

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ー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や化合物供給を、JaCVAMで実施し、国内外合計5施設からの結果をもとに最終的な評価を行うこととした。

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ロジー環境分析部  
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  
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

バリデーション組織の概略図を図 1-1 に示した。

## 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(添付資料 1)に従い実施した。バリデーション研究は Task1 から Task3 までの 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。

## 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(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 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。

## 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 17 $\beta$ -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、リードラボにおける施設内試験により設定した性能基準(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。Task-2 実験の結果を基にアンタゴニスト実験の暫定性能基準 (Performance standard) の見直し実施した。

### B-3. Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

#### 1) 試験施設

バリデーション測定は、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) Lumi-cell ER アッセイ法のフロー

Lumi-cell アッセイの測定フロー及び試薬については、Lumi-cell ER アッセイのバリデーションプロトコール(添付資料 2)に従って行った。試験に用いる標準、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。

#### 3) Lumi-cell ER の国際バリデーション Phase I

下記に示すアゴニスト及びアンタゴニストの標準及びコントロール化合物についての試験を 10 回繰り返し実施して、Lumi-cell ER アッセイの技術習熟を図り、Phase II における品質評価基準設定のための経歴データベースを構築した。また各参加施設より得られた結果からラボ内・ラボ間の再現性を検討した。

##### アゴニスト試料

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

##### アンタゴニスト試料

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

#### 4) Lumi-cell ER アッセイで用いる細胞毒性試験法に関する追加試験

Lumi-cell ER アッセイにおける細胞毒性評価法の検討のため、Bisphenol-A を用いて実際にアッセイを行い、Visual observation (目視検査) 及び Cell TiterGloR で細胞毒性の評価を実施して再現性や施設間の結果のばらつきについて検討した。

#### 5) Lumi-cell ER の国際バリデーション 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 II a 実施に当たっては、Phase I の結果から以下について変更された。

##### a) Criteria について

Phase I で構築された経歴データベースからの値をもとに設定された。

##### b) 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 穴全てを用いるレイアウトに変更された。

##### c) Cell viability について

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 Visual observation 法のみを実施することとなった。

また、本測定 (Comprehensive testing) に先立って、プロトコールに従い被験物質の溶解性試験および Range finding testing を実施して本試験における濃度設定を行うこととなった。

#### 6) Lumi-cell ER の国際バリデーション 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 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。Phase II b における評価クライテリアは、Phase I 及びPhase II a の結果を踏まえて変更された。

#### **B-4. Lumi-cell ER アッセイ日米欧3ラボにおける試験結果の評価**

Lumi-cell ER アッセイバリデーションは、米国 ICCVAM、欧州 ECVAM および JaCVAM メンバーから構成される運営委員会のもと日米欧3施設の参加により、Lumi-cell ER アッセイバリデーションプロトコールに従い4Phase からなる試験計画(表 2-1 および添付資料3)により開始した。バリデーション組織の概略図を図 2-3 に示した。本研究では、日本における測定を実施するとともに運営委員会に参加し、3参加施設からの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、測定系の信頼性及び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ールの修正を検討し、合意の得られた修正プロトコールを次の Phase 試験プロトコールとして採用した。

### **C. 研究結果**

#### **C-1. hER $\alpha$ -HeLa-9903 細胞を用いた ER $\alpha$ アンタゴニストアッセイ法の再現性及び妥当性に関する研究**

##### **1) 対照物質 E2 濃度の最適化確認**

E2 濃度を終濃度 10 nM $\sim$ 1 pM の範囲で検討した結果、E2 濃度が低くなるにつれて測定化学物質の IC50 値が低くなる傾向が見られた。結果より、E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジも狭くないと考えられる 60 pM $\sim$ 6 pM の範囲が最適と判断されたことから、E2 自身の応答曲線から算出された EC80 相当の 25 pM を採用した。

##### **3) 再現性の確認**

測定を実施した 4 物質について今回の試験濃度では、Control 細胞に対する細胞毒性は認められなかった。測定値の評価は、ばらつきを正規分布として評価するために Log10[ IC50 (M) ] で評価した。算出された 9 回分の Log10[ IC50 (M) ] 結果の標準偏差(SD)は、0.15 $\sim$ 0.27 となり、変動計数(CV)は、2.6 $\sim$ 3.8%と良好な結果が得られた。

##### **4) 測定系の妥当性評価**

事前スクリーニング以外で既に ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質および ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いて測定を行い、文献での結果と比較した結果、既報文献での結果と本測定系での結果は一致した。

##### **5) アンタゴニストアッセイ法バリデーションのための品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance criteria) 設定のための検討**

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

抗エストロゲン活性評価試験の品質を管理する (QC; Quality Control) ために各試験プレートに設定した各対照区の解析結果を表 1-1 に示す。

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

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

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

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

転写活性化倍率 (fold-induction, FI) は抗エストロゲン活性を測定する上でそのダイナミックレンジ

に影響を与え試験精度を左右する重要な要素であることから抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。本検討で実施した 9 回繰返し測定においては、25 pM の E2 の FI は全て 6 より大きかったことから (表 1-1)、25 pM の E2 の FI の許容値は 6 とした。

