

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価法の国際的バリデーション
に関する研究

平成18年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19（2006）年 4月

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
研究報告書

OECD/EDTA validation management 活動との調整、
及び内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション

分担研究者 小野 敦 医薬基盤研究所・トキシコゲノミクスプロジェクト

研究要旨

本研究では、化学物質の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法のうち、行政的有用性が推定される試験法として、我が国で開発された HeLa 細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対するレポーターアッセイ試験法および欧米で開発された Lumi-cell 法について欧米の研究機関と協力し、国際的なバリデーションを実施し、その妥当性の検討を行っている。

本年度は、HeLa 細胞をベースとした ER α に対するレポーターアッセイ試験系試験法については、これまでにアゴニストアッセイの国内バリデーションが終了し、OECD、EDTA の下部組織である OECD-VMG non-animal に於いて、その成果をまとめた報告書の作成した。現在、OECD においてバリデーションの専門家による第三者評価が実施されている。さらに、OECD における評価結果を待って、今後、アンタゴニストアッセイのバリデーションを追加すべく、プロトコール作成に向けて数種の化合物についてアンタゴニストアッセイを実施し系の安定性や信頼性に関する基礎データの取得を行った。一方、Lumi-cell 法については、米国の ICCVAM と EU の ECVAM との共同のもとバリデーション実施のために、国際的な運営委員会を組織し、プロトコールの確定、被験物質の選択を終了した。また、バリデーション試験に先立って国内参加施設の技術水準や使用する試薬類の検討のため、コントロール化合物による基礎データの測定を行った。その結果、十分な信頼性を示すデータ測定が可能であると判断されたことから、国内参加施設の決定を行い、バリデーション試験開始の準備を終了した。

A. 研究目的

現在、内分泌かく乱性など新たな問題に対応すべく既存化学物質の安全性再評価が求められているが、対象となる化学物質の数は極めて多く、それらの安全性評価は予想以上に難しい。また、それらを従来の動物を用いる安全性試験法で評価するのは時間がかかるだけでなく、経済性や研究資源の配分、動物福祉の面から問題であり、効率的かつ倫理的な新規試験法が求められ、多くの方法が開発されている。新規試験法について OECD では真に行政目的に合致し、国民の安全を確保するのに有用であるかを客観的に評価するために、バリデーションと行政的受け入れに関する基準を作成してい

るが、多くの試験法を我が国のみで開発するのは不可能であるし、OECD 基準を満たすバリデーションを行うことも容易ではない。

本研究では、化学物質の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法のうち、行政的有用性が推定される試験法として、我が国で開発された HeLa 細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対するレポーターアッセイ試験法(HeLa 法)および欧米で開発された Lumi-cell 法について欧米の研究機関と協力し、国際的なバリデーションを実施し、その妥当性を検討することを目的としている。

HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa cell)に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応

答配列とルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込み開発した安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。

本法は、厚生労働省および経済産業省の研究費により我が国の化学物質評価研究機構 (化評研) において開発が進められてきたものであり、これまでに国内におけるアゴニストアッセイバリデーションが終了している。本年度は、すでに終了しているバリデーション結果について OECD、EDTA の下部組織である OECD-VMG non-animal に於ける検討を実施し、その成果をまとめた報告書の作成を、6~7 月に OECD-VMG non-animal の secretary である Dr. Miriam Jacob を日本に招いて行った。この報告書を受け、現在 OECD において本分野の専門家およびバリデーションの専門家による第三者評価が実施されている。一方、報告書作成の過程で、これまでアゴニストの評価しかバリデーションが実施されていないことが指摘された。そこで、今後、OECD におけるアゴニストアッセイに関する評価結果を待つて、アンタゴニストアッセイについて必要なバリデーション試験を追加すべく、内因性の女性ホルモンである 17β -estradiol によるレポーター遺伝子転写活性化の阻害を指標とした抗エストロゲン作用 (アンタゴニスト活性) 検出系について、①阻害対象となる 17β -estradiol の最適濃度について、②既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質を用いた測定の実験の再現性について、更に③既に ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質も含めて文献での結果と比較を行い、測定系の妥当性について検討を行った。

Lumi-cell ER アッセイ法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc. (XDS 社) により開発された方法で、ヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンとエストロゲンレセプター (ER) との結合をルシフェラーゼ活性により検出する。本法については、バリデーション試験は実施されていないため、本研究において米国 NICEATM および欧州 ECVAM と共同で国際バリデーションを実施する。本年度は、まず国際的な運営委員会を組織し、アゴニスト、アンタゴニストそれぞれ 4 フェーズからなるバリデーションプロトコルの確定、参加施設の選択、被験物質の選択等を行った。我が国におけるバリデーション試験実施施設と

して、当初、レポーターアッセイの実験経験の豊富な化評研を提案したが、化評研では HeLa 法の開発を推進しており望ましくないとの指摘を受け、XDS 社と国内で唯一商業的ライセンスを締結している (株) 日吉を実施施設の候補として選定した。しかし、(株) 日吉では Lumi-cell ER アッセイ法の実験経験が少ないため、本年度はバリデーションフェーズ 1 試験の実施に先立って、技術水準や使用する試薬類の検討のため、コントロール化合物の測定による基礎検討試験 (フェーズ 0) を行った。その結果、十分な信頼性を示すデータ測定が可能であると判断されたことから、国内参加施設として決定を行い、バリデーション試験開始の準備を終了した。

