

Hill Slope: 傾き

X: 対数濃度 (M)

Y: 相対転写活性化倍率の抑制率 (%)

2.1 Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

本年度は、バリデーション計画における Phase II a および Phase II b 試験を我が国の参加施設である株式会社・日吉において実施し、その信頼性保証のためデータレビューを行うとともに、ICCVAM、ECVAM、JaCVAM で構成されるバリデーション運営委員会に参加して日米欧 3 参加施設からの測定結果をもとに施設内および施設間再現性について評価を行い、バリデーション試験の進め方について議論した。

2.1.1. 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。

2.1.2. Lumi-cell ER アッセイ法のフロー

フロー及び試薬について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プロトコールに従って行った。試験に用いられる標準、コントロール物質及び被検試料は the LUMI-CELL ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group により提供された。標準及びコントロールの前処理は Lumi-cell プロトコールに具体的に記載されている。標準的な試験フローを図 2-1 に示した。また、アゴニスト試験、アンタゴニスト試験のための Comprehensive testing におけるコントロール物質及び被検試料の 96 穴プレートレイアウトは図 2-2 に示した。

2.1.3. Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II a

コード化されたアゴニスト用及びアンタゴニスト用各 4 化合物についてプロトコールに従い、溶解性試験、Range finding testing に引き続き Comprehensive testing を行い、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性についての EC50 もしくは、IC50 及び Dose response curve を得た。Phase II a においては、日米欧 3 ラボの Phase I 試験結果の解析をもとに修正されたプロトコールおよび品質

評価クライテリアに従って実施した。Comprehensive testing における、クオリティー評価クライテリアとして、Phase I 試験によって得られた経歴データベースからの値を用い、クライテリアを満たさない測定に関しては再測定を実施し、各化合物についてクライテリアを満たす 3 測定以上のデータを取得した。

Phase I におけるアゴニスト及びアンタゴニストのプロトコールからの、Phase II に際しての変更点および追加点を下記に示す。

変更点-1 データ採用基準について

表 2-1. の範囲内での Plate の Pass/Fail を判定する。

変更点-2 Comprehensive testing プレートレイアウトについて

Agonist 及び Antagonist 測定には、Phase I における検討からエッジ効果は認められなかったことから 96 穴全てを用いる図 2-2 のレイアウトに変更された。

変更点-3 Cell viability について

初期のプロトコールでは Cell TiterGlo (Promega 製) を用いた、細胞毒性評価を行うこととなっていたが、Phase I における Visual observation の検討結果から、細胞を顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELL ER 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 Visual observation 法のみを実施することとなった。

追加点-1 Test Substance Solubility について

被検試薬（未知試薬）につき、下記の手順により溶解方法を決めておく。

1-1) 被検試薬の DMSO への可溶性確認試験

a) 15mL チューブに 100 mg 被検試薬及び DMSO 溶液 1mL を加え準備する。（濃度；

100mg/mL)

b) 攪拌する。溶解しない場合は、10 分間超音波をかける。

c) 溶解しない場合は、100mg/mL 溶液 1mL に 9 mL DMSO を加える。(濃度: 10 mg/mL)

その後、攪拌。必要であれば 10 分間超音波をかける。

d) 溶解するまで、1/10 希釈しながら試験を続ける。

1-2) 調整溶液の DMEM 培地への可溶性試験

a) 13mm チューブに一番濃度の高い調整 DMSO 溶液(決定した液) 4 μ L を加える。

b) 400 μ L エストロゲンフリー DMEM 培地を加え、攪拌する。

c) 濁りや沈殿が起こった場合、10 分間攪拌する。

d) 攪拌して、調整 DMSO が溶解しなければ、10 分間超音波をかける。

e) 再度濁りや沈殿がある場合、次に薄い濃度を順次作成する。

追加点-2 Range finding testing について

Range finding testing とは、Comprehensive testing における開始濃度の決定を行うための試験であり、Agonist 及び Antagonist それぞれ被検試薬溶解決定濃度から 10 倍希釈 (7 段階) で曝露し、細胞毒性及び細胞活性を考慮し、開始濃度及び希釈段階 (1:2 か 1:5) を判断する。

2.1.4. Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II b

コード化されたアゴニスト用及びアンタゴニスト用各 8 化合物についてプロトコルに従い、溶解性試験、Range finding testing に引き続き Comprehensive testing を行い、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性についての EC50 もしくは、IC50 及び Dose response curve を得た。Phase II b においては、日米欧 3 ラボの Phase II a 試験結果の解析をもとに修正されたプロトコルおよび品質評価クライテリアに従って実施した。

Comprehensive testing における、クオリティー評価クライテリアの意基値としては、Phase I 及び Phase II a 試験結果によって得られた経歴データベースからの値を用い、クライテリアを満たさない測定に関しては再測定を実施し、各化合物についてクライテリアを満たす 3 測定以上のデータを取得した。

変更点-1 Criteria について

Phase I 及び Phase II a の結果を踏まえて変更された。

変更点-2 Worksheet (Excel) の変更

特に Plate 及び Test Substance の Pass/Fail の細分判定が追加された。

2.2 Lumi-cell ER アッセイ日米欧 3 ラボにおける試験結果の評価

運営委員会で合意された Lumi-cell ER アッセイバリデーションプロトコルに従い、日米欧 3 施設において実施された Phase I、II a、II b 試験結果について各 Phase 終了時における解析結果をもとに施設内および施設間の測定結果のばらつきについて評価を行い、測定系の信頼性や再現性について検討を行った。解析結果をもとに必要と判断される場合には、運営委員会においてプロトコルの修正を検討し、合意の得られた修正プロトコルを次の Phase 試験プロトコルとして採用した。

C. 研究結果

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 Edge 効果の確認

各試験施設結果を下表に示す。プレート内の変動係数は 10% 以下であることが確認され、全施設において明白な Edge 効果はないものと結論された。

参加 5 施設の Edge 効果指標

	KANEKA	KFDA	OTSUKA	CERI	VITO
AVG	391839	5978	127916	138496	7.60456
SD	24460	519	10036	7789	0.5
CV (%)	6.2	8.7	7.8	5.6	6.9

1.2 Task-1

Task-1 実験結果の内、国内 3 施設の結果を表 1-3 に示す。

国内 3 施設の結果ではアゴニスト活性測定時の陽性対照物質に対する転写活性化倍率は平均 18.5 (29.0~9.5) であり、4 回までの実験で他の性能標

準も全て満足する結果となった。

一方、海外 2 施設の結果では、KFDA では 5 回の実験で 3 回、性能基準も全て満足する結果が得られたものの、転写活性化倍率の平均が 4.3 (6.0~0.9) が国内ラボの結果に比較して低く、Task-2 実施に備え、実験条件の確認及び転写活性化倍率を上昇させるための施策が必要と判断された (表 1-4)。

