

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 6

- BR
 - Room temp > <10C
 - Peripheral blood was also analyzed
 - Acrylamide: Neutral diffusion showed slight effects in liver
 - Histopathology showed no effect in acrylamide, 2,4-dat some effects in liver
 - EMS exptl-2 high response, similar room temp and <10C in liver, stomach, and peripheral blood

21

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 7

- HLS
 - All chemicals showed dose-dependent increase in liver and stomach (2-3 fold increase)
 - These results were reproducible based on the repeat experiment
 - The positive increase were observed in BM, kidney (strong), and colon (only on comp 7 and 8)
 - Histopathology: acrylamide showed increase MI in liver, however no hedgehog
 - 2,6, showed no change
 - 2,4 increased apoptosis and single cell necrosis, and hypertrophy in liver
 - No effect in the neutral diffusion in liver and stomach

22

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 8

- Hatano presentation
 - Histogram showed pooled data
 - Acrylamide showed positive response in only the low dose in stomach but negative in liver
 - 2,4 and 2,6 showed negative
 - Histopathology showed no response on acrylamide/stomach, which was positive in comet
- Anpyo presentation
 - 2,6 negative
 - 2,4: deviation from the standard protocol that might be important
 - 1st treatment 14:30 as same as standard but not EMS (no treatment) and next day 11:30 and 21 h later (8:30 on the next morning). Stomach was full at 8:30 and less effective for the treatment.
 - Acrylamide was positive in liver and stomach
 - No histopathological effect

23

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 9

- Treatment time at each laboratory
- BR: single treatment for EMS 3 h prior to kill animal
 - 9 and 6-7 am (not always fixed time; early morning)
- Merck: single
 - 9 am
- HLS: single
 - 8-9 am
- Hatano: double treatments
 - 14:30 and 11:30
- Anpyo: double treatments
 - 14:30 and 11:30

24

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 10

- Three groups, i.e., VMT, statistician, participants, had isolated meetings after lunch
- VMT discussed the further validation study strategy
 - After consultation with Ray and Len for the VMT proposal before showing to participants
- Laboratory sub-group (Dr. Brian)
 - Animal fasting: no
 - Electrophoresis: temp, voltage constant, etc.
 - Electrophoresis time: some variation; control tail length
 - Control % tail: consistent among animals, among experiments, among laboratories
 - pH: all >13
 - Vehicle: OK
 - Dose of positive control: OK

25

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 11

- Laboratory sub-group (Brian)
 - Animal fasting: no
 - Electrophoresis: temp,
 - Voltage: 0.7-1 volt/cm 22-36 cm box
 - mAmps: approx 300, constant among labs
 - Electrophoresis time: some variation; control tail length
 - Control % tail: consistent among animals, among experiments, among laboratories
 - pH: all >13
 - Vehicle: OK
 - Dose of positive control: OK
 - Tissue to cells: 3-60 min
 - Cells on slide: 3min to 2h
 - Lysing: overnight in dark cold
 - Estimation of cell number on slide: no count or estimate

26

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 12

- Laboratory sub-group (Brian)
 - Magnification and cell density: 200X 3-15 cells/field
 - How stable negative control data: quite many historical negative controls (send data to Dr. Omori for further analysis)
 - The range of positive control was so bad compare to the other assay?

27

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 13

- Statistician sub-group (Takashi)
 - Positive control: should be “clear” positive, for example:
 - Criteria EMS/VC >2, 3, or 5, or (VC: vehicle control)
 - EMS-VC >10, 15, or 20%
 - Lab provide negative control values
 - If protocol will be revised, this should be describe clearly
- Decision criteria (positive and negative judgment)
 - Should be made by VMT and laboratories
 - The criteria should be decided by the next study
 - Valiance of EMS is less important and the ratio/difference between EMS and VC is more important
- 24/30 called negative by toxicologist’s intuition
 - 7/15 liver, called positive by trend test
 - 6/15 stomach positive

28

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 14

- Statistician sub-group (Dr. Omori)
 - Further validation study
 - To examine whether the finalized protocol will work or not, conducting the study by these 5 lab. Is one of ways before a large laboratory study.
 - All 5 leading laboratories necessary for all compounds? One chemical per 3 laboratories?

29

March 13, 2008/Day 2/In vivo comet 15
To be discussed

- Cytotoxicity: neutral diffusion, histopathology
- Number of slide/animal (2-3)
- Number of animals/group (power calculation: criteria of positive and negative)
- How to analyze slides (both for in vitro and in vivo)
- Publication of this validation study (Uno-san will draft the paper)

30

March 14, 2008/Day 3/Summary 1

- This section was leaded by Dr. Y. Uno
- Dr. Uno explained the outcomes from the VMT meeting briefly including the future plan and phase 3 and 4 validation activities.
- Consensus: We will use only % DNA in tail. Neither the tail length nor Olive tail moment give additional information to the overall evaluation comet assay
- Dr. Uno also explained the acceptance criteria that proposed from VMT and also statistician
 - Acceptable valiance within laboratory is <100 and <15% DNA of tail in the negative control (VMT)
 - Positive control shows 'clear' positive: 2, 3, or 5 fold increase to the negative control/Effect (EMS-negative control) > 10, 15, 20% of DNA of tail