B. 研究方法および研究結果

B.1. hER α -HeLa-9903 細胞を用いた ER α antagonist 検出系の再現性及び妥当性に関する研究

研究方法

1. 試験施設: 本試験は、(財) 化学物質評価研究機構において実施した。

2. 試験材料

2.1 供試化学物質

対照物質 17β -estradiol (E2)、既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質、ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質について、その選定理由と共に Table 1 に示した。

2.2 細胞

(hER α) 安定形質転換細胞株を住友化学株式会社より入手し、実験に使用した (H12 年 4 月入手株)。

2.3 試薬の調製

1) 化学物質原液の調製

各化学物質を秤量した後、10 mM となるように Dimethyl sulfoxide (DMSO、ナカライテスク) を加えて溶解した。10 mM に調製した化学物質は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM 及び 1nM とした。化学物質は終濃度が 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM 及び 1 pM となるよう

に EMEM-10%FBS 培地に添加した。

2) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地(イーグル MEM ニススイ) 4.7 g、10% 炭酸水素ナトリウム(10 g→100 mL) 9 mL 及び 3% L-グルタミン(3 g→100 mL) 6 mL に精製水を加えて 500 mL とした (EMEM 基礎培地) 後、Dextran coated charcoal(DCC)処理した牛胎児血清(FBS) 56 mL を加え、ろ過滅菌した。

3) 細胞溶解剤

5x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10 mL に精製水を加え 45mL とした。

4) Luciferase Assay Reagent の調製

Luciferase Assay Substrate (プロメガ株式会社) の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。

3. 試験方法

3.1 測定手順

以下の手順に従って測定を行った。

細胞を測定用の 96well プレートに播種 (104/well)

↓

化学物質の添加

(終濃度 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1nM, 100 pM, 10 pM 及び DMSO 各 n=3)

(化学物質を添加する well の培地中には対照物質 E2 を終濃度

25 pM になるよう予め添加)

↓

CO₂ インキュベータ内で培養(20~24 時間)

↓

培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L×2 回)

↓

細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)

↓

10 分間室温で静置

↓

ルミノメータによる発光測定

注入量 : 50 μ L/well

測定時間: 注入 1 秒後~5 秒間(100 msec×50 interval)の積算

3.2 Assay プレート上のサンプル配列

以下の plate format に従い、化学物質の添加を行った。

	化合物 1			化合物 2			化合物 3			化合物 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 100 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 10 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 1 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F 100 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 10 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H NC	-	-	-	-	-	-	PC	-	-	-	-	-

NC: Negative control (DMSO), PC: Positive control (25 μ M E2)

3.3 検証内容

1) 細胞毒性の確認

細胞毒性による False positive 反応を回避するため、コントロール細胞、即ち ERE などのエンハンサーに依存せずに常にルシフェラーゼを産生する細胞株 (Control 細胞) を用いて実験を行う化学物質濃度域でのルシフェラーゼ活性を観察した。化学物質を添加しない場合の酵素活性に対して 80%に相当する活性まで化学物質を添加した際の活性が低下した濃度域が認められた場合には、その濃度域におけるエストロゲン活性阻害作用は細胞毒性に伴う False positive 反応と判断した。

2) 対照物質 E2 濃度の最適化確認

阻害対象となる対照物質 E2 の共存濃度によって ER アンタゴニストの示すレポーター遺伝子転写活性化の阻害効率に違いが生じることが想定されたため、E2 の共存濃度の最適条件を確認するために、化学物質と同時に添加する E2 濃度を終濃度 10 nM、6 nM、1 nM、600 pM、100 pM、60 pM、10 pM、6 pM 及び 1 pM でそれぞれ添加し、最適条件の検討を行った。測定化学物質には、4-HYDROXYTAMOXIFEN を用いた。

3) 再現性の確認

Table1に示す既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 物質を用いて、再現性の確認を実施した。測定は独立した実験を 9 回実施した。対照物質 E2 濃度は、25 pM にて実施した。

4) 測定系の妥当性評価

事前スクリーニング以外で既に報告のある ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質及び ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質 (Table 1) を用いて測定を行い、文献での結果と比較して測定系の妥当性に関して評価した。

4. 結果の解析

各濃度区で得られた発光強度の平均値は陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity) を求め、陽性対照区の転写活性化倍率の 1/2 の値まで転写活性化倍率が阻害される供試化学物質の濃度 (IC50) を Logistic 式より求めた。

研究結果及び考察

1) 細胞毒性の確認

今回実施した 4 物質について今回の試験濃度 10 μ M \sim 10 pM の範囲では、Control 細胞に対する細胞毒性がないことを確認した (図 1-1)。

2) 対照物質 E2 濃度の最適化確認

E2 濃度を終濃度 10 nM \sim 1 pM の範囲で検討した結果を Table 1-2 及び図 1-2 に示した。E2 濃度が低くなるにつれて測定化学物質の IC50 値が低くなる傾向が見られた (Table 1-2)。E2 濃度 60 pM 以下の濃度域では、測定化学物質の IC50 値は安定し始めているが (Table 2)、1 pM になると測定化学物質の IC50 値及びその阻害曲線は悪くなっていた (Table 1-2、図 1-2)。これらは E2 自身の応答性 (図 1-3) を考慮すると 100 pM 以上の濃度域では、E2 自身の応答性が飽和しているためであり、1 pM になると E2 自身の応答性がほとんどなく、阻害のダイナミックレンジが狭くなってしまふためであると考えられる。

