

1

2 4.2. 個々の試験の陽性対照物質の施設内再現性

3

4 各試験法が成立している条件として、同時に実施された陽性対照物の結果が陽性である
5 と判定される必要がある。バッテリーシステムとしての評価は、酵母光生育阻害試験と赤
6 血球光溶血試験の 2 つの試験法の実験結果を組み合わせて判定することとされているが、
7 酵母光生育阻害試験では、1つの被験物質に1つの陽性対照を用いて実験されるのに対して、
8 赤血球光溶血試験では、最大で3つの被験物質について1つの陽性対照が実験されるため、
9 組み合わせた評価を行うことができない。このため、陽性対照物質の評価は、試験法ごと
10 に各実験回数の判定を示すこととした。

11

12 表 4.2.1 に酵母光生育阻害試験の陽性対照の判定を示す。この試験法の陽性対照物質は 8
13 -MOP である。施設 b で 1 回陽性対照であると判定できず擬陽性と判定されたが、それ以
14 外はすべて陽性と判定されている。以後の解析では、擬陽性となった施設 b の結果も含ん
15 でいる。

16 陽性対照物質 8-MOP の阻止帯の測定値については第 5 章に示した。

17

18 表 4.2.2 に赤血球光溶血試験[540nm]の陽性対照の判定を示す。この試験法の陽性対照物
19 質はアクリジンである。この試験法では、すべての物質が陽性であると判定された。

20 陽性対照物質アクリジンの溶血度の差の用量反応曲線は、第 6 章に示した。

21

1

2 表 4.2.1 酵母光生育阻害試験の陽性対照の判定

		同時に測定された物質コード	陽性対照の判定			
			本試験			
			1回目	2回目	3回目	4回目
施設コード	a	A	+	+		
		B	+	+		
		C	+	+		
		D	+	+		
		E	+	+		
		F	+	+		
	b	A	+/-	+		
		B	+	+		
		C	+	+		
		D	+	+		
		E	+	+		
		F	+	+		
	c	A	+	+		
		B	+	+		
		C	+	+		
		G	+	+		
		H	+	+		
		I	+	+		
	d	A	+	+		
		B	+	+		
		C	+	+		
		G	+	+		
		H	+	+		
		I	+	+		
	e	D	+	+		+
		E	+	+		+
		F	+	+		+
		G	+		+	
		H	+	+		
		I	+	+		
f	D		+	+		
	E	+	+			
	F	+	+			
	G	+	+			
	H		+	+		
	I	+	+			

3

4

1

2 表 4.2.2 赤血球光溶血試験[540nm]の陽性対照の判定

		同時に測定された物質コード	陽性対照の判定	
			本試験	
			1回目	2回目
施設コード	a	BAC	+	+
		DFE	+	+
		D	+	+
	b	ABC	+	+
		DEF	+	+
	c	CAB	+	+
		GHI	+	+
		HH	+	
	d	GBC	+	+
		HIA	+	+
	e	DGE	+	+
		DGK	+	
		EJF	+	
		FIH	+	+
		IH	+	
	f	D	+	+
		F	+	
		IHE	+	+
G		+	+	
F		+		

3

4

5

6

7

1

2 4.3. バッテリーシステムの施設内再現性

3

4 バッテリーシステムの施設内再現性の結果を表 4.3.1 に示す。ここでは、施設内再現性の
5 評価として、試験実施手順書に規定されている 2 回の平均をとらずに、1 回の試験の組合せ
6 を行って判定することを考えることにする。その場合、どちらかの試験法が「+」と判定さ
7 れれば「+」、両方の試験法が「-」であれば「-」、それ以外ならば「+/-」となる。可能
8 な組合せを考慮した場合に、施設 b の物質 A、物質 B、物質 C、物質 D、物質 F、施設 c
9 の物質 B、物質 H で複数の判定を行うことになる。判定の可能性を表 4.3.2 にまとめた。