### 5.1.3. 抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値

25 pM の E2 が誘導する活性を完全に抑制する対照区として 1 μM の OHT を設定し、9 回の繰返し測定を実施したデータにおいては、RTA は 4.1 ± 4.3% であり、最大でも 8.0% であった。アゴニスト活性における QC を設定する際、背景データの AVG ± 3SD の範囲を使用したことから、1 μM の OHT の抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値は -8.7% ~ 16.9% とし (表 1-1)、これを抗エストロゲン活性評価における QC 項目のひとつとした。

### 5.1.4. 細胞毒性評価用の陽性対照区の許容値

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

以上 5.1.1 ~ 5.1.4 に基づいて表 1-3 に示す抗エストロゲン活性評価試験における各プレートの品質管理基準を設定した。

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

本検討では新たに設定した QC 用対照区を含めて、抗エストロゲン活性が既知の 4 物質 (OHT、ICI、TAM 及び RAL) について抗エストロゲン活性を 10 回の繰返し測定を行った。前述のとおり、n=8 では QC を満たさなかったために AVG 及び SD の算出から除外した。また、測定により得られた lin.IC30、lin.IC50 及び var.IC50 は、ばらつきを正規分布として評価するために対数値として取り扱った。また、n=1 の RAL の測定結果において、lin.IC30 が 2

ポイント算出されたことから試験系の安定性が疑われたため、n=1 のデータを AVG 及び SD の算出から除外した。残りの 8 回の繰返し測定から得られた 4 物質の lin.IC30、lin.IC50 及び var.IC50 の標準偏差 (SD) はそれぞれ、0.14 ~ 0.30、0.07 ~ 0.25 及び 0.04 ~ 0.20 であり、変動係数 (CV) の絶対値はそれぞれ 1.47 ~ 3.01%、1.46 ~ 2.78% 及び 0.40 ~ 2.14% であった。アゴニスト活性における性能基準 (表 1-2) の設定に際しては背景データの AVG ± 3SD の範囲を使用した。そこで、これらの結果および再現性確認試験結果をもとに、表 1-3 に示すアンタゴニスト測定法バリデーション試験で用いる性能基準を設定した。

## C-2. 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) 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

### 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基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)。

### 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 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、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は運営委員会において承認され、Task3 試験及び海外施設の Task2 試験を新基準に従って実施することとした(添付資料 2 参照)。

### C-3. Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

#### 1) Lumi-cell ER の国際バリデーション Phase I

Lumi-cell ER 細胞を用い標準物質を用いたアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性測定を 10 回繰り返し EC50、IC50 等の以降の測定における品質評価基準となる各指標の安定性について検討を行うとともに経歴データベースを作成した。Phase I 測定により得られた評価基準項目の値については、他の参加施設からの結果とともに図 2-5 に示されている。

#### 2) Lumi-cell ER アッセイで用いる細胞毒性試験法に関する追加試験

Visual observation 及び Cell TiterGloR の結果の例を図 2-4 で示す。顕微鏡を使った目視判定による結果(Score)は、Cell TiterGloR を使った Viability(%) の数値とほぼ一致した。

#### 3) Lumi-cell ER の国際バリデーション Phase II a

アゴニスト・アンタゴニスト各 4 化合物の溶解性試験の結果は、下記の通りであった。

	mg/ml in DMSO	mg/ml in DMSO/culture media
H0001	100	1
H0002	100	0.1
H0003	10	0.001

H0004	100	1
H0005	2	0.02
H0006	2	0.02
H0007	2	0.02
H0008	200	0.02

H0001~H0004:アゴニスト被験物質

H0005~H0008:アンタゴニスト被験物質

Phase II a では、Phase I で構築した経歴データベースから求めた評価基準値(図 2-6)を用いて測定結果の採用・不採用の判定を行い、アゴニストアッセイにおいて 1 プレートについては評価基準を満たさず、さらに 1 プレートについて被験物質調整ミスのため合計 2 プレートが再測定となった。アゴニスト・アンタゴニスト各 4 化合物の Comprehensive testing における被検化合物の EC50(3 回繰り返し)の結果は、表 2-2 の通りであった。

#### 4) Lumi-cell ER の国際バリデーション Phase II b

アゴニスト・アンタゴニスト各 8 化合物の溶解性試験の結果は、下記の通りであった。

	mg/ml in DMSO	mg/ml in DMSO/culture media
H0009	1	0.01
H0010	1	0.01
H0011	1	0.01
H0012	10	0.1
H0013	10	0.1
H0014	10	0.1
H0015	10	0.1
H0016	10	0.1
H0017	2	0.02
H0018	2	0.02
H0019	2	0.02
H0020	2	0.02
H0021	20	0.2
H0022	20	0.2
H0023	2	0.02
H0024	20	0.2