以上のことから、E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジも狭くないと考えられる 60 pM \sim 6 pM の範囲に E2 濃度の最適化条件が含まれるものと推察された。これら 2 つの条件を考慮して、E2 自身の応答曲線から算出された EC80 相当の 25 pM を採用した (図 1-3)。

3) 再現性の確認

測定値の評価に関しては、ばらつきを正規分布として評価するために Log10[IC50 (M)] で評価した。算出された 9 回分の Log10[IC50 (M)] 結果を Table 1-3 及び図 1-4 に示した。実施 4 物質において、それらの標準偏差 (SD) は、0.15 \sim 0.27 となり、変動計数 (CV) は、2.6 \sim 3.8% と良好な結果が得られた (Table 3)。各測定値は、1 点を除いて Mean \pm 2 \times SD の範囲内に入っており (図 1-4)、2 \times SD の最大値が 0.53 であることから、今回の結果から計算すると IC50 値は、Log10[0.53] = 3.4 倍 \sim 1/3.4 倍の範囲に 95.4% の確立で入ってくるものと考えられる。4 物質について、それらの IC50 (M) は、10 $^{-6}$ \sim 10 $^{-10}$ M 範囲に渡っており (Table 1-3)、この範囲において上記のことが適用できると考えられる。

4) 測定系の妥当性評価

事前スクリーニング以外で既に ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質、ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いて測定を行い、文献での結果と比較した (Table 4)。その結果、既報文献での結果と本測定系での結果は一致しており、本測定系は、ER アンタゴニスト活性検出系として妥当であると考えられる。

B2. 内分泌かく乱物質スクリーニング Lumi-cell ER アッセイのバリデーション試験 (フェーズ 0)

研究方法

1. 試験施設: 本試験は、株式会社 日吉 技術部 分析研究課において実施した。

2. 検討項目

化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究を行うにあたり、初期検討として、下記の項目について検討を行った。

- (1) Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理
- (2) Lumi-cell ER 細胞のばらつきについて
- (3) Lumi-cell ER の増殖速度について

(4) Lumi-cell ER の細胞数による比較

(5) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Pahsel)の事前確認試験

3. 方法および結果・考察

(1) Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理

初期検討の基本的なフロー及び試薬について XDS 社から提供されたプロトコールに従って整理を行った。

Lumi-cell ER アッセイ法のフロー

1) プレート播種フロー

Lumi-cell ER セル細胞を培養フラスコ(150cm²)内で RPMI 培地(8%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン in RPMI1640)で CO₂ インキュベーター(37°C)下で培養する。コンフルエントになった状態で、播種し、1:2 に希釈し、DMEM 培地(5%Carbon Stripped FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、2%L-glutamine in DMEM) (20ml)及び G418(75 μl)を添加し、1~2 日培養する。コンフルエントになった状態で、2.0×10⁵ 個/well で 96 穴マイクロプレートにまき、CO₂ インキュベーター(37°C)で一晩、前培養する。

2) アゴニスト活性の曝露フロー

被検液は、希釈段階にした[DMSO 溶液](4μl)に DMEM 培地(400 μl)を加え調整した。標準溶液(E2)についても同様の操作を行い、被検溶液を調整した(E2;17 β エストラジオール濃度、0.02 ~10ng/ml)。被検溶液は 2well(190 μl/well)に分け、CO₂ インキュベーター内(37°C)で 20~24 時間、細胞に曝露する。

3) アンタゴニスト活性の曝露フロー

被検液は、希釈段階にした[DMSO]溶液(2 μl)と[17 β-estradiol; 5ng/ml](2 μl)に DMEM 培地(400 μl)を加え調整した。標準溶液(Raloxifene)についても同様の操作を行い、被検溶液を調整した(Raloxifene 濃度、0.0098~2.5 g/ml) (2 μl)と[17 β-estradiol ; 5ng/ml](2 μl)。被検溶液は 2well(190 μl/well)に分け、CO₂ インキュベーター内(37°C)で 20~24 時間、細胞に曝露する。

4) 測定フロー

曝露後、培地を取り除き、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega 社製)により誘導されたルシフェラーゼ活性(相対発光強度;RLU)をルミノメーター(Centro LB960;Berthold 社製)で測定する。ER 相当濃度は、得られた RLU からバックグラウンド(溶媒対照の RLU)を差し引いている。図 2-1 に細胞の操作フロー、図 2-2 に曝露の操作フロー、図 2-3 に Lumi-cell ER アッセイ法のフロー(写真)を示す。

5) 試薬の整理

標準液以外は、国内で調達できる試薬等を使用する。標準液については、XDS 社にて、調整済みの試薬を使用し、特に DMSO に関しては、XDS 社の方で活性測定を行い管理したものを使用する。表1. に調達品の試薬名、商品名、メーカー、コード番号の一覧を示す。

(2) Lumi-cell ER 細胞のばらつきについて

細胞系の測定方法の中には、エッジエフェクトとあって、96 穴プレートが一番外側の well(全部で 36 穴)の外気に接触する状況(温度や CO₂ 濃度)が他の内側の well と異なり、細胞の成育状態が悪くなり、内側の well の数値より低い数値を出すことがあり、ばらつきの要因となる。本研究で使用する Lumi-cell ER 細胞のエッジエフェクトを調査した。

1) 方法

「3. 1 Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理」に従って、Lumi-cell ER 細胞は、標準液 E2(2.5ng/ml)を全 Well に曝露(n=2 プレート)を行い、活性の比較を行った。

