

18. 8月上旬に、大野がヨーロッパに出張し ECVAM の関係者と、本バリデーション研究への協力を求める。実験への直接参加は、コード化した試料の送付に出入国管理上の困難があり、日程調整も難しいので、安易に承諾することはできないであろう。しかしプロトコルチェック等、可能な範囲で協力してもらうことは歓迎する。細部は大野の判断に委ねる。
19. 規模としては、1人が取り扱える労力から考えて、被験物質を6物質程度にする必要がある。
20. 光源設備が少なく、一施設で通常の業務と離れて3週間の時間が必要なことから考えて、参加施設数は自己光源を持っている資生堂、食薬研の他では、多くても $2 \times 3 = 6$ 施設が最大であろう。したがって合計8施設が限度である。
21. 厚生労働科学研究班と共同で研究を進める部分があって差し支えない。
22. 資生堂は試験遂行上のノウハウを含めて技術研修の指導を担当する。技術研修は食薬研で11月中旬に行うが、事前に必要設備等の点検を食薬研で行う。

以上

光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書

2003年10月16日 当初作成者 吉村 功
2003年10月22日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月05日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月24日 改訂責任者 吉村 功
2004年5月6日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（以下「本学会」という）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。

本研究には、試行錯誤的な側面があるので、研究遂行中に計画の変更を余儀なくされることがある。その際には本計画書を逐次改定し、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を明記する。

1. 研究目的

本研究の目的は、酵母光生育阻害試験（以下、「酵母試験」という）と赤血球光溶血試験（以下、「溶血試験」という）とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム（以下、「試験バッテリー」という）を用いて被験物質の光毒性評価を行うとき、その結果が複数の施設間でどの程度変動するかを、多施設バリデーションを行い定量的に把握することである。もちろん試験バッテリーで評価したいのは、被験物質の生体内（*in vivo*）光毒性を予測することであるから、そのためにどのようなデータ評価法、判定規準が妥当かについての検討も研究目的の内に入る。

2. 実行組織

丁寧に言うところ「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステムバリデーション研究実行委員会」というべきであるが、あまりにも長いので、正式名称を「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」として、略称を「光バリ実行委」とする。

メンバーは次の13人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、小島肇夫（メナード）、田中憲徳（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）、藤田百合子（東洋ビューティ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、川端留美（大鵬）、吉村功（理科大、委員長）

3) 評価委員会代表：

大野泰雄（国立衛研）

4) 技術担当：

穂谷昌利（資生堂）、森眞輝（資生堂）、若栗忍（食薬研）

研究遂行においては、大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得る。

技術研修、機器手配、試料手配については、資生堂安全性・分析センター、食品薬品安全センター秦野研究所、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部の協力を得る。

3. 光毒性試験代替法についての状況

EU/COLIPA では、光毒性試験代替法として、Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験代替法を取り上げて、施設間バリデーションを行っている。その概要は添付資料 2 の通りである。

これに対して日本では、資生堂安全性・分析センターが試験バッテリーの研究を行い、施設内での結果では十分利点を持っていることが証明されたとしている。その内容は添付資料 3-1,3-2 の通りである。

しかしながら本学会評価委員会では、添付資料 3-3 に示すように、多施設でのバリデーションが行われておらず、試験バッテリーの施設間差が確かめられていないという判断を下し、これを研究することを本学会バリデーション委員会に委託した。

バリデーション委員会は、この委託を受けて、2003 年 7 月 29 日に、添付資料 4 に示す議論を行い、研究参加施設を公募し、光バリ実行委を組織し、研究を行うこととした。これが本研究である。

4. 研究日程

2003 年 9 月 30 日までに、参加施設確定、実行委員会確定、基本プロトコール作成
11 月 13 日、14 日に技術研修会を開催
12 月末までに各施設が予備実験等の自己研修
2004 年 1 月に試験開始
2004 年 2 月末に中間集計、中間報告
4 月末までに、実験者が結果を実行委員会に報告
8 月末までに、実行委員会が報告書をまとめる