H0009~H0016:アゴニスト被験物質

H0017~H0024:アンタゴニスト被験物質

Phase II b では、Phase II a の結果変更された評価項目についての Phase I および II a の経歴データバ

ースから求めた評価基準値(図 2-7)を用いて測定結果の採用・不採用を判定した。しかし、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 試験が評価基準を満たさず再測定を行った。アゴニスト・アンタゴニスト各 8 化合物の Comprehensive testing における被検化合物の EC50 (3 回繰返し)の結果は、表 2-3 の通りであった。

#### C-4. Lumi-cell ER アッセイ日米欧3ラボにおける試験結果の評価

##### 1) Phase I 試験結果の評価とプロトコールの修正

米国(XDS 社)、欧州(ECVAM)、日本(日吉)の3施設において、それぞれ独立した 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の結果から、各施設における評価基準項目の経時変化は小さく、各施設における本測定系の安定性が示された。一方、施設間比較においては、複数の品質評価基準項目で統計的有意差が認められたことから、SMT で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、Phase II 以降の試験における品質評価基準項目となる値の各施設における経時変化を図 2-5 示した。いずれの施設においても施設内変動は少なく測定系としての施設内安定性が示された。一方、施設間比較においては複数の項目で統計的有意差が示された。

Phase I 試験に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ず 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を用いて実施し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、目視判定で行うことが運営委員会にて合意された(添付資料4)。

##### 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、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目的で、アゴニストおよびアンタゴニスト測定用の各 4 化合物がコード化されて各施設に送付された。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。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(表 2-2)。一方、Phase II a において、特に海外施設では品質評価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を実施した。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(添付資料5)。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。この結果、Phase II b における各施設の品質評価基準は、図 2-7 のとおりとなった。

##### 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について検討した。Phase II a で結果採用における品質評価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)に留まった。3 施設における化合物活性判定結果では、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が、それ以外の化合物では判定結果は一致した。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 施設の判定結果は一致しなかった(表 2-3)。

#### 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  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) 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 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 法については、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試験系に加え、アンタゴニスト試験系のガイドライン化に向けた国際バリデーション試験を実施した。バリデーション試験に先立って、プロトコル作成のための基礎検討をリードラボにおいて行い、阻害対照物質として用いる  $17\beta$ -estradiol 濃度を  $25\text{pM}$  に決定した。続いて、ER アンタゴニスト作用の報告されている化合物の繰返し測定により測定された  $\text{IC}_{50}$  値の変動計数(CV)は、 $2.6 \sim 3.8\%$  であり、さらに ER アンタゴニストではないことが報告されている 2 化合物についても既報と一致する結果が得られたことから、検出結果の妥当性及び安定性が確認された。次に、試験結果 QC のための試験プレートの品質管理基準及び性能基準を、抗エストロゲン活性既知の 4 物質を用いた 10 回繰返し測定より得られた  $\text{lin.IC}_{30}$ 、 $\text{lin.IC}_{50}$  及び  $\text{var.IC}_{50}$  の標準偏差 (SD) および変動係数 (CV) をもとに設定した。設定した基準値は、1 施設からのデータを基にしていることからバリデーション試験により検証を行い必要な見直しを実施することが妥当であると考察された。バリデーション試験は、JaCVAM、ECVAM および米国 EPA より構成される運営委員会のもとで日本、欧州、韓国の施設の参加により 3 つの Task について段階的に実施することとなった。Task-1 で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、アゴニスト試験の実施経験のある国内施設に比較し、海外施設では陽性対照物質 E2 での Fold Induction が低値傾向であった。海外施設で使用しているルミノメータの感度が低いことが原因と考えられたため、上位機種での測定を指示したが、あまり改善は認められず別の問題が示唆された。Task-2 では、標準物質を用いてリードラボにおける施設内試験結果から設定された性能基準を基にしたアンタゴニスト測定を実施した。国内 3 施設ではいずれも性能基準を満たす測定結果を得ることが出来たが、海外施設では、Task1 と同様に①陽性対照物質 E2 に対する Fold Induction の低値、②細胞の活性低下という問題が報告され、基準を満たす測定結果を得ることが出来なかった。①の Fold Induction の低値に関しては、上述のとおり機種変更による劇的な改善は認められず、運営委員会における議論から、その他の要因として、培地に起因する問題(障害物質のコンタミ等)、実験器具

