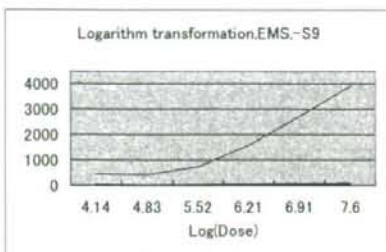
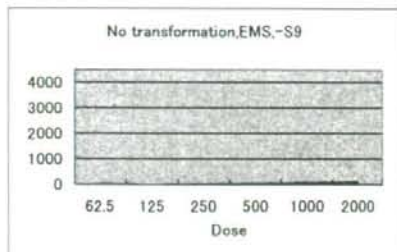
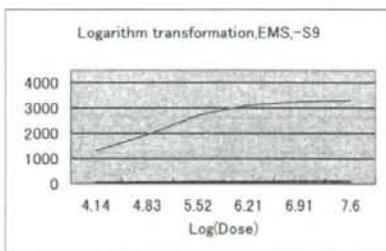
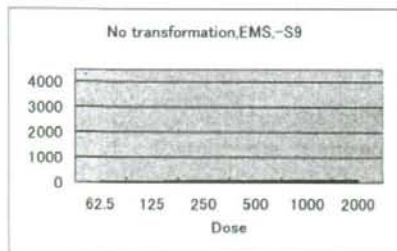


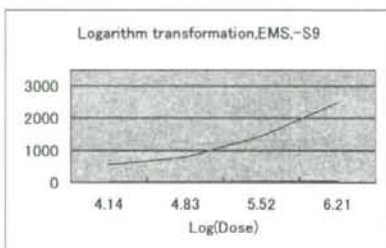
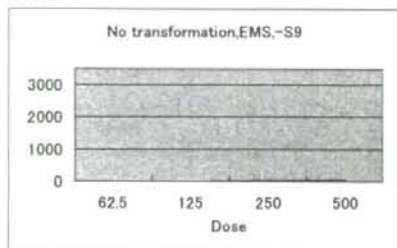
The results of dose unit -S9,EMS - . Mean value - Predict mean value  
 Anyo Ctr.



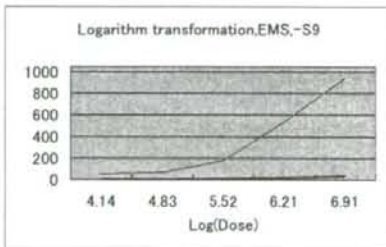
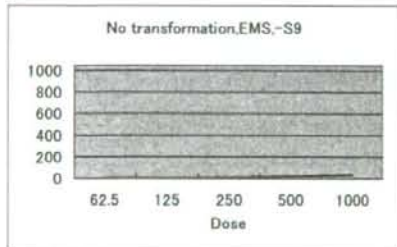
Bio-Reliance



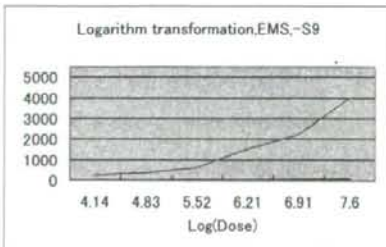
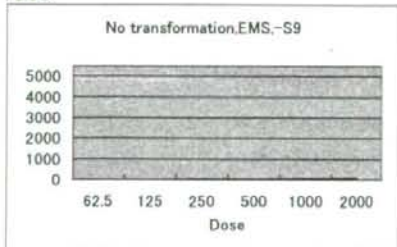
HLS



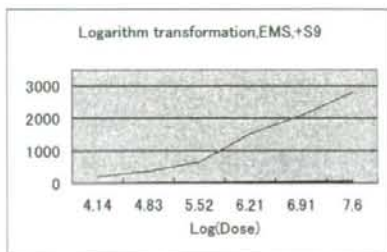
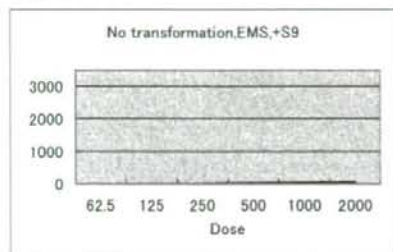
Merk



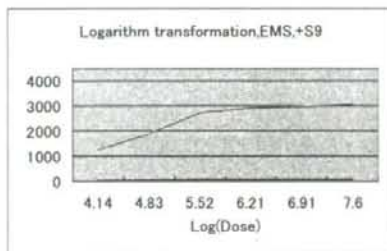
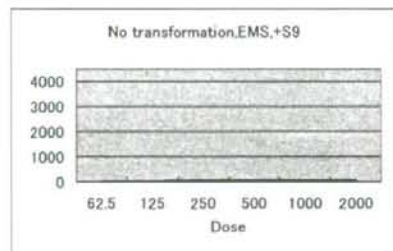
FDSC



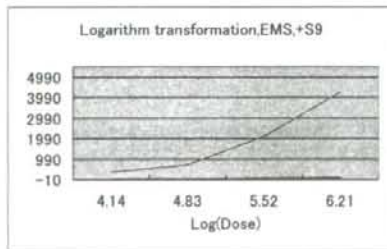
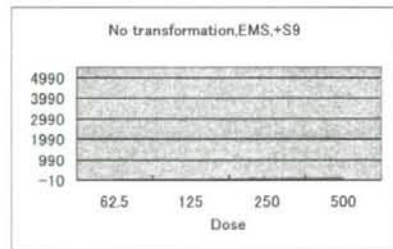
The results of dose unit.+S9,EMS - :Mean value - Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



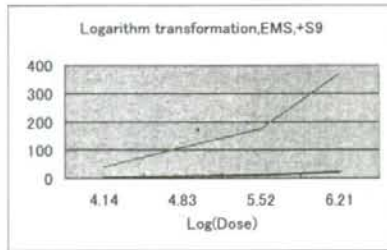
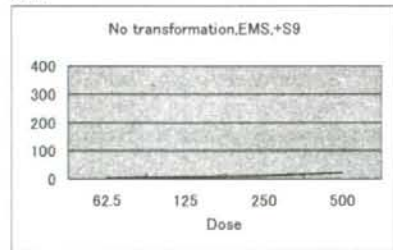
Bio-Reliance



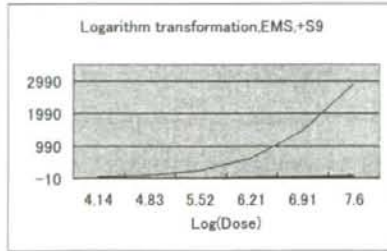
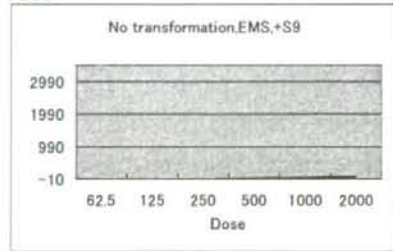
HLS



