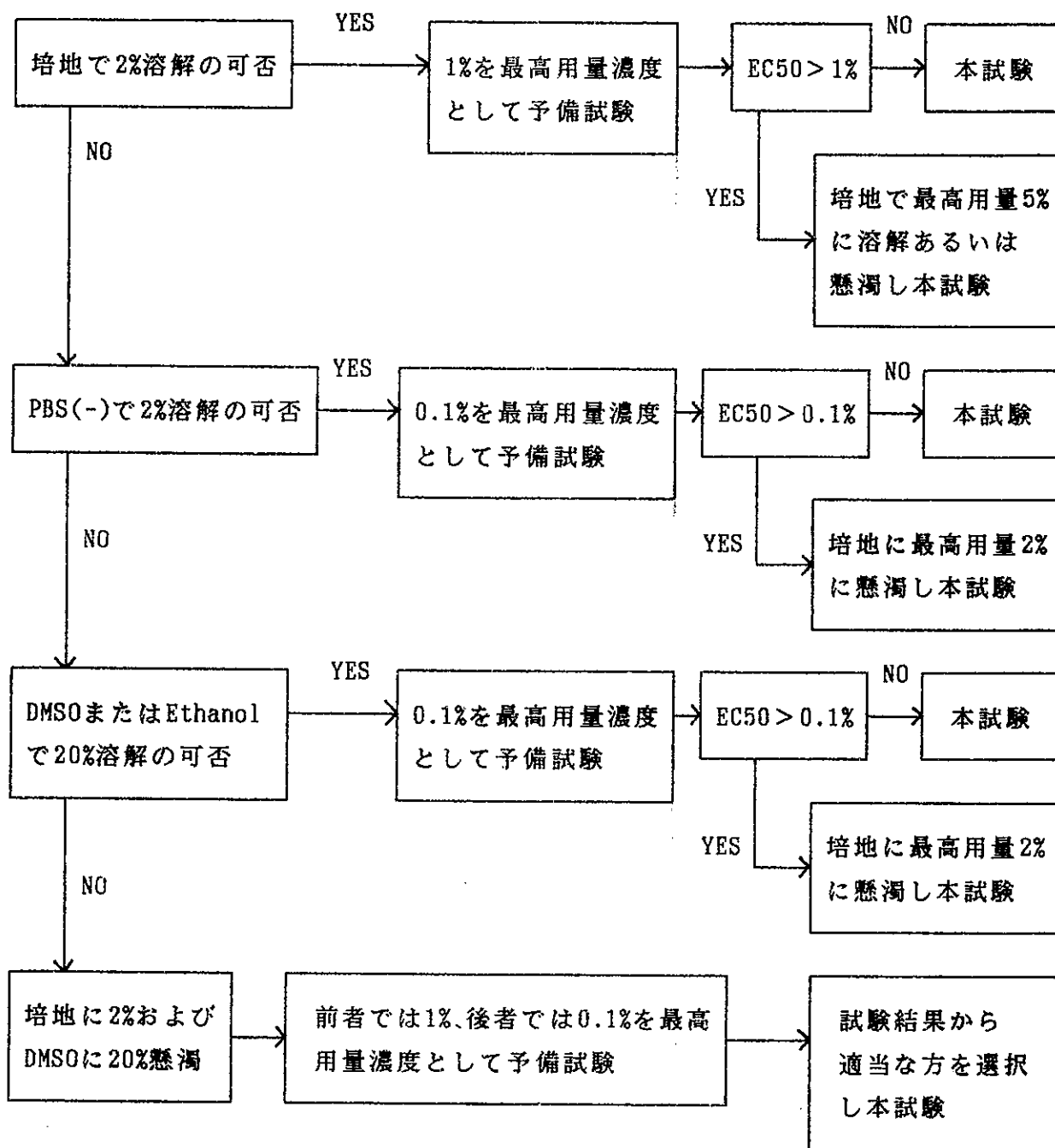
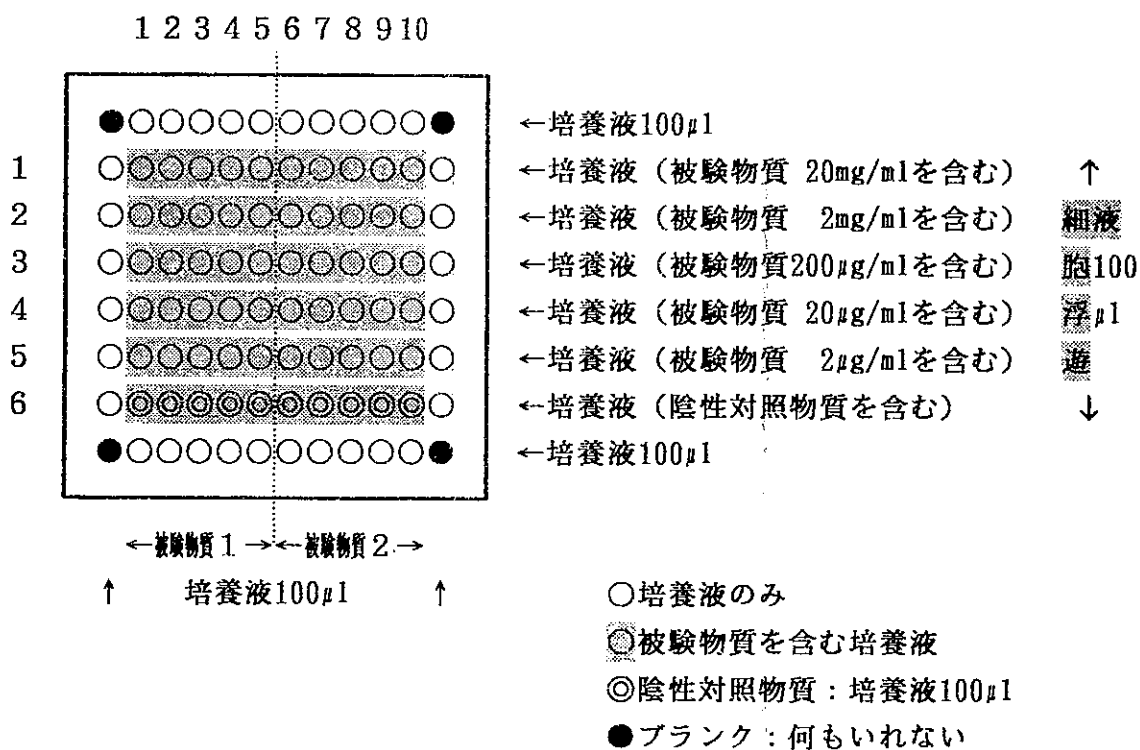