(ピペット、ディッシュ類等)、細胞の継代方法などが挙げられたため、リードラボより培地(血清不含有)及び実験器具類を各施設に供給し検討を行った。その結果、培地或いは培地調製に用いる水に起因する問題が示唆された。そこで培地調製に用いる水の要因を除外するため、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ため、現在、海外施設において新たな細胞を入手して追加の検討を行っている。なお、性能基準については、国内 3 施設における Task-2 結果をもとにした見直しを行った。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 法について本研究では、バリデーション計画のうち Phase I、Phase II a および Phase II b まで実施した。また、Phase I に追加して細胞毒性評価法の検討試験を実施した。Phase I では標準物質の 10 回繰返し測定により、各施設における評価基準値設定のための経歴データベースを作成した。Phase I の結果から、評価基準項目の施設間での有意差が示され、可能であれば施設間で共通の基準値を適用可能な評価項目の設定やデータ解析手法の検討が必要であると考察された。あわせて実施した細胞毒性評価法の検討から本バリデーションでは、目視判定による方法を採用することとなったが、細胞毒性の評価は特にアンタゴニスト判定においては重要であることから、目視判定法の妥当性について、以降の Phase の結果からさらに検討が必要であると考えられた。Phase II a では、Phase I の結果から計算された各施設における評価基準を満たす測定結果がアゴニスト・アンタゴニスト各 4 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。化合物の活性評価結果そのものについては、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ったが、その他の化合物についての判定は一致した。しかし、特に海外施設では評価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 プレートの再測定を実施したが、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。Phase II b では、判定基準項目の見直しを行った結果、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試験が基準を満たさず不採用判定となったものの、全施設における不採用率は低下した。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必要が考えられた。原因として濃度設定試験における判断のばらつきによる本試験設定濃度の違いや試薬へのコンタミが考えられ、現在、追加試験の実施を検討している。その他、現在のプロトコ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と考察された。また、アッセイデータの評価基準値が施設ごと経歴データから算出される値を用いており、測定を行うたびに再計算するため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ご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SDの高い結果が見受けられたが、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ゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 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

- 1) WS Stokes, S Bremer, M Jacobs, H Kojima, J Kanno, P Ceger, FH Deal, RR Tice, NICEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method, 46<sup>th</sup> SOT, North Carolina (2007)
- 2) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Ono A., Kojima, H., Ceger, P., Deal F. and Tice, R., NICEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phase International validation study of an *in vitro* estrogen receptor transcriptional activation assay to detect agonist and antagonist activity, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.265, Tokyo (2007)
- 3) 中村 昌文、半田洋士、J.D.Gordon、G.C.Clark、小野敦、小島肇 "LUMI-cell ER アッセイ法の基礎性能及び国際的バリデーション計画について" 第10回環境ホルモン学会研究発表会・国際シンポジウム (埼玉) 2007.12.10-11
- 4) R Tice, F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, J DeLange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes. "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・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 Validation of the lumi-cell® er assay for the detection of estrogen receptor agonists and antagonists study design and work plan.

添付資料4 LUMI-CELL® ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual

添付資料5 LUMI-CELL® ER Assay Validation Study Design Work Plan Amendment #4

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

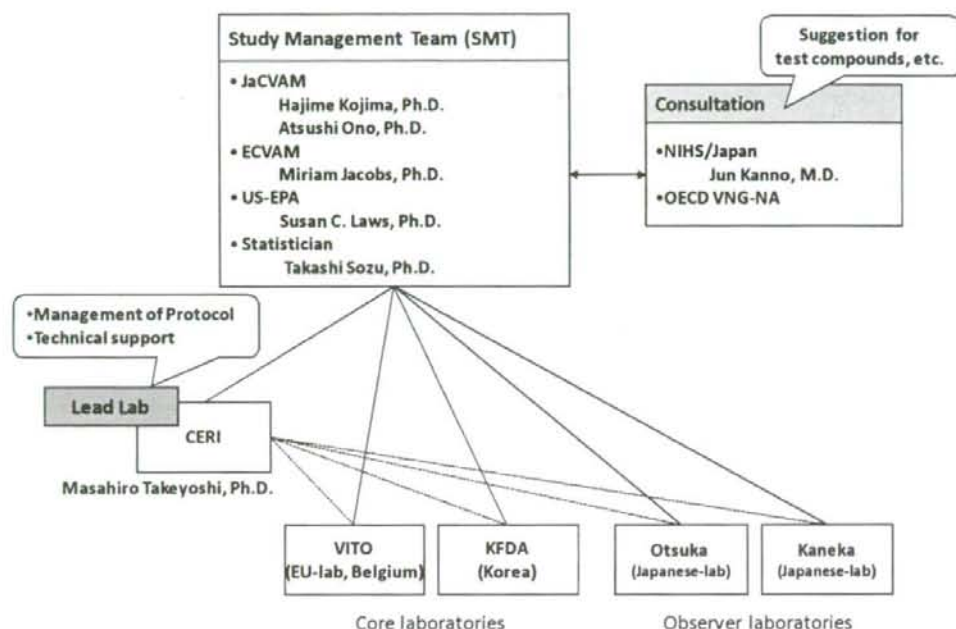


図 1-1 HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション組織の概略

Tasks	Purpose	Note
<b>Start chemical distribution from JaCVAM.</b>		
<b>Start cell culturing at each lab and prepare cell stocks.</b>		
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

