

**培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 を用いた  
皮膚刺激性試験プロトコール**

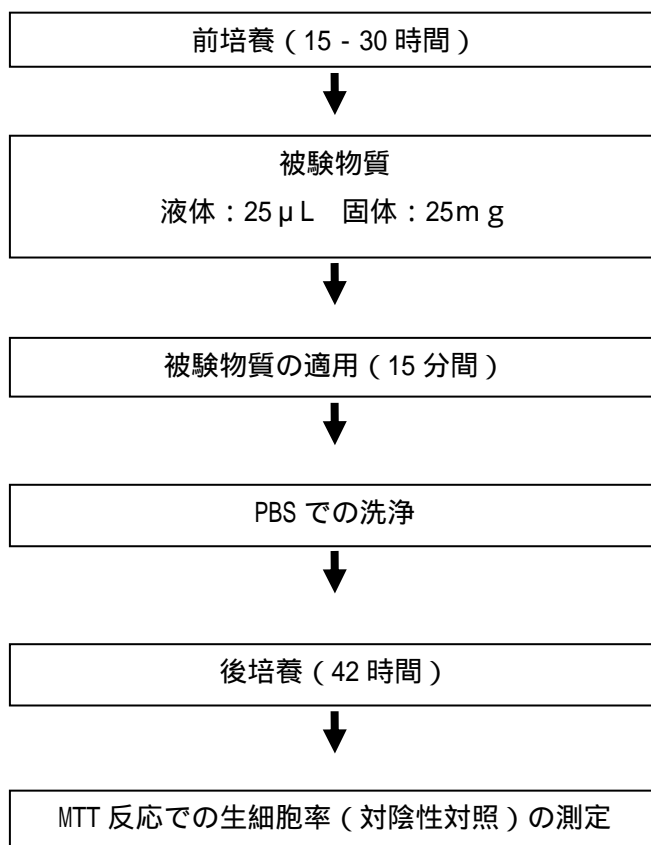
## 目次

<b>1. 皮膚刺激性試験法について</b> .....	<b>1</b>
1.1 試験の概要 .....	1
1.2 作業スケジュール例 .....	2
1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例 .....	3
<b>2. 準備</b> .....	<b>4</b>
2.1 皮膚刺激性試験セット セット構成 .....	4
2.2 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意 .....	4
2.3 消耗品 .....	4
2.4 その他 .....	4
2.4.1 機器・器具類 .....	4
2.4.2 消耗品類 .....	5
<b>3. 試験方法</b> .....	<b>5</b>
3.1 事前準備 .....	5
3.1.1 陽性対照物質 .....	5
3.1.2 陰性対照物質 .....	5
3.1.3 リン酸緩衝液充填洗浄用ポリ洗浄ピン .....	5
3.1.4 MTT 培地 .....	5
3.2 試験操作 .....	6
3.2.1 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (被験物質暴露前日 (-1 日目)) .....	6
3.2.2 被験物質の適用と洗浄 (被験物質暴露日 (0 日目)) .....	7
3.2.3 後培養 (被験物質暴露日 ~ 2 日後 (0-2 日目)) .....	9
3.2.4 MTT 試験 (被験物質暴露 2 日後 (2 日目)) .....	9
3.2.5 MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出と測定 (被験物質暴露 2~3 日後 (2-3 日目)) .....	10
<b>4. 評価</b> .....	<b>12</b>
4.1 試験成立条件 .....	12
4.2 判定基準 .....	12
<b>5. 特殊な被験物質の検討</b> .....	<b>13</b>
5.1 MTT 試験系に干渉する被験物質の検出試験 .....	13
5.1.1 培養表皮を染色してしまう被験物質の検出 .....	13
5.1.2 MTT 還元作用のある被験物質の検出 .....	14

培養表皮 LabCyte EPI - MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験を実施するためのプロトコールを示します。

## 1. 皮膚刺激性試験法について

### 1.1 試験の概要



#### 刺激性判定

生細胞率 50%	刺激性
生細胞率 > 50%	非刺激性

## 1.2 作業スケジュール例

	月	火	水	木	金	土	日	月					
8:00	出荷日	納品(地域によって午前または午後)	前培養 (15 - 30 時間)	後培養 (42 時間)	後培養 (42 時間)	抽出	抽出	抽出					
9:00													
10:00												測定	
11:00										MTT 反 応操作			
12:00										MTT 反 応(3 時 間)			
13:00													
14:00													
15:00										抽出操 作			
16:00									適用・洗 浄				
17:00								前培養 操作			抽出		
18:00		前培養 (15 - 30 時間)	後培養 (42 時 間)										
19:00													

