

アゴニスト試験	ST#1~#11(#9除)	17β-estradiol	10ng/ml	
	SA	各試料	-	
	ポジコン	Methoxychlor	313 mg/ml	
	ネガコン	DMSO	-	
アンタゴニスト試験	ST#1~#9	Raloxifene	2.5μg/ml	同量の17β-estradiol
	SA	各試料	-	
	ポジコン1	Flavone	5mg/ml	5ng/mlで混合
	ポジコン2	17β-estradiol	2.5ng/ml	-
	ネガコン	DMSO	-	-

- RPMI1640 調整培地 (8% fetal calf serum+1%penicillin/streptomycin)
- DMEM 調整培地 (10% Carbon Stripped fetal calf serum+1%penicillin/streptomycin+2%L-glutamine)



Visual Observation

図1. 曝露の操作フロー

Viability Score	Brief Description
1	Normal Cell Morphology and Cell Density
2	Altered Cell Morphology and/or Small Gaps between Cells
3	Altered Cell Morphology and/or Large Gaps between Cells
4	Few (or no) Visible Cells
P	Wells containing precipitation are to be noted with "P"

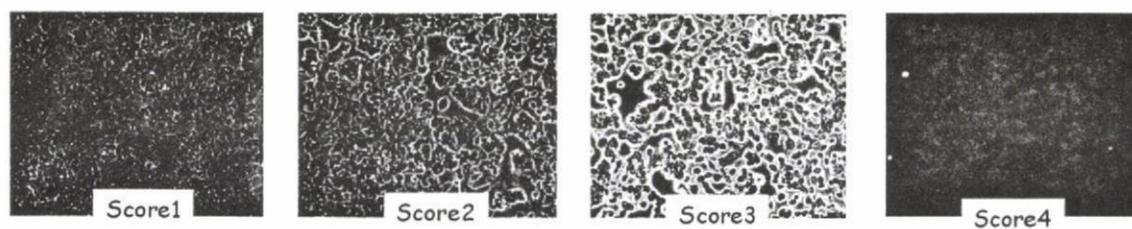
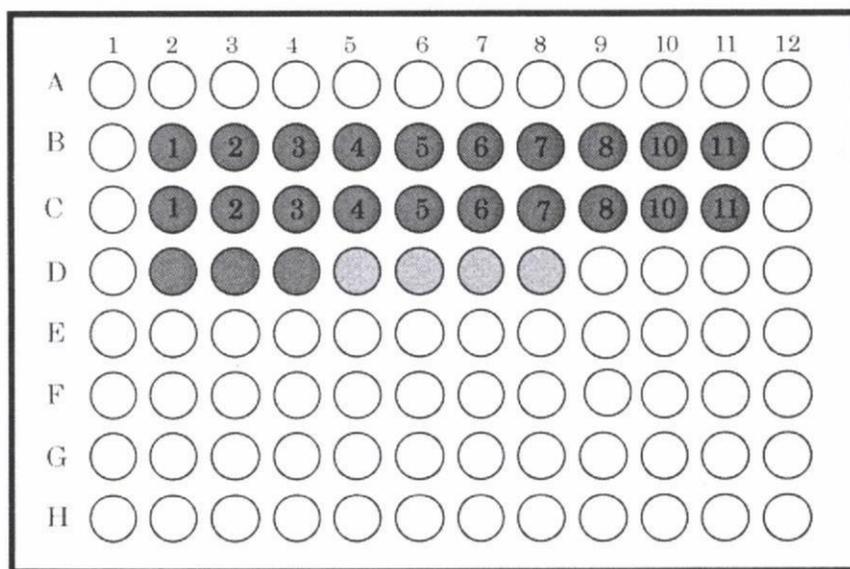