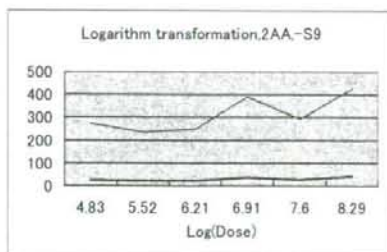
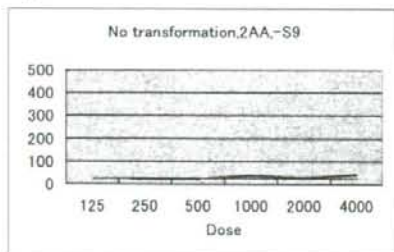
Merk



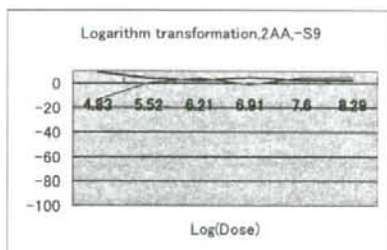
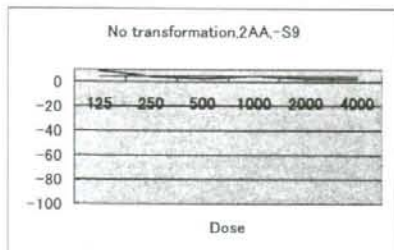
FDSC



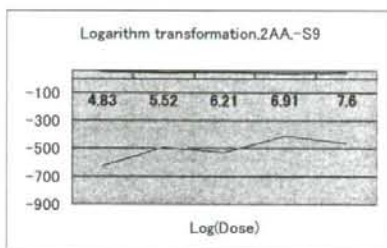
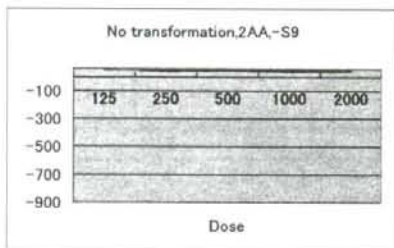
The results of dose unit.-S9,2AA - : Mean value - Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



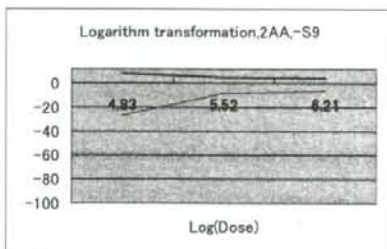
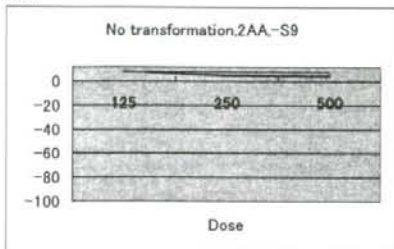
Bio-Reliance



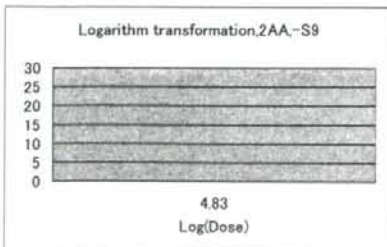
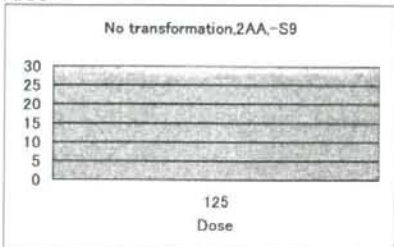
HLS



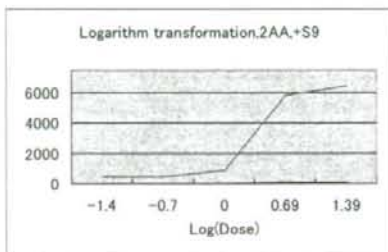
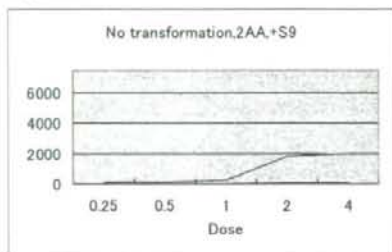
Merk



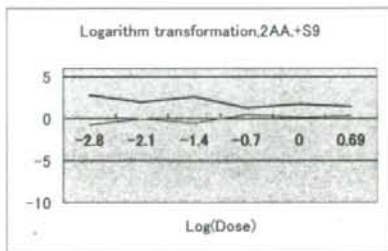
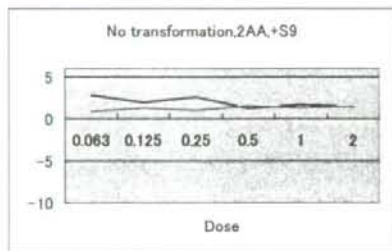
FDSC



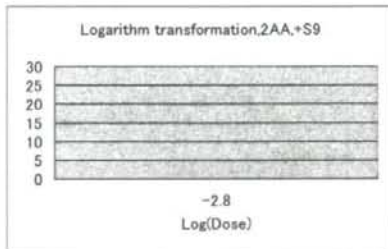
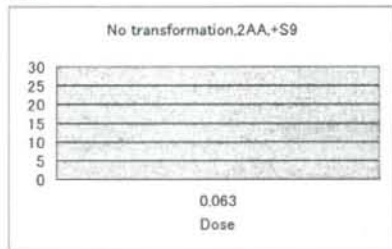
The results of dose unit.+S9,2AA - :Mean value - :Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



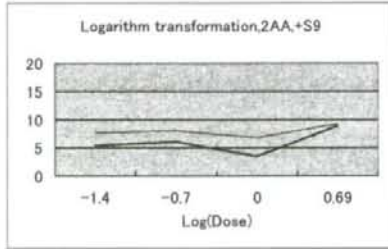
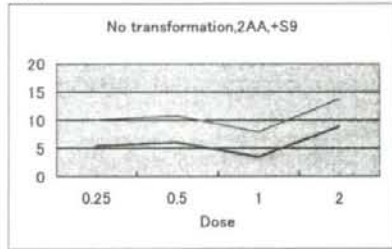
Bio-Reliance



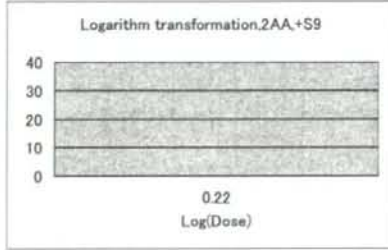
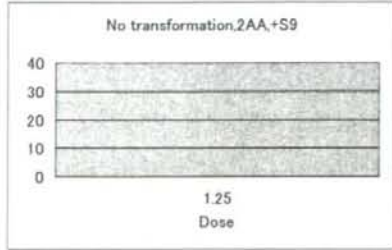
HLS