31

March 14, 2008/Day 3/Summary 2

- Dr. Lovel claimed the suggestion from the VMT is not understandable. Needs practical decision should be considered
- The suggestion from VMT is too strict and it will be happened several times to reject experiments
- Dr. Hayashi emphasize the quality control of the comet assay by the acceptable level of negative control should be less than 15 % DNA in tail and for the valiance within laboratory of positive control (EMS 200 mg/kg) should be 100 (3 sigma)
- The advice by statistician should take into consideration
- There are some misunderstanding of VMT proposal to the statisticians. The CV may be better parameter for this purpose.
- The matter should be discussed again among all members (including Ray and Len) of VMT to finalize

32

March 14, 2008/Day 3/Summary 3

- Practical plan for the in vivo comet validation study
 - The name of the validation study
 - “1st phase validation study” instead of “1st pre-validation study”
 - “2nd phase validation study” instead of “2nd pre-validation study”
 - “3rd phase validation study” instead of “Main validation study”
- Check all data by the laboratory and report to Dr. Omori
- Laboratory precise protocol and final report submit to Dr. Uno

- Minor revision on the standard protocol, ver. 12
 - Supplier of low-melting agarose
 - Tissue sampling time: 3 h after 2nd administration
 - Slide dehydration: possible to skip this process if slides are scored very soon

33

March 14, 2008/Day 3/Summary 4

- Practical issues
 - EDTA addition is not required into low-melting agarose gel in the validation study
 - Sensitivity is higher running at room temperature. We will wait for the outcomes experiments will be done by Andrew.
 - [Tentative agreement: Electrophoresis solution temp: <10C (or range should be set, e.g., 5-10C) (electrophoresis buffer)
 - Do not put ice cubes into the buffer]
- % DNA in tail in negative control:
 - It depend on the tissues: e.g., liver, lower is better and usually less than approximately X % but stomach less that approximately Y%. Statistician can say the values by the analysis of all control data from the 2nd validation study. Historical control data will be helpful.

34

March 14, 2008/Day 3/Summary 5

- How to analyze slides? Which area of slide should be analyze? Optimal cell density? The issue was discussed among all members including statisticians.
 - There is not so much influence to the test result. The important is to avoid overlap scoring, outside area, <5 cells/area should be analyzed, at least 10 area.
 - The cell density might be important to be controlled especially in vitro assay but not so important in vivo study.

35

March 14, 2008/Day 3/Summary 6

- Measure cytotoxicity
 - Histopathological examination will be included. How to use histopathological data for interpretation of comet assay will continue to discuss. Negative or positive in comet? Histopathological data will need only when the comet assay is positive.
 - Neutral diffusion no more necessary in the comet assay.
- Electrophoresis
 - Is it necessary to set the electrophoresis condition (e.g., voltage and time) should be fixed more strictly?
 - Brian will send the data to Dr. Uno showing big difference between 0.7 vs 1.0/cm.
 - Brian proposed to use consistent condition (e.g., 0.7 and 20 min) in the next trial (after analysis of the data provided by Brian).

36

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (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(H18-化学-一般-003)」

分担報告書

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 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

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うことを目的とした研究を進めている。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、アゴニストアッセイ法の OECD ガイドライン案に対するコメント対応を実施するとともに、来年度に計画しているアンタゴニストアッセイ法のバリデーション試験に向けて品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance criteria) を定めるための検討および抗エストロゲン活性の評価法について検討した。一方、Lumi-cell 法については、米国の ICCVAM と EU の ECVAM との共同のもと共通のプロトコールによる標準物質及びコントロール物質を用いたマルチフェーズ国際バリデーションスタディーの Phase I を実施し、本アッセイ系の検出能力や再現性について検討を行い、基準をクリアした Phase I データから Phase II 実施のための経歴データベースを作成した。また、細胞毒性評価法として提案されている目視評価法について細胞毒性濃度のビスフェノール A を用いた検証を実施した。

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、これまで厚生労働省および経済産業省の研究費により我

が国において開発が進められてきたものであり、アゴニストアッセイ法については、すでに国内におけるマルチサイトバリデーションが終了し、OECDにおいてガイドライン化に向けた提案を行い、現在、最終化に向けた検討が進められており、本年度は、バリデーション専門家による第三者評価により示されたコメントへの対応を行った。また、第三者評価におけるコメントのうち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に対応し、来年度、アンタゴニストアッセイ法のマルチサイトバリデーションをJaCVAM主導のもとで実施する。そこで本年度は、アンタゴニストアッセイ法のバリデーション試験に向けて品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance criteria) を定めるための検討を行うと共に、これまでの研究から抗エストロゲン活性の評価において logistic 式が適用できない物質があることが想定されることから、直線回帰により算出する \ln .IC50 及び \ln .IC30 について検討を行った。