図1. 予備試験のプレートへの被験物質、培養液及び細胞浮遊液の配置

プレートA



プレートB

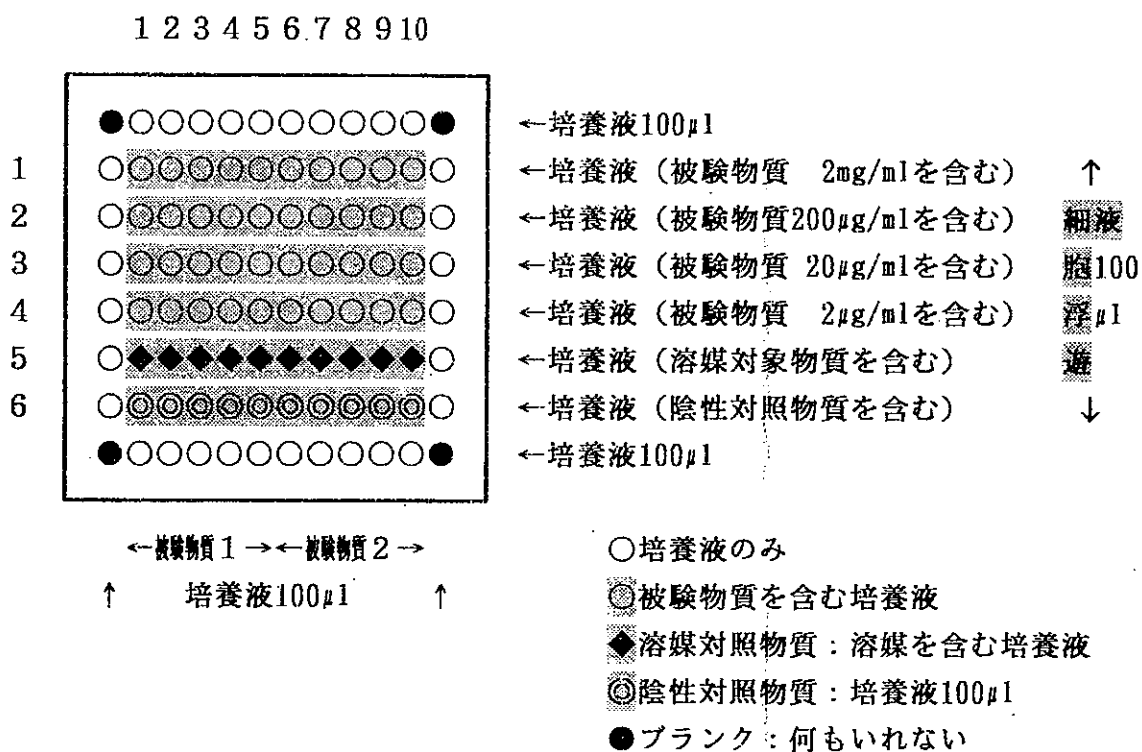
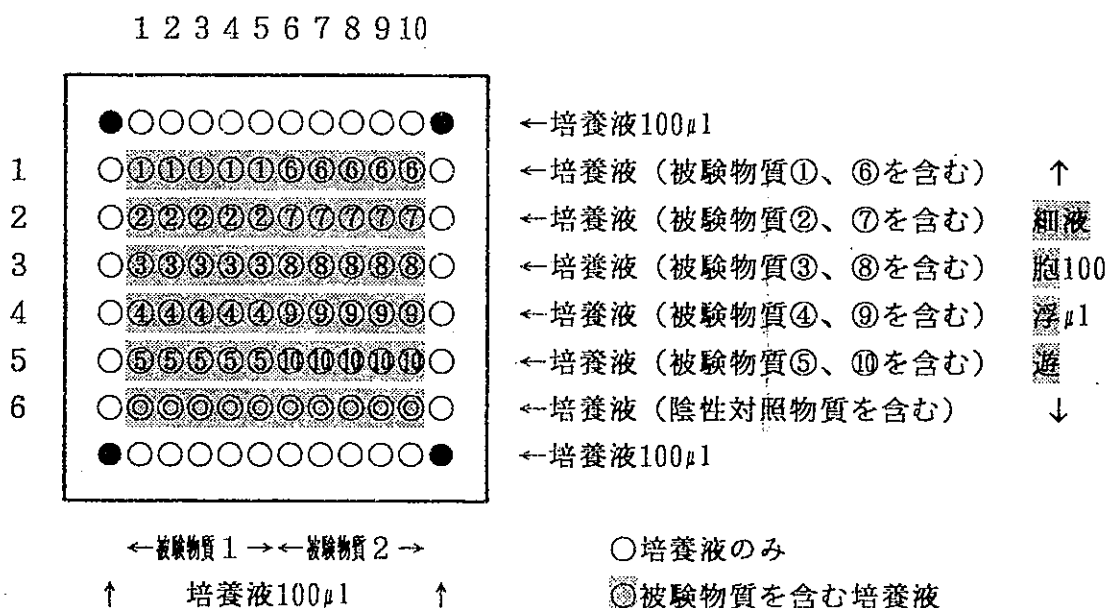
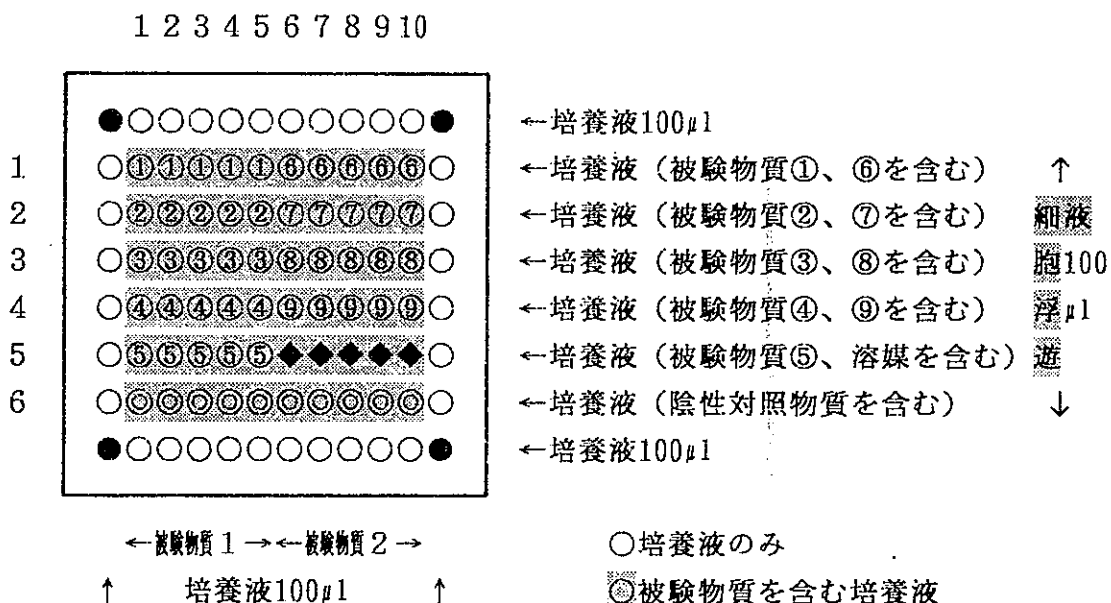