また、VITO の Task-1 試験結果では logPC10 や logPC50 に関しては性能基準を満足する結果が得られるものの、KFDA と同様に転写活性化倍率が低く、Fold Induction (FI) や 1+2SDVC_FI 等の指標について満足な結果は得られなかった (表 1-5)。

1.3 Task-2

Task-2 実験は現在、国内 3 施設について実験が終了したが、海外 3 施設では実験条件の確立等に時間を要し未だ完結していない。アンタゴニストアッセイにおける品質評価基準は、昨年度までの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をもとに暫定的に設定されたものであったため、実験の終了した国内 3 施設の結果をもとに施設間のばらつきを考慮した基準値の見直しを行った。

国内 3 施設の結果の総括を表 1-6 に示した。その結果、国内施設の全試行回数 (13 回) の結果から、Fold Induction は平均 10.35 (8.3~16.1)、RTA of lnME2 は平均 159.7% (112.2~193.2)、RTA of 1M OHT は 19.94% (5.4~39.2)、RTA of 100 M Dig. は -10.05 (-13~-5.5) となった。これらの結果から、アンタゴニストアッセイの性能基準について見直しを行った。基準見直しについて運営委員会において承認されたことをうけて、Task-3 試験及び海外施設の Task-2-3 試験は新基準に従って実施することとした (添付資料 2 参照)。

2.1 Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

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

アゴニスト・アンタゴニスト各 8 化合物の Substance solubility の結果は、下記の通りであった。

アゴニスト試料

・	H0001	100mg/ml in DMSO,	1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0002	100mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0003	10mg/ml in DMSO,	0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0004	100mg/ml in DMSO,	1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
アンタゴニスト試料			
・	H0005	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0006	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0007	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0008	200mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

アゴニスト・アンタゴニスト各 8 化合物の Range finder testing の結果は、表 2-2, 2-3 および図 2-3 のとおりであった。また、Comprehensive testing の結果は、表 2-4, 2-5 の通りであった。結果として被検化合物の EC50 (3 回繰返し) の結果は、表 2-6 の通りであった。

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

表 2-7 に Phase II b における Plate の Pass/Fail 判定に用いたクライテリアの基準範囲を示した。アゴニスト・アンタゴニスト各 8 化合物の Substance solubility の結果は、下記の通りであった。

アゴニスト試料

・	H0009	1mg/ml in DMSO,	0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0010	1mg/ml in DMSO,	0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0011	1mg/ml in DMSO,	0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0012	10mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0013	10mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
・	H0014	10mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0015	10mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0016	10mg/ml in DMSO,	0.1mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
アンタゴニスト試料		
・ H0017	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0018	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0019	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0020	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0021	20mg/ml in DMSO,	0.2mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0022	20mg/ml in DMSO,	0.2mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0023	2mg/ml in DMSO,	0.02mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		
・ H0024	20mg/ml in DMSO,	0.2mg/ml
in DMSO/aqueous cell culture media		

アゴニスト・アンタゴニスト各8化合物の Range finder testing の結果は、表 2-8、2-9 および図 2-4、2-5 のとおりであった。また、Comprehensive testing における被検化合物の EC50 (3 回繰返し) の結果は、表 2-10 の通りであった。

2.2 Lumi-cell ER アッセイ日米欧3ラボにおける試験結果の評価

2.2.1 Phase I 試験結果の評価とプロトコールの修正

Phase I 試験の目的は、本測定系を開発した XDS 社における施設内評価により準備された標準プロトコールに従い、各バリデーション参加施設においてはアゴニスト系、アンタゴニスト系の標準物質およびコントロールの測定をそれぞれ10回ずつ行い、施設内、施設間でのばらつきを検討するとともに、次の試験 Phase を実施するための経歴データベースを構築することであった。米国 (XDS 社)、欧州 (ECVAM)、日本 (日吉) の3施設では、それぞれ別のプレートにより、10、18、10 回のアゴニスト測定および15、18、12回の

アンタゴニスト測定を実施した。各施設ごとのアゴニスト系の評価基準項目の経時変化を図 2-6 に、アンタゴニスト系の評価基準項目の経時変化を図 2-7 に示した。いずれの施設においても、測定値の経時変化の傾きは大きくはないことから、アゴニスト、アンタゴニストいずれの系において施設内での変動は大きくはないことが示された。一方、施設間比較においては、Phase II における品質評価基準となる複数の項目で統計的に有意な差が認められた。図 2-8 に、評価基準値の施設間での ANOVA および Newman-Keuls 解析結果を示した。このことから本評価系においては、各施設ごとの経歴データベースから施設ごとに評価基準値を設定することが妥当であると結論された。Phase I 試験によって得られた、各施設の評価基準値を図 2-9 に示した。Phase II a においては、プロトコールに従い、各施設ごとの基準値により測定結果の採用、不採用の判定を行うこととなった。

Phase I 試験では、あわせて実施したエッジ効果についての検討結果からエッジ効果は認められなかったことから、Phase II 試験では 96 穴全てを用いるプレートフォーマットに変更になった。また、ビスフェノール A を用いて行った細胞毒性の目視判定の施設間比較結果から、細胞毒性の評価は、初期プロトコールに記載の Cell TiterGlo (Promega 製) を用いる方法ではなく、目視判定による方法に変更することが、運営委員会で合意された。

2.2.2 Phase II a 試験結果の評価とプロトコールの修正

Phase II a 試験では、Phase I で構築した施設ごとの経歴データベースからの評価基準値および修正されたプロトコールに従い、コード化された化合物の測定を行い施設間での化合物評価の再現性を評価することを目的として、アゴニストおよびアンタゴニスト測定用として各4化合物がコード化されて各施設に送付された。それぞれ、ICCVAM のデータベースにおいて強い陽性、弱い陽性および陰性の化合物を含む。各施設では、プロトコールに従い、溶解度試験、濃度設定試験を実施し、本測定では、最終的に評価基準を満たす測定結果を、各化合物について3測定以上実施して化合物活性についての判定結果を比較した。各施設におい