### 1.3 適用・洗浄のタイムスケジュール例

		被験物質												
No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0min		添加												
1min	1 分 間 暴 露		添加											
2min				添加										
3min					添加									
4min						添加								
5min							添加							
6min								添加						
7min									添加					
8min										添加				
9min											添加			
10min												添加		
11min													添加	
12min														添加
13min	作 業 時 間													
14min														
15min														
16min		洗浄												
17min			洗浄											
18min				洗浄										
19min				洗浄										
20min					洗浄									
21min						洗浄								
22min							洗浄							
23min								洗浄						
24min									洗浄					
25min										洗浄				
26min											洗浄			
27min												洗浄		

上記、1分間隔での操作を必ずしも行う必要はありません。作業の習熟度によっては1~3分間隔での操作をお奨めいたします。

#### 1人での作業の場合

1度に処理できる検体数は12検体です。各被験物質につき3個の培養表皮を使用します(N=3)。このため、1人で1度に試験できる被験物質は4つです。

1プレート(24ウェル)では、上記操作を2回繰り返してください。

陰性・陽性対照は1回目で行うことで、2回目に行う必要はありません。

#### 2人での作業の場合

1人が適用、もう1人が洗浄を行うことで、1度に24検体を処理することが可能です。

## 2. 準備

### 2.1 皮膚刺激性試験セット セット構成

#### 【皮膚刺激性試験セットの構成】

内容	数量	用途
LabCyte EPI-MODEL24 プレート	1	寒天培地中に固定された培養カップ上のヒト 3 次元培養表皮 24 個、常温保存
アッセイ培地 30ml	2	培養用の基礎培地、冷蔵保存
24 ウェルアッセイプレート	4	アッセイ用の空プレート、室温保存

### 2.2 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意

LabCyte EPI-MODEL24 プレートは、未開封のまま、培養開始まで常温保存してください。開封後は、すべての培養表皮の培養を開始してください。開封後の再保存はしないで下さい。

LabCyte EPI-MODEL24 に使用しているヒト表皮細胞は、HIV, HBV, HCV, HPV 陰性である健常ドナー由来の細胞を使用していますが、ヒト由来原材料を用いた製品であることから、LabCyte EPI-MODEL24 の取扱いには十分に注意していただき、各施設のバイオセーフティ基準に基づいて取り扱って下さい。

### 2.3 消耗品

本セットを用いて皮膚刺激性試験を行う際に必要な消耗品を示します。

#### 【必要な消耗品】

消耗品	用途・ご用意いただく量の目安
SLS	陽性対照として使用。 500mg/10mL: 5% w/v 溶液
蒸留水	陰性対照として使用。 数 mL (1 検体 25 $\mu$ L 必要)
リン酸緩衝液	被験物質の洗浄に使用。 500ml (1 プレート分)
滅菌綿棒	洗浄後、培養カップを拭くのに使用。 24 本 (1 プレート分)
MTT 試薬	生細胞数測定に使用。 6mg (1 プレート分) : 0.5mg/mL 溶液
イソプロパノール	MTT 反応後の抽出操作に使用。 10mL 程度 (1 プレート分)
96 ウェル測定プレート	マイクロプレートリーダーでの吸光度測定に使用。

別売品として取り扱っております。

MTT 試薬 (25mg) 型番 : 403026

96 ウェル測定プレート (1 枚) 型番 : 406096

### 2.4 その他

#### 2.4.1 機器・器具類

- ・安全キャビネット (又はクリーンベンチ)
- ・ウォーターバス (37 )
- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 、5%CO<sub>2</sub>, 高湿度を維持可能であるもの)

- ・オートクレーブ
- ・96 ウェルマルチプレートリーダー（必要フィルター：570nm、650nm）
- ・精密天秤（0.1mg）
- ・アスピレーター
- ・ストップウォッチ
- ・マイクロピペット（10-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L）
- ・先の尖ったピンセット（滅菌済み）
- ・マイクロスパーテル（滅菌済み）
- ・ビーカー（容量1～2L：滅菌済み）
- ・滅菌可能なポリ洗浄ビン（容量500～1,000mL：滅菌済み）

