

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
30
31
32
33
34

2.2. データシートファイル

本研究では、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれについて、結果を入力したデータを得るために、Microsoft社のExcel2002を用いたデータシートファイルを作成した。Excelを用いた利点は、このソフトウェアの(1)汎用性—どの試験実施施設でも利用することができ操作に慣れていること、(2)その機能—シートの保護、入力規制、表計算機能、によっている。どちらの試験のデータシートファイルも、1回の試験の1系列分の照射と非照射について1データシートファイルに入力されるようにした。1つのデータシートファイルには、施設名、被験物質、溶媒対照、濃度、測定値などの情報を入力するようにした。

データシートファイルを作成する上で、眼刺激性試験代替法バリデーション研究の経験を検討し、以下のような設計思想の基でこれを作成した。

- (1)試験実施者がデータシートファイルのどの位置に何を入力するのかということを理解しやすいようにする
 - ・試験している状態に合うように、プレートの形に沿った入力方法とした
 - ・入力に必要な箇所は色をつけた
 - ・マウスを近づけると何を入力すべきかのコメントが表示されるようにした
- (2)誤った入力や予期しない入力をなくすようにする
 - ・施設名や溶媒など事前に規定されているものは、選択するようにして入力不可とした
 - ・数値の入力のところには数値以外は入力できないようにした
 - ・入力する必要のない場所には入力が不可能とした
 - ・シートが改変されないように注記した
- (3)各試験実施者による試験の結果の確認ができるようにする
 - ・同じファイルの別のワークシートに照射と非照射の結果から得られる光毒性の判定が示されるようにした

作成したデータシートファイルの入力方法は、バリデーション研究の技術移転の場で各試験実施者に説明された。この説明の場で、赤血球光溶血試験のデータシートファイルは、各施設の吸光度計の出力をカットアンドペーストできるように改変することが提案され、改変された。

最終的に使用されたデータファイルシートを図2.2.1、図2.2.2に示す。

⑬酵母光生育阻害試験測定記録

施設:	本試験・予備試験:	回数:
被験物質コード:		系列:
溶媒名:		
実験日:	時刻:	
実験者名:		

濃度[mg/ml] (6穴プレート)

濃度1	濃度2	濃度3
濃度4	溶媒対照	8-MOP

用止帯の長さ:上記の6穴プレートに対応させて入力してください

照 射	吸:	吸:	吸:
	濃:	濃:	濃:
	吸:	吸:	吸:
	濃:	濃:	濃:
非 照 射	吸:	吸:	吸:
	濃:	濃:	濃:
	吸:	吸:	吸:
	濃:	濃:	濃:

コメント:

入力されたデータはプログラムにより一括処理されます。記入漏れのないようにお願いします。
シートの変更は行わないでください。
入力について不明な点は問い合わせにより確認してください。

2

3 図 2.2.1 酵母光生育阻害試験のデータシートファイル

4 試験は6穴プレートを用いて行われるため、用量と測定値の記入欄は6穴プレートと対
5 応をとるようにしている。一枚のシートで1回の試験の1系列分を記入するようになって
6 いる。

7

1

2 2.3. データクリーニングの手順と範囲

3

4 本研究では、各実験実施施設にデータクリーニング作業のためにデータシートファイル
5 とは別にデータシートファイルに入力する基となったデータの紙媒体での提出を求めた。

6

7 これら紙媒体のデータは試験実施中に試験実施者が測定した値の記入や、吸光度計から
8 得られるプリントアウトである。酵母光生育阻害試験で阻止帯の長さを測定するためのノ
9 ギスや、赤血球光溶血試験の結果を測定するための吸光度計の種類は実験実施施設により
10 異なるため、紙媒体の資料を統一することはしなかった。

11

12 データクリーニングでは、紙媒体に基づき、データシートファイルの入力項目の中の被
13 験物質名、本試験・予備試験の有無、試験回数、系列、測定値、吸光度の波長（赤血球光
14 溶血試験の場合のみ）がチェックの対象とした。データシートファイルで入力が必要な施
15 設名、実施者、溶媒名、用量の値などはデータファイルに入力されているかはチェックの
16 時点で確認するものの、紙媒体との一致を求めるまでのチェックは行っていない。チェッ
17 クのためのチェックリストを作成した。疑問が生じたデータは電子メールで確認を行った。
18 この手順の詳細は付録 A に示した。

19

20

21

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

2.4. 提出されたデータシートファイル数

提出されたデータシートファイル数を表 2.3.1 に示す。

表 2.3.1 提出されたデータシートファイル数

	酵母光生育 阻害試験	赤血球光溶 血試験
本試験	152	136
予備試験	76	56
合計	228	192

1

2 2.5. データクリーニングの結果

3

4 データクリーニングの内容を過去に実施された眼刺激性試験の分類に基づき分類し、集
5 計した結果を表 2.5.1 に示す。この表の「(7)その他」の詳細を表 2.4.2 に示す。