て基準を満たしたアゴニスト測定、アンタゴニスト測定結果からの化合物活性の判定結果を図 2-10 に示した。アゴニスト測定においては、ICCVAM のデータベースで陰性の 1 化合物について、1 施設で陽性判定となったのを除いて全ての施設で同じ判定結果を得た。一方、アンタゴニスト測定では、2 化合物については全ての施設で ICCVAM データベースの評価と一致する陽性判定を得たが、1 化合物では 1 施設のみ陰性判定となった。また、残りの 1 化合物については ICCVAM データベースでは陰性であるが、今回の試験では 3 施設全てで陽性判定となった。よって 3 施設の比較では、アゴニスト、アンタゴニストそれぞれ 1 化合物の評価結果において施設間差が示されたが、他の 3 化合物では 3 施設の評価は一致することから評価の再現性、安定性が示された。

一方、Phase II a では、プロトコルに従い各施設は Phase I 結果から計算された基準を満たす測定結果が各化合物について 3 測定以上得られるまで測定を繰り返した。しかし、特に海外施設では基準をクリア出来ず不採用となる結果が多く、3 施設合計でアゴニスト、アンタゴニスト測定それぞれ 61% (33/54) および 38% (13/34) の測定が不採用となった。そのため、Phase II b 実施に先立って、測定採用のための評価クライテリアの見直しが必要と判断された。図 2-11 には各施設で不採用となった測定数およびその原因について示した。不採用となった原因の解析結果から、アゴニスト測定においては、E2 EC50 値をクライテリアからはずして、methoxychlor コントロール値の基準幅を広げ、アンタゴニスト測定においては、Ral/E2 IC50 値をクライテリアからはずして、flavone/E2 コントロール値の基準幅を広げ、それぞれの系において標準化合物カーブがシグモイド曲線になっていることを評価基準として新たに加える変更が提案された。新たなクライテリアを採用した場合の、Phase II a において不採用となるデータの割合は、3 施設合計でアゴニスト測定 20% (54/11)、アンタゴニスト測定 5% (5/34) となる。結果採用基準変更の提案は、運営委員会で承認され (LUMI-CELL ER Assay Validation Study Design Work Plan Amendment #4 参照) Phase II b における各施設の測定結果採用基準値は図 2-12 のとおりとなった。

2.2.3 Phase II b 試験結果の評価

Phase II b 試験では、新たにアゴニスト、アンタゴニスト測定用として各 8 化合物がコード化されて各施設に配布され、Phase II a と同様に各化合物について 3 測定以上の採用基準を満たす測定結果を得て化合物活性についての各施設における評価判定結果について検討した。Phase II a で採用基準の見直しを行った結果、Phase II b における不採用データの割合は 3 施設合計で、アゴニスト測定 16% (7/45) およびアンタゴニスト測定 14% (6/44) であった。3 施設における化合物活性判定結果の比較をアゴニスト測定について図 2-13 に、アンタゴニスト測定について図 2-14 に示した。アゴニスト測定においては、1 施設 (ECVAM) で 2 化合物について他の施設および ICCVAM データベースと一致しない判定結果となった。それ以外の化合物では判定結果は一致した。また、いずれのラボでも各化合物の 3 測定の判定結果は、ほぼ一致した。一方、アンタゴニスト測定結果においては、各施設内における 3 測定の結果はほぼ一致するものの、ほとんど全ての化合物で 3 施設の判定結果が一致しなかった。

D. 考察

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 (HeLa 法) および欧米で開発された Lumi-cell を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーション研究を実施した。

HeLa 法では、すでにテストガイドライン化が進行している HeLa-9903 細胞を用いる ER レポーター遺伝子アッセイのアゴニスト系試験に加え、アンタゴニストアッセイ系をガイドラインに加えるべく、本年度より施設間バリデーションを開始した。研究は Task-1 から Task-3 まで段階的に実施することとなった。Task-1 は既存のアゴニスト系ガイドラインの性能基準を満たすことを条件とし、すべての参加施設が基準を満たす結果の取得に成功したものの、国内施設に比較し、海外施設の Fold Induction が低値傾向であった。そこで、各施設の使用するルミノメーターの機種について

ヒアリングを行った結果、VITO では Luminoskan Ascent (Labsystems)、KFDA では Victor3 (PerkinElmer) を使用しており、いずれも国内 3 施設の使用する機器 (TopCount NXT (PerkinElmer) 等) と比較すると感度の劣る機器であった。そこで、これらの施設に対して、感度の高い上位機種を試すこと等の指示を行った。

Task-2 は昨年度の施設内試験結果をもとに設定した暫定性能基準を基に実験を行い、本年度の国内 3 施設の結果から、新性能基準を設定することが出来た。しかし、海外施設においては、Task1 と同様に①陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値、②細胞の活性低下という不具合が報告された。①の陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値に関しては、上述のとおり測定機器の感度の問題が疑われたが、KFDA 及び VITO 共に機種変更による劇的な改善はみられず、不具合の原因として他の要因が考えられた。各施設からのヒアリングにより、各施設で作製して使用する培地に起因する問題 (障害物質のコンタミ等)、使用する実験器具 (ピペット、ディッシュ類)、細胞の継代方法 (フラスコによる継代とディッシュによる継代の違い) などが挙げられた。そこで、リードラボにて培地 (血清不含) 及び実験器具類を各施設に供給し、各施設において検討を実施した結果、両施設ともある程度の改善が認められ、培地或いは培地調製に用いる水に起因する障害要因が示唆された。培地に用いる水は限外濾過膜による精製処理を行ったものを使用するが、原料となる水はその施設の所在地によって条件が異なることが考えられる。そこで、培地調製に用いる水の要因を除外するため、海外施設でも入手可能な市販の実験用培養用水 (SIGMA, Water sterile-filtered, cell culture tested Cat. No. W3500-1L) の使用をリードラボにおいて検討した結果、良好な成績が得られた。現在、海外施設においては、各施設で新たに入手した細胞を用いて、培養液を実験用培養用水にて調整し、再現性について検討を行っている。今後、Task-1、Task-2 で結果明らかとなった海外施設における問題の原因を精査し、解決に取り組むと共に本研究の結果をガイドライン化のためのバリデーション報告書・及びガイドライン案の作成に活用していくことが望まれる。

LumiCell 法については、バリデーション計画の

うち昨年度実施した Phase I に続き Phase II a、Phase II b を実施した。Phase II a では、各施設は Phase I 結果から計算された基準を満たす測定結果が各化合物について 3 測定以上得られるまで測定を繰り返した。しかし、特に海外施設では基準をクリア出来ず不採用となる結果が多く、測定採用のための評価クライテリアの見直しが必要となった。国内施設における測定でも、アゴニスト測定において 2 プレーットの再測定を実施したが、うち 1 測定は、プロトコールの確認不足により被験物質の希釈率を間違えたためであり、品質基準を満たさないため不採用となった結果は、1 測定のみであった。化合物の活性評価結果については、アゴニスト、アンタゴニストともに 4 化合物中 1 化合物で施設によって異なる判定となるものがあったが、その他の化合物についての判定は一致したことから、運営委員会において Phase II b の実施が承認された。