#### 2.4.2 消耗品類

- ・マイクロピペット用チップ（滅菌済み：10-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L）
- ・マイクロチューブ（1.5mL）
- ・スカルペル

### 3. 試験方法

\* 3.1.1～3.1.4、3.2.1～3.2.4 の操作はすべて、安全キャビネット（又はクリーンベンチ）内で無菌的に実施して下さい。

\* 上記以外は無菌操作の必要はありませんが、**2.2 項 LabCyte EPI-MODEL24 取扱い上の注意**を参照の上、試験を実施してください。

#### 3.1 事前準備

##### 3.1.1 陽性対照物質

SLS（500mg）を正確に秤量します。

メスシリンダー、あるいはメスフラスコ内に秤量した SLS を入れて、蒸留水を添加して 10mL にメスアップし、陽性対照溶液を調製します（終濃度：5% w/v）。

##### 3.1.2 陰性対照物質

蒸留水を使用します。

##### 3.1.3 リン酸緩衝液充填洗浄用ポリ洗浄ビン

ポリ洗浄ビンを、オートクレーブで滅菌しておきます。

滅菌したポリ洗浄ビンに、リン酸緩衝液を無菌操作で充填します。

##### 3.1.4 MTT 培地

MTT をアッセイ培地に溶解して、MTT 培地を調製します（終濃度：0.5mg/mL）。

必要に応じて、超音波洗浄装置やボルテックスミキサーなどを利用して完全に溶解して

ください。

溶解後はディープフリーザーでの保存が可能です。常温・冷蔵での保存では反応性が失われますので、ご注意ください。

### 3.2 試験操作

EPI-MODEL24 の基本的な取扱い方法は「取扱説明書」もご参考ください。

#### 3.2.1 培養表皮 LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (被験物質暴露前日 (-1 日目))

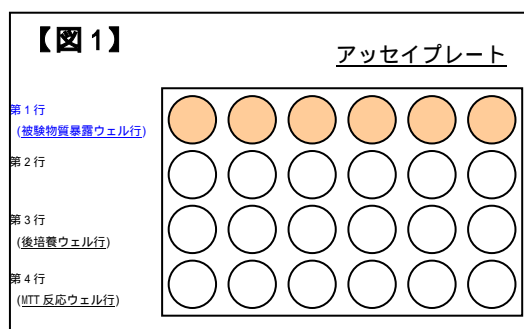
アッセイ培地を 37 °C のウォーターバスで約 30 分間温めます。

アッセイプレート第 1 行 (被験物質暴露ウェル行) に温めたアッセイ培地を 0.5mL ずつ分注します。各被験物質につき 3 個の培養表皮を使用します (N=3)

##### 【図 1】

LabCyte EPI-MODEL24 プレートをアルミ包装袋より取り出します。

プレートのフタを開け、培養表皮が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。



##### 注意点

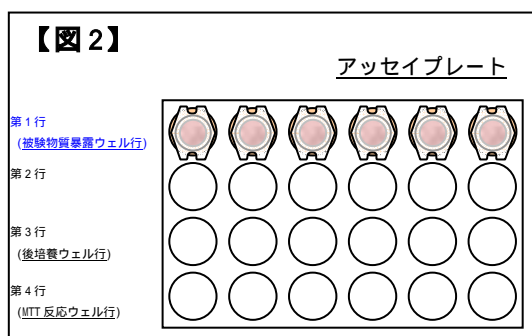
- \* 培養カップ内の培養表皮表面には触れないように注意して下さい。
- \* 培養カップの外側に付着している寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いて下さい。