2) 結果、考察

Lumi-cell ER 細胞の測定結果1回目を図 2-4. 及び表 2-2. に2回目を図 2-5. 表 2-3. に示す。Lumi-cell ER 細胞では、各プレートの発光量(Rusifese Light Units;RLU)の全 well の平均を「1」とした時の割合1回目[0.85 - 1.05, (n=96), C.V=9.17%]、2 回目[0.80 -

1.37,(n=96), C.V=5.76%]とばらつきは少ない。全体の well と外側、内側の well のばらつきを見ると 1回目 C.V=9.17%、8.51%、7.57%、2 回目 C.V=5.76%、5.44%、5.77%と特にエッジエフェクトの影響は少ないと判断できる。エッジエフェクトがないので、96 穴全ての well を使用することが可能。プレートレイアウトの再検討も考えられる。

(3)Lumi-cell ER の増殖速度について

Lumi-cell ER 細胞を増殖する際の試薬(特に血清)については国内で調達するため XDS 社と異なった種類を使用している。したがって、増殖速度を確認する必要がある。Lumi-cell ER 細胞の場合、PRMI 調整培地で継代し、DMEM 調整培地でプレート播取するため、PRMI 調整培地による培養時及び DMEM 調整培地による培養時の 2 種類について増殖速度を調べる。

1) 方法

「Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理」に従って、Lumi-cell ER 細胞を 1 つのフラスコでコンフルエント状態になったものから細胞懸濁液を作成し、それを 8 等分し、フラスコに播種した。その際、PRMI 調整培地及び DMEM 調整培地の 2 種類を使用した。その後、CO₂ インキュベーターにて培養させ、1 日毎に細胞数を血球計算盤でカウントする。

2) 結果及び考察

図 2-6. に RPMI 調整培地による増殖数、図 2-7. に DMEM 調整培地による増殖数、図 2-8. に増殖グラフを示す。図 2-9. に細胞の増殖写真を示す。開始時の細胞数(個)を「100%」とした時の 1 日毎の細胞数を示す。希釈率 1:8 で播種しているので、100%になった日が、8 倍に増殖した日となる。継代用の RPMI 調整培地は、増殖を目的とした培地であり、5~6 日で 1:8 希釈がコンフルエントに増殖することがわかった。しかし、DMEM 調整培地は、播種する際の培地で増殖を目的とせず、ブランクの低減を目的としているため、増殖は非常に低い。したがって、DMEM 調整培地で 24 時間以上培養は意味がないと思われる。

(4)Lumi-cell ER の細胞数による比較

Lumi-cell ER アッセイ法では、細胞の適正細胞数(2.0×10⁵cell/ml)が規定されている。その細胞数が異なることで活性(RLU や Fold induction)、EC₅₀ の違いがあるか、細胞数を適正細胞数の 2 倍及び 1/2 倍での活性の比較を確認する。

1) 方法

「Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理」に従って、Lumi-cell ER 細胞を使って、1 枚のプレートに細胞を播種する際に、2 倍、適正細胞数、1/2 倍の細胞に調整し、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の標準曲線を描く。これを別の日に 3 回繰り返す。測定は図 2-10. 及び図 2-11. に示すプレートレイアウトで行った。EC₅₀ の算出には、GraphPad-Prism4.0 for Window(GraphPad 社)を使用した。

2) 結果及び考察

Lumi-cell ER 細胞のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の細胞数による比較については、EC₅₀ 及び Dose response curve で確認した。アゴニスト活性の結果を、表 2-3 および図 2-12, 2-13 にアンタゴニスト活性の結果を表 2-4 および図 2-14, 2-15 に示す。アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性両方とも細胞数が 1/2 倍~2 倍で変化することによって、EC₅₀ に大きな変化はないが、その細胞数毎の活性強度が絶対値異なることから Fold Induciton に違いがあるため、同一プレート内での細胞数の均一性は精度確保には必須である。3 回繰り返して EC₅₀ を求めて、ばらつきを確認したが、細胞数の変化によるばらつきは小さい。アゴニスト活性; 16.2%~24.2%、アンタゴニスト活性; 18.3~21.4%と C.V. は、30%以下であった。Phase1 より通常量(2.0×10⁵cell/ml)に一連のプロジェクト内で合わせる必要がある。

(5)Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Pahsel)の事前確認試験

Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究に先駆けて、日本(株式会社 日吉)のラボでの Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する

研究に則った方法(特にプレートレイアウト)で事前確認を行った。

1) 方法

「Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の整理」に従って、図 2-16. 及び図 2-17. のプレートレイアウトで行った。標準液は、XDS 社で調整済みを使用し、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の標準曲線を描く。これを別の日に 3 回繰り返す。EC50 の算出には、GraphPad-Prism4.0 for Window(GraphPad 社)を使用した。

2) 結果及び考察

Lumi-cell ER 細胞のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性については、EC50 及び Dose response curve で確認した。

アゴニスト活性

EC50 の平均(n=3) $1.17 \times 10^{-11} \text{M}$ C.V.=30.9%、前回の「(4) Lumi-cell ER の細胞数による比較」の EC50 の平均(n=3) $1.13 \times 10^{-11} \text{M}$ とほぼ同等であるが、C.V.=30%以上ではばらつきが大きい傾向だった(表 2-5)。DMSO の発光量(RLU)の 3 σ も低く抑えられており、精度に問題はないと思われる。ポジティブコントロール [Methoxychlor(323mg/ml)] の Fold Induciton は、平均 6.9 (n=3)であった(図 2-18, 2-19)。