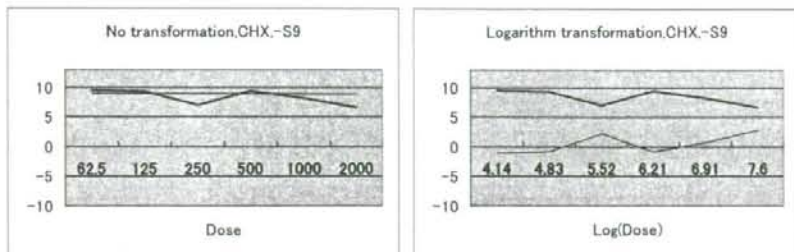
Merk



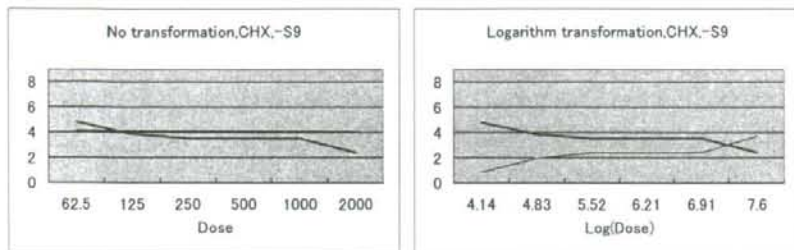
FDSC



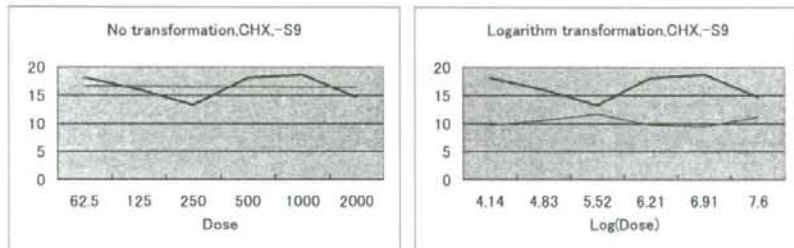
The results of dose unit.-S9,CHX - :Mean value - :Predict mean value  
 Anyo Ctr.



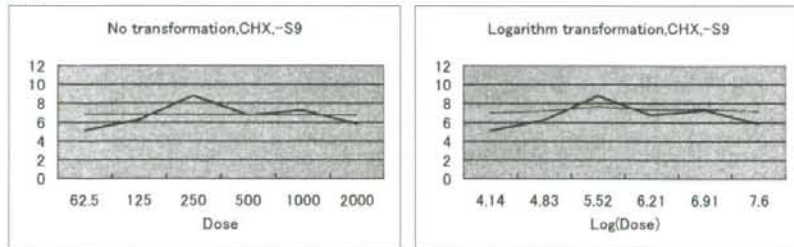
Bio-Reliance



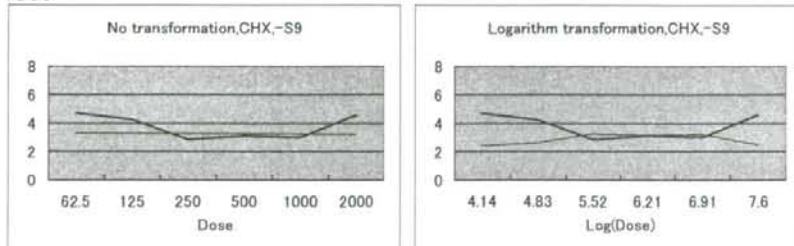
HLS



Merk



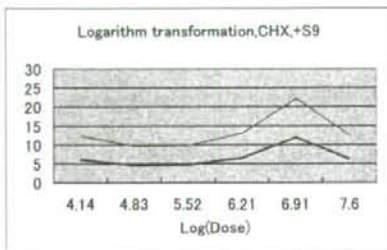
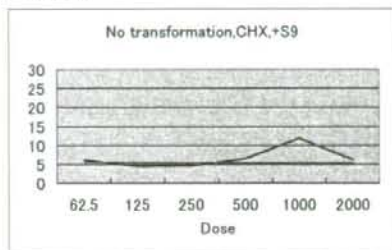
FDSC



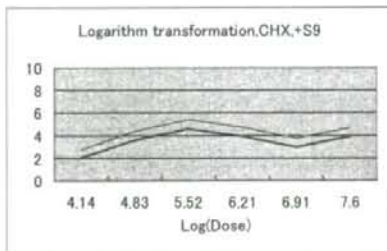
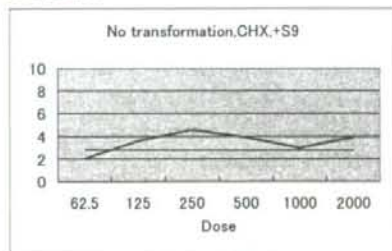
The results of dose unit.+S9,CHX  
Anpyo Ctr.

- : Mean value

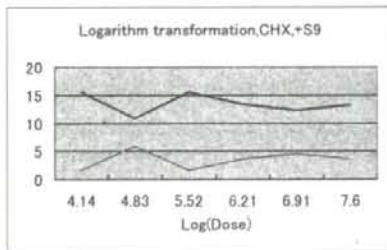
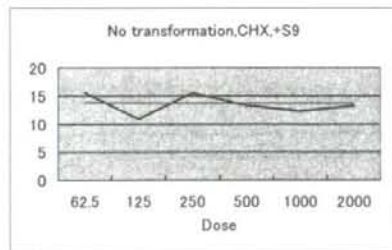
- : Predict mean value



Bio-Reliance

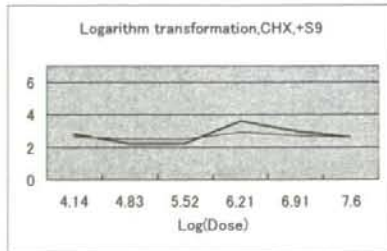
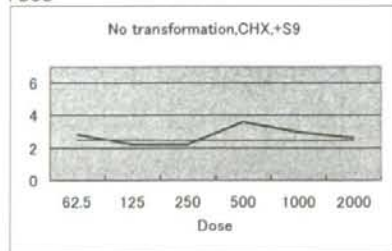


HLS

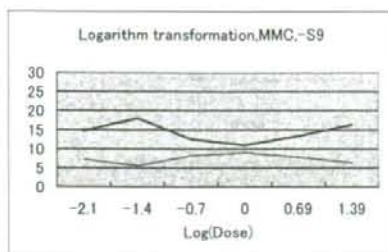
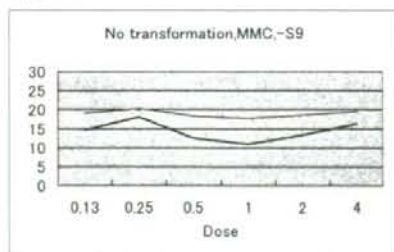