図 2. Visual Observation の一例

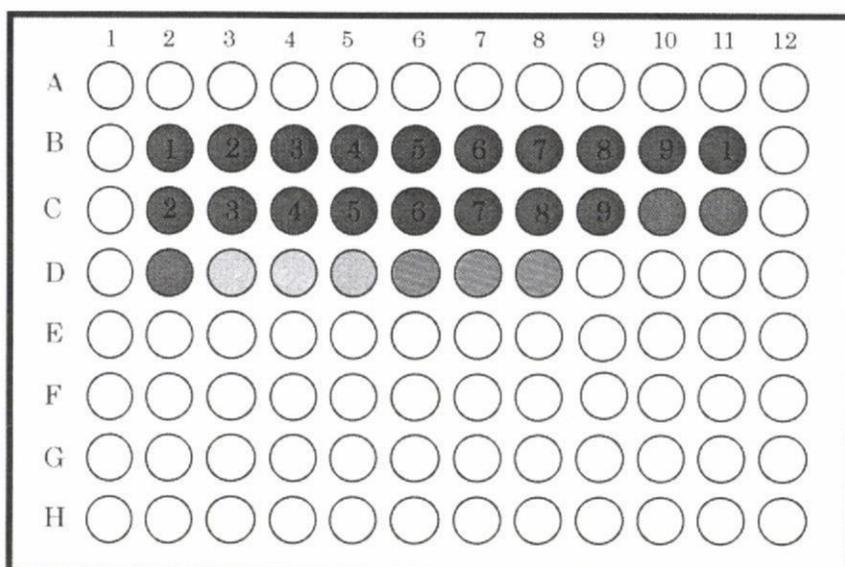


-  : E2 Reference Standard Dose Response Curve
-  : Methoxychlor Control (3.13 µg/mL)
-  : DMSO Control (1% v/v)
-  : Media only wells

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

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
E2	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Methoxychlor	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	



- : 9 point Ral/E2 Reference Standard Dose Response Curve
- : Flavone Control (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- : DMSO Control (1% v/v)
- : E2 Control ($2.5 \times 10^{-5} \mu\text{Lg}/\text{m}$)
- : Media only wells

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

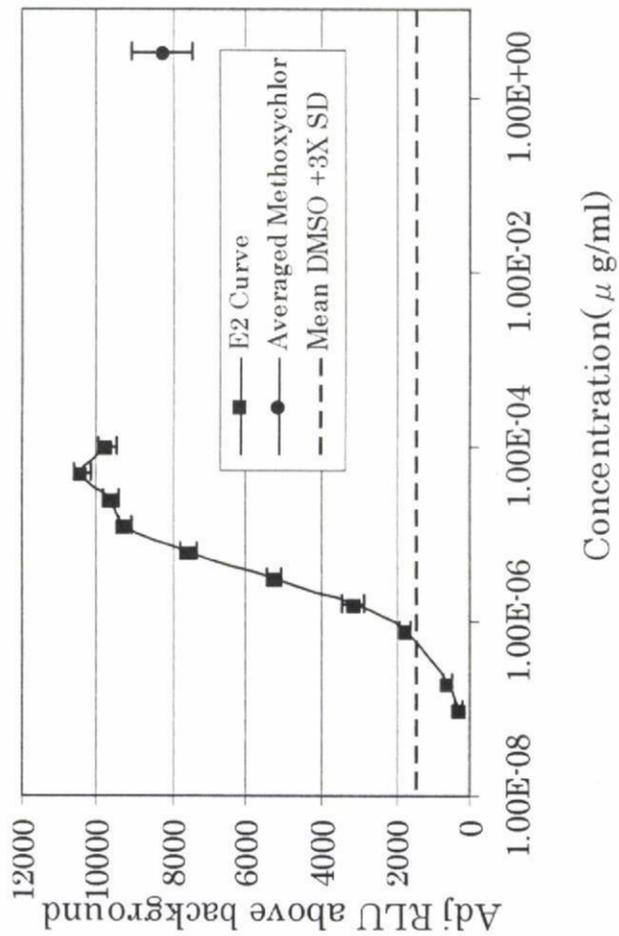
表2. アンタゴニスト試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
E2	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Flavone	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Ral	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	

表3. アゴニスト試験の結果一覧

Experiments: Phase I ¹								
試験 I.D.	試料 Code	日付	Maximum Soluble 濃度 (µg/mL) ¹	試験濃度範囲 (µg/mL)	Plate Induction	EC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
Ag1	E2	28-May-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.3	1.23E-5	Used	
Ag2	E2	30-May-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.5	1.58E-5	Used	
Ag3	E2	04-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	1.6	7.94E-5	Repeated	Induction not > 3
Ag4	E2	06-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	2.7	2.09E-5	Repeated	Induction not > 3
Ag5	E2	11-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.4	1.30E-5	Used	
Ag6	E2	13-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	1.10E-5	Used	
Ag7	E2	18-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	1.28E-5	Used	
Ag8	E2	20-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.2	1.08E-5	Used	
Ag9	E2	25-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	1.42E-5	Used	
Ag10	E2	27-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	7.13E-6	Used	
Ag1 Repeat	E2	02-Jul-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.1	1.12E-5	Used	
Ag2 Repeat	E2	06-Jul-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	6.0	1.65E-5	Used	

