

## 6.3.6. Chemical Exposure to Cells

- (1) Mix well the medium in the deep-well plate.

**Note: Confirm that the chemicals in DCC-FBS-EMEM have not precipitated. If precipitation is observed, it must be recorded.**

- (2) Add 50  $\mu$ L of the medium solution to both plates for antagonist and cytotoxicity assays prepared in "6.1." in triplicate.
- (3) Record if there is precipitation or not in wells by visually comparing the spike-in control wells in the cytotoxicity assay plate using a microscope.

(The plate for cytotoxicity assay has a clear bottom to allow this observation.)

- (4) Incubate for 20-24 hr in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

**Note: The same medium dilution should be used to prepare the plate for cytotoxicity testing.**

|   | Chem.-A            |   |   | Chem.-B            |   |   | Chem.-C            |   |   | Chem.-D            |    |    |
|---|--------------------|---|---|--------------------|---|---|--------------------|---|---|--------------------|----|----|
|   | 1                  | 2 | 3 | 4                  | 5 | 6 | 7                  | 8 | 9 | 10                 | 11 | 12 |
| A | 10 <sup>-3</sup> M | → | → | 10 <sup>-3</sup> M | → | → | 10 <sup>-2</sup> M | → | → | 10 <sup>-3</sup> M | →  | →  |
| B | 10 <sup>-4</sup> M | → | → | 10 <sup>-4</sup> M | → | → | 10 <sup>-4</sup> M | → | → | 10 <sup>-4</sup> M | →  | →  |
| C | 10 <sup>-5</sup> M | → | → | 10 <sup>-5</sup> M | → | → | 10 <sup>-5</sup> M | → | → | 10 <sup>-5</sup> M | →  | →  |
| D | 10 <sup>-6</sup> M | → | → | 10 <sup>-6</sup> M | → | → | 10 <sup>-6</sup> M | → | → | 10 <sup>-6</sup> M | →  | →  |
| E | 10 <sup>-7</sup> M | → | → | 10 <sup>-7</sup> M | → | → | 10 <sup>-7</sup> M | → | → | 10 <sup>-7</sup> M | →  | →  |
| F | 10 <sup>-8</sup> M | → | → | 10 <sup>-8</sup> M | → | → | 10 <sup>-8</sup> M | → | → | 10 <sup>-8</sup> M | →  | →  |
| G | 0.1%<br>DMSO       | → | → | 0.1%<br>DMSO       | → | → | 1 $\mu$ M<br>OHT   | → | → | 100 $\mu$ M<br>Dig | →  | →  |
| H | 0.1%<br>DMSO       | → | → | 0.1%<br>DMSO       | → | → | 1 nM of<br>E2      | → | → | 1 nM of<br>E2      | →  | →  |

**Fig. 7 Assay plate layout for estrogenic assay**

Medium to be added: 10% DCC-FBS-EMEM containing 75 pM E2 (=  $7.5 \times 10^{-11}$ M), resulting in a final concentration of 25pM E2.

Medium to be added: 10% DCC-FBS-EMEM containing 0.3 % DMSO, resulting in a final DMSO concentration of 0.2%.

#### 6.4. LUCIFERASE ASSAY

After 20-24 hr incubation, luciferase activity can be measured with the luciferase assay reagent and a luminometer in accordance with the manufacturer's instructions.

If Steady-Glo Luciferase Assay System is used, the following procedure can be used to minimize the use of substrate solution.

- (1) Newly prepare or thaw the substrate solution
- (2) Mix 3 mL of the substrate solution and 3 mL of PBS (+) in a (for 1-plate use) in a reagent tray.
- (3) Remove all the exposure medium.
- (4) Add 50  $\mu$ L of substrate solution with PBS (+) using a multi-channel pipettor.
- (5) Leave the plate for 10-min at room temperature in dark area to protect it from light.
- (6) Read plates on a Chemiluminescence plate reader.

#### 6.5. CYTOTOXICITY (CELL VIABILITY) ASSAY USING CELL COUNTING KIT-8 (CCK-8)

After 20-24 hr incubation, cell viability can be measured with CCK-8 assay kit.

- (1) Mix 16.5 mL of 10% DCC-FBS-EMEM and 880  $\mu$ L of CCK-8 reagent in a reagent tray (for one plate) [CCK-8 solution].