5. 実験参加施設

実験参加施設は、この研究の公募に参加を表明した次の 6 施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：岡本裕子、谷川浩子）

資生堂安全性・分析センター（実験担当者：穂谷昌利、森眞輝）

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

東洋ビューティ（株）研究開発部（実験担当者：藤田百合子）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：長谷川靖司）
マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：土肥孝彰）

6. 試験バッテリーの内容

本研究が対象とする試験バッテリーの試験内容は、添付資料 5-1,5-2,5-3 の通りである。

7. 被験物質

被験物質の候補物質リストは添付資料 6 の通りである。

候補物質リストの中から、実施可能性を考慮して、陽性、中間、陰性、各 3 物質の合計 9 物質を大野が選び被験物質とする。各施設には 6 物質（陽性対照物質を含めると 8 物質）を送付する。すなわち、薬物コードと実験施設との割付表は東京理科大（責任者吉村）が作成し、薬物コードへの被験物質の割付と配布は国立衛研（責任者大野）が行う。

被験物質が具体的に何かはブラインドとし、試料にはコードをつけて配布する。ブラインドであるから、実験者は被験物質の使用、保管、廃棄のすべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

8. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle 社の SOL500 とする。光源の手配は、田中が指示する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源（間に合わないときは研究班の光源 3）

コーセー（東京）研究班の光源 1

東洋ビューティ（大阪）研究班の光源 2

メナード（名古屋）研究班の光源 3

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、大野が指示する。共通消耗品の費用は、厚生労働科学研究班が負担する。

吸光度は波長 540nm と 525nm の 2 種類で測定するが、主解析は 540nm フィルターを使った測定値に基づいて行う。525nm での測定が測定機器の関係で困難なときは、520nm あるいは 530nm で代用する。赤血球は、実験施設が購入する。

測定機器、実験条件について、GLP 準拠で考えて必要なものはすべて記録しておくこととする。各実験施設は、その記録のコピーを大野に送った上で、原本を実験終了後 5 年間保管し、実行委員長から記録内容について問い合わせがあったら、記録を確かめて回答を行うものとする。

9. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

配布試料や培養プレート等光バリ実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は、各

施設で自弁とする。

10. 技術研修と予備実験

技術研修は、11月13, 14日に、食品薬品安全性センター秦野研究所で、添付資料7の要領で行う。

予備実験は、12月末までに各参加施設が自主的に行う。

11. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、添付資料8にある指定データシートに記入して、電子ファイル及び測定機器のプリントアウト又は測定結果を落とした電子ファイルのプリントアウト、酵母試験の場合はプリントアウトした指定データシートへの手書き測定結果のコピーを大森（京都大学）と吉村（東京理科大学）に送付する。記入要領は技術研修会で大森が説明する。

データ内容についての疑問は、吉村または大森が各実験者に問い合わせる。

報告されたデータは東京理科大学（責任者 吉村）と京都大学（責任者 大森）が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

大野は、各施設から送られてきた GLP 準拠の記録のコピーを、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと、光バリ実行委が判断するまで保管する。

陰性、陽性の判定はプロトコールに従って各施設で行うが、それとは別に、大森、吉村が、各被験物質に対する測定値の施設間、施設内変動の解析、各試験での用量反応関係の解析、判定基準の妥当性の解析を行う。

赤血球溶血試験では540nm フィルターを用いた測定値で主解析を行う。

12. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

13. 結果の公表

2004年2月末に中間解析を行い、得られた結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

14. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は森、穂谷に問い合わせること。

光源についての疑問は、若栗に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、大野に問い合わせること。

データシートについての疑問は、大森に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

15. 添付資料リスト

1. 光バリ実行委名簿
2. Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価報告
3. 提案法の内容に関する資料
 - (3-1) 杉山論文
 - (3-2) 森論文 (10月22日現在のドラフト)
 - (3-3) 大野報告書
4. バリデーション委員会議事録(2003.7.29)
5. 試験標準手順書
 - (5-1) SOP-1
 - (5-2) SOP-2
 - (5-3) SOP-3
6. 被験物質候補リスト
7. 技術研修計画
8. データシート
 - (8-01), (8-02), (8-03), (8-04), (8-05), (8-06), (8-07), (8-08), (8-09), (8-10), (8-11), (8-12), 以上シート①~⑫
 - (8-13) 酵母光生育阻害試験用シートの説明文書
 - (8-14) 赤血球光溶血試験用シートの説明文書