Merk

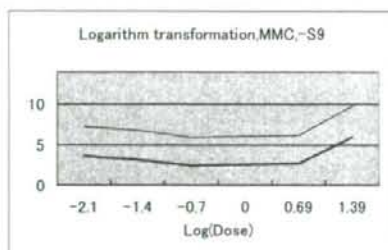
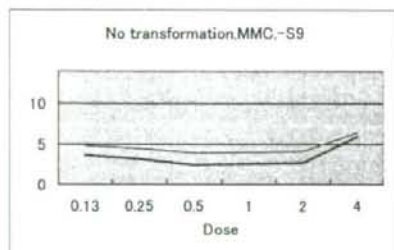
FDSC



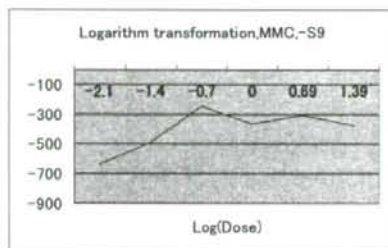
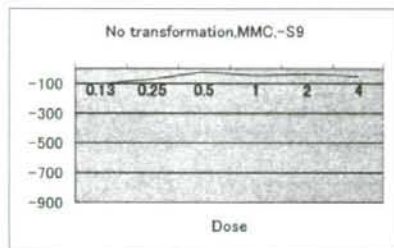
The results of dose unit.-S9,MMC - : Mean value - Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



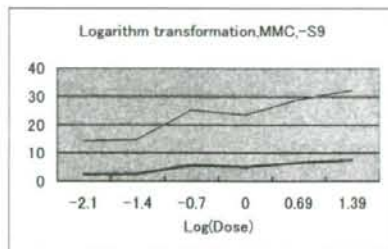
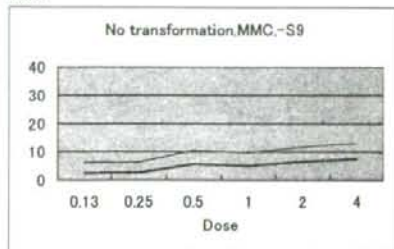
Bio-Reliance



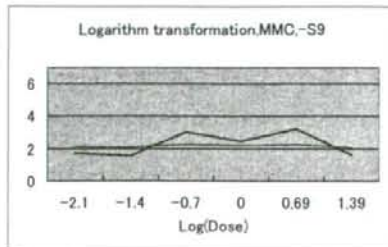
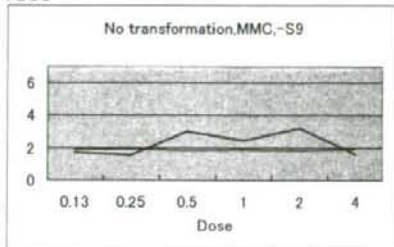
HLS



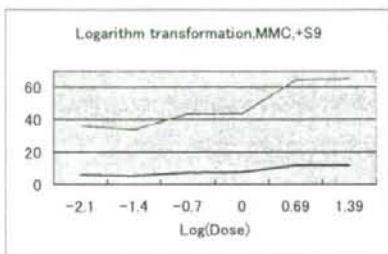
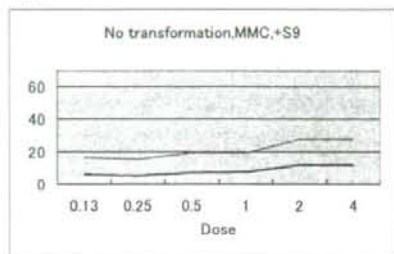
Merk



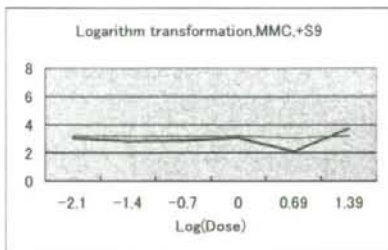
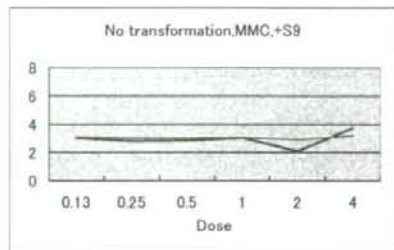
FDSC



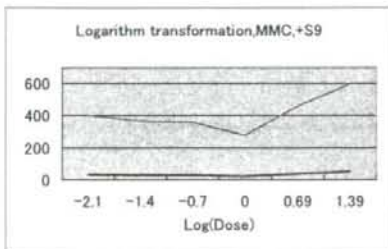
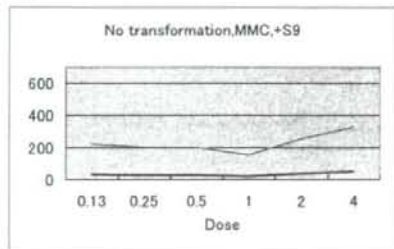
The results of dose unit.+S9,MMC - :Mean value -.:Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



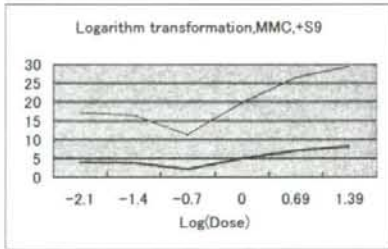
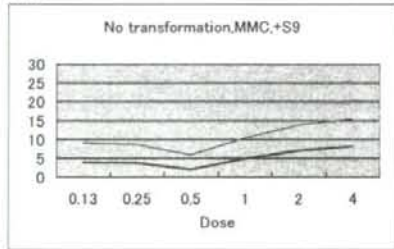
Bio-Reliance



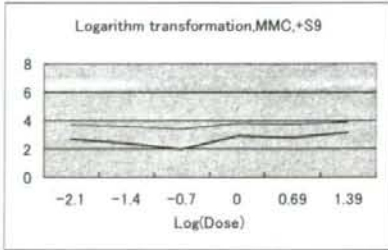
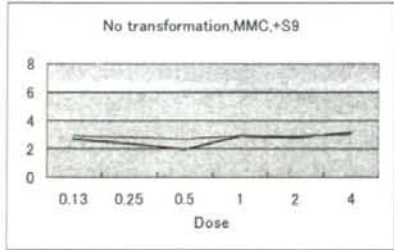
HLS