Phase II b 実施に先立って、Phase II a の結果をうけて不採用データを減らすため判定基準の見直し (一部項目の削除) を行った。これにより Phase II b 全体の不採用率は低下した。しかし、国内施設では、アゴニスト試験で 16 試験中 4 試験が、アンタゴニスト試験において、14 試験中 2 試験が Criteria に入らなかったため、Fail 判定となった。主な原因は、DMSO Control 及び一部の well における過剰な活性を引き起こした為の Criteria 判定以上の数値を示すことに原因があり、アゴニスト試験では、DMSO Control 過剰に伴い、E2 Reference Standard EC50 / Induction の Fail 判定や Methoxchlor Control 過剰の Fail 判定、アンタゴニスト試験では、Ral/E2 Reference Standard IC50 の Fail 判定であった。一方、参加 3 施設における化合物活性の評価結果は、アゴニスト測定を行った 8 化合物では施設間ではほぼ一致したが、アンタゴニスト測定を行った 8 化合物については、ほとんどの化合物で 3 施設の判定が一致せず、Phase III に先立って不一致の原因を明らかにするとともに施設間再現性を確保するための検討が必要と考えられた。

その他、国内施設における測定において問題となった事項として、現在のプロトコールでは細胞の継代数 50 代程度までが使用期限となっているが、25 代程度までの継代数の少ない細胞を使用を行う

ことで、突発的な活性などを極力軽減させてばらつきを無くすことが必要である。また、アッセイデータでのCriteriaが施設ごとの個別の指標であり、さらに測定を行うたびに再計算することになっており変動してしまい煩雑であるとともに、一般に測定数が増えれば基準幅は狭くなるため測定を行うことに基準が厳しくなる傾向にある。今後、出来れば全ての施設で共通の基準値の設定を検討することが必要であると考えられた。さらに、検量線及び被検液のComprehensive testingの際、一部S.D.の高いものが見受けられたが、これに関しても採用基準の設定が必要と考えられた。

E. 結論

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ジェン受容体 α (ER α)に対するレポーターアッセイ (HeLa法) によるアンタゴニスト測定法および欧米で開発されたLumi-cell法を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施した。HeLa法では、既にほぼガイドライン化されているアゴニスト測定においては、全ての参加施設が評価基準を満たすデータの取得に成功したものの、アンタゴニスト測定においては欧州、韓国のラボで評価基準を満たす測定結果を取得することが出来ず、その原因特定のため当初の計画より予定が遅れた。一方、LumiCell法についても当初の評価基準では、特に欧州の施設で非常に多くのデータが不採用となったため、やはり計画に比べ予定は大幅に遅れた。評価クライテリアの変更を行い、不採用データの割合は減ったものの、Phase II bにおけるアンタゴニスト測定においてはコード化された8化合物のほとんどについて評価判定結果が参加3施設で一致せず、プロトコル上の問題点が示唆された。

いずれの系においてもアンタゴニスト測定系は、アゴニスト測定系に比べ複雑であることから施設の技術的習熟度が要求される。本研究において明らかとなったそれぞれの評価系の問題点を明らかにすることは、これらのスクリーニング系を国際的に認められる評価法としてガイドライン化するにあたり、非常に重要な知見を提供するもので

あり、今後、プロトコールについて更なる検討を行い、いずれの施設においても再現性の高い結果を得られる手法を早期に確立しガイドライン化の提案を行うことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tice, RR., Deal, F., Ceger, P., Allen, D., Gordon, J., DeLange, J., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Stokes, W., "Establishing a Historical Database for a Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method." Society of Toxicology 48th Annual meeting (Baltimore, USA), 2009. 3.

G. 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

添付資料1 Protocols of Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA) Assay Using hER α -HeLa-9903 Cell line for Detecting Anti-estrogenic Activities of Chemicals -For Multi-laboratory Validation Study-

添付資料2 HeLa ATG Validation Study - Test Plate Quality Criteria and Assay Performance Criteria

添付資料3 内分泌かく乱物質スクリーニング HeLa レポーター遺伝子アッセイのバリデーション研究

添付資料4 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 II)

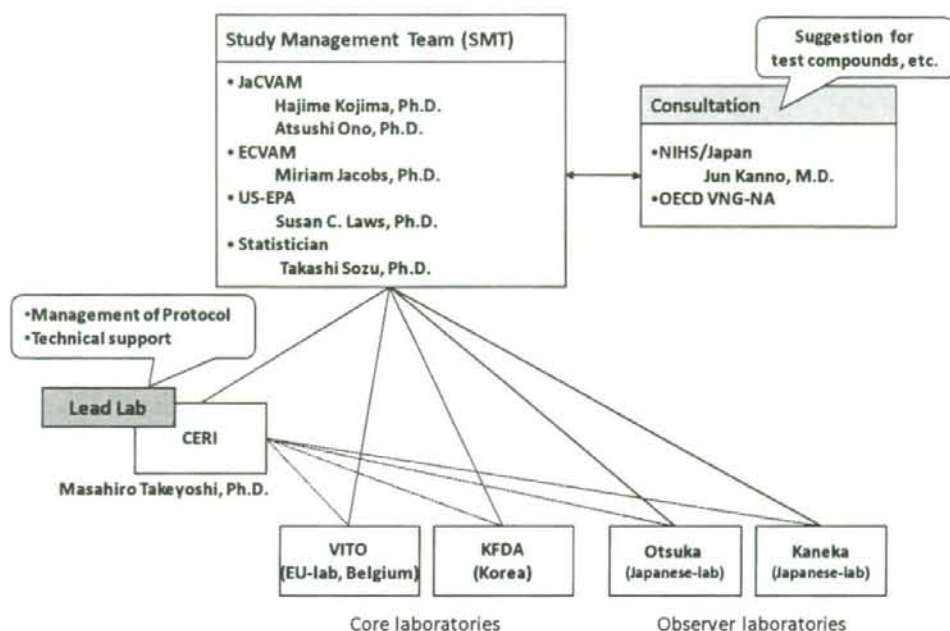


図 1-1 HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション組織の概略

Tasks	Purpose	Note
Start chemical distribution from JaCVAM.		
Start cell culturing at each lab and prepare cell stocks.		
Task-1	Confirm the edge effects (establish the plate layout)	no edge effects → use 96-well edge effects are expected → not use edge wells
	Confirm if the test system is properly setup and the participating lab can provide the basic assay performance.	Test un-coded 3-4 chemicals in "Agonist" Assay.
Task-2	Confirm lab performance for "Antagonist" (ATG) assay (including range finding test, cytotoxicity (cytotox.) test)	Test un-coded 4 chemicals in "Antagonist" Assay.
Task-3	Test coded chemicals	• Test "anti-estrogenic" activities of coded 12 chemicals.