培養カップをアッセイ培地の入った被験物質暴露ウェル行の各ウェルに移します。

##### 【図 2】

##### 注意点

- \* 培養カップ底面と培地の間に気泡が入らないように注意して下さい。



アッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れます。

3.2.2 項 被験物質の適用と洗浄まで、一晚 (15 ~ 30 時間位) 静置します。

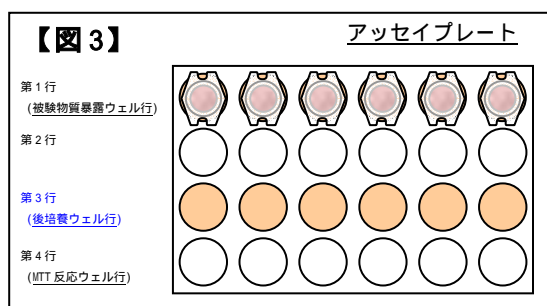
### 3.2.2 被験物質の適用と洗浄（被験物質暴露日（0日目））

#### 3.2.2.1 後培養用ウェル行の準備

アッセイ培地を 37 のウォーターバスで約 30 分間温めます。

アッセイプレートに CO<sub>2</sub> インキュベーターから取り出します。

アッセイプレートのフタをあげ、第 3 行（[後培養用ウェル行](#)）の各 3 ウェルに、温めたアッセイ培地を 1.0mL ずつ分注します。



【図 3】

アッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れます。  
被験物質の適用開始まで、静置します（0～12 時間位）。

#### 3.2.2.2 被験物質の適用

アッセイプレートに CO<sub>2</sub> インキュベーターから取り出します。

被験物質を、[被験物質暴露用ウェル行](#)の培養表皮の表皮組織表面に添加します。各被験物質につき 3 個の培養表皮を使用します（N=3）。

**液体の場合：** マイクロピペットを用いて 25  $\mu$ L 添加します。培養カップ内の培養表皮の中央部付近にチップを近づけ、注意深く添加してください。添加後、アッセイプレートにフタをして、プレート横側を軽くタッピングすることにより、全体にゆきわたらせませます。

\* 粘性状液体の場合は、マイクロピペット用チップセルセイバー（広口）タイプを使用して下さい。

【写真 1】

被験物質の性状については、事前にピペット操作等で確認しておき、試験に臨んで下さい。

【写真 1】粘性液体の適用チップ



**固体の場合：** 精密天秤で 25mg（ $\pm$ 1mg）を正確に事前に秤量しておきます。まず蒸留水 25  $\mu$ L を添加し、その上に秤量した被験物質を培養表皮上に添加し、必要に応じてマイクロスパーテルで均等にゆきわたらせて下さい。

【写真 2】

【写真 2】固体の適用



各被験物質は、ひとつの培養表皮につき、おおよそ1~3分間隔で適用します。

**1.3 項 適用・洗浄のタイムスケジュール例**を参照ください。

アッセイプレートにフタをして、**15 分間**、作業台上で静置します。

#### 注意点

\* 作業時以外は、アッセイプレートには必ずフタをして下さい。安全キャビネット（又はクリーンベンチ）内は空気循環されていますので、フタを開けたままでは添加した被験物質量が変動する場合があります。

#### 3.2.2.3 被験物質の洗浄

被験物質暴露 **15 分 (±30 秒)** 後、アッセイプレートのフタをあけ、培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