10 施設 b を除けば、ほとんどの施設で判定が異なることはない。

11 施設 c の物質 H の赤血球光溶血試験については、1 回目と 2 回目の結果の乖離が大きい
12 と判断されて、追加実験が実施されている。判定の違いはこの理由によるものであり、2 回
13 目と 3 回目の結果が用いられている施設間再現性の評価ではこの違いの影響はない。しが
14 って、実質的に施設 c で判定が異なるのは物質 B のみとなる。

15

16 施設 b では異なる判定となる物質が多い。他の施設のような再現性が得られなかった理
17 由を検討することは意義があるであろう。

18

19

20

1

2 表 4.3.1 バッテリーシステムの施設内再現性の結果[540nm]

被験物質コード	施設コード	試験法	個々の物質の判定				
			本試験				
			1回目	2回目	3回目	4回目	
A	a	YES	+	+			
		RBC	+/-	+/-			
	b	YES	+/-	+			
		RBC	+/-	+/-			
	c	YES	+/-	+/-			
		RBC	+/-	-			
	d	YES	+/-	+/-			
		RBC	+	+			
	B	a	YES	+	+		
			RBC	-	-		
		b	YES	-	-		
			RBC	-	+/-		
		c	YES	+	+/-		
			RBC	-	-		
		d	YES	+/-	+/-		
			RBC	-	-		
	C	a	YES	+/-	+/-		
			RBC	+	+		
		b	YES	-	-		
			RBC	+/-	+		
		c	YES	-	-		
			RBC	+	+		
		d	YES	-	-		
			RBC	+	+		
D	a	YES	+	+			
		RBC	+	+	+	+	
	b	YES	+/-	-			
		RBC	-	+			
	e	YES	+/-	+/-		+/-	
		RBC	-	-	+/-		
	f	YES	-	-			
		RBC	+	+			
E	a	YES	+	+			
		RBC	+	+			
	b	YES	+/-	-			
		RBC	+	+			
	e	YES	+/-	+/-		+/-	
		RBC	+	+	+		
	f	YES	+/-	+/-			
		RBC	+	+			
F	a	YES	-	-			
		RBC	-	-			
	b	YES	-	-			
		RBC	-	+			
	e	YES	-	-		-	
		RBC	-	-	-		
	f	YES	-	-			
		RBC	-	-			
G	c	YES	+	+/-			
		RBC	+	+			
	d	YES	+/-	+/-			
		RBC	+	+			
	e	YES	+		+/-		
		RBC	+	+	+		
	f	YES	+/-	+/-			
		RBC	+	+			
H	c	YES	-	-			
		RBC	+	-	-	-	
	d	YES	+/-	+/-			
		RBC	-	-			
	e	YES	+/-	+/-			
		RBC	-	-	-		
	f	YES	-	+/-	+/-		
		RBC	-	-			
I	c	YES	-	-			
		RBC	-	-			
	d	YES	-	-			
		RBC	-	-			
	e	YES	-	-			
		RBC	-	-	-		
	f	YES	-	-			
		RBC	-	-			

3

1

2 表 4.3.2 施設内で異なる判定を行う可能性[540nm]

		被験物質	可能性
施設 コード	b	A	+/- or +
		B	- or +/-
		C	+/- or +
		D	- or +/- or +
		F	- or +
	c	B	- or +/-
		H	- or +

3

4

5

4.4. バッテリーシステムの施設間再現性

バッテリーシステムの施設間再現性の結果を表 4.4.1 に示す。

各物質についての *In vivo* の判定との一致割合の結果は、物質 G、物質 I では、その物質を実験したすべての施設で正しく陽性と判定されているが、他の物質では、物質 F 以外は 2 施設以下の一致であった。

陰性物質である物質 C と物質 E（この物質は EU/COLIPA では陽性と判定）を実験した施設のすべての判定結果が陽性であった。各試験法のカットオフポイントが、陽性物質を誤って陰性と判断することを極力押さえるように設定されたことを考慮すると、このような傾向が生じることはある程度は避けられないであろう。しかしながら、施設 b の陽性物質 B の結果は陰性と判定されている。表 4.3.1 に示すように、物質 B を実験した施設のほとんどが赤血球光溶血試験では陽性とは判定されておらず、酵母光生育阻害試験の結果から陽性だと判定されている。施設 b は酵母光生育阻害試験で 2 回の試験のいずれも陰性と判定されている。