図2. 本試験のプレートへの被験物質、培養液及び細胞浮遊液の配置

プレートA



プレートB



Ⅲ. 関連SOP

1. 試薬調製法

1) 注1：10%仔ウシ血清を添加したMEM培養液の調製

- ①9.53gのMEM粉末(GIBCO, Cat.No.410-1100EF, Control No.)を精製水(約950mL)に溶解する。
- ②約1.5gの炭酸水素ナトリウムを加え溶解する(ラベルには2.2gと記述されているが経験的には過剰である)。
- ③1N水酸化ナトリウムあるいは、1N塩酸でpHを7.2~7.4に調整する。
- ④精製水を加え容量を1Lにした後、メンブレン・フィルター(0.22 μ m)により濾過滅菌する。
- ⑤使用時には、仔ウシ血清(GIBCO, Cat.No.200-6170AJ, Control No.30P1033)を10%濃度になるように添加して用いる。
- ⑥使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

2) 注2：HANKS(-)液の調製

- ①塩化ナトリウム(8g)、塩化カリウム(0.4g)、リン酸二ナトリウム・12水塩(0.121g)、リン酸一カリウム(0.06g)およびグルコース(1g)を精製水に溶解し、高圧蒸気滅菌する。
- ②メンブレン・フィルター(0.22 μ m)により濾過滅菌した7.5%炭酸水素ナトリウム水溶液を、HANKS(-)液100mlあたり0.47mlの割合で添加して用いる。
- ③使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

3) 注3：PBS(-)液の調製

- ①塩化ナトリウム(8g)、塩化カリウム(0.2g)、リン酸二ナトリウム・12水塩(2.9g)およびリン酸一カリウム(0.2g)を精製水(1L)に溶解する。
- ②調製後、高圧蒸気滅菌する。
- ③市販のPBS(-)液等を使用しても良い。
- ④使用した試薬や塩類溶液の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