*Note: CCK-8 solution should be prepared for each plate since this solution will increase in colour as time advances.*

- (2) Remove exposure medium.
- (3) Add 100  $\mu$ L of PBS (-) to each well and remove it to wash cells.
- (4) Add 150  $\mu$ L of CCK-8 solution to each well.
- (5) Incubate for 90-min in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.
- (6) Measure the absorbance at 450 nm using a microplate reader.

## 7. DATA ANALYSIS

### 7.1. DATA ANALYSIS FOR ESTROGENIC AND ANTI-ESTROGENIC ASSAYS

Using the spreadsheet provided, PC10 and PC50 for estrogenic assay and linIC30 and linIC50 for anti-estrogenic assay should be calculated. Additionally EC50 and IC50 for estrogenic and anti-estrogenic assays, respectively, should be calculated with the appropriate nonlinear curve-fitting software (GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) is recommended.) using the following Hill's logistic equation;

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogE}(\text{IC}50 - X) * \text{HillSlope}))})$$

\* Where X is the logarithm of concentration, Y is the response and Y starts at the Bottom and goes to the Top with a sigmoid shape.

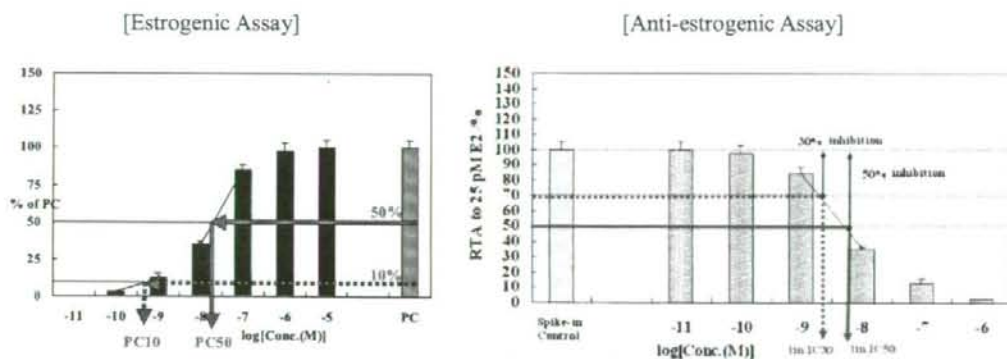


Fig. 8 Description of PC10, PC50 lin IC30 and IC50

### 7.2. CYTOTOXICITY DATA

In the cytotoxicity test, if the cell viability is less than 80%, the test chemical is cytotoxic at "that" test concentration and such data for evaluating anti-estrogenic assay should be omitted for the calculations of lin.IC30, lin.IC50 or IC50.

Cell viability should be calculated as below;

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{[(\text{Abs}_{.450} \text{ of test well}) - (\text{Mean of Abs}_{.450} \text{ of cytotox. control})]}{[(\text{Mean of Abs}_{.450} \text{ of VC}) - (\text{Mean of Abs}_{.450} \text{ of cytotox. control})]} \times 100$$

### 7.3. PERFORMANCE CRITERIA

In order to guarantee the assay performance, the performance criteria provided in this section should be fulfilled.

#### 7.3.1. Performance Criteria For Estrogenic Assay for Test System Setup (for Task-1)

Before entering task-2 testing, all laboratories should demonstrate the following performance criteria (Table 2) by using the qualified data that meets the quality criteria in

Table 3 to confirm whether the test system is correctly set up at each laboratory.

**Table 2 Performance Criteria for agonistic assay (Acceptable range of reference chemicals)**

|                    | Log[EC50]     | Log[PC50]     | Log[PC10]    | Hill slope |
|--------------------|---------------|---------------|--------------|------------|
| 17β-Estradiol (E2) | -11.3 ~ -10.1 | -11.4 ~ -10.1 | <-11         | 0.7 ~ 1.5  |
| 17α-Estradiol      | -9.6 ~ -8.4   | -9.6 ~ -8.1   | -10.7 ~ -9.3 | 0.9 ~ 2.0  |
| Corticosterone     | -             | -             | -            |            |

**Table 3 Quality Criteria for each plate for agonistic assay (control chemical)**

|  |   |
|--|---|
| Fold-induction <sup>*1</sup> of 1 nM of E2 | > = 4   |
| 10% fold-induction of 1 nM E2              | > 1 ± 2SD of fold-induction of vehicle control<br>(Mean luminescence intensity of 1 nM of E2) |
| *1: Fold-induction =                       | (Mean luminescence intensity of vehicle control)  |

### 7.3.2. Performance Criteria For Anti-estrogenic Assay (for Task-2 and Task-3)

Criteria for each plate with control chemicals (Table 4) and criteria for reference chemicals (Table 5) should be fulfilled.