以上

2003年10月22日の改訂内容

1. 杉山真理子が職場移動をして実行委員から外れたこと、アイピー化粧品が実験参加を見合わせたことにより、西澤愛が実行委員会から外れたこと。
2. 添付資料リストをつけたこと。
3. 解析内容をより具体的なものにしたこと。
4. 上記変更に伴う変更を行ったこと。
5. 細部の字句を修正したこと。

以上5点 文責 吉村 功

2003年11月5日の改訂内容

1. 被験物質を9物質にした理由が「実施可能性である」としたこと。
2. 細部の字句の訂正

以上2点 文責 吉村 功

2003年11月24日の改訂内容

1. 525nmのフィルターが購入できないことが分かったので、それに関することを変更した。
2. GLPに準拠した記録を保管することと、コピーを大野に送ることを明記した。
3. データは大森と吉村の両方に送ることを明記した。
4. 記録シートの説明文書を添付文書とし、シート番号を変えた。
5. 細部の字句の訂正

以上5点 文責 吉村 功

2004年5月14日の改訂内容

1. 本研究の内容を表す標題として、改訂前計画書では「研究目的」の項で「酵母光生育阻害試験光溶血性試験の組み合わせを用いて被験物質の光毒性評価を行う」と書き、「実行組織」の項で、「酵母光生育阻害試験と光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験のバリデーション」と書いてあったが、この試験法の提案者のSOPには、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム」という表現が使われており、かつ、2004年5月6日の検討会大森崇委員の報告書が「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステムバリデーション研究」という表現が用いられていたため、混乱を避けるために、研究計画書の該当部分にその表現を用いることにした。 文責 吉村 功

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを
組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム
バリデーション研究

データ解析報告書

(ver. 1.0)

2004年5月6日 作成者 大森 崇

目次

第1章 研究方法とデータ解析の基本方針	
1.1. はじめに	・・・A-2
1.2. データ解析の目的	・・・A-3
1.3. 研究の組織形態と研究の手順	・・・A-4
1.4. データ解析の方針	・・・A-7
1.5. 中間集計について	・・・A-8
第2章 データクリーニング	
2.1. はじめに	・・・B-2
2.2. データシートファイル	・・・B-3
2.3. データクリーニングの手順と範囲	・・・B-6
2.4. 提出されたデータシートファイル数	・・・B-7
2.5. データクリーニングの結果	・・・B-8
第3章 実験実施施設、被験物質、データの取り扱い	
3.1. はじめに	・・・C-2
3.2. 実験実施施設	・・・C-3
3.3. 物質リストと割付	・・・C-4
3.4. <i>In vivo</i> 試験の結果	・・・C-5
3.5. 提出されたデータシートファイルとデータベース	・・・C-6
3.6. プロトコールからの逸脱を含めたデータファイルの扱い	・・・C-8
3.7. データ解析に用いたソフトウェア	・・・C-10
第4章 バッテリーシステムの結果	
4.1. はじめに	・・・D-2
4.2. 個々の試験法の陽性対照物質の施設内再現性	・・・D-4
4.3. バッテリーシステムの施設内再現性	・・・D-7
4.4. バッテリーシステムの施設間再現性	・・・D-13
4.5. 赤血球光溶血試験を 52X とした場合のバッテリーシステムの結果	・・・D-14

第5章 酵母光生育阻害試験の結果

- 5.1. はじめに . . . E-2
- 5.2. 使用された溶媒について . . . E-3
- 5.3. 陽性対照の分布 . . . E-4
- 5.4. 阻止帯の差の用量反応関係 . . . E-7
- 5.5. 照射、非照射における阻止帯の用量反応関係 . . . E-17