リン酸緩衝液充填洗浄用ポリ洗浄ピンを用いて、ビーカー上で培養カップ内にリン酸緩衝液を培養表皮表面に直接吹き付けるようにして、培養カップ内に充填します。

【写真 3】

【写真 3】 洗浄



#### 注意点

\* 表皮組織表面を傷つけないように注意しておこなってください。

培養カップを傾けてカップ内のリン酸緩衝液をビーカー内に廃棄します。必要に応じて培養カップをビーカー上で一回タッピングしてカップ内のリン酸緩衝液を除去します。

【写真 4】

【写真 4】 洗浄



の操作を 10 回以上 (なるべく多く) 繰り返し、培養カップ内部の被験物質を完全に取り除きます。

最終洗浄後に培養カップ外に付着したリン酸緩衝液を、滅菌綿棒で取り除きます。

【写真 5】

培養カップ内には、滅菌綿棒を使用しないで下さい。培養カップ内に残存するリン酸緩衝液が残存する場合についても、残存させたままとします。

【写真 5】 洗浄



後培養用ウェル行の対応する同じ列の各ウェルに、洗浄した培養表皮を移します。

【図4】

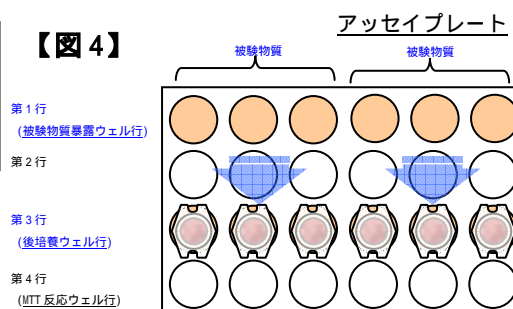
**注意点**

\* 培養カップ底面と培地の上に気泡が入らないように注意して下さい。

～ の洗浄操作は、各被験物質の添加順に、ひとつの培養表皮につき、おおよそ1～3分の間隔で洗浄します。

**1.3項 適用・洗浄のタイムスケジュール例**を参照ください。

【図4】



**3.2.3 後培養 (被験物質暴露日～2日後 (0-2日目))**

洗浄した培養表皮を移したアッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れます。

42時間 (±1時間) 静置します。

**3.2.4 MTT 試験 (被験物質暴露2日後 (2日目))**

**3.2.4.1 MTT 反应用ウェル行の準備**

MTT 培地を 37 のウォーターバスで約 30 分間温めます。

アッセイプレートを CO<sub>2</sub> インキュベーターから取り出します。

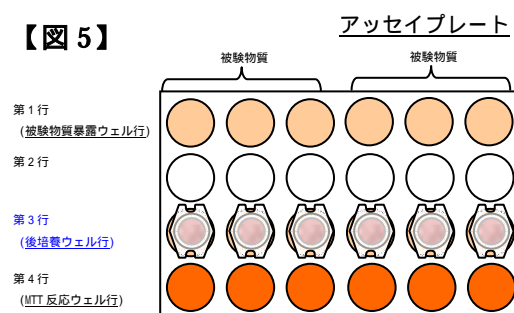
アッセイプレートのフタをあけ、第4行 (MTT 反应用ウェル行) に温めた MTT 培地を 0.5mL ずつ分注します。

【図5】

アッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れます。

MTT 反応開始直前まで静置します (0～12 時間位)。

【図5】



### 3.2.4.2 MTT 反応

後培養 42 時間 (±1 時間) 後のアッセイプレート を CO<sub>2</sub> インキュベーター から取り出します。

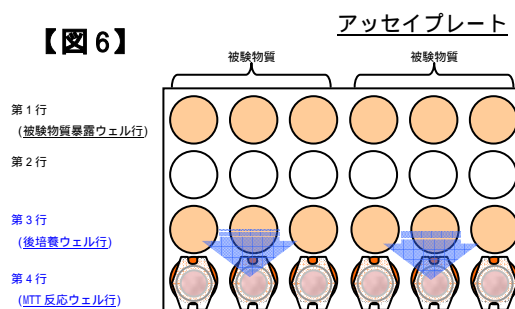
後培養の終了した培養表皮を [後培養用ウェル行](#) から取り出し、[MTT 反应用ウェル行](#) の対応する同じ列のウェルに移します。

【図 6】

#### 注意点

- \* 培養カップ底面の液垂れが、他のウェルに混入しないよう慎重に行ってください。
- \* 培養カップ底面と培地の上に気泡が入らないように注意してください。

【図 6】



培養表皮を移したアッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れます。

3 時間 (±5 分) 静置します。

### 3.2.5 MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出と測定 (被験物質暴露 2~3 日後 (2-3 日目))

#### 3.2.5.1 MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出

MTT 反応 3 時間 (±5 分) 後、アッセイプレート を CO<sub>2</sub> インキュベーター から取り出します。

アッセイプレートのフタをあけ、[後培養用ウェル行](#) の各ウェルの培養カップ内の培養表皮をピンセットでつまんで取り出します。

【写真 6】

#### 注意点

- \* 被験物質によって培養表皮組織構造が壊れてピンセットでつまめない場合、培養カップ底面のメンブランフィルターごとスカルペルなどで切り取る、又はマイクロスポイトなどを用いて表皮組織をかき集めて下さい。