**IMPORTANT NOTE: The final criteria may be modified during the study.**

**Table 4 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay**

|  |          |
|--|----------|
| Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) <sup>*1</sup> | >= 4     |
| RTA <sup>*2</sup> of 1 nM E2                                   | >= 100%  |
| RTA of 1 μM OHT  | =< 39.4% |
| RTA of 100 μM Dig.   | =< 0%    |

\*1: Fold-induction of Spike-in Control =  $\frac{(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$

\*2: Relative Transcriptional Activation (RTA) =  $\frac{[(\text{luminescence intensity of a well}) - (\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})]}{[(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control}) - (\text{Mean of luminescence intensity of vehicle control})]}$

**Table 5 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals)**

|           | log [lin.IC30] | log [lin.IC50] | log [var.IC50] |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| OHT       | -9.62 ~ -8.73  | -9.46 ~ -8.16  | -9.32 ~ -8.20  |
| TAM       | -7.55 ~ -6.84  | -7.08 ~ -6.26  | -7.02 ~ -6.32  |
| RU486     | -6.18 ~ -5.41  | -5.61 ~ -5.08  | -5.53 ~ -4.86  |
| Flutamide | -              | -              | -              |

#: Reference chemicals should be tested in at least one run in each experiment (conducted under the same conditions including the materials, source of cells (passage), and technicians).

## Appendix-1

### Preparation of Serum treated with Dextran Coated Charcoal (DCC)

The treatment of serum with Dextran-coated charcoal (DCC) is a generally used methodology for the removal of estrogenic compounds from serum. It is added to the cell medium in order to exclude the biased response associated with residual estrogens in serum.

The following materials and equipments will be required;

#### Materials

- Activated charcoal (Sigma, Catalog# C9157)
- Dextran (MW 64,000~76,000, Sigma, Catalog# D4751)
- Magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Wako, Catalog# 135-00165,  $\geq 98\%$  or its equivalent)

Prepare 1 M  $\text{MgCl}_2$  aq. by dissolving 20.3 g of  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 100 mL of Milli-Q and filtering it with sterile filter.

- Sucrose (Wako, Catalog# 196-00015 or its equivalent)
- 1 M HEPES buffer solution (pH 7.4) (Gibco, Catalog# 15630)
- Ultrapure water produced from a filter system

#### Equipment

- Autoclaved glass container (size should be adjusted as appropriate)
- General Laboratory Centrifuge (that can set temperature at 4°C.)

The following procedure is adjusted for the use of 50 mL centrifuge tubes.

[Day-1] Prepare 1 litre of dextran coated charcoal suspension by adding the following reagents in the autoclaved glass container and stir it at 4°C, overnight.

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| • 1 M $\text{MgCl}_2$ aq. | 1.5 mL |
| • Sucrose                 | 85.5 g |
| • Activated charcoal      | 2.5 g  |
| • Dextrane                | 0.25 g |
| • 1 M HEPES               | 5 mL   |

[Day-2] Dispense the suspension in 50 mL centrifuge tubes and centrifuge at 10,000 rpm at 4°C for 10 minutes. Remove the supernatant and store half of the charcoal sediment at 4°C for the use on Day-3. Suspend the other half of the charcoal with fetal bovine serum (FBS) that is thawed at 42°C and left for 30 minutes at 56°C for heat inactivation, and transfer into the autoclaved glass container such as an Erlenmeyer flask. Stir this suspension gently at 4°C, overnight.

[Day-3] Dispense the suspension with FBS into centrifuge tubes for centrifugation at 10,000 rpm at 4°C for 10 minutes. Collect FBS and transfer into the new charcoal sediment prepared and stored on Day-2. Suspend the charcoal sediment and stir this suspension gently at 4°C, overnight.

[Day-4] Dispense the suspension for centrifugation at 10,000 rpm at 4°C for 10 minutes and sterilise the supernatant by filtration through 0.22 µm sterile filter. This DCC treated FBS should be stored at -20°C.