第6章 赤血球光溶血試験[540nm]の結果

- 6.1. はじめに . . . F-2
- 6.2. 使用された溶媒について . . . F-3
- 6.3. 陽性対照の用量反応関係 . . . F-4
- 6.4. 溶血度の差の用量反応関係 . . . F-6
- 6.5. 照射、非照射における溶血度の用量反応関係 . . . F-16

第7章 赤血球光溶血試験[525nm]の結果

- 7.1. はじめに . . . G-2
- 7.2. 使用された溶媒について . . . G-3
- 7.3. 陽性対照の用量反応関係 . . . G-4
- 7.4. 溶血度の差の用量反応関係 . . . G-6
- 7.5. 照射、非照射における溶血度の用量反応関係 . . . G-16

第8章 データ解析結果のまとめ

- 8.1. 結果のまとめ . . . H-2

付録 A データクリーニングの手順

- A.1. データクリーニングの実施手順 . . . 付録 A-2
- A.2. チェックリスト . . . 付録 A-3
- A.3. 管理用データシートファイルのファイル名のルール . . . 付録 A-7
- A.4. 管理用データシートファイルの特別な処理 . . . 付録 A-9

付録 B データベースと解析に用いたプログラム

- B.1. 各データベースに含む変数一覧 . . . 付録 B-2
- B.2. データ解析に用いたプログラム . . . 付録 B-9

1 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを
2 組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム
3 バリデーション研究

4
5 データ解析報告書 (ver. 1.0)

6
7
8 第1章
9 研究方法とデータ解析の基本方針

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 2004年5月6日 作成者 大森 崇
21

1

2 1.1. はじめに

3

4 本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が組織した「酵母光生育阻
5 害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステムバリデーショ
6 ン研究」(以下、本研究)のデータ解析報告書である。本研究で評価した酵母光生育阻害試
7 験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム(以下、バッテリ
8 ーシステム)による試験法は、資生堂安全性・分析センターにより提案された。提案され
9 た試験法は、動物実験代替法評価委員会によりその評価が行われた。その結果、他施設で
10 実施した試験結果がないためこれを検討することが必要との結論が下された。このような
11 経緯により、本研究が実施されるに至っている。

12

13 本報告書は、成文化された研究計画書に従い実施された結果を提示するために作成され
14 た。

15

16 本研究では、複数の項目について結果が得られているため、章を分けて記載している。

17

18 第1章では、研究方法とデータ解析の基本方針について記載する。1.2節では研究の目的と
19 データ解析の課題を示す。1.3節では本研究の組織形態と手順について記載する。1.4節で
20 はデータ解析の基本方針を示す。1.5節では予定されていた中間集計について記載する。

21

22

23

24

25

26

27

1

2 1.2. データ解析の目的

3

4 本研究の目的は、提案されたバッテリーシステムによる試験方法を多施設で実施し、そ
5 の結果を定量的に把握することである。また、この試験法は、動物実験代替法であるから
6 *In vivo* 光毒性試験における結果との関連の検討も目的となる。

7

8 事前に示された本研究の研究計画書には、データ解析の項目としては、測定値の施設間、
9 施設内変動の評価、各試験での用量関係の評価、判定基準の妥当性、が掲げられている。
10 データ解析はこの計画案に従い実行されているが、判定基準の妥当性については、他の内
11 容について議論のした後に実施すべきであると思われるため、この報告書では判定基準の
12 検討結果は含めていない。

13 この報告書で示すデータ解析の結果は以下のものである。

- 14 ・ バッテリーシステムの判定の施設内変動
- 15 ・ バッテリーシステムの判定の施設間変動
- 16 ・ バッテリーシステムと *In vivo* 試験との関連
- 17 ・ 酵母光生育阻害試験の用量反応関係
- 18 ・ 赤血球光溶血試験の用量反応関係

19

20

1.3. 研究の組織形態と研究の手順

本研究は、実験参加施設代表、バリデーション委員会委員、評価委員会代表、技術担当による実行組織と、実験参加施設の実験実施者により実施された。詳細は本研究の研究計画書に記載されている。