6

7 眼刺激性試験では、項目番号の小さい順にデータクリーニングの対象となったファイル
8 が多かった。本研究ではそのような結果にはなっていない。これは、この研究で作成され
9 たデータシートファイルが過去の研究の反省に基づき作成されたことが反映されていると
10 考えられる。

11

12 表 2.5.1 各データクリーニング項目における問合せ回数と該当データファイル数

13

I：問合せ回数、II：該当ファイル数

問合せ内容の項目	酵母光生育阻害試験		赤血球光溶血試験		合計	
	I	II	I	II	I	II
(1) 何かしらの必要なデータが入力されていない	0	0	1	16	1	16
(2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない	0	0	1	1	1	1
(3) プロトコールや事前に決められたルールに適合していない	0	0	2	48	2	48
(4) 単純な入力ミス	1	4	2	2	3	6
(5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告	1	3	0	0	1	3
(6) 紙媒体で提出されたデータと入力された結果が一致しない	4	17	10	37	14	54
(7) その他	2	15	7	79	9	94
合計	8	39	23	183	31	222

14

15

16

17

18

19

1

2 表 2.5.2 その他の項目の内容

試験法	その他の項目	該当ファイル数	主な原因と考えられること
酵母光生育阻害試験	(7-1) 提出された記録用紙からは予備試験か本試験かを確認できない	7	実験者の記入し忘れのため
	(7-2) 試験回数番号が「2」と「3」はあるが、「1」がない	8	1回目は試験不成立のため提出しなかったため
赤血球光溶血試験	(7-3) 内容の異なる同じ名前のファイルが複数存在する	32	ディレクトリごとを圧縮して送付されたファイルを解凍した際に、ディレクトリが復元されなかったため
	(7-4) 物質がないところに記載された値の内容の確認	8	データシートファイルに1物質、2物質のみが実験された場合のルールを定めなかったため
	(7-5) その施設には配布されていない物質コードが入力されている	28	データシートファイルに1物質、2物質のみが実験された場合のルールを定めなかったため
	(7-6) 異なるファイルと同じ値が入力されている	1	実験者の提出ミスのため
	(7-7) 試験回数番号が「5」と「その他」となっており、それ以外がない	8	他の回は試験不成立であり、データシートには最大5回までしか選択できないように設計されて
	(7-8) コメント欄の物質名と入力された物質名が異なる	2	実験者の入力ミスのため

3

4

5

6

7

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3章

9 実験実施施設、被験物質、データの取り扱い

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 2004年5月6日 作成者 大森 崇
21
22

1

2 3.1. はじめに

3

4 第3章では、実験施設や被験物質、データの取り扱いについて記す。

5 実験施設については3.2.節に、被験物質の配布リストと割付については3.3.節に、*In vivo*

6 試験の結果については3.4.節に示す。提出されたデータシートファイル数とデータベースに

7 ついては3.5.節に示す。いくつかのデータシートファイルは検討が必要であった。これにつ

8 いては、3.6.節に示す。3.7.節はデータ解析に用いた統計ソフトについて記載した。データ

9 ベースと作成したプログラムについては付録Bに示した。

10

11

12

13

14

1

2 3.2. 実験実施施設

3

4 以後、本報告書では実験実施施設をコードで示すことにし、小文字のアルファベットで
5 示すことにする。表 3.2.1 に実験実施施設の施設コード、実験実施担当者のリストを示す。

6

7 表 3.2.1 試験実施施設、施設コード、試験実施担当者

試験実施施設名	施設コード	試験実施担当者
[Redacted]	a	[Redacted]
[Redacted]	b	[Redacted]
[Redacted]	c	[Redacted]
[Redacted]	d	[Redacted]
[Redacted]	e	[Redacted]
[Redacted]	f	[Redacted]

8

(注意：施設名と担当者は本計画書を公開する際には原則マスクする。)

9

10

11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

3.3. 物質リストと割付

本研究では、陽性対照物質の他に 9 被験物質の被験物質が使用された。各実験実施施設にはマスク化をされた物質が 6 物質配布された。各施設はマスク下で 2 つの試験法の実験を実施した。

データ解析では、データベースを固定する前に、各実験施設の実験結果を入力したデータシートファイルを集め、データクリーニングを実施した。

被験物質のマスクの開示は、データクリーニングの終了した時点で行われた。

以後、本報告書では配布された物質をコードで示すことにし、大文字のアルファベットで示すことにする。各施設に配布された物質と物質コードの対応表を表 3.3.1 に示す。この表で○は配布されたことを示し、×は配布されなかったことを示す。