4) 注4：0.05%トリプシン液の調製

①エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(2g)を精製水(100ml)に溶解し、pHを7.4に調整して高圧蒸気滅菌する。また、市販のトリプシン液を0.05%の濃度になるようにHANKS(-)液またはPBS(-)液で希釈し、使用時には、2%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液を100ml当り1mlの割合で添加して用いる。

②市販のトリプシン・EDTA液等を使用しても良い。

③使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

5) 注5：ニュートラル・レッド溶液の調製

①ニュートラル・レッド(5mg)を秤量し、培養液(100ml)に溶解してニュートラル・レッド溶液(50 μ g/ml)を調製する。

②もしくは、ニュートラル・レッド(5mg)を秤量し、培養液(10ml)に溶解する。37℃のウォーターバスを用いて加温後、1500gで5分間遠心して不溶性の結晶を除く。遠心上清(3ml)を培養液(27ml)に加え混合して、ニュートラル・レッド溶液(50 μ g/ml)を調製する。

③使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

6) 注6：洗浄・固定液の調製

①2%ホルムアルデヒド水溶液および2%塩化カルシウム水溶液を調製し、使用時に等量混合して使用する。

②使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

7) 注7：抽出液の調製

①50%エタノール水溶液を調製し、使用時に99mlの50%エタノール水溶液に1mlの水酢酸の割合で混合して調製する。

②使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

8) 注8：0.4%クリスタル・バイオレット溶液の調製

①クリスタル・バイオレット(2g)をメタノール(500ml)に溶解する。

②使用した試薬の製造メーカー名、グレード及び製造ロット番号等を記述する。

2. 細胞の解凍、継代および凍結保存

- 1) 入手した細胞（ドライアイスとともに凍結されたアンプルで送付されてくる場合が多い：すぐに使用しない場合には -80°C 以下の温度で保存する。）を 37°C 恒温水槽にてすぐに溶解し、滅菌綿にてアンプルをよく拭く。滅菌したパスツールピペットを用い、細胞懸濁液を取り、等量以上の培養液とともに滅菌遠沈管に加え、ピペッティングする。
- 2) 1200rpmにて5分間遠心し、上清を捨て細胞のpelletを得る。
- 3) 2~3mℓの培養液を加え、ピペッティングにより細胞を懸濁させた後、遠心によりpelletを回収する。
- 4) 得られたPelletに培養液を4~5mℓ加え、ピペッティングで懸濁し、培養用シャーレあるいはボトルに入れ、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養する。
- 5) 翌日以降、細胞の状態を位相差顕微鏡下で観察し、細胞の増殖・形態の正常性、微生物の汚染の有無を観察する。
- 6) 細胞は3~4日後に継代する。すなわち、細胞の増殖しているシャーレあるいはボトルから培養液を除き、PBS（-）2~3mℓを加え、細胞表面を軽く洗った後、除去する。（2回）
- 7) トリプシン溶液を3mℓ加える。5~10分室温に放置し、ピペッティングし細胞を剥離し、単細胞化する。
- 8) この細胞懸濁液を等量の培養液を加えた遠沈管に取り、遠心して細胞を集める。
- 9) 5~10mℓの培養液を加え、細胞懸濁液を調製し、その一部を取り、血球計算盤にて細胞数を計数する。これらの95%以上の生細胞であるが、より正確に生細胞数を求めたい場合には、トリパンブルー溶液と細胞懸濁液を1:1の割合にて加え、トリパンブルーで染色されない細胞数を計数し、細胞懸濁液1mℓ当りの生細胞数を算出する。
- 10) SIRC 細胞の場合には $1\sim 2\times 10^6$ 細胞をシャーレあるいはボトルに加え、培養する。シャーレあるいはボトルの上部に細胞名、継代数、日時および播種細胞数を明記する。
- 11) 培養3~5日後、細胞は対数増殖末期（サブコンフルエント）にあるので継代する。試験に必要な大まかな細胞数を計算し、その2~3倍量のディッシュおよびボトルを用意することが望ましい。
- 12) 細胞を凍結保存する場合は、10%DMSOを含む $1\times 10^6/\text{mℓ}$ 細胞懸濁液を1~2mℓ用のストックチューブに1mℓ入れ、液体窒素タンク中で凍結保存する。ストックには細胞名、凍結年月日および継代数を明記する。
短期間（約1年間）であれば、 -80°C の超低温槽を用いることができる。