## HeLa ATG Validation Study

### Test Plate Quality Criteria and Assay Performance Criteria

#### Amendment:

Reason: The prior criteria were provisionally defined based solely upon the preliminary assay data from the lead laboratory (CERI), and it was expected that these might need minor modification following data analyses from the participating laboratories.

This amendment modifies the Quality Criteria and the Performance Criteria for the HeLa ATG assay based on the Task2 results from three Japanese laboratories. These modifications were agreed upon with the biostatistician at the data analysis meeting of HeLa ATG validation study held on 15 Dec 2008 at CERI.

#### Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay:

The newly defined quality criteria and background calculated data are shown in Table 1. Modified sections are indicated in red characters.

# Detailed individual data were shown in Appendix. Table 1 ~4.

Table 1. Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

|  | Prior   | New            | mean±2SD      | mean±2.5SD    | mean±3SD     |
|--|---------|----------------|---------------|---------------|--------------|
| Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) | > 6     | ≥ 4            | 6.0 ~ 14.7    | 4.9 ~ 15.8    | 3.9 ~ 16.8   |
|  |         | (>6 recommend) | 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 |
| 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 |

RTA : Relative transcriptional activation

#### Rationale for definition of Quality Criteria:

##### Fold induction:

While all data from three Japanese laboratories met the prior provisional criteria, two additional laboratories have so far had difficulty in achieving >6 fold induction (FI).

This suggests that the prior provisional criteria may be too stringent, and that for practical reasons the range could be extended a little, whilst also maintaining adequate performance, thereby accommodating all participating laboratories. It is expected that sufficient performance will be achieved if the FI is ≥4, based upon the experience of the lead laboratory with the agonist assay (the FI Criteria of the agonist assay is ≥4).



However, it is still recommended that the FI >6 remains as the preferred FI recommended value to obtain optimal results

RTA of 1  $\mu$ M OHT:

One laboratory (Kaneka) could not meet this criteria within five assay runs (see Appendix Table 3). However, their data was reproducible and concordant results (i.e. IC30, IC50) were observed for the reference chemicals. We therefore concluded that this was inter-laboratory variation. New criteria was defined by mean+2SD (39.4%) of all data (n=13).

RTA of 1 nM E2 and RTA of 100  $\mu$ M Dig.:

There was no change in prior criteria.

**Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals):**

The newly defined criteria range for reference chemicals are shown in Table 2.

Modifications are indicated in red characters.

# Detailed individual data are shown in Appendix. Table 5 ~7.

Table.2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay

|       |                | Prior         | New           | n* |
|-------|----------------|---------------|---------------|----|
| OHT   | log [lin.IC30] | -9.86 ~ -8.76 | -9.62 ~ -8.73 | 13 |
|       | log [lin.IC50] | -9.79 ~ -8.28 | -9.46 ~ -8.16 | 13 |
|       | log [var.IC50] | -9.15 ~ -8.94 | -9.32 ~ -8.20 | 13 |
| TAM   | log [lin.IC30] | -7.88 ~ -6.99 | -7.55 ~ -6.84 | 13 |
|       | log [lin.IC50] | -7.48 ~ -6.50 | -7.08 ~ -6.26 | 13 |
|       | log [var.IC50] | -7.17 ~ -6.77 | -7.02 ~ -6.32 | 13 |
| RU486 | log [lin.IC30] | -6.20 ~ -5.32 | -6.18 ~ -5.41 | 10 |
|       | log [lin.IC50] | -5.70 ~ -5.09 | -5.61 ~ -5.08 | 10 |
|       | log [var.IC50] | -6.22 ~ -5.32 | -5.53 ~ -4.86 | 10 |

n\*: Number of data used for calculation.

lin.IC30: 30% inhibition concentration by linear fitting.

lin.IC50: 50% inhibition concentration by linear fitting.

var.IC50: 50% inhibition concentration by non-linear fitting to Hill equation using Prism ver.4.

**Rationale for definition of Performance Criteria:**

The criteria ranges are defined based on mean $\pm$ 2SD as calculated from the results obtained from 13 assay runs during Task 2 from three Japanese laboratories (CERI: 5 assays, Otsuka: 3 assays, Kaneka: 5 assays). There were no large differences between the prior provisional range and the newly proposed provisional ranges on each parameter for each compound. For the parameter of RU486, three assay data sets (CERI: #5, Kaneka: #2, #5) were excluded from the calculation due to cytotoxicity, and at the recommendation of the biostatistician (see follows).