一方、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、ヒト卵巣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。本研究では、JaCVAM、米国 NICEATM および欧州 ECVAM と共同で国際バリデーションを進めている。本年度は、NICEATM、ECVAM、そして JaCVAM によって構成される運営委員会により計画されたアゴニスト及びアンタゴニスト検出のためのマルチフェーズ国際バリデーションスタディーの Phase I を行った。Phase I では共通のプロトコールによる標準物質及びコントロール物質を用いた独立した実験により LUMI-CELLR ER アッセイの能力を実証し、またあわせてビスフェノールAの細胞毒性濃度検査により細胞活性の目視による評価能力を実証した。基準をクリアしたアゴニスト及びアンタゴニストの標準物質及びコントロール物質の結果は本バリデーションスタディーの Phase II の経歴データベース作成に使われる。各試験施設における試験結果は、Validation Study Project Coordinator が取りまとめ、にサイト内およびサイト間の再現性、細胞活性目視法の信頼性等について現在評価が行われている。

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・安全性評価技術研究所(試験責任者: 武吉正博、赤堀有美、宮浦英樹)において実施した。

2. 実験材料

2.1. 細胞及び細胞培養に関わる試薬

2.1.1. 細胞

HeLa-9903 (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)。

2.1.2. EMEM-10%FBS 培地

粉末培地 (イーグル MEM ニュスイ) 4.7 g、7.5% 重炭酸ナトリウム溶液 (Gibco) 12 mL 及び 200 mM L-グルタミン溶液 (Gibco) 5.6 mL に精製水を加えて 500 mL とし、Dextran coated charcoal (DCC) 処理した牛胎児血清 (FBS) (Gibco あるいは Hyclone) 56 mL を加え、0.22 μ m のフィルター (Millipore) でろ過滅菌した。

2.2. 被験物質及び対照物質

2.2.1. 供試化学物質

抗エストロゲン活性が既知の物質として、本検討で使用した4物質を表1に示す。

各被験物質は DMSO を用いて 10 mM となるようにストック溶液を調製し、4°C で保存した。

2.2.2. 溶媒対照 (VC; Vehicle Control)

溶媒対照として、試験終濃度として 0.2% の dimethyl sulfoxide (DMSO、和光純薬) を含むウェル (6 連) を設定した。

2.2.3. 陽性対照

抗エストロゲン活性評価の陽性対象として、25 pM の E2 のエストロゲン活性を完全に抑制す

る 1 μM の OHT (3 連) を設定した。

2.2.4. 抗エストロゲン活性評価における基準活性

抗エストロゲン活性評価における基準活性として 25 pM の E2 (6 連) を設定した。

この濃度は前年度までの検討で、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た E2 自身の応答曲線から算出された EC80 相当濃度として採用した。

2.2.5. 細胞毒性評価用の陽性対照

DMSO に 100 μM の Digitonin (Dig, 和光純薬) (3 連) を細胞毒性評価の陽性対象として設定した。

2.2.6. 細胞の応答性評価用の対照

抗エストロゲン活性評価における基準活性が E2 の最大活性ではない (つまり、E2 の応答性が飽和していない) ことを示す対照として、E2 の最大活性を誘導することができる 1 nM の E2 (6 連) を設定した。

2.3. 暴露用被験物質あるいは対照物質の調製
EMEM-10%FBS 培地に DMSO で終濃度が目的濃度になるよう調製した被験物質あるいは対照物質を DMSO 終濃度が 0.2%となるように添加して調整した。

2.4. Luciferase Assay Reagent の調製

Luciferase Assay Substrate (プロメカ株式会社) の容器に付属の Luciferase Assay buffer 全量を直接加えて溶解し、-80°C で保存した。使用時には、必要量を解凍し 0.3 mM の MgCl₂ を含む PBS と 1:1 で混和し、Luciferase Assay Reagent として使用した。

3. 実験方法

3.1. 操作手順

以下の手順に従って測定を行った。

EMEM-10%FBS 培地を用いて HeLa-9903 細胞が 100 mm ティッシュに 70-90%コンフルエントになる

ように培養

↓
細胞を測定用の 96-well プレートに播種 (104 cells/100 μL/well)

↓
CO₂ インキュベータ内で培養 (約 2 時間)

↓
EMEM-10%FBS 培地で希釈した被験物質あるいは対照物質を 50 μL/well で添加
[プレートレイアウト]

	OHT			IC1			TAM			RAL		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁻⁷ M + 25 pM E2	10 ⁻⁸ M + 25 pM E2										
B	10 ⁻⁸ M + 25 pM E2	10 ⁻⁹ M + 25 pM E2										
C	10 ⁻⁹ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2					
D	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2	10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2										
E	10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2	10 ⁻¹² M + 25 pM E2										
F	10 ⁻¹² M + 25 pM E2	10 ⁻¹³ M + 25 pM E2										
G	VC + 25 pM E2						1 μM OHT + 25 pM E2			100 μM Dig + 25 pM E2		
H	VC									1 nM E2		

↓
CO₂ インキュベータ内で培養 (20~24 時間)

↓
培地の除去

↓
Luciferase Assay Reagent の添加 (50 μL/well)

↓
10 分間室温で静置

↓
ルミノメータによる発光測定

4. データ解析

4.1. 抗エストロゲン活性評価指標の算出

各濃度区の発光強度の値から溶媒対照区 (VC) の平均値から差し引き、算出された 25 pM E2 の平均値でさらに各濃度区の値を除して 25 pM E2 に対する相対転写活性化倍率 (RTA; Relative Transcriptional activity (%)) を求めた。これら相対転写活性化倍率を用いて、以下の式より IC₅₀ を算出した。IC₅₀ 値の算出には GraphPad PrismR Ver. 4 (GraphPad Software 社) を用いた。また、図 1 で定義される 25 pM の E2 に対する RTA を 30 あるいは 50%抑制する濃度 (lin.IC₃₀ あるいは lin.IC₅₀) を求めた。