表 4.4.1 では、各施設についての要約指標である感度 I（陽性物質を陽性と判定する割合）、感度 II（陽性物質を陽性もしくは擬陽性と判定する割合）、特異度（陰性物質を陰性と判定する割合）、一致度（陽性物質を陽性、陰性物質を陰性と判定する割合）を算出している。これらの指標の値は、計算をする被験物質の数は少ないことに注意すべきである。

ベータ分布と記載したところは、各指標（感度 I、感度 II、特異度、一致度）がベータ分布に従うと仮定し、モーメント法により分布のパラメータを推定したときの平均と分散に対応した値である。平均は各施設の値の平均値、分散は平方和を施設数で減じた値となっている。

この試験法は、陰性物質の判定により重きが置かれている。特異度は、陰性物質を正しく陰性と判定する割合であるが、この値は低い。一方で、陽感度 II は、各施設とも高い値を示している。

図 4.4.1 は、各施設における 2 つの試験法の判定指標の値の対応を示している。縦軸が酵母光生育阻害試験の阻止帯の差、横軸が溶血度の差である。文字は物質コードを示しており、水色は *In vivo* 試験で陽性と、桃色は陰性と判定されたことを示している。

酵母光生育阻害試験では、施設 a が他の施設に比べて陽性と判定されている物質が多い

- 1 傾向にあるようである。一方、赤血球光溶血試験では、施設 d が他の施設に比べて陽性と
- 2 判定された物質はカットオフ値にどれも近い傾向があることがわかる。
- 3
- 4

1

2 表 4.4.1 バッテリーシステム[540nm]の施設間再現性の結果

被験物質名	物質コード	<i>In vivo</i> の判定	施設コード						<i>In vivo</i> の判定との一致割合	
			a	b	c	d	e	f		
アントラセン	A	P	P	G	G	P			2/4	
アミオダロン	B	P	P	N	P	G			2/4	
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P	P			0/4	
クロルプロマジン	D	P	P	G			G	P	2/4	
ピチオノール	E	N	P	P			P	P	0/4	
SLS	F	N	N	P			N	N	3/4	
アクリジン	G	P			P	P	P	P	4/4	
6-メチルクマリン	H	N			N	G	G	G	1/4	
Parsol 1789	I	N			N	N	N	N	4/4	
									ベータ分布	
									平均	分散
感度I (%)			100.0	0.0	66.7	66.7	50.0	100.0	0.639	0.115
陽性と判断された物質の数			3	0	2	2	1	2		
<i>In vivo</i> の陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
感度II (%)			100.0	66.7	100.0	100.0	100.0	100.0	0.944	0.015
陽性、疑陽性と判断された物質の数			3	2	3	3	2	2		
<i>In vivo</i> の陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
特異度 (%)			33.3	0.0	66.7	33.3	50.0	50.0	0.389	0.043
陰性と判断された物質の数			1	0	2	1	2	2		
<i>In vivo</i> の陰性物質の数			3	3	3	3	4	4		
一致割合 (%)			66.7	0.0	66.7	50.0	50.0	66.7	0.500	0.056
<i>In vivo</i> と判定が一致した数			4	0	4	3	3	4		
被験物質の数			6	6	6	6	6	6		