**Exclusion of data based upon chemical-induced cytotoxicity:**

The limit for cytotoxicity was set at <20% in the protocol for this STTA. Thus, no data were used for the calculation of the criteria parameters from any chemical concentration for which cell viability was less than 80% (e.g., cell cytotoxicity > 20%). In addition, non-linear curve fitting was not performed in cases where there were no data points were observed for more than 50% inhibition of ER-mediated gene transcriptional activation, after exclusion of the data points for cytotoxicity.

## 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

(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、宮浦英樹

## 1. 緒言

既存および新規化学物質は極めて多くあり、それらの安全性評価を速やかに行う必要がある。しかし、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。本研究では我が国および欧米で開発された安全性試験法の内、化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある方法について、欧米の研究機関と協力して検討し、国際的に受け入れられる方法を確立することを目的として、特に内分泌かく乱性試験法として日本で開発された HeLa 細胞をベースとしたエストロゲン受容体  $\alpha$  に対するレポーターアッセイ試験法について国際バリデーションを実施し、OECD におけるガイドライン化の提案を行うことを目的として、ヒトエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 蛋白を常時発現するためのレセプター発現プラスミドと Firefly Luciferase 遺伝子の上流に ER $\alpha$  に対する応答配列を含むシス領域が組み込まれたレポータープラスミドが同時に且つ安定的に組み込まれたヒト由来 HeLa 細胞による化学物質の抗エストロゲン活性高速スクリーニング試験法の国際バリデーション試験にリードラボとして参加し、プロトコール作成や他の参加機関への技術協力を行うとともにバリデーション測定を実施して得られた結果の取りまとめを行うこととした。

本研究では特に OECD の新テストガイドラインとして仮承認された HeLa 細胞を用いるエストロゲン受容体  $\alpha$  に対するアゴニスト検出系試験のピアレビュー時の指摘事項に従い、アンタゴニスト活性検出系のガイドライン提案のための国際施設間バリデーションの実施と実施に伴う技術支援及び関連作業を実施した。

## 2. 実験材料及び方法

### 2.1. 細胞及び細胞培養に関わる試薬

#### 2.1.1. 細胞

HeLa-9903 (hER $\alpha$ ) 安定形質転換細胞株 (住友化学株式会社) を使用した。

#### 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  $\mu$ 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、本検討で使用した対照物質及び標準物質を表1に示す。

表1 対照物質及び標準物質

| 対照物質及び標準物質                            | CAS No.    | M. W.  |
|---------------------------------------|------------|--------|
| 17 $\beta$ -Estradiol (E2)            | 50-28-2    | 272.4  |
| 17 $\alpha$ -Estradiol ( $\alpha$ E2) | 57-91-0    | 272.4  |
| Corticosterone (Cor)                  | 50-22-6    | 346.5  |
| 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)            | 68047-06-3 | 387.5  |
| Tamoxifen (TAM)                       | 10540-29-1 | 371.5  |
| RU486                                 | 84371-65-3 | 429.6  |
| Digitonin (Dig)                       | 11024-24-1 | 1229.3 |

### 2.2.2. 溶媒対照 (VC; Vehicle Control)

溶媒対照として dimethyl sulfoxide を使用した。

### 2.2.3. 陽性対照

アゴニスト活性の陽性対照として 1nM の E2、アンタゴニスト活性評価の陽性対照として、25 pM の E2 のエストロゲン活性を完全に抑制する 1  $\mu$ M の 4-OHT 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 を設定した。

### 2.2.5. 細胞毒性評価用の陽性対照

DMSO に 100  $\mu$ M の Digitonin (Dig、和光純薬) を細胞毒性評価の陽性対照として設定した。

### 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 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、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。使用時には、必要量を解凍し  $0.3\text{ mM}$  の  $\text{MgCl}_2$  を含む PBS と 1:1 で混和し、Luciferase Assay Reagent として使用した。

## 2.5. 実験の実施体制

### 2.5.1. 実験参加施設

下記の国内 3 施設、国外 2 施設による施設間バリデーション研究を実施した。

施設 1 : 株式会社カネカテクノロジー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 manager 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