アンタゴニスト活性

IC50 の平均(n=3) $9.43 \times 10^{-10} \text{M}$ C.V.=30.9%、「(4) Lumi-cell ER の細胞数による比較」の IC50 の平均(n=3) $1.81 \times 10^{-9} \text{M}$ とほぼ同等であるが、C.V.=7.1%ではばらつきも少なかった(表 2-6)。ポジティブコントロール 1[E2(2.5mg/ml)] の Fold Induciton は、13.7 [9.9-16.2(n=3)] ポジティブコントロール 2[Flavone(5mg/ml)/E2(5ng/ml)] の Fold Induciton は、5.4 [4.6-6.8(n=3)]であった。DMSO の発光量(RLU)の 3 σ も低く抑えられており、精度に問題はないと思われる(図 2-20, 2-21)。

D. 考察及び今後の展望

HeLa 系については、アンタゴニスト検出系としての基礎検討結果から、17 β -estradiol の最適濃

度を E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジ が広い EC80 相当の 25 pM とした。既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質を用いた測定における変動計数(CV)は、2.6~3.8%と非常に安定した結果が得られ、また既に ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質も含めて文献での結果との比較既報文献での結果と本測定系での結果は一致した。今回の結果から HeLa 細胞アッセイ系アンタゴニスト活性検出系としての妥当性が確認できた。今後はこれまでに取得済みデータをもとにバリデーションに必要となる検討項目について整理し、プロトコールの作成を進める。

Lumi-cell ER 細胞及びアッセイ方法については、詳細な基礎データを取得しアッセイ系の特徴を把握することが出来た。Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の確認、事前検討の結果より、バリデーションフェーズ1の実施は可能と判断された。ただし、今回の結果についてはXDS社における試験結果と十分な比較検討を行っていないため、今後フェーズ 0 の結果についても、XDS社と相互に情報を共有し、フェーズ1に備える。また、今回の検討結果より現状のプロトコール中で改善できる部分も考えられたため、これらについても国際的バリデーションに関する研究と併行に検討を行う。

E. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

WS Stokes¹, S Bremer², M Jacobs², H Kojima³, J Kanno³, P Ceger⁴, FH Deal⁴, RR Tice, NICEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method. 46th SOT, North Carolina (2007)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

- | | |
|---|--|
| <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> <p>G. 添付資料一覧</p> <p>1
) International Endocrine Disruptor Study Management Team</p> <p>2) Proposed Timelines for International LUMI-CELL ER TA Validation Studies</p> <p>3) Draft Statement of Work, Validation of the LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assay for the Detection of Estrogen receptor Agonists and Antagonists</p> <p>4) Report on the LUMI-CELL Protocol standardization Study</p> <p>5) Agonist Protocol, LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Test Methods for Identifying Estrogen Agonists and Antagonists</p> <p>6) Antagonist Protocol, LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Test Methods for Identifying Estrogen Agonists and Antagonists</p> <p>7) Draft Report of the Preliminary Validation Assessment Panel of the Japanese Multi-laboratories Validation Study of a Stably Transected ER alpha Mediated Reporter Gene Assay in Japan</p> <p>8) Detection of Estrogenic Activity using Reporter Gene Assay</p> <p>9) Detection of Anti-estrogenic Activity using Reporter Gene Assay</p> <p>10) ICCVAM/NICEATM ED Activities</p> | <p>11) Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, Monday, 15, May 2006</p> <p>12) Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, Thursday, 13, April 2007</p> <p>13) Action Items from 2 August 2006 EDWG Meeting</p> <p>14) Action Items from 27 July 2007 EDWG Meeting</p> <p>15) Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, 02, October 2006</p> <p>16) HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイのバリデーションの進捗について</p> <p>17) Draft summary minutes of teleconference meeting held on 17 March 2006, The Preliminary validation assessment panel of the Japanese multi-laboratories validation study of a stable transected Era mediated reporter gene assay in Japan</p> <p>18) Draft summary minutes of teleconference meeting held on 19 May 2006, The Preliminary validation assessment panel of the Japanese multi-laboratories validation study of a stable transected Era mediated reporter gene assay in Japan</p> <p>19) Stably Transected Transcriptional Activati</p> |
|---|--|

on (TA) Assay- Nomination
of Peer Reviewers

20) 内分泌かく乱物質スクリーニング

Lumi-cell ER アッセイのバリデーション(

Phase0)に関する研究

内分泌かく乱物質試験法のバリデーション資料一覧

No.	資料名
1	International Endocrine Disruptor Study Management Team
2	Proposed Timelines for International LUMI-CELL ER TA Validation Studies
3	Draft Statemet of Work, Validation of the LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assay for the Detection od Estorgen receptor Agonists and Antagonists
4	Report on the LUMI-CELL Protocol standaraization Study
5	Agonist Protocol, LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Test Methods for Identifying Estorogen Agonists and Antagonists
6	Antagonist Protocol, LUMI-CELL Estrogen Receptor Transcriptional Activation Test Methods for Identifying Estorogen Agonists and Antagonists
7	Draft Report of the Pleliminary Validation Assessment Panel of the Japanese Multi-laboratories Validation Study of a Stably Transfected ER alpha Mediated Reporter Gene
8	Detection of Estorogenic Activity using Reporter Gene Assay
9	Detection of Anti-estorogenic Activity using Reporter Gene Assay
10	ICCVAM/NICEATM ED Activities
11	Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, Monday, 15, May
12	Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, Thursday, 13,
13	Action Items from 2 August 2006 EDWG Meeting
14	Action Items from 27 July 2007 EDWG Meeting
15	Draft Minutes, International ED Study Management Team (SMT) Meeting, 02, Octobe 2006
16	HeLa-9903細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイのバリデーションの進捗について
17	Draft summary minutes of teleconference meeting held on 17 March 2006, The Preliminary validation assessment panel of the Japanese multi-laboratories validation study of a stable transfected Er α mediated reportor gene assay in Japan
18	Draft summary minutes of teleconference meeting held on 19 May 2006, The Preliminary validation assessment panel of the Japanese multi-laboratories validation study of a stable transfected Er α mediated reportor gene assay in Japan
19	Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay- Nomination of Peer Reviewers