3

4

5

6

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

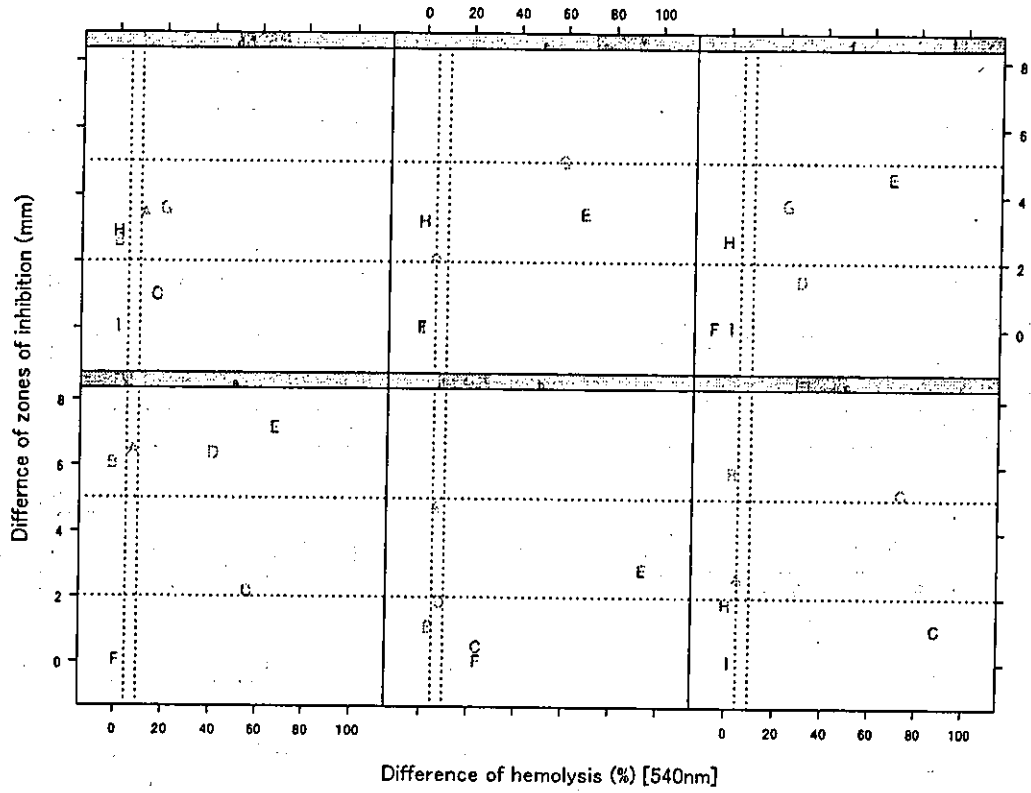


図 4.4.1 各指標と物質の関係[540nm]

1

2 4.5. 赤血球光溶血試験を 52Xnm とした場合のバッテリーシステ

3 ムの結果

4

5 ここでは、赤血球光溶血試験における吸光度の値を 520nm もしくは 525nm で測定した
6 場合の結果を示す。520nm で測定された施設は施設 d のみであり、他の施設は 525nm で
7 あった。

8

9 表 4.2.2 に対応する陽性対照の判定については、まったく同じ結果であったので省略する。

10

11 表 4.5.1 に 52Xnm の場合のバッテリーシステムの施設内再現性の結果を、表 4.5.2 に施
12 設内で異なる判定を行う可能性を示す。

13

14 表 4.5.3 に 52Xnm の場合のバッテリーシステムの施設間再現性の結果を、図 4.5.1 にこ
15 の場合の各指標と物質の関係を示す。

16

1 表 4.5.1 バッテリーシステムの施設内再現性の結果[52Xnm]