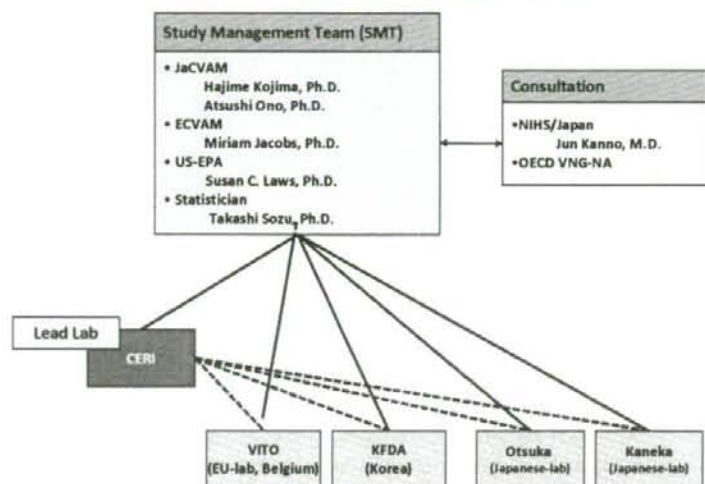
### 2.5.2. Study Management Team (SMT) 及び実施体制の概要

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。

## バリデーション試験実施組織



### 3. レポーター遺伝子アッセイの基本的な手技

#### 3.1. 操作手順

レポーター遺伝子アッセイは以下の手順に従って実施した。

詳細は試験計画書参照(添付資料1)

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  $\mu$ L/well)

↓

CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L/well で添加

↓

CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L/well)

↓

10 分間室温で静置

↓

ルミノメータによる発光測定

### 3.2. 実験設計

バリデーション研究は Task-1 から Task-3 の 3 段階に分割して実施し、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。また、供試化学物質は JaCVAM より、同一のものが配布された。

#### 3.2.1. 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（ $17\beta$ -Estradiol、 $17\alpha$ -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 1 nM 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（ $17\beta$ -Estradiol、 $17\alpha$ -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 2）が定められているため、Task-1 実験は図 1 のプレートレイアウトに従って実験を行い、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。

図 1 Task-1 実験におけるプレートレイアウト

|   | E2                     |   |   | E2                  |   |   | ・E2                        |   |   | Corticosterone      |    |    |
|---|------------------------|---|---|---------------------|---|---|----------------------------|---|---|---------------------|----|----|
|   | 1                      | 2 | 3 | 4                   | 5 | 6 | 7                          | 8 | 9 | 10                  | 11 | 12 |
| A | 10 <sup>-8</sup> M     |   |   | 10 <sup>-8</sup> M  |   |   | 10 <sup>-6</sup> M         |   |   | 10 <sup>-4</sup> M  |    |    |
| B | 10 <sup>-9</sup> M     |   |   | 10 <sup>-9</sup> M  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M         |   |   | 10 <sup>-5</sup> M  |    |    |
| C | 10 <sup>-10</sup> M    |   |   | 10 <sup>-10</sup> M |   |   | 10 <sup>-8</sup> M         |   |   | 10 <sup>-6</sup> M  |    |    |
| D | 10 <sup>-11</sup> M    |   |   | 10 <sup>-11</sup> M |   |   | 10 <sup>-9</sup> M         |   |   | 10 <sup>-7</sup> M  |    |    |
| E | 10 <sup>-12</sup> M    |   |   | 10 <sup>-12</sup> M |   |   | 10 <sup>-10</sup> M        |   |   | 10 <sup>-8</sup> M  |    |    |
| F | 10 <sup>-13</sup> M    |   |   | 10 <sup>-13</sup> M |   |   | 10 <sup>-11</sup> M        |   |   | 10 <sup>-9</sup> M  |    |    |
| D | 10 <sup>-14</sup> M    |   |   | 10 <sup>-14</sup> M |   |   | 10 <sup>-12</sup> M        |   |   | 10 <sup>-10</sup> M |    |    |
| H | Vehicle Control (DMSO) |   |   |                     |   |   | Positive Control (1 nM E2) |   |   |                     |    |    |

表2-1 Performance Criteria for agonistic assay (標準物質の許容値)

|                    | Log [EC50]    | Log [PC50]    | Log [PC10]   | Hill slope |
|--------------------|---------------|---------------|--------------|------------|
| 17β-Estradiol (E2) | -11.3 ~ -10.1 | -11.4 ~ -10.1 | <-11         | 0.7 ~ 1.5  |
| 17α-Estradiol      | -9.6 ~ -8.4   | -9.6 ~ -8.1   | -10.7 ~ -9.3 | 0.9 ~ 2.0  |
| Corticosterone     | -             | -             | -            |            |