INTERNATIONAL ENDOCRINE DISRUPTOR STUDY MANAGEMENT TEAM**ECVAM**

Dr. Susanne Bremer
Reproductive Toxicity and Cardiotoxicity
EC-Joint Research Centre, Ispra site
via E. Fermi 1
I-21020 Ispra (VA), Italy
Phone: +39 0332 785914
Fax: +39 0332 785336
Email: susanne.bremer@jrc.it

Dr. Miriam Jacobs
Reproductive Toxicity and Endocrine Disruption
EC-Joint Research Centre, Ispra site
via E. Fermi 1
I-21020 Ispra (VA), Italy
Phone: +39 0332 786512
Fax: +39 0332 785845
Email: miriam.jacobs@jrc.it

JACVAM

Dr. Haijime Kojima
National Institute of Health Sciences (NIHS)
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)
Division of Pharmacology
Biological Safety Research Center
1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, 158-5801, Tokyo
Phone: +81-3-3700-1141 (Ex.462)
Fax: +81-3-3700-9874
Email: h-kojima@nihs.go.jp

Dr. Jun Kanno
National Institute of Health Sciences (NIHS)
Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)
1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, 158-5801, Tokyo
Phone: +81-3-3700-9639
Fax:
Email: kanno@nihs.go.jp

ICCVAM

William S. Stokes, DVM, DACLAM
Captain, U.S. Public Health Service
Chief Veterinary Officer, USPHS

Director, National Toxicology Program Interagency Center
for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)
National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, DHHS
Bldg. 4401, Room 3129, MD EC-14
79 T.W. Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709
Phone: 919-541-7997
Fax: 919-541-0947
Email: stokes@niehs.nih.gov

Dr. Raymond Tice
National Institute of Environmental Health Sciences
MD EC-17, P.O. Box 12233
Research Triangle Park, NC 27709
Phone: 919-541-4482
FAX: 919-541-0947
Email: tice@niehs.nih.gov

NICEATM Staff:

Mr. Frank Deal
ILS, Inc./Contractor supporting the NTP Interagency Center for
the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)
National Institute of Environmental Health Sciences
MD EC-17, P.O. Box 12233
Research Triangle Park, NC 27709
Phone: 919-316-4587
FAX: 919-541-0947
Email: dealf@niehs.nih.gov

Ms. Patricia Ceger
ILS, Inc./Contractor supporting the NTP Interagency Center for
the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)
National Institute of Environmental Health Sciences
MD EC-17, P.O. Box 12233
Research Triangle Park, NC 27709
Phone: 919-316-4556
Fax: 919-541-0947
E-Mail: cegerp@niehs.nih.gov

Central Test Substance Repository

Cynthia S. Smith, Ph.D.
Chemistry Resources Group Leader
National Institute of Environmental Health Sciences
MD EC-06, P.O. Box 12233
111 Alexander Drive
RTP, NC 27709