Merk

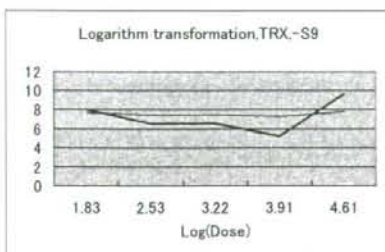
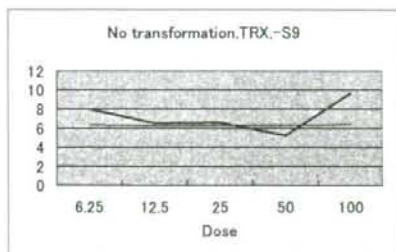


FDSC

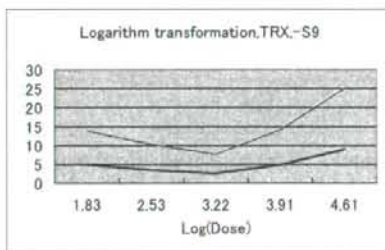
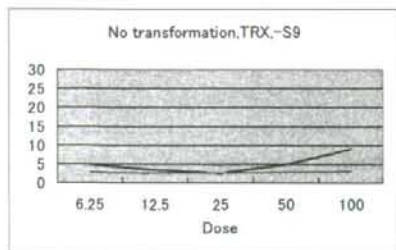




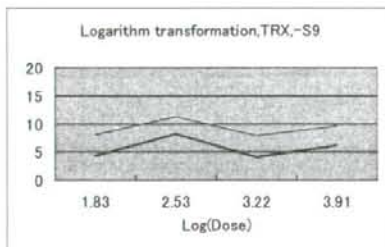
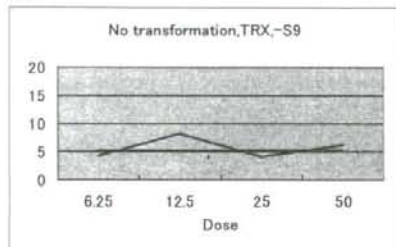
The results of dose unit.-S9, TRX - : Mean value - : Predict mean value  
 Anyo Ctr.



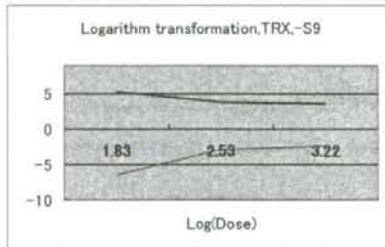
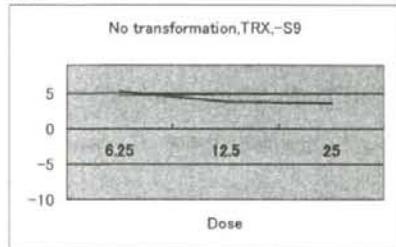
Bio-Reliance



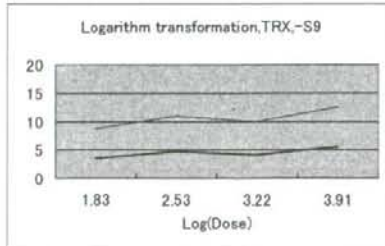
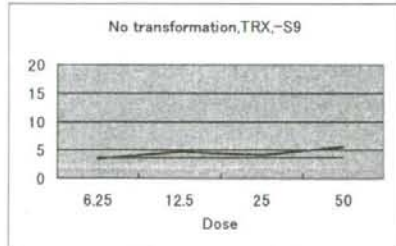
HLS



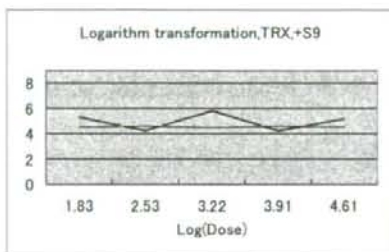
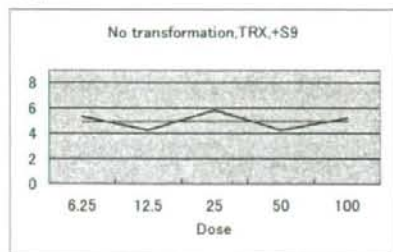
Merk



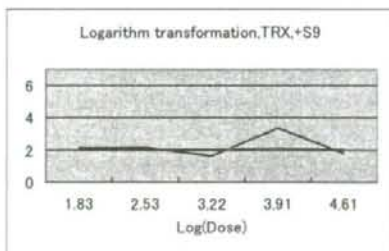
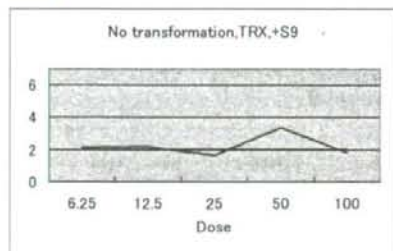
FDSC



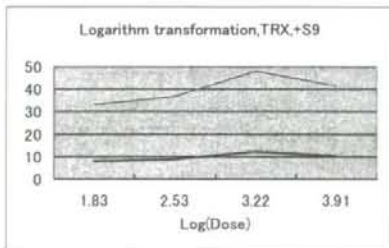
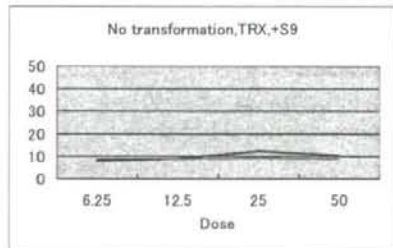
The results of dose unit.+S9,TRX - :Mean value - :Predict mean value  
 Anpyo Ctr.



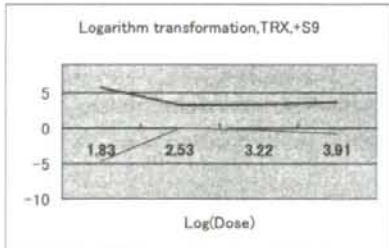
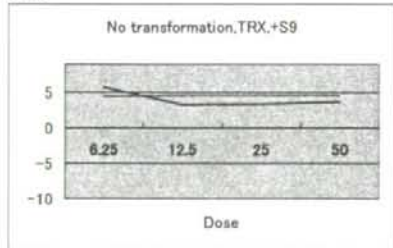
Bio-Reliance



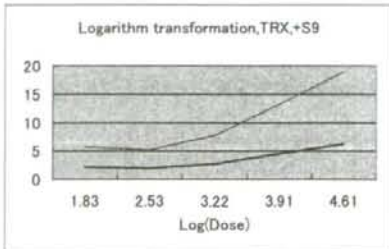
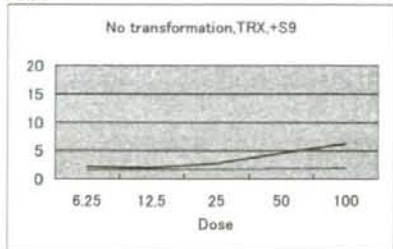
HLS



Merk



FDSC



## **PHASE II VALIDATION STUDY OF THE IN VITRO ALKALINE COMET ASSAY**

**Issued by the VMT (Masamitsu Honma)**  
**Version 5, July 11, 2008**

### **A. PURPOSE OF THIS DOCUMENT**

This document is provided to conduct an international phase II validation study of the in vitro alkaline Comet assay. Following the phase I study, five leading laboratories conduct the in vitro Comet assay for 6 genotoxic or non-genotoxic chemicals to conform the in vitro Comet assay procedure and to make consensus for evaluation and interpretation of the Comet results. In phase II study, we take blind trial. The management members review and validate the Comet results with the consultation of experts.

