

設である。新たな施設公募を行わなかったのは、後で述べるように、光生育阻害試験については補完実験を行わず、主実験の結果を利用することにしたためである。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター
- (株)資生堂安全性・分析センター
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所
- 日本メナード化粧品(株)総合研究所
- マルホ(株)京都 R&D センター

3-2) 実験

3-2-1) 主実験

各施設は、提案されている酵母-赤血球試験の SOP に従って、指定された被験物質の光毒性を実験的に評価した。ただし、予備実験において発生した疑義に応じて SOP の補足が行われたので、最終的に用いられた SOP は資料 5 に示すものである。

3-2-2) 補完実験

SOP が問題になった試験は、酵母光生育阻害試験だけで、赤血球光溶血試験は SOP を変えることを求められなかった。実験の負担を考慮して、補完実験は酵母光生育阻害試験のみで実験をすることにした。

しかし、酵母-赤血球試験では、表 1 に示すように、二つの試験の結果を合わせて評価を行うので、赤血球光溶血試験については主実験の結果を使うことにした。その結果、参加施設を、主実験を行った施設に限ることになり、結果として、実験施設は 5 施設となった。補完実験で採用した酵母光生育阻害試験の SOP は資料 6 に示すものである。

表 1 二つの試験からの総合判定の規則

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

3-3) 被験物質

3-3-1) 主実験

被験物質は、表 2 に示す 16 物質から 9 物質を試料準備担当者が選択し、表 3 に○で示した 6 物質を物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照 (8-Methoxypsoralen) , 赤血球光溶血試験の陽性対照 (Acridine) と共に、各施設に配布した。

施設名は a, b, ..., f というコードで表しておき、データ解析が終了した後に明示した。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表 2 被験物質候補となった 16 物質と *in vivo* での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価(評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
<u>Amiodarone</u>	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-me thoxydibenzoy lmethane(BM DM)	N	N(0)	

Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
Chlorhexidine(C HD)	N		N	Rose Bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetra chlorosalicylan ilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsora len(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsor alen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoum arin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> - dimethylaminob enzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の *in vivo* 判定はモルモットの結果，ECVAM, EU/COLIPA の判定はヒトの結果によっている。 *In vivo* 判定において，空白はデータなし，である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 193-202.

EU/COLIPA の *in vivo* 判定についての文献：

- (1) Spielman H., et al. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro*, **8(4)**, 793-796.
- (2) Spielman H., et al. (1998) The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro*, **12(3)**, pp. 305-327.
- (3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, **28(6)**, 777-814.

表3 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	<i>in vivo</i> 判定	施設コード					
			a	B	C	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○

BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○
------	---	---	---	---	---	---	---	---

3-3-2) 補完実験

実験を酵母光阻害試験のみで行うという制約から、被験物質とその割り当ては主実験と同じものにした。その内容は表4の通りで、主実験と違うのは施設bが無いことだけである。試料コードは、予測可能性を小さくするために、主実験と異なるものにした。

表4 各施設に割り付けた物質 (○印)

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計

太陽光のシミュレーション光源については、各施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

3-4-1) 主実験での補正

強度計に機差が認められたので、各施設で標準計にあわせた換算係数をかけて強度の補正をおこなった。換算係数は、各施設で記録されている。

3-4-2) 補完実験での強度計の補正

強度計の校正を2006年7月に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが2台あったので、この2台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数は各施設で記録されている。

3-5) 吸光度の測定波長

主実験における赤血球光溶血試験では、光溶血度についての吸光度を、測定波長540nmと525nmの2種類で実施し、主解析を540nmでの測定値とした。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で代用することを認めた。

赤血球光溶血試験は主実験のみで行ない、補完実験では主実験のデータを利用した。

3-6) 実験条件の記録

主実験と補完実験の両方とも、GLP準拠で実験し、すべての実験施設が定められた様式で、指定された測定機器や実験条件などを記録した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データクリーニング

4-1-1) 主実験

各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験 39 ファイル、赤血球光溶血試験 183 ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は以下の通りである。