NICEATM Draft Int'l Communication Flow Chart
DO NOT CITE, QUOTE, OR DISTRIBUTE

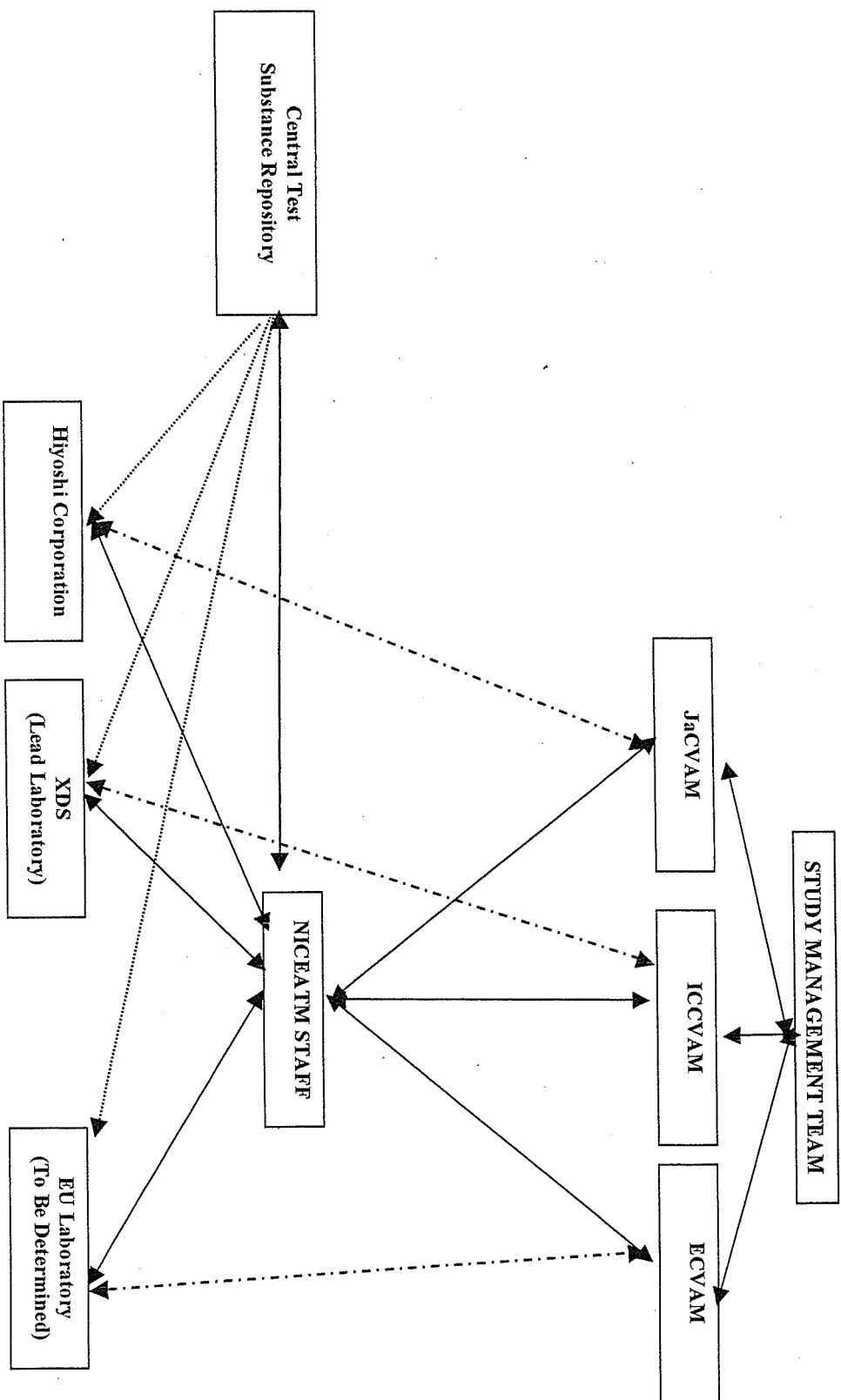
10 October 2006

Phone: 919-541-3473

Fax: 919-316-4670

Email: smith19@niehs.nih.gov

DRAFT INFORMATION FLOW FOR THE LUMICELL® INTERNATIONAL VALIDATION EFFORT¹



¹Solid lines indicate direct communication. Dotted lines indicate shipment of test substances. Dashed lines indicate indirect communication (e.g., CC'ed e-mails).

Proposed Timelines for International LUMI-CELL® ER TA Validation Studies

TASK	ACTIVITIES	TIMELINE
Statement of Work issued to the Testing Facilities		Nov. 2006
Response/Proposal from Testing Facilities		Nov. 2006
Award of Contracts		Nov. 2006
Teleconference Involving All Participating Laboratories		Dec. 2006
Phase I	<ul style="list-style-type: none"> • Training and laboratory qualification/protocol refinement by testing reference standards and controls • Establish historical database for standards and controls by conducting independent experiments (10 each for both agonist and antagonist protocols) • Submission and review of draft report 	Dec. 2006 - Mar. 2007
Phase IIa	<ul style="list-style-type: none"> • Four substances from ER minimum list tested independently three times in each laboratory for agonism and antagonism (24 total experiments) • Submission and review of draft report 	Apr. – May 2007
Phase IIb	<ul style="list-style-type: none"> • Eight substances from ER minimum list tested independently three times in each laboratory (48 total experiments) • Submission and review of draft report 	Jun. – Aug. 2007
Phase III	<ul style="list-style-type: none"> • Remaining 41 substances from ER minimum list tested once in each laboratory for agonism and antagonism (82 total experiments) • Submission and review of draft reports 	Sep. – Oct. 2007
Phase IV	<ul style="list-style-type: none"> • Testing of remaining 25 substances from ER list for agonism and antagonism divided between participating laboratories (50 total experiments) • Submission and review of draft report 	Nov. 2007
Preparation of Draft SMT Validation Report		Oct. – Nov. 2007
Review of Draft Report		Nov. 2007
Final Report		Dec. 2007
Approval of Final Validation Report		Jan. 2008

1 **1. SUBSTANCES FOR EACH PHASE OF THE VALIDATION OF**
2 **AGONIST PROTOCOLS**

3 **1.1 Phase I**

- 4 • Training and laboratory qualification/protocol refinement by testing reference
5 standards and controls
6 • Establish historical database for standards and controls by conducting ten
7 independent experiments

Substance Name	CASRN
17 β estradiol (Reference Standard)	50-28-2
<i>p,p'</i> -methoxychlor (Weak Positive Control)	72-43-5

8 Abbreviations: CASRN = Chemical
9 Abstracts Service Registry Number
10

11 **1.2 Phase IIa**

- 12 • Four substances from ER minimum list tested independently three times in each
13 laboratory for agonism (12 total experiments)
14 • Substances to be well-characterized for ER TA agonist activity (one strong
15 positive, one moderately positive, one weakly positive and one negative); having
16 no anticipated difficulties relating to solubility or cytotoxicity

Substance Name	CASRN	ER TA Agonist Activity ¹
Diethylstilbestrol ²	56-53-1	+++
Bisphenol B ²	77-40-7	++
Bisphenol A ²	80-05-7	+
Corticosterone ²	50-22-6	-

17 Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

18 ¹+++ Indicates that the substance was strongly active (EC₅₀ value was <0.001 M);

19 ++ indicates that the substance was moderately active (EC₅₀ value was between

20 0.001 and 0.1 M); + indicates that the substance was weakly active (EC₅₀ value