### **B. ORGANIZATION**

1. Validation management team (VMT)

M. Hayashi (JaCVAM/An-Pyo Ctr.), R. Corvi (ECVAM), M. Honma (NIHS), Y. Uno (MTP/MMS), L. Schechtman (Consultant), R. Tice (NIEHS/ICCVAM/NICEATM), H. Kojima (JaCVAM/NIHS; Secretariat)

2. Consultation team

N. Asano (MMS/Nitto Denko), D. Lovell (Univ. of Surrey), T. Morita (NIHS), N. Nakashima (PMDA), Y. Ohno (JaCVAM/NIHS), T. Omori (Kyoto Univ.), YF Sasaki (Hachinohe Natl. Coll. of Tech.), M. Suzuki (An-Pyo Ctr.), S. Hoffmann (ECVAM), G. Speit (Unv. of Ulm), A. Collins (Unv. of Oslo), S. Park (KFDA), Y. Seo (Kyung Hee Univ.)

3. Leading laboratory

K. Yamakage (FDSC, JP)  
B. Burlinson (HLS, UK)  
P. Escober (Boehringer-Ingelheim, USA)  
K. Pant (Bio-Reliance, USA)  
A. Kraynak (Merk, USA)

### **C. ASSUREANCE OF DATA QUALITY**

The study will be conducted by the leading laboratories which have a facility of Good Laboratory Practice compliant (GLP).

## D. TESTING PROCEDURE

### 1. BASIC PROCEDURES OF ALKALINE COMET ASSAY

We understand that the basic procedures for the Comet assay including cell lysis, un-winding, electrophoresis, neutralization, DNA staining, visualization, and Comet analysis are identical between in vivo and in vitro experiments. Those procedures were already established in the international validation study of the in vivo rodent alkaline Comet assay before. In this pre-validation study, the laboratory should conduct the Comet assay according to the established procedure. The summary of basic procedure is shown in Table 1.

Table 1

		In Vivo Comet Standard Procedure
Agarose gel and sample preparation	Bottom gel	1.0-1.5%-low-gelling temperature-agarose in PBS (if used)
	Sample gel (A)	0.5%-low-gelling temperature-agarose in PBS
	Solution of suspended cells (B)	Cells in HBSS with 20 mM EDTA and 10% DMSO*
	Mixture/ Final conc. of agarose	(A):(B)= 9:1/ 0.45%
Lysis and electroporation	Lysis solution	2.5M NaCl, 100mM Na <sub>2</sub> EDTA, 10mM Tris-base, 10% DMSO, 1% Triton-X (pH 10) *
	Lysis condition	Overnight, 4C
	Rinse solution/ Condition	Distilled water/ Dipping
	Electrophoresis solution	0.3M NaOH, 1mM EDTA (pH >13), <10C
	Electrophoresis condition	Unwinding 20min + Electrophoresis 0.7-1 V/cm (300mA), <10C
Staining	Neutralization/ Dehydration	0.4M-Tris-base (pH 7.5) at least 5 min/ Absolute ethanol at least 5 min
	Staining dye/ Time	SYBR Gold/ 10 min
Scoring and statistics	Comet analysis	Comet IV, Tail length, Tail moment, % tail DNA

\* DMSO and/or Triton X should be added just before use.

### 2. SPECIFIC ISSUES FOR THE IN VITRO ALKALINE COMET ASSAY; MATERIALS AND METHODS

#### 2-1. Cells, cell lines

The TK6 human lymphoblast cell line must be commonly used in the

*International Pre-Validation Study of the In Vitro Alkaline Comet Assay*  
**Version 5**

pre-validation study. Other cells including human peripheral lymphocytes, L5178Y, V79, CHO, CHL/IU, or HepG2 can be used as a second choice if the laboratory prefers.

2-2. Media, cell culture condition, and cell stocks

Appropriate culture media, and incubation conditions (culture vessel, CO<sub>2</sub> and concentration, temperature should be used in maintaining culture. For TK6 cells, culture medium consists of RPMI1640 medium (GIBCO by Invitrogen Corporation; Cat. No.11875 ) supplemented with 200 ug/ml sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin-100 ug/ml streptomycin (GIBCO by Invitrogen Corporation; Cat. No.15140), and 10 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

The TK6 cells are always maintained in the culture medium at 37C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. Cell density is measured by a hemocytometer or an automatic cell counter and the cells are routinely diluted to ~2 X 10<sup>5</sup> cells/ml each day to prevent overgrowth (>1.5 X 10<sup>6</sup>/ml).

The laboratory will thaw the delivered the cells and expansively culture in the medium and maintain approximately 1 week. Logarithmic growth is normally maintained with population doubling times of 11-15 h. The cell stocks should be made at approximately 1 X 10<sup>6</sup> cells/ml, 1ml/tube in culture medium containing 10% dimethylsulfoxide (DMSO).

Note) Each laboratory purchase TK6 cell line and FBS from ATCC by itself. ATCC can provide same lots of the TK6 cell (CRL-8015, lot#: 3296817) and FBS (30-2020, lot#: 6504229). TK6 can well grow with FBS and horse serum (HS), and the both conditions are available for any genotoxicity studies. However, the population doubling time with FBS is a little faster than that with HS.

2-3. Metabolic activation

Cells should be exposed to the test chemicals both in the presence and absence of the metabolic activation system (S9-mix). Each laboratory purchase S9 from MolTox (<http://www.moltox.com/>). Catalog number 11-105 (Post-Mitochondrial Supernatant: Sprague-Dawley rat liver. Male. Phenobarbital/5,6 Benzoflavone induced) must be commonly used in the study. The preparation of S9-mix and its use are as follows;

Energy source (co-factors):

6.7g NADP (disodium salt, mw = 787) and 12.5g isocitrate (trisodium salt,

mw = 258) are dissolved in a final volume of 500 ml distilled water and then filtered through a 0.2 micron filter to sterilize. Aliquots of this can be frozen at -70C for up to 2 years and used as needed (one use per aliquot).