- (1) 必要なデータが入力されていない (16 件),
- (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 (1 件),
- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (48 件),
- (4) 単純な入力ミス (6 件),
- (5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告 (3 件),
- (6) 紙媒体で提出されたデータと電子媒体で送られてきた結果が一致しない (54 件),
- (7) その他 (94 件)

SOP では、各試験で 2 回の本実験を行ない、2 回の結果が大きく異なった場合は追加実験を 1 回行なうことになっていた。追加実験が行われた場合は、本実験の中の追加実験と結果が類似している方を採用して 2 回の実験結果とした。追加実験を 2 回行っている場合は、先に行った方を 1 回の追加実験とした。

被験物質コードは、データクリーニングを行ってデータが固定された後に被験物質割付担当者からデータ解析担当者に開示された。実行委員会に施設コードと被験物質コードが開示されたのは、2004 年 5 月の検討会である。

4-1-2) 補完実験

主実験の経験を生かして、データシートを改善した結果、クリーニングが必要なデータファイル数は、わずか 2 件に減少した。いずれも、データシートへの転記ミスである。

4-2) 施設内再現性

本研究の主要課題は施設間再現性の検討であるが、施設内で再現性がなければ施設間再現性の吟味が無意味になる。そこでまず施設内再現性を吟味した。

4-2-1) 主実験

本実験の 2 回の結果を、1 回ずつの 2 試験とした組み合わせについて、2 回の判定結果が同じかどうかを調べた。その結果、表 5 に示した場合には、実験を反復したときに異なる結果が生じる可能性があることが分かった。

施設 b は特に結果が悪かった。その原因を検討したところ、実験者が使用機器に慣れておらず、例えば光照射による温度変動を制御していなかったことが分かった。これによって結果が不安定となり、他の実験施設と異なる結果を導いたものと思われた。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れた検討を行うこととした。

施設 c の物質 H については、赤血球光溶血試験で 1 回目と 2 回目が大きく異なった結果が得られていたが、追加実験でこれが補正されているので次項の検討には影響しないと考えられる。施設 c の物質 B については、結果としての陰性と擬陽性の違いはあるが、測定値としては、それほど大きな差ではないので、酵母-赤血球試験にある程度の施設内再現性が認められたものとして施設間再現性を検討した。

表 5 施設内の実験反復で結果が異なる可能性のある施設・被験物質組み合わせ

施設	被験物質	可能性
b	A	E または P
	B	N または E
	C	E または P
	D	N または E または P
	F	N または P

c	B	N または E
	H	N または P

4-2-2) 補完実験

主実験と同様、平均値ではなく、個別の測定値を用いて施設内再現性を評価した。追加実験をした場合には酵母-赤血球試験で使わないことになっている本実験の測定値も、施設内再現性の評価には用いることにした。この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表6の場合に施設内で判定の違いが生じていた。補完実験での施設内再現性は明らかに主実験より良くなっている。SOPの改訂で施設内再現性が改善されたと考えられる。

表6 施設内で異なる結果が出た場合

		被験物質	可能性
施設	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

4-3) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

4-3-1) 主実験

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表7が得られる。施設bを除いて考えると、陽性と陰性が混在する物質はない。物質A、B、Dで陽性と擬陽性が混在、物質Hで陰性と擬陽性が混在している。この擬陽性をどう考えるかが、施設間再現性の評価を左右する。

実行委員会では、カットオフ値の変更と用量相関性を考慮に入れた判定が必要であるという意見が出たが、これを考慮することによる再現性の改善は認められなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表8-1、8-2が得られる。前者は施設bを除いた場合、後者は施設bを含めた場合である。

表8-1、8-2において採用している指標の定義は次の通りである。

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I： *In vivo* 判定と実験判定が一致した割合

一致度 II：擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

表8-1、8-2においては、感度IIがかなり大きな値であるのに、特異度は小さな値であることが目立っている。その主たる原因は、物質C、Hの *in vivo* 判定が陰性なのに、実験判定のほとんどが陽性または擬陽性であることである。

まず物質Cの *in vivo* 判定の根拠を表2で見ると、ここでは判定が文献によるものであって実験値が明瞭には示されていない。この判定の妥当性の再検討が必要である。