施設コード	試験法	他々の物質の判定					
		本試験					
		1回目	2回目	3回目	4回目		
被験物質コード	A	a	YES	+	+		
		RBC	+/-	+			
	b	YES	+/-	+			
		RBC	+	+			
	c	YES	+/-	+/-			
		RBC	+/-	+/-			
	d	YES	+/-	+/-			
		RBC	+	+			
	B	a	YES	+	+		
		RBC	-	-			
		b	YES	-	+/-		
		RBC	-	-			
	c	YES	+	+/-			
		RBC	-	-			
	d	YES	+/-	+/-			
		RBC	-	-			
	C	a	YES	+/-	+/-		
		RBC	+	+			
		b	YES	-	-		
		RBC	+	+			
	c	YES	-	-			
		RBC	+	+			
	d	YES	-	-			
		RBC	+	+			
D	a	YES	+	+			
	RBC	+	+	+	+		
	b	YES	+/-	-			
	RBC	+	+				
	c	YES	+/-	+/-		+/-	
	RBC	+	+	+			
e	YES	-	-				
	RBC	+	+				
E	a	YES	+	+			
	RBC	+	+				
	b	YES	+/-	-			
	RBC	+	+				
e	YES	+/-	+/-		+/-		
	RBC	+	+	+			
f	YES	+/-	+/-				
	RBC	+	+				
F	a	YES	-	-			
	RBC	-	-				
	b	YES	-	-			
	RBC	-	+				
e	YES	-	-		-		
	RBC	-	-	-			
f	YES	-	-				
	RBC	-	-				
G	c	YES	+	+/-			
	RBC	+	+				
	d	YES	+/-	+/-			
	RBC	+	+				
e	YES	+		+/-			
	RBC	+	+	+			
f	YES	+/-	+/-				
	RBC	+	+				
H	c	YES	-	-			
	RBC	+	-	-			
	d	YES	+/-	+/-			
	RBC	-	-				
e	YES	+/-	+/-				
	RBC	-	-				
f	YES	-	+/-		+/-		
	RBC	-	-				
I	c	YES	-	-			
	RBC	-	-				
	d	YES	-	-			
	RBC	-	-				
e	YES	-	-				
	RBC	-	-				
f	YES	-	-				
	RBC	-	-				

2

3

1 表 4.5.2 施設内で異なる判定を行う可能性[540nm]

		被験物質	可能性
施設 コード	b	B	- or +/-
		F	- or +
	c	B	- or +/-
		H	- or +

2
3
4
5
6
7

8 表 4.5.3 バッテリーシステム[52Xnm]の施設間再現性の結果

被験物質名	物質 コード	In vivo の判定	施設コード						In vivoの判定 との一致割合	
			a	b	c	d	e	f	平均	分散
アントラセン	A	P	P	P	G	P			3/4	
アミオダロン	B	P	P	N	P	G			2/4	
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P	P			0/4	
クロルプロマジン	D	P	P	P			P	P	4/4	
ピチオノール	E	N	P	P			P	P	0/4	
SLS	F	N	N	P			N	N	3/4	
アクリジン	G	P			P	P	P	P	4/4	
6-メチルクマリン	H	N			N	G	G	G	1/4	
Parsol 1789	I	N			N	N	N	N	4/4	
									ベータ分布	
									平均	分散
感度I			100.0	66.7	66.7	66.7	100.0	100.0	0.833	0.028
陽性と判断された物質の数			3	2	2	2	2	2		
In vivoの陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
感度II			100.0	66.7	100.0	100.0	100.0	100.0	0.944	0.015
陽性、疑陽性と判断された物質の数			3	2	3	3	2	2		
In vivoの陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
特異度			33.3	0.0	66.7	33.3	50.0	50.0	0.389	0.043
陰性と判断された物質の数			1	0	2	1	2	2		
In vivoの陰性物質の数			3	3	3	3	4	4		
一致割合			66.7	33.3	66.7	50.0	66.7	66.7	0.583	0.016
In vivoと判定が一致した数			4	2	4	3	4	4		
被験物質の数			6	6	6	6	6	6		