S9-mix:

1.5 ml S9  
6.0 ml energy source (from above)

Cultures:

Cell culture 9.15 ml  
S9-mix 0.75 ml  
Test chemical solution 0.1 ml

Final concentrations in culture media:

1 mM NADP  
5.8 mM Isocitrate  
15 ul/ml S9 (1.5%)

Note) In the absence of S9-mix, 150mM KCl should be used instead of S9-mix.

2-4. Duplicate cultures

The Comet assay for each chemical in the absence and the presence S9 should be conducted in duplicate, because the duplicate results will be appropriately evaluated statistically.

2-5. Duration of the treatment

The culture cells are treated with the chemical for 4 hours, and then the Comet assay should be immediately conducted. The 4 hours treatment is the optimal condition for in vitro Comet assay for most of cells.

2-6. Test chemicals and solvent

VMT selected 6 chemicals and delivered them to a chemical master in each laboratory. According to the direction of the chemicals master, the test chemicals should be prepared. The solvents used, in order of preference, are physiological saline, distilled water, or DMSO.

2-7. Evaluation of cytotoxicity

The three cytotoxicity tests should be commonly used for the studies.

- 1) Trypan blue dye exclusion test (TBDE) just after the treatment
- 2) Counting non-detectable cell nuclei (NDCN; hedgehog)
- 3) Relative cell growth for 24 h after the treatment

Optionally, other tests as follows could be taken if the laboratory prefers.

- a) Late trypan blue dye exclusion test after the treatment
- b) Relative survival (colony formation) just after the treatment
- c) Neutral diffusion assay just after the treatment
- d) Dual dye viability staining just after the treatment (Strauss et al., 1991)
- e) Others (ATP concentration, mitotic index, etc.)

#### 2-8. Top concentration and dose selection

The laboratory should conduct the Comet assay for the chemicals until 5mg/ml if no cytotoxicity is observed. When cytotoxicity is observed less than 5mg/ml, a top concentration is determined by cytotoxicity tests. The top concentration should show enough cytotoxicity, but not severe cell damage causing a lot of non-detectable cell nuclei (NDCN; hedgehog). The recommended top concentration is one with 80% TBDE, 20% NDCN, or no cell growth for 24 h after the treatment. The laboratory can conduct preliminary experiment for the dose-finding.

Each main experiment usually consists of one solvent control and at least five concentration of the test chemical. As a rule, 2-fold serial dilutions were prepared from the top concentration.

#### 2-9. Standard procedure of treatment for TK6

- i) The laboratory thaws the stoked cells into 50 ml of culture medium in a TS-75 culture bottle and starts cell culture. After several days, logarithmic growing TK6 cells are prepared approximately at  $2 \times 10^5$  cells/ml with culture medium and divided into 15 ml plastic tubes by 9.15 ml aliquots, and 0.75 ml S9-mix (with metabolic activation) or 150mM KCl (without metabolic activation) are added into the tubes.
- ii) The 0.1 ml of serially diluted chemical is added into the tube for starting treatment. The tube is closed tightly and incubated at 37C with gentle shaking on a rocker platform in an incubator for 4 hours.
- iii) After the treatment, 1 ml of culture is taken into a new tube and is centrifuged at low speed (approximately 1,000 r.p.m. for 5 min), and supernatant is discarded. Each culture is washed with 1 ml of cold HBSS solution with 20mM EDTA and 10% DMSO, once by re-suspension and centrifugation. The cells are then re-suspended in 0.5 ml of the cold HBSS solution again. The cell suspensions are used for Comet slide preparation.
- iv) After the treatment, a small portion of cell cultures are taken and

examined for trypan blue dye exclusion test.

- v) The remained culture is also centrifuged at low speed (approximately 1,000 r.p.m. for 5 min), and supernatant is discarded. Each culture is washed with 5 ml of fresh medium once by re-suspension and centrifugation. The cells are then re-suspended in 10 ml of fresh medium and transferred to culture bottles (TS-25) or culture dishes. The cell density is measured by a hemocytometer or an automatic cell counter before starting culture. The cultures are incubated at 37C in a humidified incubator gassed with 5% CO<sub>2</sub> and in air. Twenty-four hours later, the cell density is measured again. The relative cell growth to the solvent control is calculated.

### **3. SLIDE PREPARATION**

After the treatment, the cells are washed and made as single cell suspension with or without trypsinization. The cell sample for Comet assay should be finally suspended in cold HB solution with 20mM EDTA and 10% DMSO. The cell suspension sample and 0.5 % low melting agarose are mixed by 1:9 for preparing Comet slides.

### **E. DATA AND REPORTING**

The data sheets in the phase II study will be sent later. After finishing all experiments, each laboratory will send the filled datasheets with final reports to VMT. The chemical master will also send the information of chemical name in the blind trial separately.

### **F. ARCHIVES AND REVIEW**

The study reports and all of data should be retained according to the SOP in each laboratory. They will be provided to VMT for reviewing.

### **G. REFERENCES**

Henderson, L., et al., The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13, 89-94 (1998)

Honma et al., Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mutation Research* 374, 89-98 (1997)



*International Pre-Validation Study of the In Vitro Alkaline Comet Assay*  
**Version 5**

Honma, M., Hayashi M., Shimada H., Tanaka N., Wakuri S., Awogi T., Yamamoto K.I, Kodani N.-U., Nishi Y., Nakadate M. and Sofuni T. Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test. *Mutagenesis*, 14, 5-22 (1999).

Strauss, GHS., Non-random cell killing in cytopreservation: Implication for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research*, 252, 1-15 (1991)

Vock, EH., et al., Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melpharan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and gamma-irradiation. *Mutation Research*, 413, 83-94 (1998)

## 厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

### 平成 20 年度分担研究報告書

#### 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション

研究分担者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

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  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) 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、その妥当性の検討を行うことを目的として研究を実施した。HeLa 法については、昨年度までの検討をもとにバリデーションプロトコルに従い、JaCVAM の主導により、JaCVAM、ECVAM および米国 EPA のメンバーより構成されたスタディーマネージメントチームのもと、日本、欧州、韓国の施設における 3Task からなる国際バリデーション試験を開始した。Task1 では、HeLa 細胞測定系の準備として既に OECD ガイドライン化が進んでいるアゴニストアッセイにおいて標準物質の測定を実施し、全てのラボで評価基準を満たす結果を得た。しかし、アンタゴニストアッセイの準備段階である Task2 では、海外のラボで標準物質の評価基準をクリア出来ず、原因究明のための追加実験により培養液の問題などを示唆する結果が得られた。一方、Lumi-cell 法については、まず昨年度実施した Phase I データにより得られた経歴データベースから設定された品質評価基準に従いアゴニスト試験 4 物質、アンタゴニスト試験 4 物質からなる Phase II a を実施した。その結果、海外のラボでは複数回の測定で基準をクリア出来なかったことから、基準の修正が SMT で合意された。これを受けて修正された評価基準に従いアゴニスト試験 8 物質、アンタゴニスト試験 8 物質からなる Phase II b を実施した。各ラボからの化合物評価結果についてアゴニスト試験では、ほぼ共通した結果が得られたのに対して、アンタゴニスト試験では、米国、欧州、日本のラボで多くの化合物で評価結果が一致せず、さらなる検討の必要性が示された。