次に物質Hの実験データを見ると、擬陽性を示した3施設の全てにおいて、酵母光生育阻害試験での反応が、カットオフ値ぎりぎり擬陽性になっている。従って、現在設定されているカットオフ値の妥当性の再検討が必要と思われた。

表7 施設間再現性（P：陽性，E：擬陽性，N：陰性）

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodarone	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		

CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

表 8-1 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性（施設 b を除いた場合）

	施設コード					平均
	A	c	D	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

表 8-2 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性（施設 b を含めた場合）

	施設コード						平均
	a	b	C	D	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (00%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

4-3-2) 補完実験

表 9 は施設間再現性の検討結果を要約したものであり、表 10 は *in vivo* の結果との類似性を評価したものである。採用している指標は上と同じであるが、感度 I と感度 II の値が同じだったので、一致度については両者を区別しなかった。

SOP 改訂の結果、感度は高くなったが、特異度は低くなり、結果として一致度の改善は実現しなかった。

表 9 施設間再現性（P：陽性，E：擬陽性，N：陰性）

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設				
			a	c	d	e	f
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		E	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表 10 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	A	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

5. 考察

5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

5-1-1) 主実験

個々の実験での判定について解析者がまとめた特徴は表 11 の通りである。それぞれ注意点があるので、SOP の改訂や今後のバリデーション研究での被験物質選択において参考にすべきであろう。

赤血球光溶血試験では、陽性対照が陽性にならないという現象がいくつかの施設で見られた。その原因は、当初予定していた Veronal buffer と Sigma 社製 acridine をそれぞれ PBS(-)と東京化成社製 acridine に変更したことの影響と考えられた。前者に基づいて作成した SOP では、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためと考えられた。SOP を設定するとき、陽性対照をどのように使うかについて、十分な吟味が必要である。

表 11 データに表れた被験物質の特徴

	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶血試験 (540nm)	<i>In vivo</i>
物質 A	・施設 a での差がやや大 ・施設 b のばらつき大	・施設 d の陽性という判定はカットオフ値ぎりぎり	・陽性
物質 B	・施設 a,c,d では用量反応があるが、施設 b では傾向がない	・全施設で用量反応がない	・陽性
物質 C	・照射・非照射で用量反応あるが差では用量反応が不明確	・全施設で陽性 ・非照射でも用量反応あり ・施設 b での再現性が無い	・陰性
物質 D	・照射・非照射で用量反応あり ・施設 a で照射・非照射の差がやや大	・施設 a,b,e で非照射の溶血度が大 ・全施設で非照射での用量反応があり、照射に対する関係が複雑	・陽性
物質 E	・施設 a で差が大 ・差の用量反応は不明確	・全施設で明確に陽性 ・非照射でもやや反応あり	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 F	・全施設で用量反応ない	・施設 b のばらつき大	・陰性
物質 G	・全施設で判定が微妙 ・非照射でもやや反応あり	・全施設で陽性 ・非照射での反応がほとんどない	・陽性
物質 H	・全施設で判定が微妙	・全施設で反応がほとんどない ・施設 c は再実験で陰性	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 I	・全施設で用量反応ない	・全施設で用量反応ない	・陰性

(資)：資生堂，(E/C)：EU/COLIPA

5-1-2) 補完実験

SOP 改訂は、陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果、すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは、阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため、阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し、結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) SOP の改訂について

5-2-1) 主実験

本研究では、本試験に先立って、SOP への修正提案が実験担当者などから出された。提案の内に示すものは、担当の森、穂谷の検討の後で、SOP の改訂や追加説明に取り入れられた。

- (1) 両試験とも、当初の SOP では、データの記入方法の詳細が明確でなかった。本研究の際には記録用紙のフォーマットを更新した。
- (2) 酵母光生育阻害試験では阻止帯の境界線が不明確な場合が生じた。このような場合の測定方法について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母-赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。
- (5) 今回は被験物質を 4 倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたろ紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24 穴マイクロプレートから 96 穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めるようになっているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

5-2-2) 補完実験

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが、陰性と判定された物質には、大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が、陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため、阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

中間報告会の討論において、実験担当者から阻止帯の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい、表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として、SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた(資料 7)。