【写真 6】培養表皮の剥離



培養表皮片を 1.5mL マイクロチューブに入れます。

マイクロチューブにイソプロパノール 300 μL を入れ、培養表皮を完全に浸漬します。

冷暗所 (冷蔵庫内でも可) で一晩以上 (約 15 時間以上) 静置して色素を完全に抽出します。

**注意点**

- \* チューブを完全に密栓して下さい。
- \* 時々、振とうすることにより効果的に抽出をおこなうことができます。

マイクロチューブ内の溶液を良く混合します。

**注意点**

- \* 細かな表皮組織片が浮遊している場合は、沈むまでしばらく静置するか、遠心装置があれば軽く遠心して下さい。

各マイクロチューブ内の溶液 200  $\mu$ L を 96 ウェルプレートの各ウェルに入れます。

- \* ブランクとして、イソプロパノール 200  $\mu$ L を設定します。
- \* 【図 8】に 96 ウェルプレートへの割り付け例を示します。

**【96 ウェルプレートへの割り付け例】**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク											
B	蒸留水-1 1-1	被験物質 3-1	被験物質 3-1	被験物質 5-1	被験物質 7-1	被験物質 9-1	被験物質 11-1	被験物質 13-1	被験物質 15-1	被験物質 17-1	被験物質 19-1	
C	蒸留水-2 1-2	被験物質 3-2	被験物質 3-2	被験物質 5-2	被験物質 7-2	被験物質 9-2	被験物質 11-2	被験物質 13-2	被験物質 15-2	被験物質 17-2	被験物質 19-2	
D	蒸留水-3 1-3	被験物質 3-3	被験物質 3-3	被験物質 5-3	被験物質 7-3	被験物質 9-3	被験物質 11-3	被験物質 13-3	被験物質 15-3	被験物質 17-3	被験物質 19-3	
E	5% SLS-1 2-1	被験物質 4-1	被験物質 4-1	被験物質 6-1	被験物質 8-1	被験物質 10-1	被験物質 12-1	被験物質 14-1	被験物質 16-1	被験物質 18-1	被験物質 20-1	
F	5% SLS-2 2-2	被験物質 4-2	被験物質 4-2	被験物質 6-2	被験物質 8-2	被験物質 10-2	被験物質 12-2	被験物質 14-2	被験物質 16-2	被験物質 18-2	被験物質 20-2	
G	5% SLS-3 2-3	被験物質 4-3	被験物質 4-3	被験物質 6-3	被験物質 8-3	被験物質 10-3	被験物質 12-3	被験物質 14-3	被験物質 16-3	被験物質 18-3	被験物質 20-3	
H												

**3.2.5.2 抽出液の吸光度測定**

96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、570nm、および 650nm の吸光度を測定し、**吸光度 (570nm) から吸光度 (650nm) を差し引いた値を測定値とします。**

下記に計算値を示します。

$$\text{測定値} = [\text{検体の吸光度}(570\text{nm}) - \text{ブランクの吸光度}(570\text{nm})] - [\text{検体の吸光度}(650\text{nm}) - \text{ブランクの吸光度}(650\text{nm})]$$

下記式より被験物質の生細胞率を計算します。

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

\* N=3 の試験から算出した平均値

## 4. 評価

### 4.1 試験成立条件

本法における試験成立条件は、下記条件にいずれも適合する場合とします。

- ・ 生細胞数： 陰性対照の吸光度測定値平均 0.7
- ・ 陽性対照： 5%SLS（陽性対照）の生細胞率 40%

### 4.2 判定基準

本法における判定基準を示します。

生細胞率	判定
生細胞率 50%	刺激性
生細胞率 > 50%	非刺激性

#### 【判定フローチャート】

<u>陰性対照の生細胞数</u> 吸光度測定値（平均値） 0.7 <u>陽性対照（5%SLS）が刺激性の判定</u> 生細胞率平均 40%
--

（どちらかが No） 試験不成立

（いずれも Yes）

<u>被験物質の評価</u> 生細胞率(%) [N=3 の平均値] 50%
--

（Yes） 皮膚刺激性と判定

（No）

皮膚非刺激性と判定

## 5. 特殊な被験物質の検討

### 5.1 MTT 試験系に干渉する被験物質の検出試験

MTT 試験系を干渉する被験物質は、下記の 2 種類があります。

培養表皮を染色してしまう被験物質

MTT 還元作用のある被験物質

培養表皮を染色する被験物質は、培養表皮から抽出液に移行して吸光度測定値に影響を及ぼす可能性があります。MTT 還元作用のある被験物質は、洗浄後の培養表皮に残留した被験物質が MTT を還元してフォルマザンが産生することにより、吸光度測定値に影響を及ぼす可能性があります。