3. 細胞倍加時間の測定

- 1) 培養3～5日の対数増殖末期にある細胞のシャーレあるいはボトルから培養液を除き、PBS (－) 2～3mlを加え、細胞表面を軽く洗った後、除去する。(2回)
- 2) トリプシン溶液を3ml加える。5～10分室温に放置し、ピペティングし細胞を剥離し、単細胞化する。
- 3) この細胞懸濁液を等量の培養液を加えた遠沈管に取り、遠心して細胞を集める。
- 4) 5～10mlの培養液を加え、細胞懸濁液を調製し、その一部を取り、血球計算盤にて細胞数を計数する。これらの95%以上の生細胞であるが、より正確に生細胞数を求めたい場合には、トリパンプルー溶液と細胞懸濁液を1:1の割合にて加え、トリパンプルーで染色されない細胞数を計数し、細胞懸濁液1ml当りの生細胞数を算出する。また、単一細胞が95%以上ない時は他のディッシュあるいはボトルを用いやり直す。
- 5) あらかじめ15枚の35mmディッシュに1.0mlの培養液を分注し、インキュベーターに入れておく(3枚は予備である)。
- 6) 培養液を $5 \times 10^4/\text{ml}$ に培養液にて希釈し、その1.0mlずつを各ディッシュに入れ培養する。
- 7) 24時間後に3枚のディッシュをトリプシン液で処理し、PBS (－) に懸濁し、トリパンプルー染色をして全細胞数と生細胞数を数える。1サンプルについて3回ずつ数え、平均する。
- 8) 7の操作を24時間毎に4日目まで繰り返す。細胞を懸濁するため入れるPBS (－) の量は24～48時間後は1mlが適当であるが、72時間後以降は2～5mlが適当である。
- 9) 片対数グラフにプロットし、増殖曲線を作成する。
- 10) 倍加時間(D.T.)は増殖曲線で直線性を示す時間の値から以下の式で求める。

$$D.T. = \frac{(t-t_0)\log 2}{\log N - \log N_0}$$

t_0, t : 細胞数を数えた時間

N_0 : t_0 時での細胞数

N : t 時での細胞数

- 11) 飽和密度は、増殖がもはやみられない定常期の細胞数を、ディッシュの底面積(35mmディッシュは 9.0cm^2)で割った値である。

4. マイコプラズマ検出法

種々の方法が考案されているが、ここでは培養による直接検出法を記載する。尚、簡易な方法とし、ELISA法を用いたMycoplasma Detection Kit（ペーリカ-社製）も推奨される。

材料

- 1) 指標細胞
- 2) 試験検体：約 10^6 個の細胞とその培養上清1mℓ
- 3) マイコプラズマ：Mycoplasma hyorhinis(ATCC29052):M. orale(IF01447)
- 4) MEM+10%FBS（抗生物質なし）：PBS（-）；固定液（メタノール：酢酸＝3:1）；ネイルエナメル（無色）
- 5) 各種ピペット；60mm²プラスチックシャーレ；10mℓ遠心管；4チャンネルスライト1個（ラフテック社，#4804）；ラバーホース1本；無蛍光カバーガラス（No.1，松浪ガラス製，24×50mm）。
- 6) ①濃縮染色液 [100mℓのPBS(-)にHoechst Dye 33258(Bisbenzimidazole 33258, 和光純薬)を5mgとthimerosal（防腐剤，Sigma社製）10mgを加え、遮光し、マグネティックスターを用いて完全に溶解させる（約30分）。1mℓずつ分注し、完全に遮光した状態で-20℃に保存する]
②使用染色液 [凍結保存をしている①液0.15mℓを100mℓのPBS(-)と混和し、最終濃度が $0.075\mu\text{g}/\text{mℓ}$ Hoechst Dye 33258, $0.15\mu\text{g}/\text{mℓ}$ thimerosalの溶解する。30分間マグネティックスターを用いて色素を完全に溶解する。使用直前に調製する]；フロアプレート封入液 [0.1Mクエン酸22.2mℓ，0.2Mリン酸二ナトリウム27.8mℓ，グリセリン50mℓを混和し、pH5.5に調製する。5℃に保存する]
- 7) 落射式蛍光顕微鏡 [オリンパス製の場合は励起フィルターUGL1，カットフィルターL475，ニコ製の場合はUV励起法による]

方法

1) 試験検体の調製

- ① 試験検体細胞の培養：被試験細胞を抗生物質を含まない培養液で少なくとも3回継代する。最後の培養の培養液を新鮮なものと交換し、2～3日間培養する。
- ② 細胞の回収：培養上清、およびラバーホースを用いて培養器からかき取った細胞を遠心管に取り、1,200rpm, 10分間、4℃で遠心する。約 10^6 個の細胞に相当するペレットに対し、約1mℓの割合になるように上清の培養液を残し、あとは捨てる。
- ③ 凍結融解：ピペティングしたのち-20℃で凍結し、30分間後37℃で融解する。この操作を二度行い、1,200 10分間、4℃で遠心する。その上清を試験検体とする。

2) 指標細胞の培養と試験検体の接種

- ① 凍結保存している C K T - 1、または V E R O 細胞を解凍し (37℃, 1 分間)、制裁生細胞として $2 \sim 3 \times 10^3 / \text{m} \ell$ とする。4 チンバー-スライド の各 チンバー にその 1 m を植え込み、炭酸ガスインキュベーター内で培養する。
- ② 1 日後培養液を除き、各 チンバー に新鮮な培養液を 0.9 m ℓ 入れる。
チンバー-1 に a-3 の試験検体 0.1 m ℓ を チンバー-2 に添加し、陽性対照として M. hyorhinis, M. orale のそれぞれ 100 CFU (コロニー形成単位) を チンバー-3, 4 に接種する。
- ③ 炭酸ガスインキュベーターに入れ 6 日間培養する。