図 1-2 HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション計画の概略

Quality Controls

Fold-induction of Positive Control (1 nM of E2) [=(AVG of PC)/(AVG of VC)]	>=4
10% fold-induction of 1 nM E2	> 1 ± 2SD of fold-induction of VC
CV of the raw data triplicates (i.e. luminescence intensity) of the data points that are used for the calculation of PC10	within 20%

Performance Standard

	log [PC50 (M)]	log [PC10 (M)]	log [EC50 (M)]	Hill Slope
17beta-Estradiol	-11.4 ~ -10.1	<-11	-11.3 ~ -10.1	0.7 ~ 1.5
17alpha-Estradiol	-9.6 ~ -8.1	-10.7 ~ -9.3	-9.6 ~ -8.4	0.9 ~ 2.0
Corticosterone	-	-	-	-

表 1-1 HeLa アゴニスト測定法の性能基準

Quality Controls

Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2)	> 6
RTA of 1 nM E2	> 100%
RTA of 1 μM OHT	< 16.9%
RTA of 100 μM Digitonin (cytotox. control).	< 0%

RTA: Relative transcriptional Activation to 25 pM E2

Performance Standard

	log [lin.IC30]	log [lin.IC50]	log [IC50]
4-Hydroxytamoxifen	-9.86 ~ -8.76	-9.79 ~ -8.28	-9.15 ~ -8.94
Tamoxifen	-7.88 ~ -6.99	-7.48 ~ -6.50	-7.17 ~ -6.77
RU-486	-6.20 ~ -5.32	-5.70 ~ -5.09	-6.22 ~ -5.32
Negative	-	-	-

表 1-2 HeLa アンタゴニスト測定法の暫定性能基準

		CERI			KANEKA			OTSUKA			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	4
Fold Induction		21.96	20.96	23.81	11.57	10.74	12.81	29.02	23.15	21.63	9.55
1+2SD VC_FI		1.65	1.27	1.29	1.52	1.50	1.18	1.21	1.06	1.24	1.37
10%PC-FI		3.10	3.00	3.28	2.06	1.97	2.18	3.80	3.21	3.06	1.85
E2(1)	logPC10	-12.70	-12.67	-12.52	-13.42	-13.34	-12.13	-12.84	-12.47	-12.83	-11.91
	logPC50	-11.10	-11.03	-11.05	-11.23	-11.26	-10.72	-11.40	-10.71	-11.01	-10.71
E2(2)	logPC10	-12.63	-12.67	-12.49	-12.48	-12.33	-11.98	-12.87	-12.42	-12.58	-12.30
	logPC50	-11.13	-11.01	-10.85	-11.29	-11.24	-10.75	-11.35	-10.77	-10.98	-10.69
aE2	logPC10	-10.28	-10.42	-10.02	-10.41	-10.44	-10.04	-10.58	-10.28	-9.98	-9.88
	logPC50	-8.95	-8.91	-8.84	-9.20	-9.25	-8.94	-9.38	-8.85	-8.80	-8.70
Corticosterone	logPC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	logPC50	-	-	-	-6.4334	-6.5296	-	-	-	-	-

表 1-3A 国内 3 施設の Task1 結果

		AVG	MAX	MIN
Fold Induction		18.5	29.0	9.5
1+2SDVC_FI		1.3	1.7	1.1
10%PC-FI		2.8	3.8	1.9
E2(1)	logPC10	-12.7	-11.9	-13.4
	logPC50	-11.0	-10.7	-11.4
E2(2)	logPC10	-12.5	-12.0	-12.9
	logPC50	-11.0	-10.7	-11.4
aE2	logPC10	-10.2	-9.9	-10.6
	logPC50	-9.0	-8.7	-9.4
Corticosterone	logPC10	0.0	0.0	0.0
	logPC50	-6.5	-6.4	-6.5

表 1-3B 国内 3 施設の Task1 結果

		AVG	MAX	MIN
Fold Induction		4.3	6.0	0.9
1+2SDVC_FI		1.44	1.99	1.20
10%PC-FI		1.33	1.50	0.99
E2(1)	logPC10	-12.12	-11.88	-12.60
	logPC50	-10.81	-10.66	-11.01
E2(2)	logPC10	-12.38	-11.91	-13.37
	logPC50	-10.84	-10.51	-11.16
aE2	logPC10	-10.13	-9.92	-10.36
	logPC50	-9.37	-8.40	-11.91
Cor	logPC10	-	-9.8854	-9.8854
	logPC50	-	0	0

表 1-4 KFDA の Task1 結果

		AVG	MAX	MIN
Fold Induction (FI)		2.8	3.0	2.7
1+2SDVC_FI		1.24	1.31	1.20
10%PC-FI		1.18	1.20	1.17
E2(1)	logPC10	-11.63	-11.47	-11.79
	logPC50	-10.52	-10.37	-10.69
E2(2)	logPC10	-11.89	-11.79	-12.02
	logPC50	-10.61	-10.48	-10.74
aE2	logPC10	-9.97	-9.66	-10.37
	logPC50	-8.65	-8.61	-8.71
Cor	logPC10	-	0	0
	logPC50	-	0	0

表 1-5 VITO の Task1 結果

	Old	New	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD
Fold-induction of Spike-in Control (25 µM of E2)	> 6	>= 4	6.0 ~ 14.7	4.9 ~ 15.8	3.9 ~ 16.8
			7.5 ~ 12.8	6.8 ~ 13.4	6.2 ~ 14.1
RTA of 1 nM E2	> 100%	>= 100%	114.9 ~ 204.5	103.7 ~ 215.7	92.5 ~ 226.9
			130.4 ~ 185.5	123.6 ~ 192.3	116.7 ~ 199.2
RTA of 1 µM OHT	< 16.9%	=< 39.4%	0.5 ~ 39.4	-4.4 ~ 44.3	-9.3 ~ 49.1
			-0.2 ~ 38.7	-5.0 ~ 43.6	-9.9 ~ 48.4
RTA of 100 µM Dig.	< 0%	=< 0%	-14.2 ~ -5.9	-15.2 ~ -4.8	-16.3 ~ -3.8
			-13.8 ~ -6.9	-14.6 ~ -6.1	-15.5 ~ -5.2