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{((\log \text{EC}_{50} - X) * \text{HillSlope})}}$$

ここで、HillSlope: 傾き

X: 対数濃度 (M)

Y: 相対転写活性化倍率の抑制率 (%)

5. 結果及び考察

5.1. 抗エストロゲン活性評価試験の品質管理基準 (QC; Quality Control) の設定

抗エストロゲン活性評価試験の品質を管理する (QC; Quality Control) ために各試験プレートに設定した各対照区の解析結果を表 2 に示す。

5.1.1. 25 pM の E2 対照区と 1 nM の E2 対照区の応答性の比較

抗エストロゲン活性評価において基準活性となる 25 pM の E2 は、平均的な E2 の用量反応曲線の EC80 に相当する濃度であり、1 nM は E2 自身の応答が飽和している濃度であることから 1 nM の E2 の RTA は 100% より大きい必要がある。そこで、抗エストロゲン活性評価試験における基準活性となる 25 pM の E2 の濃度が最大活性未満であることを保証するため、これを抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。

ここで、本検討で実施した 10 回繰返し測定において、n-8 では 1 nM の E2 の RTA が 80.7% であり (表 2)、抗エストロゲン活性評価において QC を満たさなかった試験と判断し、以降は n-8 のデータを除外して解析を行った。

5.1.2. 25 pM の E2 対照区の Fold-induction の許容値

転写活性化倍率 (fold-induction, FI) は抗エストロゲン活性を測定する上でそのダイナミックレンジに影響を与え試験精度を左右する重要な要素であることから抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。本検討で実施した 9 回繰返し測定においては、25 pM の E2 の FI は全て 6 より大きかったことから (表 2)、25 pM の E2 の FI の許容値は 6 とした。

5.1.3. 抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値

25 pM の E2 が誘導する活性を完全に抑制する

対照区として 1 μ M の OHT を設定し、9 回の繰返し測定を実施したデータにおいては、RTA は $4.1 \pm 4.3\%$ であり、最大でも 8.0% であった。アゴニスト活性における QC を設定する際、背景データの $AVG \pm 3SD$ の範囲を使用したことから、1 μ M の OHT の抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値は -8.7% ~ 16.9% とし (表 2)、これを抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。

5.1.4. 細胞毒性評価用の陽性対照区の許容値

抗エストロゲン活性評価においては、化学物質による細胞毒性による影響と抗エストロゲン活性による影響を区別するために、細胞毒性試験を平行して実施することが望ましく、抗エストロゲン活性評価試験と細胞毒性試験に使用する被験物質の調製液が完全に同じであることにより、結果の解釈がより正確なものとなる。そこで、細胞毒性試験において必要となる明確な細胞毒性を示す陽性対照として 100 μ M の Digitonin を使用し、9 回の繰返し測定における RTA 値はいずれも 0 未満であったことから、これを抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。なお、RTA が 0 未満になる理由としては、細胞毒性に伴う細胞剥離が原因の一つと考えられる。

以上 5.1.1 ~ 5.1.4 に基づき設定した抗エストロゲン活性評価試験における各プレートの品質管理基準を表 3 に示す。

5.2. 試験の性能基準 (Performance Criteria) の設定

本検討では新たに設定した QC 用対照区を含めて、抗エストロゲン活性が既知の 4 物質 (OHT、ICI、TAM 及び RAL) について抗エストロゲン活性を 10 回の繰返し測定を行った (表 4 及び図 2)。前述のとおり、n-8 では QC を満たさなかったために AVG 及び SD の算出から除外した。また、性能基準を設定するに当たり、測定により得られた lin.IC30、lin.IC50 及び var.IC50 は、ばらつきを正規分布として評価するために対数値としてとして取り扱った。ここで、n-1 の RAL の測定結果において、lin.IC30 が 2 ポイント算出されたことから、RAL 測定における試験系の安定性が疑われた

ことから、n-1 のデータを AVG 及び SD の算出から除外した。残りの 8 回の繰返し測定から得られた 4 物質の lin.IC30、lin.IC50 及び var.IC50 の標準偏差 (SD) はそれぞれ、0.14~0.30、0.07~0.25 及び 0.04~0.20 であり、変動係数 (CV) の絶対値はそれぞれ 1.47~3.01%、1.46~2.78% 及び 0.40~2.14% であった (表 4)。前述したようにアゴニスト活性における性能基準を設定する際に背景データの AVG±3SD の範囲を使用したことから、OHT、ICI、TAM 及び RAL を用いた試験性能基準として、表 5 に示す基準を設定した。

これらの結果を示した報告書を添付資料 1 に示す。

B-2. 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

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 (試験責任者: 中村 昌文) において実施した。

2. 検討項目

本年度は、以下の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 (Phase I) を行った。

- 1) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I)
- 2) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I) 追加
- 3) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I) 追加 2