これらの被験物質を検出する試験法を下記に示します。

#### 5.1.1 培養表皮を染色してしまう被験物質の検出

##### 5.1.1.1 ステップ 1 (予備検討)

被験物質を液体の場合 25  $\mu$ L、固体の場合 25mg ずつ、0.5mL の蒸留水が入ったアッセイプレートに添加します。対照として、0.5mL の蒸留水が入ったウェルを準備します。アッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、15 分間静置します。15 分後、プレートを静かに攪拌し、目視で蒸留水の着色を確認します。明らかな着色が確認できる場合は、培養表皮を染色する可能性がある被験物質として、ステップ 2 を実施します。明らかな着色を確認できない場合は、培養表皮を染色しない被験物質と判定します。

##### 5.1.1.2 ステップ 2 (培養表皮を用いた検討)

5.1.1.1 項 ステップ 1 (予備検討) で明らかな着色を示した被験物質、および陰性対照として蒸留水を、液体の場合 25  $\mu$ L、固体の場合 25mg ずつ、培養表皮上に添加します。試験は、3.2 項 試験操作 に従って実施します。ただし、3.2.4 項 MTT 試験 の操作では、組織の染色を確認するため、MTT 培地の代わりにアッセイ培地を添加します。

下記計算式に従い、被験物質による培養表皮の染色率を計算します。

$$\text{被験物質染色率 (\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値} - \text{陰性対照の測定値}}{\text{陰性対照の測定値}} \times 100$$

被験物質染色率が、5%未満の場合には、測定値を補正する必要はありません。

被験物質染色率が 5%以上 30%以下の場合には、下記式に従って、測定値を補正します。

$$\text{補正測定値} = \text{被験物質の測定値 (MTT 培地)} - \text{被験物質の測定値 (アッセイ培地)}$$

被験物質染色率が 30%より高い場合には、本試験法に適合できない被験物質と判定します。ただし、**3.2.5.2 項 抽出液の吸光度測定**に従って算出した生細胞率(%)が 50%未満の場合には、刺激性と判定され、測定値の補正、あるいは本試験法に適合しない物質と判定する必要はありません。

## 5.1.2 MTT 還元作用のある被験物質の検出

### 5.1.2.1 ステップ 3 (予備検討)

被験物質を液体の場合 25 μL、固体の場合 25mg ずつ、0.5mL の MTT 培地が入ったアッセイプレートに添加します。対照として、0.5mL の MTT 培地が入ったウェルを準備します。アッセイプレートにフタをして、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、1 時間静置します。15 分後、プレートを静かに攪拌し、目視で MTT 培地の着色を確認します。明らかにフォルマザンの生成(青紫色の沈殿物)が確認できる場合は、培養表皮を染色する可能性がある被験物質として、ステップ 4 を実施します。

### 5.1.2.2 ステップ 4 (培養表皮を用いた検討)

**5.1.2.1 項 ステップ 3 (予備検討)**で明らかな着色を示した被験物質、および陰性対照として蒸留水を、液体の場合 25 μL、固体の場合 25mg ずつ、培養表皮上に添加します。試験は、**3.2 項 試験操作**に従って実施します。

ただし、培養表皮は、-20 以下の冷凍庫で 24 時間以上静置して凍結し細胞死に至らせたモデル(凍結死)を使用します。

下記計算式に従い、被験物質による培養表皮の染色率を計算します。

$$\text{被験物質染色率(\%)} = \frac{\text{被験物質の測定値} - \text{陰性対照の測定値}}{\text{陰性対照の測定値}} \times 100$$

被験物質染色率が 30%以下の場合には、下記式に従って、測定値を補正します。

$$\text{補正測定値} = \frac{\text{被験物質の測定値(生存)} - (\text{被験物質の測定値(凍結死)} - \text{陰性対照の測定値(凍結死)})}{1}$$

被験物質染色率が 30%より高い場合には、本試験法に適合できない被験物質と判定します。ただし、**3.2.5.2 項 抽出液の吸光度測定**に従って算出した生細胞率(%)が 50%未満の場合には、刺激性と判定され、測定値の補正、あるいは本試験法に適合しない物質と判定する必要はありません。