1 MAXIMUM SOLUBLE CONCENTRATION IN 1% DMSO, 99% ESTROGEN-FREE DMEM THIS CONCENTRATION INDICATES THE HIGHEST CONCENTRATION THAT WAS APPLIED TO THE CELLS.



採用データは、Ag1~Ag2 Ag5 ~Ag2Repeat の N=10 データ

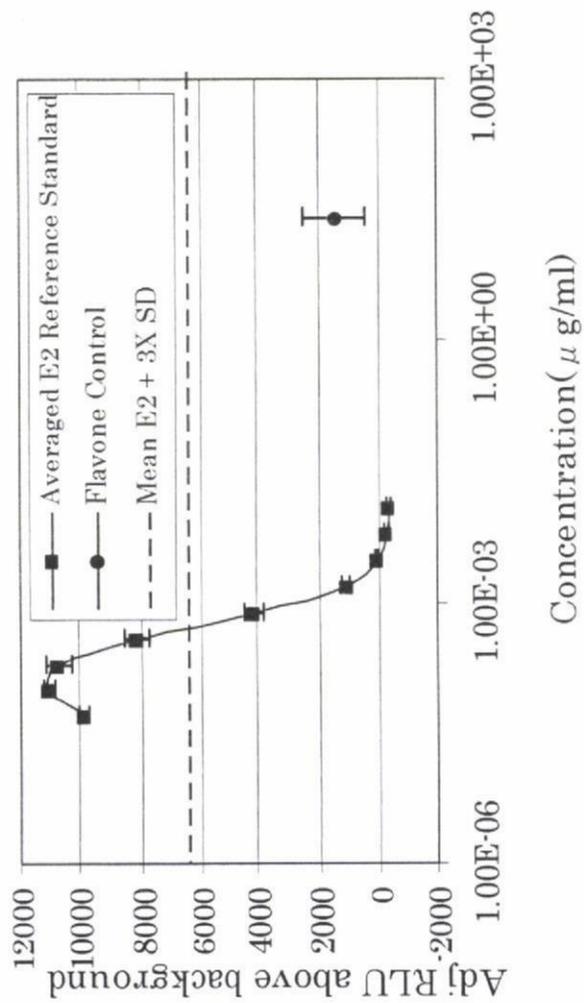
図5. アゴニスト試験(Phase 1)の経歴データベース

表4. アンタゴニスト試験の結果一覧

Experiments: Phase I ¹								
試験 I.D.	試料 Code	日付	Maximum Soluble 濃度 (µg/mL) ¹	試験濃度範囲 (µg/mL)	Plate Induction	IC ₆₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
An1	Ral/E2	28-May-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	8.84	1.47E-03	Used	
An2	Ral/E2	30-May-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	6.35	1.90E-03	Used	
An3	Ral/E2	04-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	6.69	2.51E-03	Used	
An4	Ral/E2	06-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	3.96	1.83E-03	Used	
An5	Ral/E2	11-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	5.20	2.55E-03	Used	
An6	Ral/E2	13-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	9.18	1.87E-03	Used	
An7	Ral/E2	18-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	4.81	1.61E-03	Used	
An8	Ral/E2	20-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	10.53	1.78E-03	Used	
An9	Ral/E2	25-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	6.35	2.34E-03	Used	
An10	Ral/E2	27-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	5.50	2.28E-03	Used	
An1 Repeat	Ral/E2	02-Jul-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	6.37	1.88E-03	Used	2
An2 Repeat	Ral/E2	06-Jul-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ²	9.95	1.33E-03	Used	2