3. 試験方法と結果

Lumi-cell ER アッセイの試験フロー

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 (Phase 0) の際のフロー、試験薬を用いて行った。主なフローを図 1. 及び図 2 に示す。

3.1 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I)

アゴニスト及びアンタゴニストの標準及びコント

ロールの試験を用いて、Lumi-cell ER アッセイの熟練度合いを示し、ラボ内の繰返し性及びラボ内・ラボ間の再現性を示し、個々の実験を行って (アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコールそれぞれ 10 回) 経歴データベース作成を目的とする。

3.1.1 実験方法

試験に用いる標準及びコントロール化合物は the LUMI-CELL ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group (Dr. Cynthia Smith, Group Leader) により提供された。

標準及びコントロールの前処理はルミセルプロトコール 1)2)3) に具体的に記載されている。アゴニストの標準及びコントロール物質の 96 穴プレートレイアウトは、図 3 に示し、アンタゴニストの標準及びコントロール物質の 96 穴プレートレイアウトは、図 4 に示す

アゴニスト試料

下記及び表 1. に示した試料を使用した。

- 17 β -estradiol (E2)
CASRN 50-28-2
- p,p'-methoxychlor (methoxychlor)
CASRN 72-43-5

アンタゴニスト試料

下記及び表 2. に示した試料を使用した。

- 17 β -estradiol (E2)
CASRN 50-28-2
- Raloxifene HCl (Ral)
CASRN 84449-90-1
- Flavone
CASRN 525-82-6

3.1.2 結果

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 もしくは、IC50 及び Dose response curve の経歴データベースを作成した。結果を表 3. 図 5. 表 4. 図 6. に示す。

3.2 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I) 追加

アゴニスト標準及びコントロール、Bisphenol-Aの試験を用いて、Lumi-cell ER に対して併行に Visual observation 及び Cell TiterGloR で測定する。個々の実験を行って、データベースを作成する。

3.2.1 実験方法

試験に用いられる標準及びコントロール、Bisphenol-A は the LUMI-CELLR ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group(Dr. Cynthia Smith, Group Leader)により提供済み。標準及びコントロール、Bisphenol-A の前処理はルミセルプロトコールに具体的に記載されている。参考に、プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準及びコントロール物質の 96 穴プレートレイアウトは、図7に示す。

•Viability 試験試料

下記及び表5. に示した試料を用いた。

• Bisphenol A (BPA)

CASRN 80-05-7

Bisphenol-Aは、10mg/mlの Stock solution を作成し、最終濃度 100 μ g/ml~2 倍希釈で 6 段階(100 μ g/ml~3.125 μ g/ml)を供試試料とする。これらの濃度で、各試料 3 ウェル、別のプレートで計 3 回測定を行う。

•Visual observation(1 プレート目)

顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELLRER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual に従って、カテゴリー1、2、3、4 を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100 でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリーの判断を評価する。

•Cell TiterGloR(2 プレート目)

AGONIST PROTOCOL [11.4 CellTiter-GloR Assessment of Cell Viability]に従って、分析を行う。

3.2.2 結果

• Visual observation(1 プレート目) 及び Cell TiterGloR(2 プレート目)の結果を図8. 及び表6. で示す。顕微鏡を使った目視判定及び Cell TiterGlo を使った Viability(%)の数値と合致していた。しかし、選定試料の特性もあるが、濃

度の振分けが悪く、判定 1~4 全てを見ることができなかつたため、再度濃度を振りなおして、細胞毒性の評価を行う。

•Visual observation(1 プレート目) 及び Cell TiterGloR(2 プレート目)の比較

Visual observation : DRAFT LUMI-CELLRER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual の通り Score1~4 で判定

Cell TiterGloR ; Viability(%) = 100 - (Absolute RLU Value \div DMSO Average \times 100)

0~20% = Score4 20~40% = Score3 40~80% =

Score2 80~100% = Score1

3.3 Lumi-cell ERの国際的バリデーションに関する研究(Phase I)追加 2

Bisphenol-Aは、10mg/mlの Stock solution を作成し、最終濃度 100、90、80、70、60、50 μ g/ml で 6 段階(100 μ g/ml~50 μ g/ml)を供試試料とする。これらの濃度で、各試料 3 ウェル、別のプレートで計 3 回測定を行う。

3.3.1 実験方法

試薬の調整は、下記のとおり

100mg/ml ; Stock solution

90mg/ml ; Stock solution: DMSO = 10:90 (μ l)

80mg/ml ; Stock solution: DMSO = 20:80 (μ l)

70mg/ml ; Stock solution: DMSO = 30:70 (μ l)

60mg/ml ; Stock solution: DMSO = 40:60 (μ l)

50mg/ml ; Stock solution: DMSO = 50:50 (μ l)

試験に用いられる標準及びコントロール、Bisphenol-A は the LUMI-CELLR ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group(Dr. Cynthia Smith, Group Leader)により提供済み。標準及びコントロール、Bisphenol-A の前処理はルミセルプロトコールに具体的に記載されている。参考に、プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準及びコントロール物質の 96 穴プレートレイアウトは、図9に示す。

•Visual observation(1 プレート目)

顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELLRER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual

に従って、カテゴリー1、2、3、4を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリーの判断を評価する。