	Old	New	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD	
OHT	log [lin. IC30]	-9.86 ~ -8.76	-9.62 ~ -8.73	-9.73 ~ -8.62	-9.84 ~ -8.51	
			-9.50 ~ -8.83	-9.58 ~ -8.75	-9.66 ~ -8.67	
	log [lin. IC50]	-9.79 ~ -8.28	-9.46 ~ -8.16	-9.46 ~ -8.16	-9.62 ~ -8.00	-9.79 ~ -7.83
			-9.39 ~ -8.21	-9.54 ~ -8.07	-9.68 ~ -7.92	
	log [var. IC50]	-9.15 ~ -8.94	-9.32 ~ -8.20	-9.32 ~ -8.20	-9.47 ~ -8.06	-9.61 ~ -7.91
			-9.32 ~ -8.18	-9.46 ~ -8.04	-9.60 ~ -7.90	
TAM	log [lin. IC30]	-7.88 ~ -6.99	-7.55 ~ -6.84	-7.55 ~ -6.84	-7.64 ~ -6.75	-7.73 ~ -6.66
			-7.29 ~ -7.10	-7.31 ~ -7.08	-7.34 ~ -7.05	
	log [lin. IC50]	-7.48 ~ -6.50	-7.08 ~ -6.26	-7.08 ~ -6.26	-7.19 ~ -6.15	-7.29 ~ -6.05
			-6.93 ~ -6.41	-7.00 ~ -6.35	-7.06 ~ -6.28	
	log [var. IC50]	-7.17 ~ -6.77	-7.02 ~ -6.32	-7.02 ~ -6.32	-7.11 ~ -6.23	-7.20 ~ -6.14
			-6.93 ~ -6.41	-6.99 ~ -6.35	-7.05 ~ -6.28	
RU486	log [lin. IC30]	-6.20 ~ -5.32	-6.18 ~ -5.41	-6.18 ~ -5.41	-6.27 ~ -5.32	-6.37 ~ -5.22
			-6.11 ~ -5.47	-6.19 ~ -5.39	-6.27 ~ -5.31	
	log [lin. IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08	-5.61 ~ -5.08	-5.68 ~ -5.01	-5.74 ~ -4.95
			-5.56 ~ -5.11	-5.62 ~ -5.05	-5.67 ~ -4.99	
	log [var. IC50]	-6.22 ~ -5.32	-5.56 ~ -4.86	-5.56 ~ -4.86	-5.64 ~ -4.78	-5.73 ~ -4.69
			-5.44 ~ -4.95	-5.50 ~ -4.89	-5.56 ~ -4.83	
Corticosterone	log [lin. IC30]	-	-	-	-	
	log [lin. IC50]	-	-	-	-	
	log [var. IC50]	-	-	-	-	

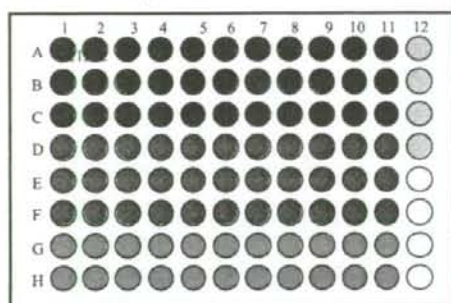
表 1-6 国内 3 施設における Task2 試験結果における性能評価基準値の範囲



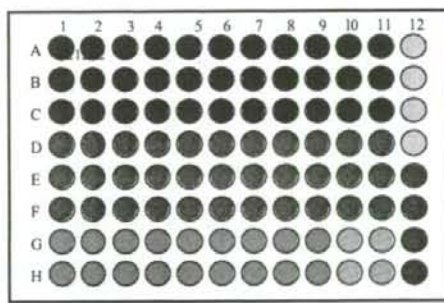
アゴニスト試験	ST#1~#11(#9除)	17 β -estradiol	10ng/ml	
	SA	各試料	-	
	ポジロン	Methoxychlor	313 mg/ml	
アンタゴニスト試験	ネガロン	DMSO	-	同量の17 β -estradiol 5ng/mlで混合
	ST#1~#9	Raloxifene	2.5 μ g/ml	
	SA	各試料	-	
	ポジロン1	Flavone	5mg/ml	
	ポジロン2	17 β -estradiol	2.5ng/ml	
ネガロン	DMSO	-	-	

・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)

図 2-1 Lumi-Cell ER アッセイの操作フロー



- 11 Point Duplicate E2 Reference Standard
- DMSO (Solvent Control)
- Test Substance #1
- Test Substance #2
- Methoxychlor Control



- 9 Point Duplicate Ral/E2 Reference Standard
- DMSO (Solvent Control)
- Test Substance #1
- Test Substance #2
- E2 Control
- Flavone Control

図 2-2 Comprehensive testing;96 穴プレートレイアウト
左図:アゴニスト試験 右図:アンタゴニスト試験

表 2-1 Phase II a におけるプレート Pass/Fail の判定 Criteria 一覧

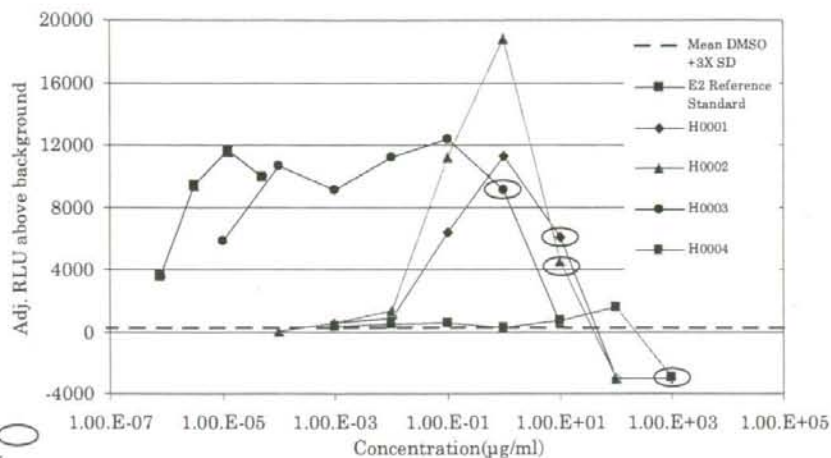
Agonist	Phase II a	Antagonist	Phase II a
Methoxychlor Control	6843~8990	Flavone\E2 Control	(-)1050~4202
E2 Reference Standard EC50	1.1E ⁶ ~5.1E ⁶	E2 Control	2830~9001
DMSO Control	256~7756	Ral\E2 Reference Standard IC50	3.2E ⁴ ~9.6E ⁴
Induction	>3times	DMSO Control	583~7513
		Reduction	>3times