#### 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、OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォース (EDTA : Task Force on Endocrine

Disruptors Testing and Assessment) により示されたコンセプトアルフレームワークのレベル 2 に分類される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  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 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同様のレポーターアッセイ法である 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とともに得られた結果から信頼性や再現性が確認された手法については、最終的に OECD においてガイドライン化の提案を行っていくことを目的としている。

## B. 研究方法

### 1. HeLa9903 細胞を用いたアンタゴニストアッセイバリデーション試験

#### 1.1. バリデーション運営委員会 (Study Management Team (SMT)) の設置と参加施設

本年度は、昨年度までの検討により定められたバリデーションプロトコルおよび品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance criteria) をもとに多施設国際バリデーション試験を開始した。本研究ではバリデーション研究の透明性及び客観性を確保するため、Study Management Team (SMT) を組織し、実験の進行に関する情報の収集、解析及び状況に応じた指示を行った。SMT は小島肇博士 (国立医薬品食品衛生研究所・新試験法評価室 (JaCVAM))、小野敦博士 (国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室)、Miriam Jacobs 博士 (ECVAM)、Susan C. Laws 博士 (US-EPA)、寒水孝司博士 (大阪大学) の 5 名で構成され、さらに菅野純博士 (国立医薬品食品衛生研究所) 及び OECD VMG non-animal メンバーをアドバイザーとした。実験の技術面の支援に関しては本法の開発施設である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) をリードラボとして、試験計画書の作成、参加施設に対する実験指導、結果の解析、実験進行に伴う技術的問題点の把握及び問題解決のための技術支援を実施した。

本研究におけるバリデーション試験参加施設は、本測定系を開発した化学物質評価研究機構をリードラボとして、欧州 ECVAM の推薦によりベルギー VITO および韓国 FDA の 3 施設とした。一方、本測定系は、これまで厚生労働省および経済産業省の共同により開発および検証が進められてきており、経済産業省において国内施設における多施設バリデーション試験が計画されていたことから、本研究班と共通のプロトコルにより実施することとし、全てのバリデーション試験の取りまとめを、JaCVAM で主導して実施することとなった。これにより、国内外合計 5 施設の参加によりバリデーション試験を開始した。

参加施設の詳細は下記に示す。

施設 1 : 株式会社カネカテクノリサーチ環境分析部環境分析センター

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 番 8 号

施設 2 : 大塚製薬株式会社 大塚診断事業部特別プロジェクト Eco-Screen 開発室

〒771-0195 徳島市川内町平石字夷野 224-18

施設 3 : 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600

施設 4

: Flemish Institute for Technological Research

-  
VITO Expertisecenter Environmental Toxicology Research  
Researchmanager Environment & Health  
Project leader Test development  
in vitro alternatives Boeretang 200 B-2400  
MOL Belgium

施設 5 :

National Institute of Toxicological Research  
Korea Food and Drug Administration  
194 Tongil-ro, Eunpyung-gu, Seoul  
122-704, Korea

本研究班および国内参加施設を含むバリデーション組織の概略図を図 1-1 に示した。

## 1.2. バリデーションプロトコールと実施設計

バリデーション試験の実施は、昨年度までの本研究における検討により作成されたプロトコール案に基づき、最終的に運営委員会で合意されたバリデーションプロトコールに従い実施した。現時点での最新のプロトコールを添付資料1として示した。

バリデーション研究はTask1からTask3の3段階に分割して実施(図1-2)し、バリデーション実験開始前に試験計画書の作成及びVITOを除く4施設に対する試験計画書の沿った実験方法の説明を国立医薬品食品衛生研究所にて実施(2008年4月14日)し、K-FDA(韓国)の実施担当者に対する技術指導を化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所にて実施した。標準物質を含む被験化合物および化合物を溶解するDMSOはJaCVAMより、同一ロットのものが配布された。

## 1.3. Task-1

Task-1では各参加ラボが本法で用いる基本的な技術に対する習熟度を確認するため、Edge効果の有無及び代表的なアゴニスト作用物質及び非作用物質(17β-Estradiol、17α-Estradiol、Corticosterone)を用いたアゴニスト実験を実施した。

### Edge効果の確認:

アッセイプレートにHeLa-9903細胞を10000個/ウェルの密度で播種した後、終濃度が1nMとなるようにE2を添加し、約20時間後にルシフェラーゼ検出試薬を加え、全ウェルの発光強度を計測した。Edge効果の有無はアッセイプレート全ウェルで平均値を算出し、バラツキを評価するため変動係数を算出した。変動係数が10%未満の場合、Edge効果はないものと判断した。

### アゴニスト検出手技の確認:

アゴニスト活性の確認は代表的なアゴニスト作用物質及び非作用物質(17β-Estradiol、17α-Estradiol、Corticosterone)を用いたアゴニスト実験を実施した。アゴニスト実験に関してはOECDガイドライン化が進行し、既にガイドラインの中に性能基準(Performance standard、表1-1

)が定められているため、その結果が性能基準を満たすことを条件とした。実験は最大5回までの実験を実施し、性能基準を満たす実験が3回となった時点でTask-1終了とした。

## 1.4. Task-2

Task-2はTask-1通過施設がアンタゴニスト活性系実験において十分なスキルを有しているか否かを判断することを目的とした。

Task-2では代表的なアンタゴニスト作用物質として(4-Hydroxytamoxifen(OHT)、Tamoxifen(TAM)、RU486、非作用物質としてCorticosterone(Cor)、陽性対照及びスバイク用物質として17β-Estradiol(E2)、細胞毒性用陽性対照物質としてDigitonin(Dig))を用いて実験を行った。実験は最大5回までの実験を実施し、性能基準(表1-2)を満たす実験が3回となった時点でTask-2終了とした。

### アンタゴニスト検出手技の確認:

アンタゴニスト活性の確認は代表的なアンタゴニスト作用物質及び非作用物質(4OH-Tamoxifen、Tamoxifen、RU486、Corticosterone)を用いたアンタゴニスト実験を実施した。アンタゴニスト実験の性能基準(Performance standard)はリードラボである化学物質評価研究機構において実施された施設内試験結果のみに由来するため暫定基準とし、Task-2実験の結果を基に見直しを行うこととした。

## 1.5. データ解析

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25pM E2の平均値でさらに各濃度区の値を除いて25pM 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、25pM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。

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