物質 E (ピチオノール)、物質 F (SLS)、物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが、阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも、酵母試験は、これら 3 物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では 2mm であったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで 5mm とされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が 2mm 以上 5mm 未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば 3mm~4mm に変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値 5mm 付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表 1 の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM 等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質 C (Chlorhexidine) の酵母・赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で 2 種類の指標を検討したのはそのためである。

5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表 1 に示したように、陽性 > 擬陽性 > 陰性 の順で強い判定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう 1 つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表 12 が得られる。表中で () で囲んであるのが赤血球光溶血試験が不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36 実験中 14 実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

しかし、これは両者のどちらを先にするかは無関係である。施設での作業のしやすさの関係で赤血球光溶血試験を先に行っても差し支えないことを、SOP に明記しておくべきであろう。

表 12 二つの試験の役割 (P : 陽性, G : 擬陽性, N : 陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
D	d	E	P	P	E	d	E	N	E	F	d	N	P	P
	a	P	(P)	P		a	P	(P)	P		a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
E	e	E	N	E	H	e	E	P	P	I	e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
	c	P	(P)	P		c	N	N	N		c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

5-6) 吸光度の測定波長

赤血球光溶血試験の SOP では、吸光度の測定波長を 540nm にすることを標準にしていたが、表 13 に示されているように、525nm 前後での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。どちらの波長を標準にするかについて適切な SOP 改訂が必要である。

表 13 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左：赤血球光溶血試験での吸光度を 540nm で評価，右：525nm で評価（単位は%）

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合，感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合，

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合，一致度：判定結果が *in vivo* の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験で SOP から次のような逸脱例が生じた。逸脱を生じさせないような技術研修での注意をすべきである。

(1) 24 穴プレートから 96 穴プレートに分ける際に，実施が 2 系列でなされなかった。

=> 分けるのは測定のためなので，このデータを本研究のデータとして採用した。

(2) 予備試験と本試験 1 回目の陽性対照に，自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を 2 回追加した。

=> 2 回目と 3 回目の測定値を採用した。

(3) 被験物質の濃度設定を誤ったので，新たに 2 実験を行った。

=> 追加した 2 実験のデータを採用した。

(4) 1 回目と 2 回目が大きく食い違ったので，実験を 2 回追加した。

=> 3 回目までのデータを採用した。

5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から，将来のバリデーション研究で留意すべきこととして，以下の指摘が出された。

(1) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合，実験装置のみでなく，実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確にしておくべきである。

(2) 光毒性については，今回の使用したものと異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。

(3) 今回の研究では，SOP で光源とフィルターを指定したが，試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく，機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。

(4) 結果論であるが，被験物質 C の *in vivo* 判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では，事前に *in vivo* 判定の根拠を調べ，それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

6. 本研究のまとめ

6-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

補完実験で用意した SOP による実験結果は，感度が 100%，特異度が 42%，一致度 60%であった。SOP 改訂によって，前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。擬陽性を陽性とすれば，陽性物質を誤って陰性とするのが少ないという意味で，酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

SOP 改訂により，陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面では SOP 改訂は妥当であったと考えられる。

6-2) 施設間差

実験技術に問題があって施設を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。補完実験で用意した SOP を用いたときの施設間差は小さいと思われる。

6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nm より 525nm 前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOP では波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) データマネジメント

主実験では大幅なデータクリーニングが必要であったが、記入書式等を改善した補完実験では修正すべきところのごくわずかになった。

6-6) SOP 改訂の影響

陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP 改訂の一つの結果と考えられる。

添付資料

- 資料 1 主実験研究計画書
- 資料 2 主実験研究報告書
- 資料 3 補完実験研究計画書
- 資料 4 補完実験研究報告書
- 資料 5 主実験 SOP
- 資料 6 補完実験 SOP
- 資料 7 酵母光生育阻害試験の最終改訂 SOP

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

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）と光溶血性試験（以下、「溶血試験」という）の組み合わせ（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

丁寧に言うなら「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施設間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。

13. 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。

14. 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。

15. 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。

16. 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、アイビ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

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2004年8月27日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会代替法評価委員会（以下「評価委員会」という）は、2003年7月29日、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」という）に、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母－赤血球試験」）の施設間バリデーションを行うことを要請した。（別添え資料1「合同委員会議事録」を参照のこと。）