9
10

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

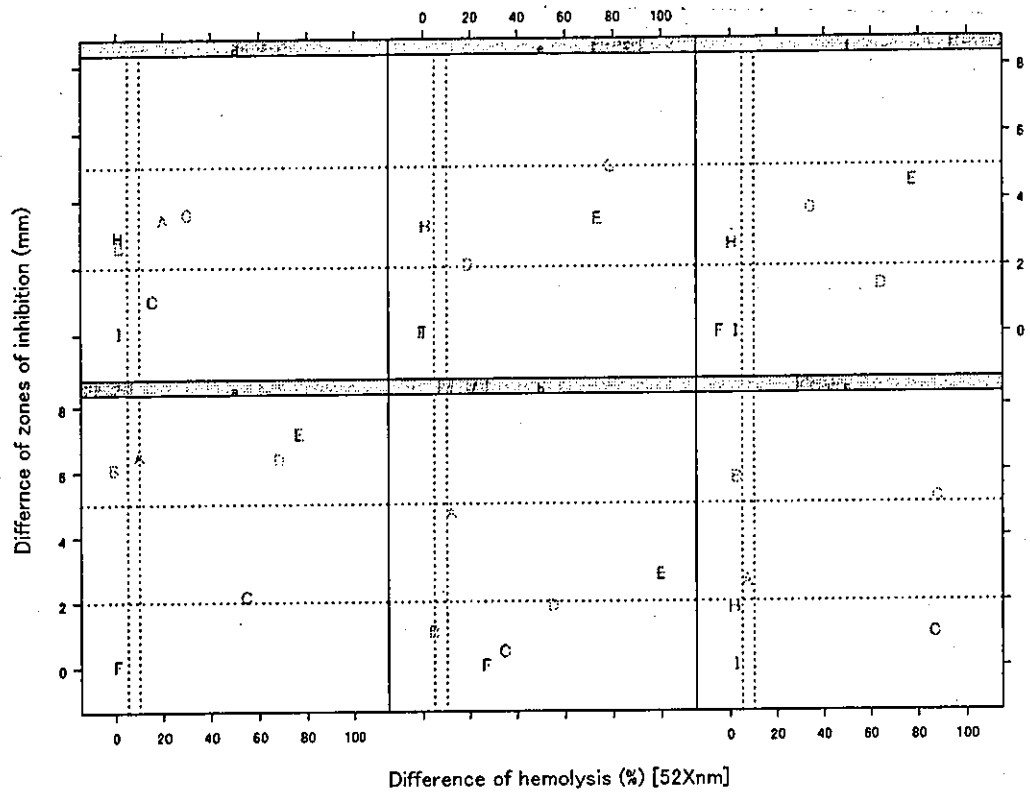


図 4.5.1 各指標と物質の関係[52Xnm]

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5章

9 酵母光生育阻害試験の結果

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

1

2 5.1. はじめに

3

4 第 5 章では、酵母光生育阻害試験の試験結果を示す。本研究はバッテリーシステムの評
5 価であるから、本章では個々の試験法の光毒性の有無の判定についてはあまり重視してい
6 ない。計画書に従ったバッテリーシステムの判定のみでは、個々の試験の用量反応関係の
7 情報などが失われてしまうため、本報告書では用量反応関係を中心に個々の試験法の結果
8 を示すこととした。

9

10 5.2.節では使用された溶媒の一覧を示す。5.3.節では陽性対照の施設内、施設間再現性に
11 ついて示す。5.4.節では阻止帯の差の用量反応関係を示す。5.5.節では照射、非照射におけ
12 る阻止帯の用量反応関係について示す。

13

14 この章で示す結果は、データベースに集められたすべてのデータを用いている。特に除
15 外したデータはない。

16

17 また、この章では本試験と併せて、予備試験の結果も併せて記すことにする。

18

1

2 5.2. 使用された溶媒

3

4 表 5.2.1 に使用された溶媒の一覧を示す。物質 A では施設 b が、物質 B では施設 d が、
5 物質 C では施設 c が、物質 G では施設 f が他の施設と異なる溶媒を用いていた。物質 D、
6 E、F、H、I はすべての施設が同じ溶媒を用いていた。

7

8

9

10 表 5.2.1 酵母光生育阻害試験の使用溶媒の状況

		酵母光生育阻害試験					
		施設コード					
		a	b	c	d	e	f
被 験 物 質 コ ー ド	A	アセトン	DMSO	アセトン	アセトン		
	B	DMSO	DMSO	DMSO	エタノール		
	C	DMSO	DMSO	エタノール	DMSO		
	D	精製水	精製水			精製水	精製水
	E	DMSO	DMSO			DMSO	DMSO
	F	DMSO	DMSO			DMSO	DMSO
	G			エタノール	エタノール	エタノール	アセトン
	H			アセトン	アセトン	アセトン	アセトン
	I			アセトン	アセトン	アセトン	アセトン