実施された研究手順を図 1.4.1 に示す。また、以下に個々の内容について記載する。

1.3.1. 実験施設の募集

バリデーション委員は、評価委員からの依頼を受け、実施する研究参加施設の募集を行った。研究への参加を望む実施施設は実施施設として研究に参加することになった。

1.3.2. 技術研修

実施施設の実験実施者は、技術研修会に参加し技術的の習得を行った。なお、本研究では、実験実施者の技術研修会への参加が実験実施者の資格となっている。

1.3.3. 研究計画書、実施手順書の固定

技術研修会では、研究計画書、実施手順書が議論された。その後、研究計画書、実施手順書と実験開始前に固定された。

1.3.4. 実施手順書 (SOP P-1~P-3 の変更)

すべての施設が実験を実施している期間に実施手順書の変更が行われた。実施手順の変更が行われた時点で、すべての施設は予備実験を行っていたため、この影響が本実験に影響はしていない。

1.3.5. 被験物質の選択

被験物質は、EU/COLIPA のバリデーション研究もしくは提案施設である資生堂の *In vivo* 試験の結果がある 16 物質から 9 物質を選ぶこととした。この 16 の候補物質のリストは事前に公開しているが、そのうちのどの 9 物質が選択されたのかは実験実施者にはわからないようにマスクして配布が行われた。公開されたリストを表 1.3.1 に示す。

1.3.6. 被験物質の割付とマスク化

選択された 9 つの被験物質のうち、1 施設あたり 6 物質が実験実施施設に配布された。選択された物質と、各施設への割付状況の結果は第 3 章に示す。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

1.3.7. データの収集とデータクリーニング

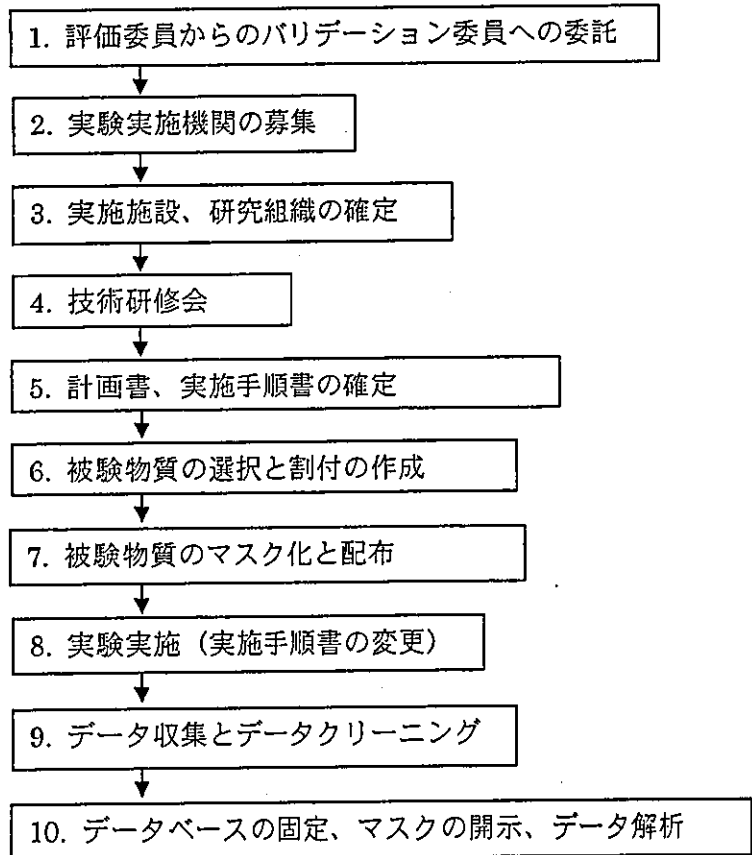
データクリーニングでは、各実験実施施設で得られた実験結果が入力されたデータシートファイルのチェックを行った。この作業の詳細については第2章、付録Aに示す。