表2-2 Quality Criteria for each plate for agonistic assay (control chemical)

|  |  |
|--|--|
| Fold-induction <sup>†1</sup> of 1 nM of E2 | >= 4   |
| 10% fold-induction of 1 nM E2              | > 1 ± 2SD of fold-induction of vehicle control |

$$^{\dagger 1}: \text{Fold-induction} = \frac{(\text{Mean luminescence intensity of 1 nM of E2})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$$

### 3.2.2. 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)、陽性対照及びスパイク用物質として17β-Estradiol (E2)、細胞毒性用陽性対照物質としてDigitonin (Dig)を用い、下記のプレートレイアウトに従って実験を行った。実験は最大5回までの実験を実施し、性能基準(表4)を満たす実験が3回となった時点でTask-2終了とした。

表3 Task-2 実験におけるプレートレイアウト

|   | OHT                            |   |   | TAM                            |   |   | RU486                          |   |   | Corticosterone                 |    |    |
|---|--------------------------------|---|---|--------------------------------|---|---|--------------------------------|---|---|--------------------------------|----|----|
|   | 1                              | 2 | 3 | 4                              | 5 | 6 | 7                              | 8 | 9 | 10                             | 11 | 12 |
| A | 10 <sup>-7</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-5</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-8</sup> M + 25 pM E2  |    |    |
| B | 10 <sup>-8</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-8</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-6</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-9</sup> M + 25 pM E2  |    |    |
| C | 10 <sup>-9</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-9</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-7</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-10</sup> M + 25 pM E2 |    |    |
| D | 10 <sup>-10</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-10</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-8</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-11</sup> M + 25 pM E2 |    |    |
| E | 10 <sup>-11</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-11</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-9</sup> M + 25 pM E2  |   |   | 10 <sup>-12</sup> M + 25 pM E2 |    |    |
| F | 10 <sup>-12</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-12</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-10</sup> M + 25 pM E2 |   |   | 10 <sup>-13</sup> 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                        |   |   |                                |    |    |

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。

表4-1 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

|  |         |
|--|---------|
| Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) <sup>*1</sup> | > 6     |
| RTA <sup>*2</sup> of 1 nM E2                                   | > 100%  |
| RTA of 1 μM OHT  | < 16.9% |
| RTA of 100 μM Dig.   | < 0%    |

$$*1: \text{Fold-induction of Spike-in Control} = \frac{(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$$

$$[(\text{luminescence intensity of a well}) - (\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})]$$

$$*2: \text{Relative Transcriptional Activation (RTA)} = \frac{[(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control}) - (\text{Mean of luminescence intensity of vehicle control})]}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$$

表4-2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (標準物質の許容値)

|                | log [lin. IC30] | log [lin. IC50] | log [var. IC50] |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| OHT            | -9.86 ~ -8.76   | -9.79 ~ -8.28   | -9.15 ~ -8.94   |
| TAM            | -7.88 ~ -6.99   | -7.48 ~ -6.50   | -7.17 ~ -6.77   |
| RU486          | -6.20 ~ -5.32   | -5.70 ~ -5.09   | -6.22 ~ -5.32   |
| Corticosterone | -               | -               | -               |

#### 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。IC<sub>50</sub> 値の算出には GraphPad Prism<sup>®</sup> Ver. 4 (GraphPad Software 社) を用いた。また、エラー! 参照元が見つかりません。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。

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

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. 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。

表 5 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     |

### 5.2. Task-1

Task-1 実験結果の内、国内 3 施設の結果を表 6 に示す。

表 6-1 国内 3 施設の Task-1 実験結果

|                |         | 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 | -12.63 | -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6-2 国内3施設のTask-1実験結果

|                |         | 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  |

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、性能標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7)。

表7 KFDAのTask-1実験結果

|                |         | 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       |

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8 VITO の Task-1 実験結果

|                     |         | 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      |

国内施設に比較し、海外施設の FI が低値傾向にあることについて、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。

### 5.3. 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。そこで実験の終了した国内 3 施設の結果から表 4 に示したアンタゴニスト試験用性能基準の見直しを行った。

国内 3 施設の結果を表 9 及び付表 1 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 1nM E2 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、表 4 に示した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い、新基準 (表 10) を設定した。これに伴い、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。