11

12

13

14

1

2 5.3. 陽性対照の分布

3

4 酵母光生育阻害試験の陽性対照は 8-MOP である。この試験では、1 回の試験ごとに 0.1%
5 の陽性対照の結果が得られる。

6

7 図 5.3.1 に各施設の本試験で得られた陽性対照の阻止帯の差の値を示す。また、図 5.3.2
8 に同じデータから作成した箱ひげ図を示す。同様に、予備試験で得られた、阻止帯の差と
9 その箱ひげ図をそれぞれ図 5.3.3、図 5.3.4 に示す。これらの図は、陽性対照の施設内再現
10 性と施設間再現性を把握することができる。

11 これらの図からは施設により陽性対照の分布のばらつきだけでなく、位置も異なってい
12 ることがわかる。

13 施設 a は本試験では陽性対照の分布の位置は大きめな値となっているが、予備試験では
14 かなり低い。酵母光生育阻害試験の陽性と判定するためのカットオフ値は 5mm であるから、
15 予備試験ではほとんどが陽性と判定されないことになる。

16 施設 b では他の施設に比べ、施設内再現性が低い。

17 施設 d、e、f は同じくらいのばらつきである

18

19

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
35

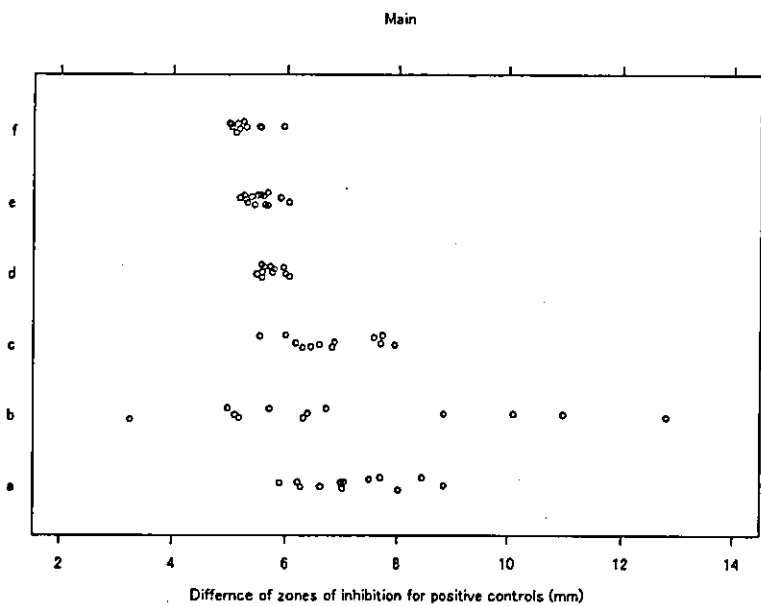


図 5.3.1 酵母光生育阻害試験本試験の陽性対照のばらつき (生データ)