3) 細胞固定、染色、封入、観察

- ① 培養液を除去し、CMF-PBS で細胞を洗ったのち、固定液 1 m ℓ ずつ各 チンバー に加え、10 分間固定する。
- ② 固定液を除去し風乾したのち、染色液 1 m ℓ を各 チンバー に加え、室温 30 分間放置する。
- ③ 染色液を除去し、蒸留水で 3 回洗ったのち、チンバー の桁、カスケツを取り除く。
- ④ 封入液を滴下し、その上にカバーガラスをのせる。気泡および余分の封入液を除き、カバーガラスのまわりをネイルエナメルを用いて封じる。
- ⑤ UV 励起下、蛍光顕微鏡を用いて観察する。約 400 ~ 600 倍が適当である。

4) 判定

- ① 細胞質領域での蛍光の有無を観察する。
- ② 1,000 個の細胞を観察して、5 個以上の細胞質領域に蛍光が見られたとき、陽性と判定す。

参考文献

- 1) 本原光城、奥村秀夫 組織参考 7(1), P21-26(1981)
- 2) 川瀬雅子ら 組織培養 12(8), P298-303(1988)
- 3) 小谷 均、Greard J. McGarrity 組織培養 13(7), P248-253(1987)
- 4) 組織培養の技法 日本組織培養学会編 朝倉書店 P62-65(1988)
- 5) Mycoplasma Detection Kit (ペーリカ Cat. No. 1296 744)

5. 染色体モード検査法

1. 材料

- 1) 対数増殖期のSIRC細胞 約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個
- 2) コルセミド $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$; 0.05%トリフ[®]シン/PBS (ー) 液 ; 低張液0.075MKCI (1%クエン酸ナトリウムも可) ; 固定液 (メタノール : 氷酢酸=3:1, 用事調製) ; 0.1%トリフ[®]シン/0.9% N_2CI 液 (1NN.0HでpH8~9にする) ; エタノール ; キムサ[®]液 ; 封入剤
- 3) 各種ピペット ; 10m ℓ 遠心管1本 ; 歯科用ピソセット1本 ; スライドガラス5~10枚 ; 染色瓶 ; カバーガラス.
- 4) 顕微鏡用写真撮影装置 (ミニフィルム、ハサミ、両面テープ、台紙)

2. 方法

- 1) SIRC細胞のシャーレにコルセミドを $0.1 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ の濃度になるように加え、培養を続ける。(コルセミドの処理濃度、時間は、細胞の種類、増殖度により適当に加減する)
- 2) 2時間培養後、培地を遠心管に移す。
- 3) 細胞表面を0.05%トリフ[®]シン液3m ℓ で洗い、液は方法2の遠心管に入れる。
- 4) さらにシャーレに0.05%トリフ[®]シン液を2m ℓ 加え、37℃で5~10分間保温する。
- 5) 細胞がはがれたら、方法2の遠心管の液をシャーレに移し、ピペティングをして再び遠心管に戻す。
- 6) 1,200rpmで5分間遠心し、上清を捨てる。
- 7) 沈渣に低張液を3m ℓ 加え、軽くピペティングをした後、37℃で20分間保温する。
- 8) ついでに固定液を6m ℓ 加え、口の太い駒込ピペティングでゆっくりと静かに混和した後、1,200rpmで5分間遠心し、上清を捨てる。
- 9) 沈渣に固定液を5m ℓ 加え、1,200rpmで5分間遠心し、上清を捨てる。
- 10) 9)の操作を2回繰り返す。
- 11) 0.5~1m ℓ の固定液に細胞を浮遊する。
- 12) エタノールにつけたスライドガラスをきれいなカバーで表面をよく拭い、その上に浮遊液を1~2滴たらして風乾する。(単に染色体を数えるだけなら、この段階でキムサ[®]染色をしてもよい)
- 13) 標本を数日間室温におくか、37℃ふらん器に一昼夜おく(急ぐ時は80℃ふらん器で2~3時間おく)
- 14) スライドガラスを10℃前後に冷却しておいた0.1%トリフ[®]シン液につけ、軽くゆすりながら10秒~2分位作用させる。
- 15) 用意しておいたエタノール液にスライドをつけてトリフ[®]シンの作用をとめる。
- 16) 蒸留水で水洗後、キムサ[®]染色し、風乾後、封入する。
- 17) 400倍または1,000倍で写真を取る。
- 18) 核型分析には印画用紙に焼き付け、その裏面に両面テープをはり、染色体を切り抜いて台紙上に並べる。

参考文献

- 1) 組織培養の技法 黒田行昭編 ニュー・サイエンス社P272-286(1989)
- 2) 組織培養の技術 日本組織培養学会編 朝倉書店P42-46(1988)
- 3) 組織培養の技術 日本組織培養学会編 朝倉書店P30-33(1982)
- 4) 放射線・化学物質と染色体異常 医学書院P266-296(1982)

6. コロニー形成率測定法

1. 材料

- 1) 対数増殖期の細胞 約 2×10^6 個
- 2) MEM+10%CS; トリプシン/EDTA液; 10%中性ホルマリン液; 0.1%クリスタル紫液
- 3) 各種ビペット; 0.5ml メスビペット5本; 60mmプラスチックシャーレ10枚; 短試験管10本
細胞数計算用具一式