	1 nM E2 の RTA (%)	25 pM E2 の Fold-induction	1 μM OHT の RTA (%)	100 μM Dig. の RTA (%)
n-1	143.3	8.3	6.7	-11.3
n-2	159.4	11.9	6.0	-7.5
n-3	134.1	6.3	-2.7	-17.7
n-4	105.9	9.7	9.4	-19.3
n-5	142.6	6.5	-2.1	-16.5
n-6	101.8	9.9	2.2	-9.8
n-7	138.5	11.2	8.0	-8.4
n-8*	(80.7)	(6.0)	(-4.1)	(-18.9)
n-9	143.1	6.9	3.1	-15.6
n-10	144.4	8.1	5.9	-12.6
AVG	134.8	8.8	4.1	-12.2
SD	18.8	2.0	4.3	3.6
3SD	56.5	6.1	12.8	10.9
CV (%)	14.0	23.1	105.0	-29.9
AVG-3SD	78.3	2.7	-8.7	-23.1
AVG+3SD	191.3	14.9	16.9	-1.3

\* QC マライディアを選ばなかったため、AVG, SD, CV の算出において解析データの除外  
 ( ) : AVG, SD, CV の算出において除外したデータ

表 1-1 品質管理基準設定のための施設内検討試験結果

### 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 1-2 HeLa アゴニスト測定法の品質評価基準および性能基準

### 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 1-3 HeLa アンタゴニスト測定法の品質評価基準および性能基準

		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+2SDVC_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	2.16	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	-9.36	-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 pM 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	-9.62 ~ -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	-9.47 ~ -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	-7.64 ~ -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	-7.19 ~ -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	-7.11 ~ -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	-6.27 ~ -5.22	-6.37 ~ -5.22
			-6.11 ~ -5.47	-6.19 ~ -5.39	-6.27 ~ -5.21
	log [lin. IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08	-5.88 ~ -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	-5.64 ~ -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

# Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験



図 2-1 Lumi-Cell ER アッセイの標準操作フロー

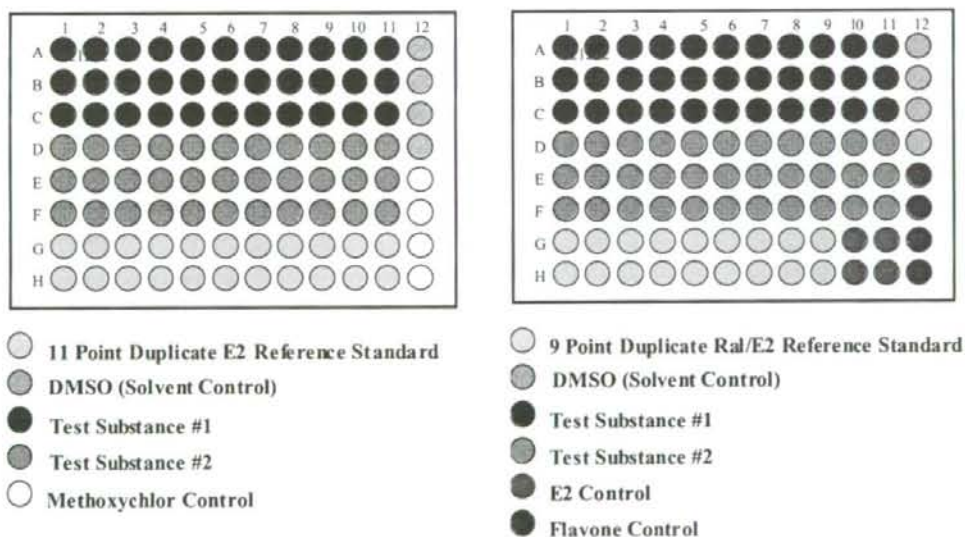
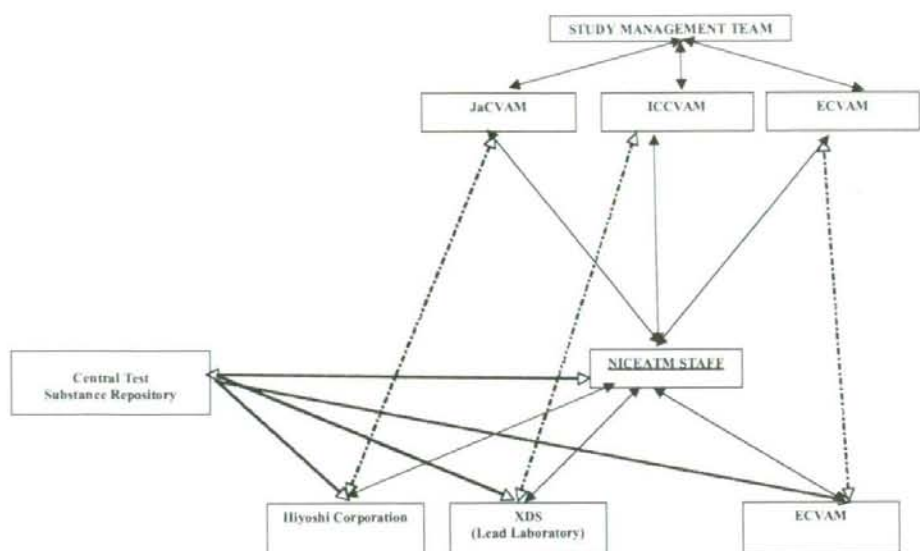