バリデーション委員会は、要請に応じるため、別添え資料2「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」（以下、計画書の添付資料も含めて「計画書」という）に述べるように、「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」（以下「実行委員会」という）を組織し、2003年10月16日に研究を開始した。

実行委員は、

板垣宏、大野泰雄、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲穂、土肥孝彰、

藤田百合子、穂谷昌利、森眞輝、吉村功（委員長）、若栗忍

の13人で、その所属等は計画書の添付資料の通りである。

実行委員会は、計画書にそって、2003年11月13,14日に食品薬品安全センター（秦野）で技術研修会を開催した。実験参加施設への機材送付等は、大野が2003年度末までに行った。実験参加施設は2003年中に実技復習を行い、2004年1月から4月中旬までの間に実験を終え、データを解析担当者の大森に送付した。大森はデータクリーニング・解析を行った上、2004年5月7日の検討会に結果を報告した。

本報告書は、検討会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が解答を与えるべき主要課題は、酵母－赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するか、多施設試験を行って定量的に把握することである。副次課題は、提案されている酵母－赤血球試験の標準手順（standard operating procedure; SOP）の各指示、とりわけ陽性・陰性の判定法が適切かどうかを吟味することである。

3. 研究の遂行

研究はほぼ計画書にそって遂行された。

3-1) 実験施設

実験を行った施設は、公募に応じた次の6施設で、括弧内は実験担当者である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（岡本裕子、谷川浩子）

(株)資生堂安全性・分析センター（森眞輝、穂谷昌利）

(財)食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍）

東洋ビューティ（株）中央研究所（藤田百合子）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（長谷川靖司）

マルホ（株）京都 R&D センター（土肥孝彰）

3-2) 被験物質

被験物質は表 1 に示す 16 物質から、9 物質を大野が選択しコード化した。

各施設には、表 2 中に○で示された 6 物質が、物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照 (8-Methoxypsoralen) , 赤血球光溶血試験の陽性対照 (Acridine) と共に配布された。

これらの物質名・施設名は 2004 年 5 月 7 日の検討会で明らかにされたが、本報告書では施設名を a,b,...,f というコードで表し、どのコードがどの施設であるかを示さないことにした。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表 1 被験物質候補となった 16 物質と *in vivo* での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーション 採用の 評価	資生堂 評価(評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーション 採用の 評価	資生堂 評価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
<u>Amiodarone</u>	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(BM DM)	N	N(0)	
Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
<u>Chlorhexidine(C HD)</u>	N		N	Rose bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsoralen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoumarin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -dimethylaminobenzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の *in vivo* 判定はモルモットの結果、ECVAM, EU/COLIPA の判定はヒトの結果によっている。*In vivo* 判定において、空白はデータなし、である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 193-202.

EU/COLIPA の *in vivo* 判定についての文献：

- (1) Spielman H., et al. (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro*, **8(4)**, 793-796.
- (2) Spielman H., et al. (1998) The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology*

in Vitro, 12(3), pp. 305-327.

- (3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 28(6), 777-814.

表2 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○

3-3) 光源

太陽光のシミュレーション光源については、6施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

3-4) 吸光度の波長

赤血球光溶血試験で光溶血度を測定する際の吸光度測定は波長540nmと525nmの2種類で実施したが、主解析を540nmフィルターの測定値に基づくことにした。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で代用することを認めた。これについては後で考察する。

3-5) 実験条件の記録

GLP準拠で実験することにしたので、すべての実験施設が、そこで定められている測定機器や実験条件などの記録のコピーを大野に送付した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データ量

実験で得られたデータは各施設から、大森と吉村に送られた。

そのファイル数は、本実験と予備実験をあわせて、酵母光生育阻害試験が228、赤血球光溶血試験が192であった。データ解析は大森が担当した。前記検討会に提出された資料、及びその後の追加資料は別添え資料3「データ解析報告書」の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、詳細についてはこの報告書で確かめることができる。

4-2) データクリーニング

大森は、各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験の39ファイル、赤血球光溶血試験の183ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は

- (1) 必要なデータが入力されていない (16件),
- (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 (1件),