・Cell TiterGloR(2プレート目)

AGONIST PROTOCOL [11.4 CellTiter-GloR Assessment of Cell Viability]に従って、分析を行う。

3.3.2 結果

・Visual observation(1プレート目)及びCell TiterGloR(2プレート目)の結果を図10及び表7で示す。顕微鏡を使った目視判定及びCell TiterGloを使ったViability(%)の数値と合致していた。

D. 考察及び今後の展望

HeLa系については、昨年度までに実施した試験条件に、試験の品質を保証するQCのための対照区を含め、抗エストロゲン活性が既知の4物質を用いて10回の繰返し試験を実施し、各試験プレートの品質管理基準及び性能基準を設定した。性能基準については、抗エストロゲン活性の評価においてlogistic式が適用できない物質があることが想定されることから、直線回帰により算出するlin.IC50及びlin.IC30についても検討を行い、抗エストロゲン活性が既知の4物質のlin.IC30、lin.IC50及びvar.IC50の標準偏差(SD)および変動係数(CV)をもとに、OHT、ICI、TAM及びRALを用いた試験性能基準を設定した。設定した基準は、来年度実施が予定されている複数の試験機関が参加する検証試験(Multi-lab Validation)における基準値として有用と思われる。しかしながら、本年度で設定した各基準は試験プロトコルを開発したリードラボのみの試験データに基づくものであり、次年度実施が予定されている複数の試験機関が参加する検証試験(Multi-lab Validation)で得られるデータから、その妥当性を確認し、必要に応じて見直しを行うことも考慮するべきものと思われる。

Lumi-cell ER法のプロトコルに関しては、Compound Tracking Formに示されたデータの採用[PASS or Fail]の基準があいまいであった。そこで本研究では、Phase I結果よりQC SCATTER CHARTSを作成し、独自にデータ許容基準を作成

した。この基準は、QA/QC Memorandumに記載し、今後のPhaseでのデータ許容基準とすることとした。Phase I アゴニストアッセイAg3及びAg4のデータの不採用理由は、Induction notが3倍を超えないためであった。これは、一部のDMSOウェルでのBackgroundが高く出たことが原因であった。この理由については明らかには出来ていないが、作業中でのコンタミネーションの可能性も考えられたため、それ以降の暴露工程は、安全キャビネット内で行うこととした。Lumi-cell細胞については、試験に使用してよい細胞の継代数の限界が示されておらず、Phase Iでは、10~60代までを使用可能数と判断し分析を行ったが、今後、限界代数の基準を設定する必要があると考えられた。また、アッセイ効率に関して、転写活性測定用試薬として、Promega Luciferase Assay Kitを使用することになっているが、同種の試薬は様々な商品が販売されており、発光強度が長時間保持し、細胞を溶解させる成分も発光試薬に含まれているワンステップの試薬の使用を検討することでアッセイの簡素化が可能と考えられる。また、BG-1細胞は、エッジ効果が少ないことがわかっているので、Test Plate Layoutの変更が可能と考えられる。さらに、細胞の播種や継代に関しても改良を検討する余地があると考察された。これらの点については、今後、バリデーションマネージメントグループを通し、今後の検討課題として報告した。

なお、これらの提出結果を添付資料2に、これらの結果を含めたICCVAMの報告書を添付資料3として示した。

E. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

中村 昌文、半田洋士、J.D.Gordon、G.C.Clark、小野敦、小島肇 "LUMI-cell ER アッセイ法の基礎性能及び国際的バリデーション計画について" 第10回環境ホルモン学会研究発表会・国際シンポジウム(埼玉) 2007.12.10-11

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

J. 添付資料

添付資料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

添付資料2: 研究報告書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 (Phase I)

添付資料3

: Results of Phase I of the LUMI-CELL[®] ER Assay International Validation Study

平成19年度 厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
 分担研究報告書 図表一覧

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

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

- 表 1 被験物質リスト
 表 2 抗エストロゲン活性評価試験の質を保證する対照区の解析結果
 表 3 各プレートの品質管理をする基準値
 表 4 10 回繰返し測定における lin.IC30、linIC50 及び var.IC50
 表 5 試験性能基準値
 図 1 2 点間の直線回帰による lin.IC30 及び lin.IC50 算出法模式図
 図 2 OHT、ICI、TAM 及び RAL の IC 値のばらつき及び用量反応曲線

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

- 図 1. 曝露の操作フロー
 図 2. Visual Observation の一例
 図 3. アゴニスト応答反応試験；96 穴プレートレイアウト
 表 1. アゴニスト試験で用いる試薬一覧
 図 4. アンタゴニスト応答反応試験；96 穴プレートレイアウト
 表 2. アンタゴニスト試験で用いる試薬一覧
 表 3. アゴニスト試験の結果一覧
 図 5. アゴニスト試験(Phase I)の経歴データベース
 表 4. アンタゴニスト試験の結果一覧
 図 6. アンタゴニスト試験(Phase I)の経歴データベース
 図 7. アンタゴニスト応答反応試験 (Cell Viability)；96 穴プレートレイアウト
 表 5. Viability 試験で用いる試薬一覧
 図 8. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値
 表 6. アンタゴニスト試験の結果一覧
 図 9. アンタゴニスト応答反応試験 (Cell Viability) 2；96 穴プレートレイアウト
 図 10. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値
 表 7. アンタゴニスト試験の結果一覧