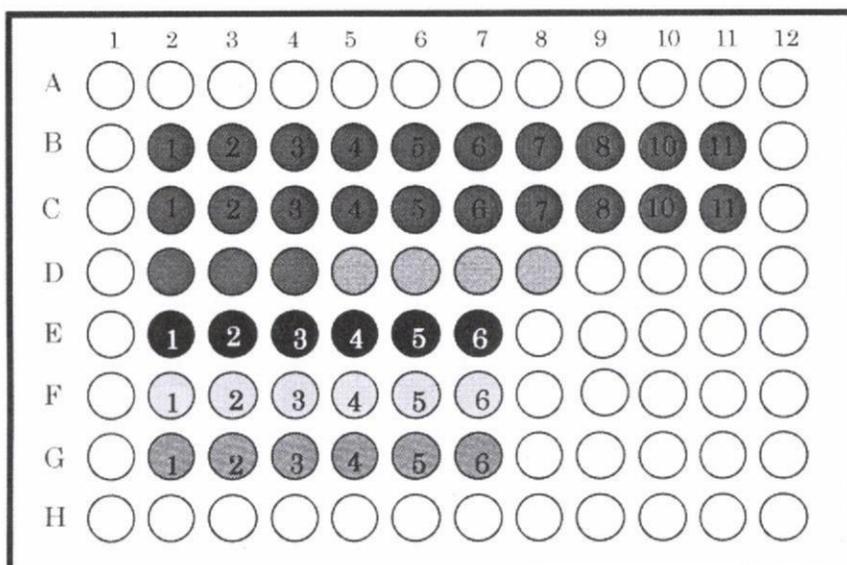
1 MAXIMUM SOLUBLE CONCENTRATION IN 1% DMSO, 99% ESTROGEN-FREE DMEM THIS CONCENTRATION INDICATES THE HIGHEST CONCENTRATION THAT WAS APPLIED TO THE CELLS.

2 BECAUSE AG3 AND AG4 OF PHASE I AGONIST EXPERIMENTS WAS REPEATED, WE HAVE ALSO REPEATED ANTAGONIST ANALYSIS (ONLY FOR REFERENCE)



採用データは、An1~An10のN=10データ

図6. アンタゴニスト試験(Phase I)の経歴データベース



-  : E2 Reference Standard Dose Response Curve
-  : Methoxychlor Control (3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
-  : DMSO Control (1% v/v)
-  : Media only wells
-  : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #1
-  : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #2
-  : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #3

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

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
Bisphenol A	固形	室温	18-Jul-07	中村 昌文	

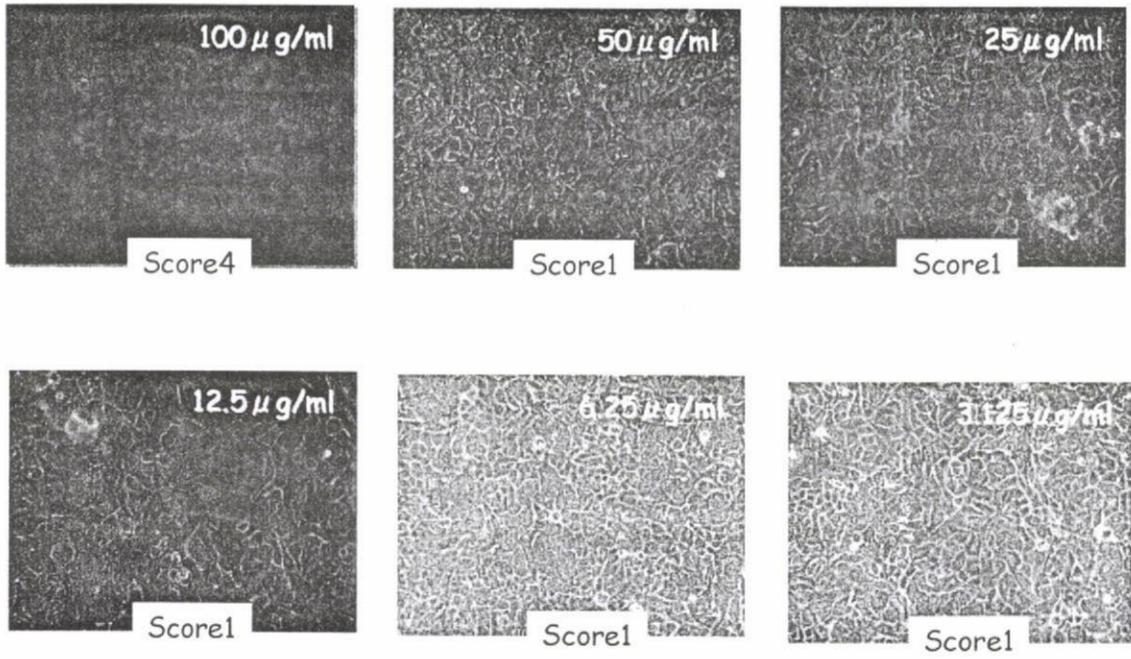
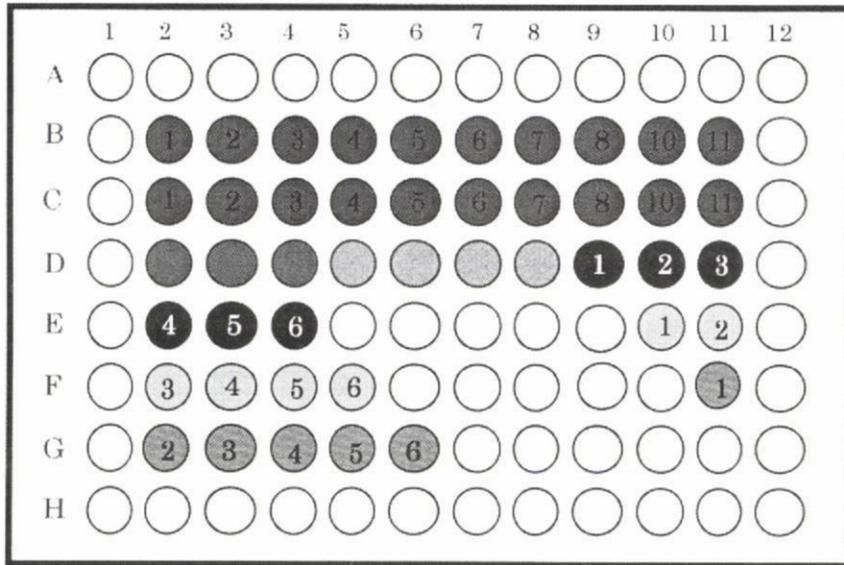