表 2-2 Phase II a アゴニスト試料における Range finding testing

Experiments: Phase II a Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AgRF 1	H0001	12 Apr. 08	3.4	Used	Acceptable
	H0002	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0003	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0004	12 Apr. 08		Used	Acceptable

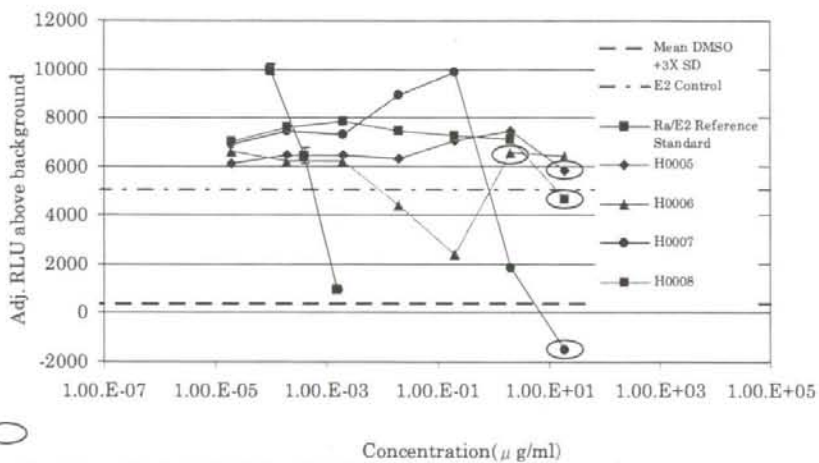
表 2-3 Phase II a アンタゴニスト試料における Range finding testing

Experiments: Phase II a Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AntRF 1	H0005	12 Apr. 08	6.9	Used	Acceptable
	H0006	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0007	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0008	12 Apr. 08		Used	Acceptable



○
HC.....
H0003 は、Half-Log dilution

図 2-3A Phase II a Range finder testing (アゴニスト試験) のグラフ



○
HC.....

図 2-3B Phase II a Range finder testing (アンタゴニスト試験) のグラフ

表 2-4 Phase II a Comprehensive testing (アゴニスト試験)の結果一覧

Experiments: Phase IIa Comprehensive Testing; Agonist						
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Reduction	IC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
CT 1	H0001	22-Apr-08	3.1	0.090 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.058 ³	Used	Acceptable
CT 2.1	H0003	22-Apr-08	3.7	NA	Repeated	Dilution ratio mistake
	H0004			NA	Repeated	NG ¹
CT 2.2	H0003	01-May-08	4.3	NA	Repeated	NG ¹
CT 3	H0001	01-May-08	4.1	0.095 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.059 ³	Used	Acceptable
CT 4	H0003	01-May-08	3.9	8.6E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Negative	Used	Acceptable
CT 5	H0001	16-May-08	4.1	NA	Repeated	Range over the Methoxychlor
	H0002			NA		
CT 6	H0003	16-May-08	4.1	3.6E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Positive ⁴	Used	Acceptable
CT 7	H0003	31-May-08	3.7	4.0E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Negative	Used	Acceptable
CT 8	H0001	20-Jun-08	4.7	0.086 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.057 ³	Used	Acceptable

NA = Not applicable, EC₅₀ values are not calculated for substances tested on plates not meeting acceptance criteria.

¹ The reason for NG is because we set a principle to use same plate for H0003 and H0004. Hence, if either of these does not exist; the data will not be accepted.

² Well was accidentally exchanged for the controls but due to the historical records we could confirm the data and thus replace it in the right place, hence the data was accepted.

³ Deleted some points for calculating EC₅₀. The deleted points are shown in Figure 7.

⁴ Positive at $6.25 \times 10^{+1}$ and $3.13 \times 10^{+1}$ µg/mL

表 2-5 Phase II a Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) の結果一覧

Experiments: Phase IIa Comprehensive Testing:Antagonist						
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Reduction	IC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
CT 1	H0005	25-Apr-08	7.5	Negative ⁷	Used ¹	Acceptable
	H0006			Positive ^{2,7}	Used ¹	Acceptable
CT 2	H0007	25-Apr-08	10	0.53	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable
CT 3	H0005	09-May-08	12	Positive ^{4,7}	Used	Acceptable
	H0006			Positive ^{5,7}	Used	Acceptable
CT 4	H0007	09-May-08	13	0.40	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable
CT 5	H0005	21-May-08	8.5	Positive ^{3,7}	Used	Acceptable
	H0006			Positive ^{6,7}	Used	Acceptable
CT 6	H0007	21-May-08	8.2	0.75	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable

¹Well was accidentally exchanged for the controls but due to the historical records we could confirm the data and thus replace it in the right place, hence the data was accepted.

²Positive for antagonism at 2.5×10^{-1} , 1.25×10^{-1} , 6.25×10^{-2} , 3.13×10^{-2} and 1.56×10^{-2} µg/mL

³Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+1}$ and $5.0 \times 10^{+0}$ µg/mL

⁴Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+1}$ µg/mL

⁵Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+0}$ to 7.81×10^{-3} µg/mL and at 1.95×10^{-3} µg/mL

⁶Positive for antagonism at 5.0×10^{-1} and 1.56×10^{-2} µg/mL

⁷Deleted some points for calculating EC₅₀. The deleted points are shown in Figure 7.