表 1 被験物質リスト

物質名	略語	CAS No.	メーカー	カタログ番号	Purity
4-Hydroxytamoxifen (<i>trans</i>)	OHT	68047-06-3	Sigma	H7904	=98%
Tamoxifen (<i>trans</i>)	TAM	10540-29-1	Sigma	T5648	=99%
Raloxifen hydrochloride	RAL	82640-04-8	Sigma	R1402	>99%
ICI 182780	ICI	129453-61-8	和光純薬	F862500	-

表 2 抗エストロゲン活性評価試験の質を保証する対照区の解析結果

	1 nM E2 の RTA (%)	25 pM E2 の Fold-induction	1 μM OHT の RTA (%)	100 μM Dig. の RTA (%)
n-1	143.3	8.3	6.7	-11.3
n-2	159.4	11.9	6.0	-7.5
n-3	134.1	6.3	-2.7	-17.7
n-4	105.9	9.7	9.4	-10.3
n-5	142.6	6.5	-2.1	-16.5
n-6	101.8	9.9	2.2	-9.8
n-7	138.5	11.2	8.0	-8.4
n-8*	(80.7)	(6.0)	(-4.1)	(-18.9)
n-9	143.1	6.9	3.1	-15.6
n-10	144.4	8.1	5.9	-12.6
AVG	134.8	8.8	4.1	-12.2
SD	18.8	2.0	4.3	3.6
3SD	56.5	6.1	12.8	10.9
CV (%)	14.0	23.1	105.0	-29.9
AVG-3SD	78.3	2.7	-8.7	-23.1
AVG+3SD	191.3	14.9	16.9	-1.3

*: QC クライテリアを満たさなかったため、AVG、SD、CV の算出において解析データから除外

(): AVG、SD、CV の算出において解析から除外したデータ

表 3 各プレートの品質管理をする基準値

項目	基準値
25 pM E2 の Fold-induction	>6
RTA of 1 nM E2	> 100%
RTA of 1 μM OHT	< 16.9%
RTA of 100 μM Dig.	< 0%

表4 10回繰返し測定におけるlin.IC30、lin.IC50及びvar.IC50

n	OHT			ICI			TAM			RAL		
	lin.IC30	lin.IC50	var.IC50									
1 [*]	(-9.42)	(-9.18)	(-9.08)	(-9.84)	(-9.54)	(-9.46)	(-7.35)	(-6.88)	(-7.00)	(-12.10)	(-9.90)	(-9.76)
2	-9.00	-8.60	-9.00	-9.59	-9.32	-9.26	-7.24	-6.78	-6.94	-9.65	-9.42	-9.33
3	-9.50	-9.26	-9.07	-9.91	-9.62	-9.47	-7.57	-7.10	-6.96	-9.97	-9.68	-9.56
4	-9.48	-9.24	-9.09	-9.84	-9.54	-9.49	-7.52	-7.13	-7.01	-9.92	-9.64	-9.58
5	-9.36	-9.10	-9.02	-9.69	-9.41	-9.23	-7.37	-6.94	-6.98	-9.75	-9.52	-9.46
6	-9.44	-9.24	-9.08	-9.95	-9.64	-9.56	-7.64	-7.17	-6.99	-10.53	-9.84	-9.66
7	-9.21	-8.90	-9.03	-9.73	-9.40	-9.24	-7.27	-6.78	-6.82	-9.71	-9.46	-9.14
8 [*]	(-9.51)	(-9.30)	(-9.12)	(-10.05)	(-9.71)	(-9.53)	(-7.57)	(-7.13)	(-6.99)	(-10.35)	(-9.86)	(-9.78)
9	-9.39	-9.17	-9.06	-9.89	-9.61	-9.57	-7.51	-7.13	-7.03	-9.81	-9.55	-9.47
10	-9.11	-8.76	-9.00	-9.59	-9.30	-9.30	-7.33	-6.88	-7.01	-9.59	-9.38	-9.12
AVG	-9.31	-9.03	-9.04	-9.77	-9.48	-9.39	-7.43	-6.99	-6.97	-9.87	-9.56	-9.42
SD	0.18	0.25	0.04	0.14	0.14	0.15	0.15	0.16	0.07	0.30	0.15	0.20
3SD	0.55	0.75	0.11	0.43	0.42	0.44	0.44	0.49	0.20	0.89	0.46	0.60
CV%	-1.98	-2.78	-0.40	-1.47	-1.46	-1.56	-1.99	-2.34	-0.95	-3.01	-1.60	-2.14
AVG-3SD	-9.86	-9.79	-9.15	-10.20	-9.90	-9.83	-7.88	-7.48	-7.17	-10.76	-10.02	-10.02
AVG+3SD	-8.76	-8.28	-8.94	-9.34	-9.06	-8.95	-6.99	-6.50	-6.77	-8.97	-9.10	-8.81