図 8. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値

表6. アンタゴニスト試験の結果一覧

Cell name	Project/Sample ID	Dosing Fraction	Comments	results	DMSO Average		5265000		Score
					Absolute RLU Value	% Cell Death	% Viable		
B2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol a	-245000	245000	4.7%	95.3%	1	
B3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol a	-115000	115000	2.2%	97.8%	1	
B4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol a	-45000	45000	0.9%	99.1%	1	
B5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol a	-25000	25000	0.5%	99.5%	1	
B6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol a	45000	45000	0.9%	100.9%	1	
B7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol a	165000	165000	3.1%	103.1%	1	
B8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol a	125000	125000	2.4%	102.4%	1	
B9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol a	125000	125000	2.4%	102.4%	1	
B10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol a	75000	75000	1.4%	101.4%	1	
B11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol a	95000	95000	1.8%	101.8%	1	
C2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol b	-325000	325000	6.2%	93.8%	1	
C3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol b	-195000	195000	3.7%	96.3%	1	
C4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol b	-65000	65000	1.2%	98.8%	1	
C5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol b	-15000	15000	0.3%	99.7%	1	
C6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol b	175000	175000	3.3%	103.3%	1	
C7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol b	75000	75000	1.4%	101.4%	1	
C8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol b	185000	185000	3.5%	103.5%	1	
C9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol b	105000	105000	2.0%	102.0%	1	
C10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol b	55000	55000	1.0%	101.0%	1	
C11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol b	115000	115000	2.2%	102.2%	1	
D2	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-685000	685000	13.0%	87.0%	1	
D3	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-575000	575000	10.9%	89.1%	1	
D4	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-425000	425000	8.1%	91.9%	1	
D5	#105K00451	DMSO	control	-15000	15000	0.3%	99.7%	1	
D6	#105K00451	DMSO	control	-65000	65000	1.2%	98.8%	1	
D7	#105K00451	DMSO	control	195000	195000	3.7%	103.7%	1	
D8	#105K00451	DMSO	control	-115000	115000	2.2%	97.8%	1	
D9	EG1-1.1	4.00E+07	Bisphenol-A	-4892008	4892008	92.9%	7.1%	4	
D10	EG1-1.1	2.00E+07	Bisphenol-A	-675000	675000	16.6%	83.4%	1	
D11	EG1-1.1	1.00E+07	Bisphenol-A	-415000	415000	7.9%	92.1%	1	
E2	EG1-1.1	5.00E+06	Bisphenol-A	-275000	275000	5.2%	94.8%	1	
E3	EG1-1.1	2.50E+06	Bisphenol-A	-45000	45000	0.9%	99.1%	1	
E4	EG1-1.1	1.25E+06	Bisphenol-A	105000	105000	2.0%	102.0%	1	