表 2-6 Phase II a 被検化合物の EC₅₀ (3 回繰返し) 結果一覧

Code	1st.	2nd.	3rd.	Ave.	S.D.	C.V.
H0001	0.090	0.095	0.086	0.090	0.0043	4.7
H0002	0.058	0.059	0.057	0.058	0.0012	2.1
H0003	8.5E-06	3.6E-06	4.0E-06	5.4E-06	2.8E-06	52
H0004	negative	positive	negative	-	-	-
H0005	negative	positive	positive	-	-	-
H0006	positive	positive	positive	-	-	-
H0007	0.53	0.40	0.75	0.56	0.18	32
H0008	positive	positive	positive	-	-	-

表 2-7 Phase II b におけるプレート Pass/Fail の判定 Criteria 一覧

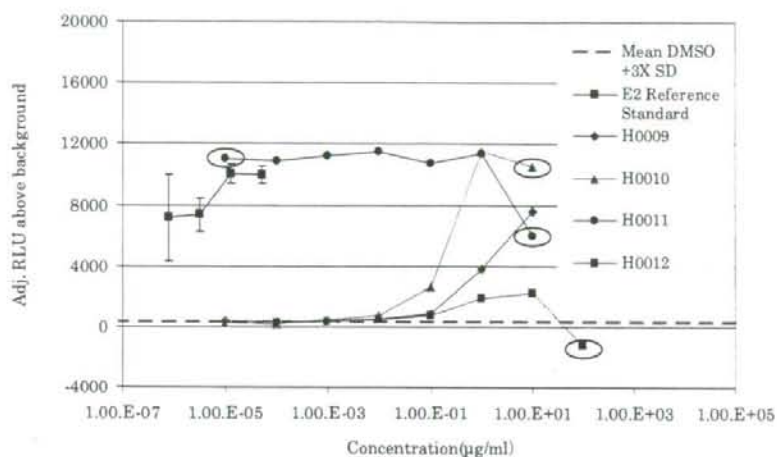
Agonist	Phase II a	Phase II b
Methoxychlor Control	6843~8990	6881~9347
E2 Reference Standard EC50	1.1E ⁻⁶ ~5.1E ⁻⁶	7.1E ⁻⁷ ~4.7E ⁻⁶
DMSO Control	256~7756	428~8119
Induction	>3times	
Antagonist	Phase II a	Phase II b
Flavone\E2 Control	(-)1050~4202	(-)1283-3716
E2 Control	2830~9001	3333~8399
Ral\E2 Reference Standard IC50	3.2E ⁻⁴ ~9.6E ⁻⁴	2.9E ⁻⁴ ~9.8E ⁻⁴
DMSO Control	583~7513	428~8119
Reduction	>3times	

表 2-8 Phase II b アゴニスト試料における Range finding testing

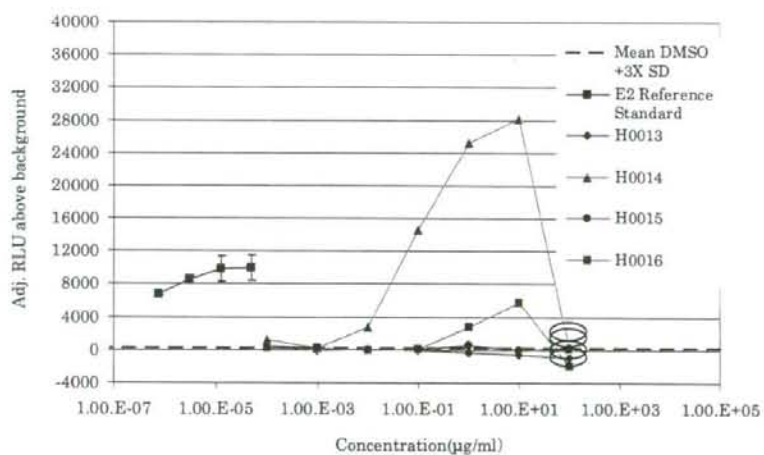
Experiments: Phase IIb Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AgRF 1	H0009	23 Sep. 08	8.3	Used	Acceptable
	H0010	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0011	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0012	23 Sep. 08		Used	Acceptable
AgRF 2	H0013	23 Sep. 08	5.9	Used	Acceptable
	H0014	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0015	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0016	23 Sep. 08		Used	Acceptable

表 2-9 Phase II b アゴニスト試料における Range finding testing

Experiments: Phase IIb Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AntRF 1	H0017	23 Sep. 08	8.7	Used	Acceptable
	H0018	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0019	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0020	23 Sep. 08		Used	Acceptable
AntRF 2	H0021	23 Sep. 08	8.4	Used	Acceptable
	H0022	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0023	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0024	23 Sep. 08		Used	Acceptable

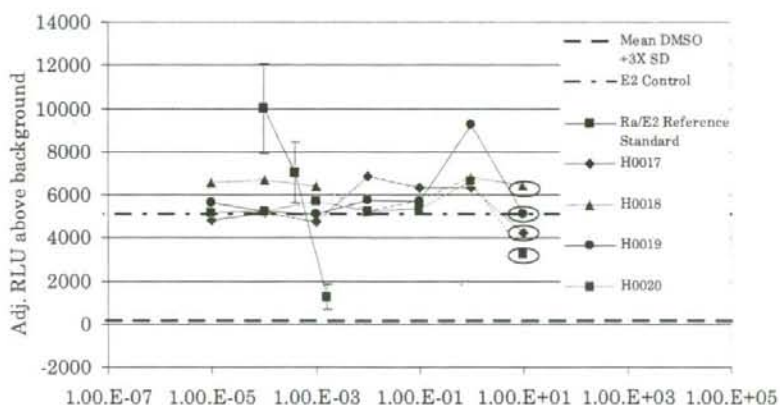


H0009, H0010, H0011, H0012 is Half-Log serial dilution

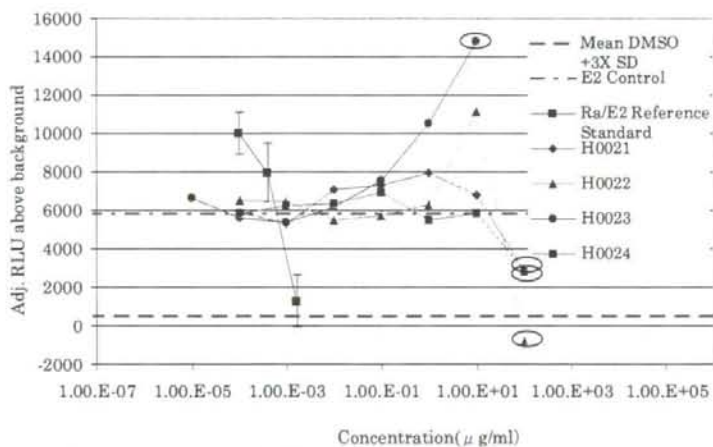


H0013, H0015, H0016 is Double serial dilution
 H0014 is Half-Log serial dilution

図 2-4 Phase II b Range finder testing (アゴニスト試験) のグラフ



Starting Concentration used for Comprehensive testing
 H0017~H0020 is Double serial dilution concentration(μ g/ml)



Starting concentration used for Comprehensive testing
 H0021~H0024 is Double serial dilution

図 2-5 Phase II b Range finding testing(アンタゴニスト試験)のグラフ