2. 方法

- 1) あらかじめ60mmシャーレ10枚に、それぞれ5mlの培地を入れて炭酸ガスインキュベーターに入れておく。
- 2) 古い培地を捨てて、あらかじめ37℃に保温しておいたトリプシン/EDTA液5mlで細胞表面を洗う。
- 3) 新しいトリプシン/EDTA液5mlを加え、37℃で5～10分間保温する。
- 4) 浮遊しはじめた細胞をビペッティングでバラバラにし、5mlの培地を加えて氷水中に保つ。
- 5) 血球計算盤で細胞数をかぞえる。
- 6) 細胞液を培地でまず 10^6 個/mlないし 10^5 個/mlにうすめ、さらに 10^4 個/ml、 10^3 /mlと10倍ずつ階段希釈する。この場合、細胞液は少なくとも0.5mlを取ってうすめる。
- 7) 方法1)の各シャーレに 10^3 個/mlの希釈細胞浮遊液を0.1ml加え、ラックを前後左右に5回ずつ振り、炭酸ガスインキュベーターにもどし、37℃で培養する。
- 8) 10～14日後培地を捨て、PBS(-)で一度洗い、中性ホルマリン液5mlで30分間固定し、クリスタル紫液5mlで染色する。
- 9) コロニー数を数え、植え込み細胞数(100)で割った値、コロニー形成率(plating efficiency)を計算する。コロニーアナライザーを用いると、自動的にコロニー数をかぞえたり、コロニーの大きさの解析などができる。

参考文献

- 1) 組織培養の技法 黒田行昭編 ニュー・サイエンス社P176-183(1989)
- 2) 組織培養の技術 日本組織培養学会編 朝日書店P47-50(1988)
- 3) 組織培養の技術 日本組織培養学会編 朝日書店P34-36(1982)

哺乳動物細胞株を用いる細胞毒性試験報告書 - 1 -
(各試験につき提出)

1、試験機関名： _____
試験責任者： _____
試験担当者： _____

2、細胞の種類

細胞名： _____ 入手先： _____
細胞のLot.： _____ 入手年月日： _____ 年 _____ 月 _____ 日
細胞倍加時間： _____ 時間 (継代数： _____) 別紙に記入のこと)
染色体モード： _____ コロニー形成率： _____ %
細菌汚染の有無： _____ マイコプラズマ汚染の有無： _____
マイコプラズマ汚染試験を行った場合はその方法： _____

継代数： 1 回目 _____ 2 回目 _____
備考： _____

3、培養液

基本培地の種類： _____
培地製造元： _____ 培地のLot.： _____
血清の種類： _____
血清の発売元： _____ 血清のLot.： _____
備考： _____

4、アッセイ法

種類： _____
試薬の製造元： _____ 試薬のLot.： _____
測定波長： _____ nm 測定機器名： _____
測定機器の製造元： _____
備考： _____

5、感想・意見

予備試験

哺乳動物細胞株を用いる細胞毒性試験報告書-2-
(各被験物質につき提出)

1、被験物質

名称：_____

Lot.：_____ 溶媒の種類：_____

被験物質の最高用量濃度 _____ mg/ml および pH _____ *

*pH5>またはpH9<の場合、希釈にてpH5～9になる最高用量濃度 _____ mg/mlとpH _____

備考：_____

被験物質の性状： _____ 溶解 _____ 懸濁 _____ その他 _____

加温した場合はその温度： _____ °C

懸濁させた場合はその方法： _____

濾過滅菌した場合はその方法： _____ (フィルター名： _____)

被験物質調製日：1回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日 追試の場合 _____ 年 _____ 月 _____ 日

被験物質投与日： _____ 年 _____ 月 _____ 日 追試の場合 _____ 年 _____ 月 _____ 日

試験終了日： _____ 年 _____ 月 _____ 日 追試の場合 _____ 年 _____ 月 _____ 日

被験物質溶液の保存方法： _____

備考：_____

2、結果(予備試験は原則として1回実施する)

試験結果(溶媒)			追試結果(溶媒)		
濃度 mg/ml	OD(nm)	%	濃度 mg/ml	OD(nm)	%
陰性対照	±	100.0	陰性対照	±	100.0
溶媒対照	±				

陽性対照：

名称：_____ メーカー名：_____ Lot. _____

EC₅₀値：_____

備考：_____

追試験を実施した場合の変更点

備考：_____

哺乳動物細胞株を用いる細胞毒性試験報告書-3-
(各被験物質につき提出)

1、被驗物質

名称：

Lot.: _____ 溶媒の種類: _____

被験物質の最高用量濃度 _____ mg/ml および pH _____ *

*pH5>またはpH9<の場合、希釈にてpH5～9になる最高用量濃度 mg/mlとpH

備考：

被験物質の性状： 溶解 懸濁 その他

加温した場合はその温度: °C

懸濁させた場合はその方法：

濾過滅菌した場合はその方法： (フィルター名：)

被験物質調製日：1回目 年 月 日 2回目 年 月 日

被験物質投与日：1回目 年 月 日 2回目 年 月 日

試験終了日: 1回目 年 月 日 2回目 年 月 日

被験物質溶液の保存方法：

備考：

2、本試驗結果

1 回目の結果			2 回目の結果		
濃度 mg/ml	OD(nm)	%	濃度 mg/ml	OD(nm)	%
陰性対照	±	100.0	陰性対照	±	100.0
溶媒対照	±		溶媒対照	±	