- : E2 Reference Standard Dose Response Curve
- : Methoxychlor Control (3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- : DMSO Control (1% v/v)
- : Media only wells
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #1
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #2
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #3

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

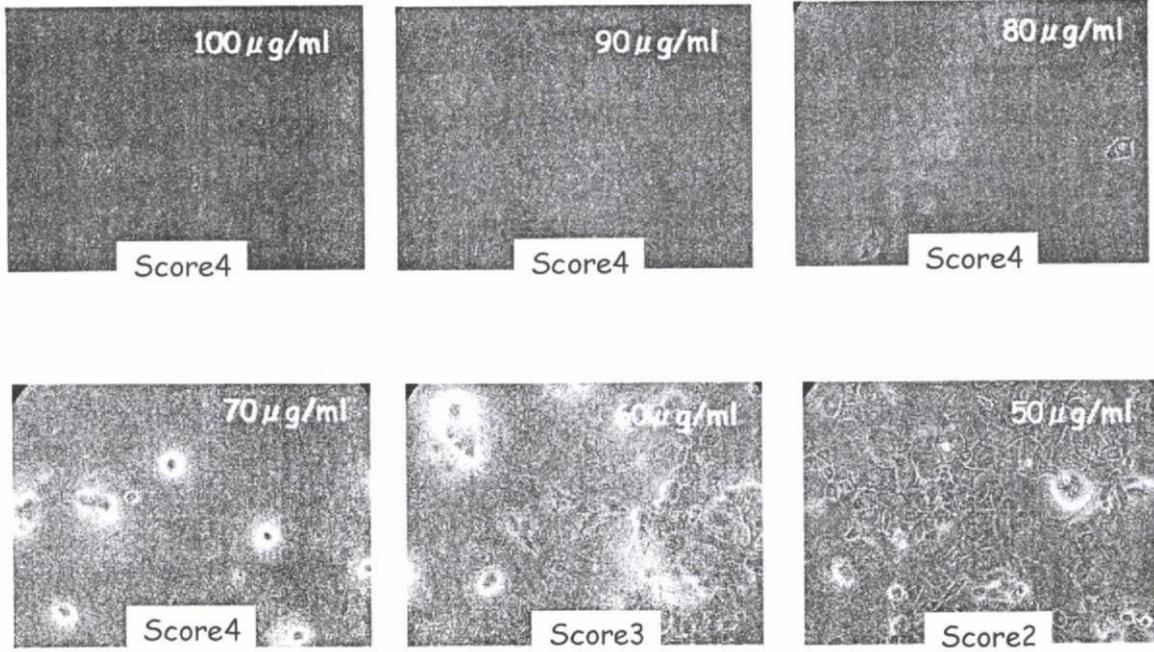


図 10. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値

表7. アンタゴニスト試験の結果一覧

Cell name	Project/Sample ID	Dosing Fraction	Comments	results	DMSO Average		3155000		Score
					Absolute RLU Value	% Cell Death	% Viable		
B2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol a	-275000	275000	8.7%	91.3%	1	
B3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol a	-95000	95000	3.0%	97.0%	1	
B4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol a	-45000	45000	1.4%	98.6%	1	
B5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol a	-35000	35000	1.1%	98.9%	1	
B6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol a	15000	15000	0.5%	100.5%	1	
B7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol a	5000	5000	0.2%	100.2%	1	
B8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol a	35000	35000	1.1%	101.1%	1	
B9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol a	35000	35000	1.1%	101.1%	1	
B10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol a	-15000	15000	0.5%	99.5%	1	
B11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol a	-25000	25000	0.8%	99.2%	1	
C2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol b	-225000	225000	7.1%	92.9%	1	
C3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol b	-165000	165000	5.2%	94.8%	1	
C4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol b	-65000	65000	2.1%	97.9%	1	
C5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol b	-45000	45000	1.4%	98.6%	1	
C6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol b	-35000	35000	1.1%	98.9%	1	
C7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol b	-15000	15000	0.5%	99.5%	1	
C8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol b	15000	15000	0.5%	100.5%	1	
C9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol b	15000	15000	0.5%	100.5%	1	
C10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol b	-5000	5000	0.2%	99.8%	1	
C11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol b	-85000	85000	2.7%	97.3%	1	
D2	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-435000	435000	13.8%	86.2%	1	
D3	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-265000	265000	8.4%	91.6%	1	
D4	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-265000	265000	8.4%	91.6%	1	
D5	#105K00451	DMSO	control	-5000	5000	0.2%	99.8%	1	
D6	#105K00451	DMSO	control	35000	35000	1.1%	101.1%	1	
D7	#105K00451	DMSO	control	-25000	25000	0.8%	99.2%	1	
D8	#105K00451	DMSO	control	-5000	5000	0.2%	99.8%	1	
D9	EG1-1.1	4.00E+07	Bisphenol-A	-2936844	2936844	93.1%	6.9%	4	
D10	EG1-1.1	3.60E+07	Bisphenol-A	-3012886	3012886	95.5%	4.5%	4	