図 2-2 Comprehensive testing; 96 穴プレートレイアウト  
左図; アゴニスト試験 右図; アンタゴニスト試験



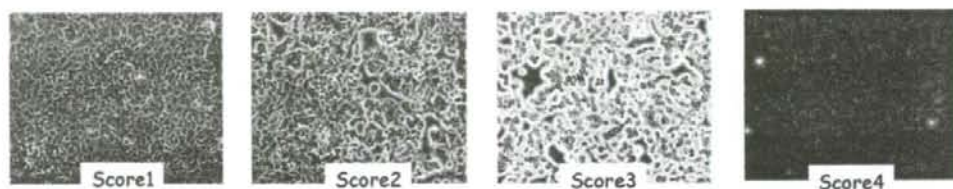
Solid lines indicate direct communication. Dotted lines indicate shipment of test substances. Dashed lines indicate indirect communication (e.g., CC'd e-mails).

図 2-3 Lumi-cell アッセイ国際バリデーション組織図

STUDY PHASE	ACTIVITY
Phase I	Each laboratory conducts multiple testing of reference standards and controls to demonstrate proficiency with agonist and antagonist protocols, establish historical databases to be used to develop acceptability criteria for tests conducted in Phase IIb, and to provide measured for calculated reference standard and control data for an evaluation of intra- and inter-laboratory reproducibility.
Phase IIa	Four substances each from the ICCVAM recommended ER minimum list tested independently by each laboratory three times for agonist and antagonist activity.
Phase IIb	Eight substances each from the ICCVAM recommended ER minimum list tested independently by each laboratory three times for agonist and antagonist activity.
Phase III	Remaining 41 substances from ICCVAM recommended ER minimum list tested once by each laboratory for agonist and antagonist activity.
Phase IV	Remaining 25 substances from ICCVAM recommended ER list tested once each by the lead laboratory only for agonist and antagonist activity.

表 2-1 Lumi-cell アッセイ国際バリデーション計画の概要

Well	Dose	Compound	results	Absolute RLU	Cell TiterGloR		Visual Observation
					% Cell Death	% Viable	Score
D5	DMSO	control	-5000	5000	0.2%	99.8%	1
D6	DMSO	control	35000	35000	1.1%	101.1%	1
D7	DMSO	control	-25000	25000	0.8%	99.2%	1
D8	DMSO	control	-5000	5000	0.2%	99.8%	1
D9	4.00E+07	Bisphenol-A	-2936844	2936844	93.1%	6.9%	4
D10	3.60E+07	Bisphenol-A	-3012886	3012886	95.5%	4.5%	4
D11	3.20E+07	Bisphenol-A	-2859835	2859835	90.6%	9.4%	4
E2	2.80E+07	Bisphenol-A	-2065000	2065000	65.5%	34.5%	4
E3	2.40E+07	Bisphenol-A	-1615000	1615000	51.2%	48.8%	3
E4	2.00E+07	Bisphenol-A	-605000	605000	19.2%	80.8%	2

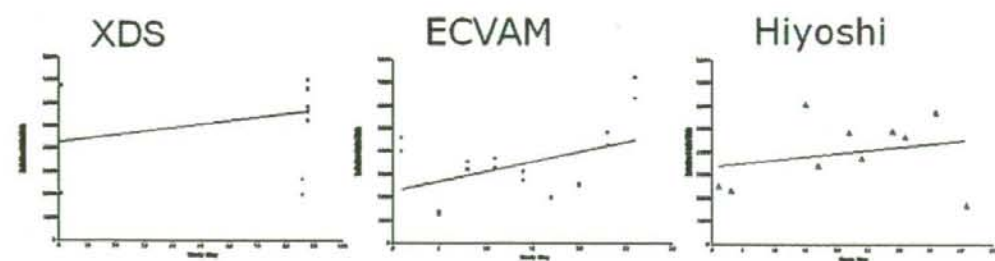


Viability Score	Brief Description
1	Normal Cell Morphology and Cell Density
2	Altered Cell Morphology and/or Small Gaps between Cells
3	Altered Cell Morphology and/or Large Gaps between Cells
4	Few (or no) Visible Cells
P	Wells containing precipitation are to be noted with "P"