*1:2点のlin.IC30が算出されたため、AVG、SD、CVの算出において解析データから除外

*2:QCクライテリアを満たさなかったため、AVG、SD、CVの算出において解析データから除外

() :AVG、SD、CVの算出において解析から除外したデータ

表5 試験性能基準値

	log [lin.IC30]	log [lin.IC50]	log [var.IC50]
OHT	-9.86 ~ -8.76	-9.79 ~ -8.28	-9.15 ~ -8.94
ICI	-10.20 ~ -9.34	-9.90 ~ -9.06	-9.83 ~ -8.95
TAM	-7.88 ~ -6.99	-7.48 ~ -6.50	-7.17 ~ -6.77
RAL	-10.76 ~ -8.97	-10.02 ~ -9.10	-10.02 ~ -8.81

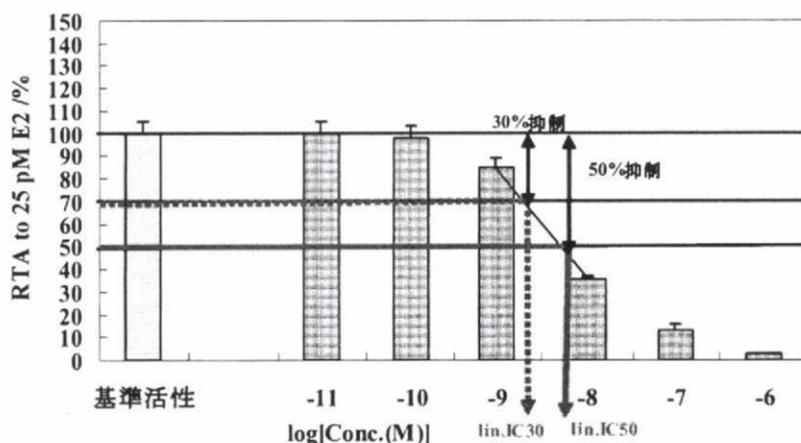


図1 2点間の直線回帰によるlin.IC30及びlin.IC50算出法模式図

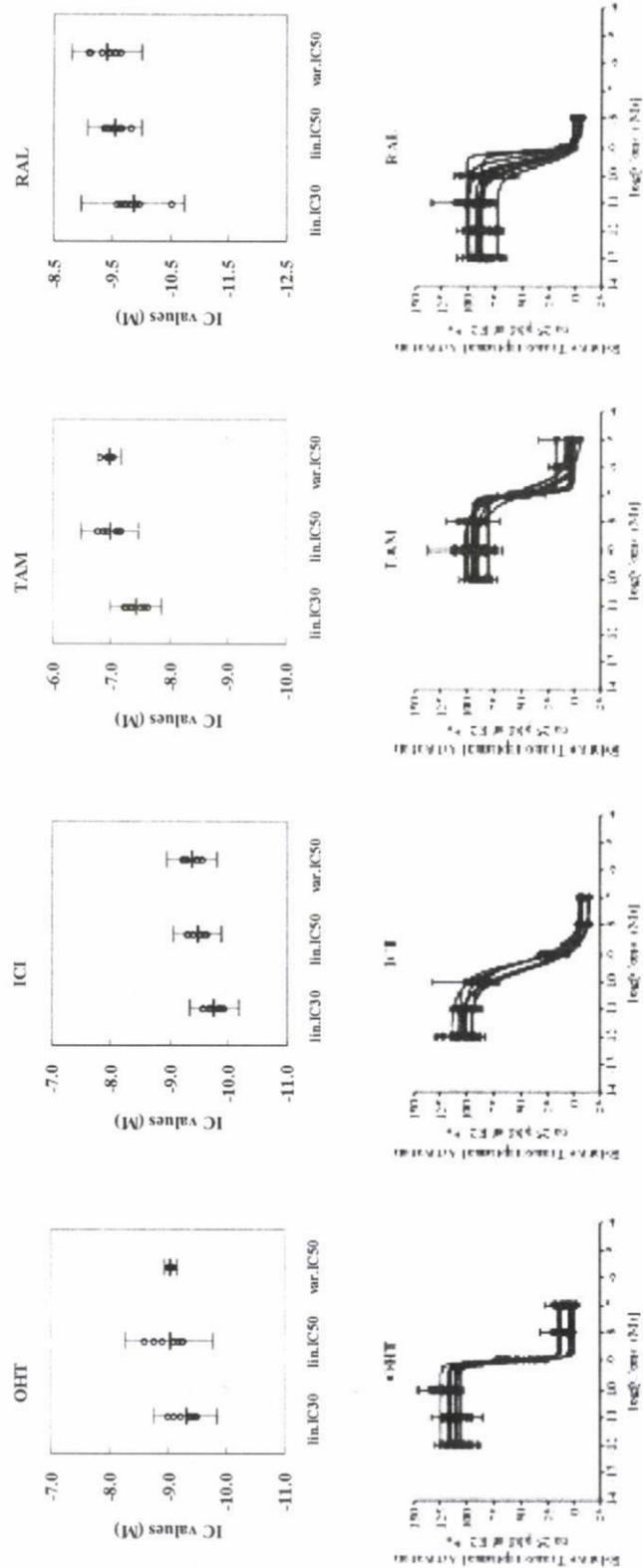


図 2 OHT、ICI、TAM及びRALのIC値のばらつき及び用量反応曲線