表 3.3.1 被験物質と割付の記入例

○が配布、×が非配布

物質名	物質コード	施設コード					
		a	b	c	d	e	f
アントラセン	A	○	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	○	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	○	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	○	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	○	○	×	×	○	○
SLS	F	○	○	×	×	○	○
アクリジン	G	×	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	×	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	×	×	○	○	○	○

1

2 3.4. *In vivo* 試験の結果

3

4 表 3.4.1 に、本研究に使用された 9 物質の *In vivo* データの判定結果を示す。

5

6 被験物質は、EU/COLIPA もしくは資生堂による *In vivo* データが存在する 16 候補物質
7 の中から選択された。選択の基準は、

- 8 ・ 陽性物質と陰性物質が同じくらいの数になること、
- 9 ・ EU/COLIPA と資生堂の *In vivo* 試験で判定が異なった物質も含めること、

10

とされた。第 2 点目の観点から E (ピチオノール) と H (6-メチルクマリン) が選択され
11 た。これらはどちらも EU/COLIPA では陽性物質とされているが、資生堂の結果は陰性で
12 ある。本報告で示す解析結果はこれらの物質を陰性物質として扱っている。

13

14 表 3.4.1 *In vivo* データのまとめの例

被験物質名	被験物質コード	判定	参考	
			資生堂	EU/COLIPA
アントラセン	A	+	+	+
アミオダロン	B	+		+
クロルヘキシジン	C	-		-
クロルプロマジン	D	+	+	+
ピチオノール	E	-	-	+
SLS	F	-		?
アクリジン	G	+	+	+
6-メチルクマリン	H	-	-	+
Parsol 1789	I	-	-	

15

16

17

1
2 3.5. 提出されたデータシートファイル数とデータベース

3
4 各実験実施施設の酵母光生育阻害試験、赤血球光溶血試験のデータシートファイル数を
5 それぞれ表 3.5.1、表 3.5.2 に示す。

6
7 表 3.5.1 酵母光生育阻害試験のデータシートファイル数

酵母光生育阻害試験							
	施設コード						合計
	a	b	c	d	e	f	
本試験	24	24	24	24	32	24	152
予備試験	12	12	12	12	16	12	76
合計	36	36	36	36	48	36	228

8
9
10
11 表 3.5.2 赤血球光溶血試験のデータシートファイル数

赤血球光溶血試験							
	施設コード						合計
	a	b	c	d	e	f	
本試験	24	16	20	16	28	32	136
予備試験	8	8	8	8	12	12	56
合計	32	24	28	24	40	44	192

12
13
14
15 データベースの構築は、データクリーニングが終了した後に行った。以下、本報告書に
16 記載するデータ解析の結果は、固定されたデータベースに基づき行っている。

17
18 試験方法が 2 つであり、指標の計算するための基となる値（酵母光生育阻害試験では阻
19 止帯の長さ、赤血球光溶血試験では吸光度）から指標の計算を行うことにしていたため、
20 作業効率を考慮し 3 段階のデータベースを作成した。以下に個々のデータベースについて
21 記載する。

22
23 データベース 1:

24 指標を計算するための基となる値を含めたデータベース。酵母光生育阻害試験、赤血球
25 光溶血試験、*In vivo* のそれぞれについて作成した。酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試
26 験については、データシートファイルのコメント以外のすべてのデータを含めた。

1 データベース 2:

2 酵母光生育阻害試験、赤血球光溶血試験のそれぞれについて、試験回数と用量の情報と
3 各指標の値を含めたデータベース。実質的な解析はほとんどこのデータベースを基に行っ
4 た。

5

6 データベース 3:

7 バッテリーシステムの施設間再現性の評価が可能なレベルまでデータを要約したデータ
8 ベース。実施手順書の手順に従って計算した判定を含めた。

9

10

1

2 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

3

4 データクリーニングが終了し、データベースを固定する際に、いくつかのデータファイ
5 ルの扱いを決める必要が生じた。これらのデータファイルは、バリデーション委員会で取
6 り扱いを決めた。検討内容を表 3.6.1 に示す。