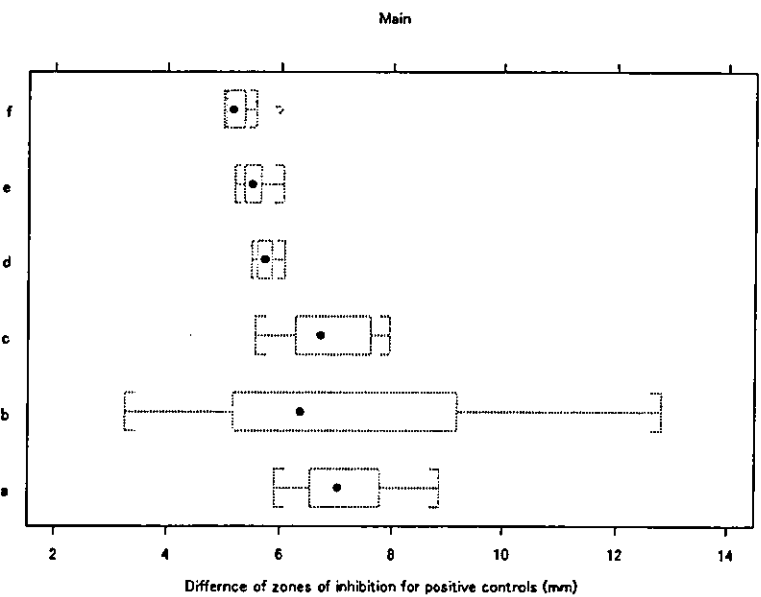


図 5.3.2 酵母光生育阻害試験本試験の陽性対照のばらつき (箱ひげ図)

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

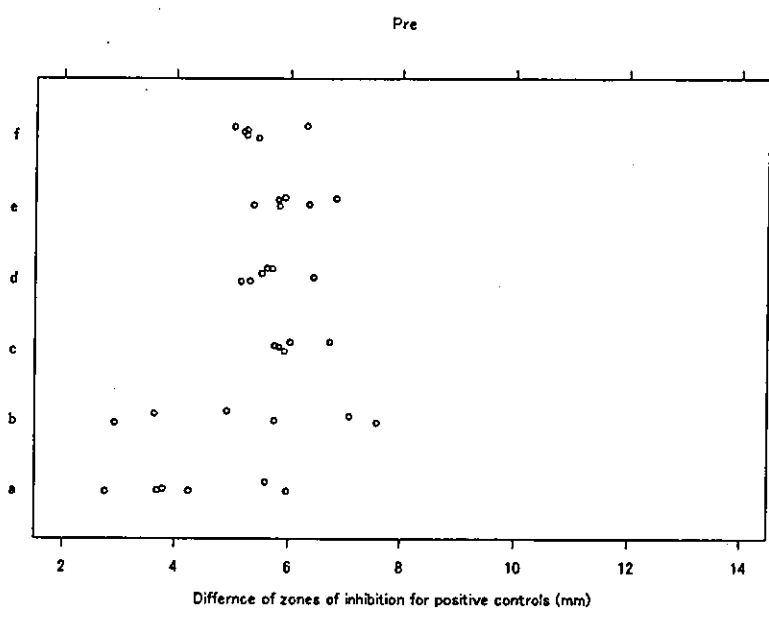


図 5.3.3 酵母光生育阻害試験予備試験の陽性対照のばらつき (生データ)

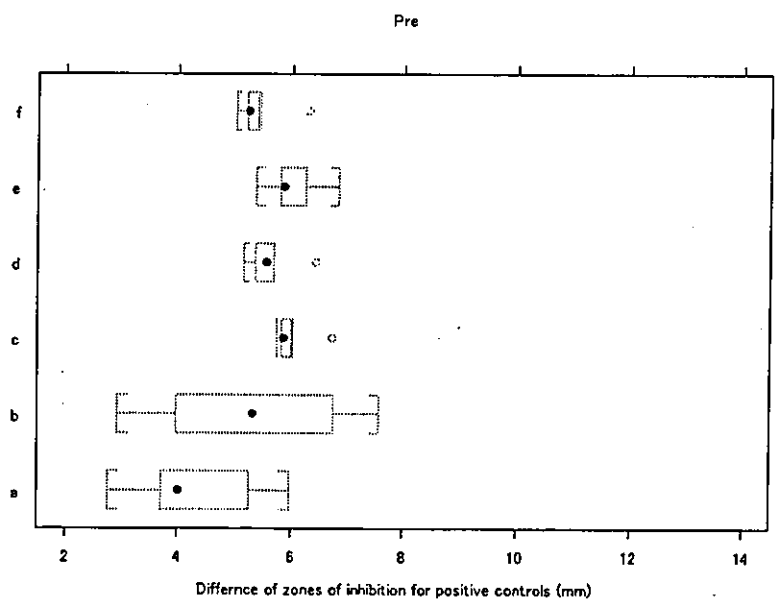


図 5.3.4 酵母光生育阻害試験予備試験の陽性対照のばらつき (箱ひげ図)