1.3.8. データベースの構築

データクリーニング終了後、データベースを作成した。被験物質のマスクの開示はこの時点で行われた。データベースについては、第3章、付録Bに示す。

1.3.9. データ解析

データベースのデータに基づき、解析プログラムが作成された。解析結果については第4章～第7章に示す。作成した解析プログラムについては付録Bに示す。



14
15
16

図 1.3.1 本研究の手順

1

2 表 1.3.1 被験物質の候補

被験物質	動物実験		
	資生堂の平均 評価点、(): ECVAM 結果	資 生 堂	EU/ COLIPA
Amidarone	(+)		+
Anthracene	1.8	+	+
Bithionol	0(ECVAM:+)	-	+
Chrolhexidine	(NA)		-
CPZ	1.6	+	+
5-MOP	2.7	+	+
SLS	(NA)		?
Escarol 507	1	+/-	
Parsol 1789	0	-	
Musk Ambrette	0.7	-	-
Piroxicam	0	-	-
Rose bengal	0	-	+/-
TCSA	1.5	+	
8-MOP	4.8	+	+
6-MC	0(ECVAM:+)	-	+
Acridine	+(+)	+	+

3

4

5

6

7

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

1.4. データ解析の方針

データ解析方法を含めた研究デザインの詳細は、研究計画書と実施手順書に規定されている。

実施手順書に従えば、各試験法は複数回の本実験（基本的に2回）を行い、2回の結果の平均値から判定を行うことになっている。各施設が2回しか試験を行わなければ、判定の施設内差を評価することはできない。つまり、その場合には各施設で一つの判定しか得ることができないことになる。1つの物質について、数多くの繰り返しを実施することは、困難であると思われた。また、この研究を始める動機は他施設でのバッテリーシステムの検討である。そこで本研究のデータ解析では、施設間再現性を主要な解析とした。

施設間再現性評価では、2つの方針で *In vivo* データとの関係を検討した。前者には、感度や特異度のような要約指標の算出である。これらは複数の物質について1つの指標に要約できる。後者は、物質ごとの *In vivo* データとの一致割合である。これにより個々の物質についての検討が可能である。（第4章参照）

施設内再現性の検討の場合については試験回数ごとに判定を行うこととした。ただし、個々の試験法の試験回数は各物質で最低2回実施すればよいことになっている。試験回数が2回では施設内差を評価するには少なすぎる。また、物質はマスク化されているが、同じ物質について複数回の繰り返し実験を行った結果を評価することになるので、施設内差の評価は、施設間差の評価とは意味が異なる。（第4章参照）

個々の試験の用量反応関係の情報は、施設間、施設内のばらつきを検討するうえで有用である。したがって、個々の試験の用量反応関係を明示するようにする。（第5章～第7章）

1

2 1.5. 中間集計について

3

4 研究計画書では、2004年2月末に中間集計が実施される旨が記載されているが、中間集
5 計は実施されなかった。この理由は、実施手順書の変更により研究が遅れたことと、マス
6 クの開示するための手順が十分に確立されていなかったことによる。

7

8

9

10

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを
組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム
バリデーション研究

データ解析報告書 (ver. 1.0)

第2章
データクリーニング

2004年5月5日 作成者 大森 崇

1

2 2.1. はじめに

3

4 第2章では、データクリーニングについて記載する。

5

6 複数の施設が試験を実施するバリデーション研究では、単独の施設で試験行う場合に比
7 べ規模が大きくなるだけでなく、作業が複雑になる。このため効率のよいデータクリー
8 ングの方法を確立することが課題の一つである。本研究ではデータクリーニングを効率よ
9 く実施することを意識したデータシートファイルの作成を行った。2.2.節では作成したデー
10 タシートファイルについて記載する。2.3.節ではデータクリーニングの手順と範囲について示
11 す。2.4.節では本研究で提出されたデータファイル数について示す。2.5.節ではデータクリ
12 ーニングを行ったファイル数の集計を示す。

13 実施手順の詳細は付録 A に示した。

14

15