7

8

1

2 表 3.6.1 バリデーション委員で審議したデータシートファイルの取り扱い

試験法	内容	バリデーション委員会による決定	該当データシートファイル名
赤血球光溶血試験	24穴プレートから96穴プレートに分ける際に2系列で実施されていない	データには1と2が同じ値で入力されている。測定のために96穴に移すという趣旨から判断して、このデータを採用することとする。	該当施設の赤血球光溶血試験のすべて
赤血球光溶血試験	被験物質のコードを読み間違えて赤血球光溶血試験と酵母光生育阻害試験の両方の陽性対照のデータも実験を実施してしまい、その結果が本試験の1回目として提出されている。予備試験および本試験1回目の陽性対照は独自に購入したものをを用いた。この施設は本試験を3回実施しており、2回目と3回目は計画書どおりに実施されている。	本試験の解析として2回目と3回目を採用して、1回目を除外する。副次的な解析結果を示す際に注記を記して、1回目の結果も示す。	該当施設の赤血球光溶血試験の1回目すべて
赤血球光溶血試験	被験物質の濃度を間違え2回の本試験を実施したため、新たに2試験の追加が実施された。データは4回分提出された。	本解析では本試験の解析として3回目と4回目を採用して、1回目と2回目を除外する。副次的な解析結果を示す際に注記を記して、1回目の結果も示す。	該当施設の赤血球光溶血試験の物質の1回目と2回目
赤血球光溶血試験	1回目と2回目で大きく結果が食い違ったため、3回目を実施する際に、ついでに実施された4回目のデータも提出された。	本解析では本試験の解析として1、2、3回目の結果から被験物質の判定をし、4回目は除外する。副次的な解析結果を示す際に注記を記して、4回目の結果も示す。	該当施設の赤血球光溶血試験の物質の4回目

3

1 3.7. データ解析に用いたソフトウェア

2

3 データ解析には、SAS ver.8.2 と S Plus ver.6.0J を使用した。2つのソフトの使い分けは、
4 データベースの作成、各表の基となる出力値の計算には SAS で行ない、グラフの作成には
5 S Plus を用いた。3.5.節に記載したデータベースは SAS データセットとして作成した。S
6 Plus を用いる場合には、SAS データセットであるデータベースのデータを S Plus で使用
7 可能なように変換したオブジェクトを用いた。したがって、すべてのプログラムはいずれ
8 かのデータベースを参照している。

9

10 作成したプログラムの一覧を付録 B に示した。

11

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

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4章
バッテリーシステムの結果

2004年5月6日 作成者 大森 崇

1
2 4.1. はじめに

3
4 第4章では、バッテリーシステムの評価結果を示す。研究目的で示したように、ここで
5 行う評価は施設内再現性、施設間再現性、*in vivo* 試験との対応関係についてである。

6
7 はじめに個々の試験の陽性対照の結果を示す。これを4.2節に示す。4.3節では施設内再
8 現性の結果を示す。4.4節では施設間再現性の結果を示す。*in vivo* 試験との対応関係につ
9 いては施設間再現性の評価として4.4節で併せて示すこととする。赤血球光溶血試験で測定
10 される吸光度の値は、540nmの他に、525nmもしくは520nmのどちらかの波長で測定さ
11 れている。研究計画書には、540nmの結果を主解析として行うことと規定されているため
12 に、525nmもしくは520nm（以下、52Xnm）の結果については4.5節に示す。

13
14 第1章で示したように本研究のデザインは、どちらかという施設内再現性よりも施設
15 間再現性の評価の方を厳密に規定した計画となっている。そのためにデータ解析では、施
16 設間再現性の評価については、計画書の規定に沿うように提出された本試験データの一部
17 を除外扱いとした。一方、施設内再現性の評価では、個々の施設で実施された実験回数が
18 最大でも4試験であり、多くの場合は2試験であったため、規定に沿わないデータも含め
19 て提示することにした。表4.1.1に施設内再現性と施設間再現性のデータの取り扱いの違い
20 をまとめた。

21
22 表 4.1.1 データの取り扱い

		被験物質 コード	実験 回数	施設内 再現性	施設間 再現性	理由
施設 コード	a	D	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	2	○	×	
	c	H	4	○	×	・計画書には、4回目を実施するようには記載されていないため施設間再現性の評価からは除外。
	e	D	1	○	×	・1回目はその施設で購入した陽性対照物質を用いて実験が実施されており、後に2試験を実施しているため施設間再現性の評価からは除外。 (実質的には指標の計算に陽性対照は使われていない)
		E	1	○	×	
		F	1	○	×	
		G	1	○	×	
H		1	○	×		
	I	1	○	×		

23
24
25 先に記したように、実験実施手順書では各試験について2回の結果の平均値を用いて判

1 定を行うことが必要とされているが、ほとんどの試験で施設内の繰り返し実験回数は 2 回
2 であるために、施設内再現性は各試験のそれぞれの回数について結果について評価するこ
3 とにする。この区別を明確にするために、本報告書では（陽性、擬陽性、陰性）の表示に
4 ついて、各実験回数における判定の場合は (+, +/-, -) というように表記し、2 回の実験
5 結果からの判定を決める施設間再現性の場合には (P, G, N) という表記とした。

6

7