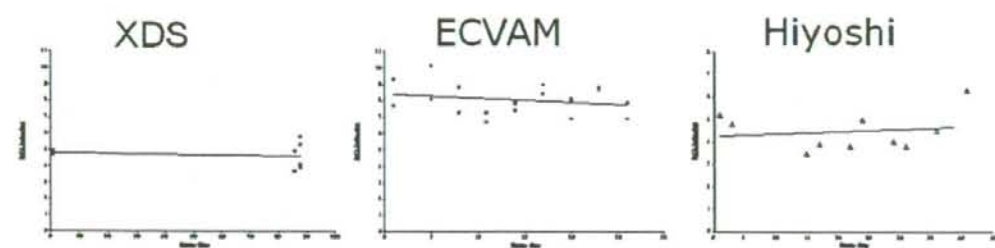
図 2-4 Visual observation による細胞毒性の判定基準と判定結果の例



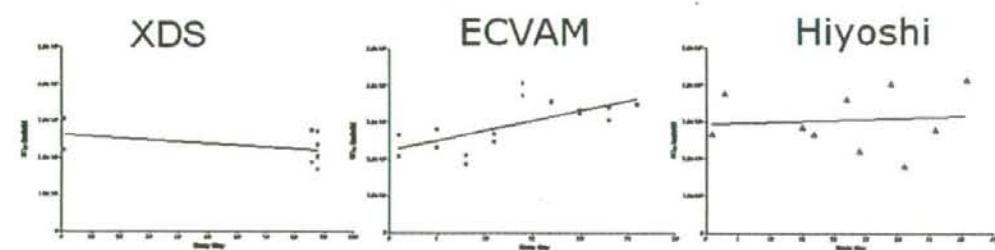
DMSO



E2 Fold-induction



E2 EC50



Methoxychlor control

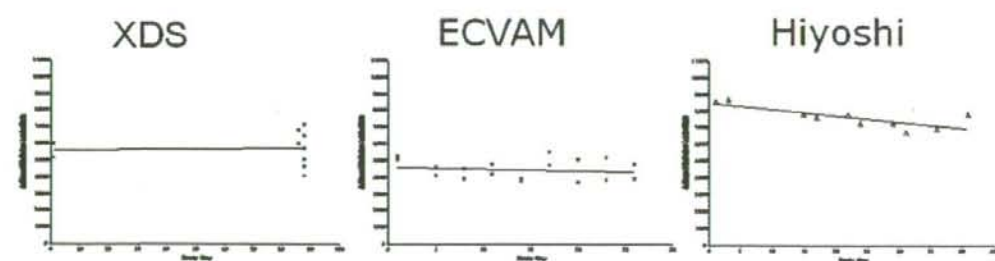
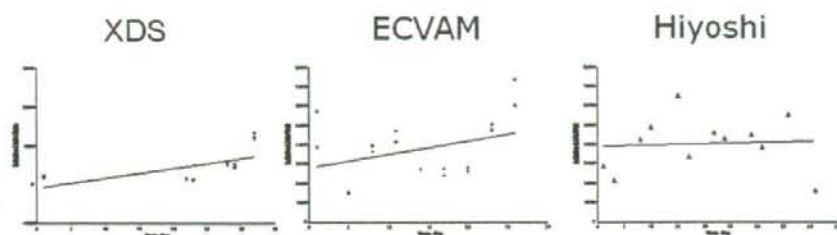
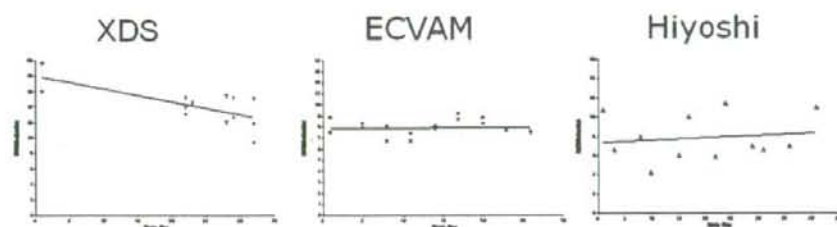