21 was >0.1 M), or a positive response was reported without an EC₅₀ value. The

22 EC₅₀ is the effective concentration that causes half-maximal activation of the receptor.

23 ²Tested for agonism during LUMI-CELL protocol standardization.
24

25 **1.3 Phase IIb**

- 26 • Eight substances from ER minimum list tested independently three times in each
 27 laboratory for agonism (24 total experiments)
- 28 • Substances to be well-characterized for ER TA agonist activity (a mix of strong
 29 positive, moderately positive, weakly positive and negative); with some
 30 anticipated difficulties relating to solubility or cytotoxicity

Substance Name	CASRN	ER TA Agonist Activity ¹	Anticipated Difficulty
17- α ethinyl estradiol ^{2,3}	57-63-6	+++	
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	++	
<i>p</i> - <i>n</i> -nonylphenol	104-40-5	++	
<i>o,p</i> -DDT ^{2,3}	789-02-6	+	Cytotoxic, can potentially "stick" to plastic tissue cultureware
Flavone ²	525-82-6	+	
Genistein ³	446-72-0	+	Relatively insoluble
Atrazine ²	1912-24-9	-	Cytotoxic
Vinclozolin ³	50471-44-8	-	

31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹+++ Indicates that the substance was strongly active (EC₅₀ value was <0.001 M);

++ indicates that the substance was moderately active (EC₅₀ value was between

0.001 and 0.1 M); + indicates that the substance was weakly active (EC₅₀ value

was >0.1 M), or a positive response was reported without an EC₅₀ value. The

EC₅₀ is the effective concentration that causes half-maximal activation of the receptor.

²Tested for agonism during LUMI-CELL protocol standardization.

³Included on the ECVAM Provisional Chemicals Selection List

39

1.4 Phase III

40

- Remaining 41 substances from ER minimum list tested once in each laboratory

41

for agonism (41 total experiments)

Substance Name	CASRN	ERT A Agonist Activity ¹
Apigenin	520-36-5	+++
17- α estradiol	57-91-0	+++
17- β estradiol ²	50-28-2	+++
Estrone	53-16-7	+++
<i>meso</i> -hexestrol ²	84-16-2	+++
Coumestrol	479-13-0	++
5 α -dihydrotestosterone	521-18-6	++
Methyl testosterone	58-18-4	++
Resveratrol	501-36-0	++
4-cumylphenol	599-64-4	+
Daidzein	486-66-8	+
<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	+
Dexamethasone ²	50-02-2	+
Dicofol	115-32-2	+
4-hydroxytamoxifen ²	68047-06-3	+
Kaempferol	520-18-3	+
Kepone	143-50-0	+
<i>p,p'</i> -methoxychlor	72-43-5	+
4- <i>tert</i> -octylphenol ²	140-66-9	+
Di- <i>n</i> -butyl phthalate ²	84-74-2	+
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	93-76-5	+
Diethylhexyl phthalate	117-81-7	+
Progesterone ²	57-83-0	+
Tamoxifen	10540-29-1	+
Testosterone ²	58-22-0	+
4-androstenedione	63-05-8	-
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracene	53-70-3	-
Fluoranthene	206-44-0	-
Phenobarbital	50-06-6	-
Raloxifene HCl ²	82640-04-8	-
Clomiphene citrate	50-41-9	PP
Norethynodrel ²	68-23-5	PP
Ethyl paraben	120-47-8	PP
Actinomycin D	50-76-0	PN
2- <i>sec</i> -butylphenol	89-72-5	PN
Hydroxyflutamide	52806-53-8	PN
Morin	480-16-0	PN
Phenolphthalin	81-90-3	PN

Substance Name	CASRN	ER TA Agonist Activity ¹
Propylthiouracil	51-52-5	PN
Sodium azide	26628-22-8	PN
12 - O - Tetradecanoylphorbol- 13-acetate	16561-29-8	PN

42
43
44
45
46
47
48
49

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number
¹+++ Indicates that the substance was strongly active (EC₅₀ value was <0.001 M);
 ++ indicates that the substance was moderately active (EC₅₀ value was between
 0.001 and 0.1 M); + indicates that the substance was weakly active (EC₅₀ value
 was >0.1 M), or a positive response was reported without an EC₅₀ value. The
 EC₅₀ is the effective concentration that causes half-maximal activation of the receptor;
 PP = Presumed Positive; PN – Presumed Negative
²Included on the ECVAM Provisional Chemicals Selection List

50

51

1.5 Phase IV

52

- Testing of remaining 25 substances from ER list for agonism tested once in one laboratory (may be divided between participating laboratories) (25 total experiments)

53

54

Substance Name	CASRN	ER TA Agonist Activity ^{1,2}
Fenarimol	60168-88-9	+
19-nortestosterone	434-22-0	+
Cyproterone acetate	427-51-0	-
Fluoxymestron	76-43-7	-
Flutamide ³	13311-84-7	-
Linuron ³	330-55-2	-
Mifepristone ³	84371-65-3	-
Procymidone	32809-16-8	-
17β-trenbolone	10161-33-8	-
Ammonium perchlorate	7790-98-9	PN
Apomorphine	58-00-4	PN
Bicalutamide	90357-06-5	PN
Chrysin	480-40-0	PN
Cycloheximide	66-81-9	PN
Finasteride	98319-26-7	PN
Haloperidol	52-86-8	PN
4-hydroxy androstenedione ³	566-48-3	PN
Ketoconazole	65277-42-1	PN
Medroxyprogesterone acetate	71-58-9	PN
Nilutamide	63612-50-0	PN