D11	EG1-1.1	2.88E+07	Bisphenol-A	-2859835	2859835	90.6%	9.4%	4	
E2	EG1-1.1	2.02E+07	Bisphenol-A	-2065000	2065000	65.5%	34.5%	4	
E3	EG1-1.1	1.21E+07	Bisphenol-A	-1615000	1615000	51.2%	48.8%	3	
E4	EG1-1.1	6.05E+06	Bisphenol-A	-605000	605000	19.2%	80.8%	2	

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

(財) 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
武吉正博、赤堀有美、宮浦英樹

1. 緒言

ヒトエストロゲン受容体 ER α (hER α) 遺伝子およびエストロゲン応答配列とレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子をヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に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において、内因性の女性ホルモンである 17 β -estradiol (E2) 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活性 (アンタゴニスト活性) 検出系について、ER アンタゴニスト活性が既知の 4 種の化学物質を用いた 10 回の繰り返し実験を実施し、抗エストロゲン活性検出系における試験の品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance criteria) を定めるための検討を行なった。また、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 $^{\circ}$ 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 μ M 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 μ M 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 (プロメガ株式会社) の容器に付属の Luciferase Assay buffer 全量を直接加えて溶解し、-80℃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 (10^4 cells/100 μ L/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 μ L/well で添加
[プレートレイアウト]

	OHT			ICI			TAM			RAL		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-7} M + 25 pM E2			10^{-7} M + 25 pM E2			10^{-5} M + 25 pM E2			10^{-8} M + 25 pM E2		
B	10^{-8} M + 25 pM E2			10^{-8} M + 25 pM E2			10^{-6} M + 25 pM E2			10^{-9} M + 25 pM E2		
C	10^{-9} M + 25 pM E2			10^{-9} M + 25 pM E2			10^{-7} M + 25 pM E2			10^{-10} M + 25 pM E2		
D	10^{-10} M + 25 pM E2			10^{-10} M + 25 pM E2			10^{-8} M + 25 pM E2			10^{-11} M + 25 pM E2		
E	10^{-11} M + 25 pM E2			10^{-11} M + 25 pM E2			10^{-9} M + 25 pM E2			10^{-12} M + 25 pM E2		
F	10^{-12} M + 25 pM E2			10^{-12} M + 25 pM E2			10^{-10} M + 25 pM E2			10^{-13} M + 25 pM E2		
G	VC + 25 pM E2						1 μ M OHT + 25 pM E2			100 μ M 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 μ L/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いて 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 Prism[®] 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

は lin.IC50) を求めた。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{EC50} - X) * \text{HillSlope})})$$

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 $\text{AVG} \pm 3\text{SD}$ 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 $-8.7\% \sim 16.9\%$ 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

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 $AVG \pm 3SD$ 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。

6. 結論

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 (表 3) 及び性能基準 (表 5) を設定した。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) における基準値として有用と思われる。しかしながら、本検討の結果は本検討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。

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	-