図 2-5A 各施設ごとのアゴニスト系の評価基準項目の経時変化

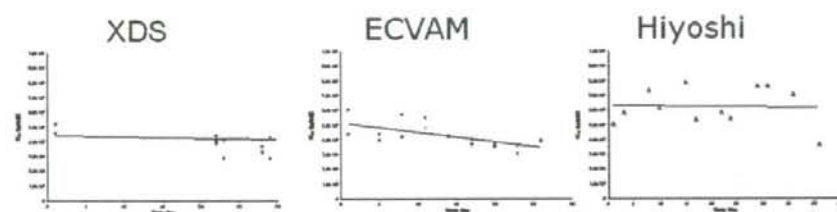
DMSO



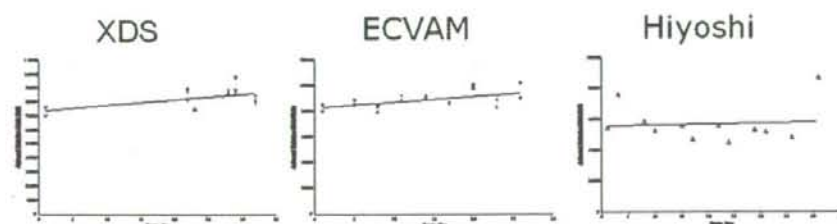
Ral/E2 fold induction



Ral/E2 IC50



E2 control



Flavone/E2 control

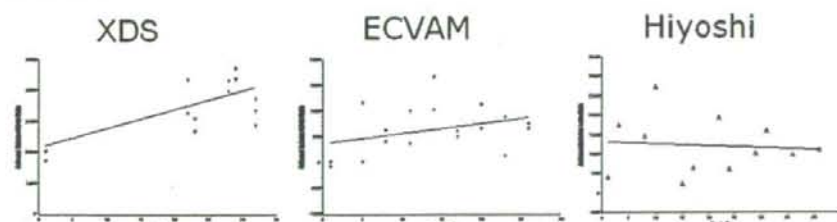


図 2-5B 各施設ごとのアンタゴニスト系の評価基準項目の経時変化

Phase II a アゴニスト測定における各施設の品質評価基準値

XDS					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	5394	2558	11789	0*
E2 EC <sub>50</sub>	µg/mL	2.3 x 10 <sup>-6</sup>	4.5 x 10 <sup>-7</sup>	3.4 x 10 <sup>-6</sup>	1.2 x 10 <sup>-6</sup>
Methoxychlor	Adjusted RLU	5709	974	8144	3274

ECVAM					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	3486	1582	7441	0*
E2 EC <sub>50</sub>	µg/mL	2.7 x 10 <sup>-6</sup>	8.5 x 10 <sup>-7</sup>	4.8 x 10 <sup>-6</sup>	1.9 x 10 <sup>-6</sup>
Methoxychlor	Adjusted RLU	4494	590	5969	3019

Hiyoshi					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	4006	1500	7756	256
E2 EC <sub>50</sub>	µg/mL	3.1 x 10 <sup>-6</sup>	7.9 x 10 <sup>-7</sup>	5.1 x 10 <sup>-6</sup>	1.1 x 10 <sup>-6</sup>
Methoxychlor	Adjusted RLU	7692	633	9275	6110

\*Unadjusted DMSO control values can not be below zero

Phase II a アンタゴニスト測定における各施設の品質評価基準値

XDS					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	1986	1748	6355	0*
Ra/E2 IC <sub>50</sub>	µg/mL	4.3 x 10 <sup>-4</sup>	9.0 x 10 <sup>-5</sup>	6.5 x 10 <sup>-4</sup>	2.0 x 10 <sup>-4</sup>
E2	Adjusted RLU	8284	744	10143	6424
Flavone	Adjusted RLU	3583	1089	6305	860

ECVAM					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	3783	1587	7752	0*
Ra/E2 IC <sub>50</sub>	µg/mL	4.3 x 10 <sup>-4</sup>	7.9 x 10 <sup>-5</sup>	6.3 x 10 <sup>-4</sup>	2.3 x 10 <sup>-4</sup>
E2	Adjusted RLU	8881	640	10480	7282
Flavone	Adjusted RLU	644	458	1789	-501

Hiyoshi					
	Units	Mean	SD	Mean Plus 2.5 Times SD	Mean Minus 2.5 Times SD
DMSO	RLU	4048	1386	7513	583
Ra/IC <sub>50</sub>	µg/mL	6.3 x 10 <sup>-4</sup>	1.3 x 10 <sup>-4</sup>	9.5 x 10 <sup>-4</sup>	3.1 x 10 <sup>-4</sup>
E2	Adjusted RLU	5728	1221	8781	2676
Flavone	Adjusted RLU	1226	724	3036	-584

\*Unadjusted DMSO values can not be below zero

図 2-6 各施設の Phase I から計算された LumiCell 評価基準値

表 2-2 Phase II a 被検化合物の EC<sub>50</sub> (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 2-3 Phase II b 被検化合物の EC<sub>50</sub> (3 回繰返し) 結果一覧

Code	1st.	2nd.	3rd.	Ave.	S.D.	C.V.
H0009	0.83	0.99	0.43	0.75	0.29	38
H0010	0.27	0.26	0.21	0.25	0.032	13
H0011	3.0E-06	1.9E-06	2.6E-06	2.5E-06	5.9E-07	24
H0012	0.49	0.79	0.41	0.56	0.20	36
H0013	11	18	25	18	7.3	40
H0014	0.051	0.16	0.14	0.12	0.058	49
H0015	positive	negative	negative	-	-	-
H0016	1.4	1.3	8.1	3.6	3.95	110
H0017	positive	negative	positive	-	-	-
H0018	positive	negative	positive	-	-	-
H0019	negative	negative	negative	-	-	-
H0020	negative	positive	positive	-	-	-
H0021	550	28	18	200	300	150
H0022	25	26	27	26	0.9	3.5
H0023	negative	negative	negative	-	-	-
H0024	positive	positive	positive	-	-	-