EC₅₀値: 1 回目

EC₅₀値：2回目

平均 EC_{50} 值: _____

備考：

陽性对照：

名称: _____ メーカー名: _____ Lot. _____

EC₅₀値: 1 回目

EC₅₀値：2 回目

平均 EC_{50} 值: _____

備考：_____

注) 提出の際には、 EC_{50} の算出に用いた手書きグラフを添付すること。

3、追試験結果

回目の結果			回目の結果		
濃度 mg/ml	OD(nm)	%	濃度 mg/ml	OD(nm)	%
陰性対照	±	100.0	陰性対照	±	100.0
溶媒対照	±		溶媒対照	±	

EC₅₀値： 回目 _____
 EC₅₀値： 回目 _____
 平均EC₅₀値： _____
 備考： _____

陽性対照：
 名称： _____ メーカー名： _____ Lot. _____
 EC₅₀値： 回目 _____
 EC₅₀値： 回目 _____
 平均EC₅₀値： _____
 備考： _____

注) 提出の際には、EC₅₀の算出に用いた手書きグラフを添付すること。

哺乳動物細胞株を用いる細胞毒性試験報告書-4-

細胞倍加時間測定結果
(各細胞ごとに提出)

1、使用細胞 _____ (lot. _____)

2、試験実施日 _____ 年 _____ 月 _____ 日 ~ _____ 年 _____ 月 _____ 日

3、試験結果

時間	dish 1	dish 2	dish 3	mean cells/dish	cells/cm ²
0					
2 4					
4 8					
7 2					
9 6					

4、倍加時間 (D.T.) の算出

(増殖曲線を作成し、直線性を示す時間の値から以下の式で求める。)

$$(D.T.) = \frac{(t - t_0) \log 2}{\log N - \log N_0}$$

t_0, t : 細胞数を数えた時間
 N_0 : t_0 時での細胞数
 N : t 時での細胞数

$$\begin{aligned}
 (D.T.) &= \frac{(__ - __) \log 2}{\log __ - \log __} \\
 &= __
 \end{aligned}$$

注) 提出の際には、増殖曲線グラフを添付すること。

S I R C 試験担当者 様

H 5 年 1 2 月 2 2 日
P O L A 中央研究所
試験研究部
谷 尚子

拝啓

年の瀬もおしせまっておりますが、皆様におかれましては益々ご健勝の事と存じます。

第2次バリデーションのS I R C細胞毒性試験のS O Pが出来上がりましたのでご送付いたします。

前回からの主な改正点は以下の通りです。

- ①被験物質の調製法について他の細胞試験と統一化し、文章中の説明と共にチャートを作成し、参考資料とした。
- ②結果報告書の書式を他の株化細胞試験と統一化した。
- ③倍加時間の計測値を記入する報告書を作成し、記入・提出することとした。

ご不明な点・訂正箇所等ございましたら、ご連絡下さるようお願い致します。

なお、1月13日に今回オプションとしたC V法の参加の有無を確認したいと思しますので、御検討の程お願い致します。

敬具

細胞毒性試験報告書 - 2 -

(各被験物質につき提出)

1、被験物質

名 称： _____

Lot.： _____ 溶媒の種類： _____

被験物質の最高調製濃度 _____ mg/ml および pH _____ *

*pH5>またはpH9<の場合、希釈にてpH5~9になる最高用量濃度(final) _____ mg/ml

被験物質の性状： 溶解 懸濁 その他

加温した場合はその温度： _____ °C

懸濁させた場合はその方法： _____

滅菌方法： _____ (濾過滅菌した場合のフィルター名： _____)

細胞播種日： 1回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日 2回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日

被験物質調製日： 1回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日 2回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日

被験物質投与日： 1回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日 2回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日

試験終了日： 1回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日 2回目 _____ 年 _____ 月 _____ 日

被験物質溶液の保存方法： _____

備考： _____

2、本試驗結果

[illegible]

NR50値：1回目（手書き） _____ （解析ソフト） _____
NR50値：2回目（手書き） _____ （解析ソフト） _____
平均NR50値： （手書き） _____ （解析ソフト） _____

陽性对照：

名称: _____ メーカー名: _____ Lot. _____

NR50値：1回目（手書き）_____（解析ソフト）_____

NR50値：2回目（手書き） （解析ソフト）

平均NR50値： (手書き) _____ (解析ソフト) _____

備考：

Circumstance	Percentage (%)
If someone is attacking you	85
If someone is threatening you	65
If someone is harassing you	45
If someone is insulting you	35
If someone is annoying you	15

3、追試験結果

[illegible]

N R50値：1回目（手書き） _____ （解析ソフト） _____
 N R50値：2回目（手書き） _____ （解析ソフト） _____
 平均 N R50値： （手書き） _____ （解析ソフト） _____

陽性对照：

名称: _____ ヌーカ一名: _____ Lot. _____

NR50値：1回目（手書き）_____（解析ソフト）_____

NR50値：2回目（手書き）_____（解析ソフト）_____

平均NR50値：（手書き）_____（解析ソフト）_____

備考：

