

200941020A

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

国際協調により公的な試験法を確立するための手順
に関する研究

平成 21 度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野泰雄

平成 22 年（2010）年 4 月

研究代表者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）

研究分担者

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

小野 敦（国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室）

能美 健彦（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）

本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）

森田 健（国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部）

鈴木 雅也（(財)食品農医薬品安全性評価センター）

目 次

I. 総括研究報告		
国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究-----		1
大野泰雄		
II. 分担研究報告		
1. 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーションおよび検証のための 化合物測定の実施-----		7
小野 敦		
2. 遺伝毒性試験法コメットアッセイ (in vitro) のバリデーション-----		211
小島 肇		
3. コメットアッセイ (in vitro) のバリデーション研究-----		265
本間 正充		
4. コメットアッセイ (in vitro) の統計解析に関する研究-----		277
鈴木 雅也		
5. 遺伝毒性試験 (トランスジェニックアッセイ) のバリデーションに 関する基盤的研究-----		281
能美 健彦		
6. in vitro皮膚感作性試験代替法のバリデーション研究-----		289
大野 泰雄		
7. バリデーションと第三者評価を円滑に行うための研究-----		355
森田 健		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----		367
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----		369

平成 21 年度総括研究報告書

研究課題名：国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究 (H21-化学-一般-004)

研究代表者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨

本研究では、我が国あるいは欧米で開発された新しい安全性試験法の内、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妥当性を評価・確認し、国際的に受け入れられることが確認妥当とされた方法をガイドライン化することを通じて、新規試験法を国際的方法として公定化する手順を確立することを目的とした。

内分泌かく乱化学物質スクリーニング法として、①エストロゲン受容体 α (ER α) に対する HeLa9930 細胞を用いたレポーターアッセイ(アンタゴニスト検出系:STTA 法)と②米国で開発された Lumi-Cell 法の国際バリデーションを実施した。遺伝毒性試験として、③*in vivo* コメットアッセイと④*in vitro* コメットアッセイの国際バリデーションを実施している。また、⑤遺伝子組み換え動物を用いる遺伝毒性試験法(トランスジェニックアッセイ)の共同研究を開始した。更に、*in vitro* 皮膚感作性試験として、⑥ヒト樹状細胞株を用いる方法(h-CLAT 法)の国際プレバリデーションを開始した。本研究は、これらの結果を受け、上記試験の OECD テストガイドライン化を目指すものである。この過程を通じて行われる、国際機関との意見交換において、バリデーションの手順に関する研究として、本年はバリデーションに用いる被験物質の選定に関する手順について検討した。本年度にバリデーションの開始が検討された遺伝毒性試験 コメットアッセイ、*in vitro* 皮膚感作性試験、Bhas 形質転換試験および 3 次元培養角膜モデルを用いた眼刺激性試験について国際的なバリデーション実行委員会で議論し、十分な被験物質を繰り返し実施できない場合、科学的に妥当な範囲で可能な限り経費を削減するために、施設間再現性の検討は最小限の物質数で検討し、試験法の適応範囲を明らかにするために被験物質数を多くする方向での施設間再現性よりも妥当性を重視する傾向が示された検討が進められた。

なお、①から⑥までの試験法を同時かつ同様のレベルで進める事は不可能であることから、21 年度は、*in vivo* コメットアッセイおよび ER α に対する 2 つのレポーターアッセイを中心に、国際的なバリデーションを推進し、前者については、プロトコルを確定し、施設間再現性を調べるためのバリデーションを実施し、良好であるとの結果を得た。ER α に対するレポーターアッセイのうち、Lumi-Cell 法については 3 年間の歳月を経て、国際的バリデーションを終了した。

研究分担者

小野 敦(国立医薬品食品衛生研究所 総合評価
研究室・主任研究員)
小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
新規試験法評価室・室長)
本間正充(国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝
部・室長)
能美健彦(国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝
部・部長)
森田 健(国立医薬品食品衛生研究所 安全情報
部・室長)
鈴木雅也(財団法人 食品農医薬品安全性評価セ
ンター・一般職)

A. 研究目的

安全性評価が十分になされていない多くの既存化学物質および新規化学物質の安全性を評価するにあたり、動物実験の福祉または動物実験における 3 Rs (Reduction、Refinement および Replacement) 尊重を考慮に入れた新規の試験法の整備やその確立が、世界的に求められている。

本研究では、我が国あるいは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、欧米の動物実験代替法研究機関や他の研究機関と協力して国際的に受け入れられる方法か否かを

検討し、ガイドライン化することを通して、協力して新しい試験法を国際的公定化する手順を確立することを目的としている。

試験法としては、内分泌かく乱化学物質スクリーニング法である①エストロゲン受容体 α (ER α)に対する HeLa9930 細胞を用いたレポーターアッセイ (アンタゴニスト検出系:STTA 法)、②米国で開発された Lumi-Cell 法のバリデーションを行う。、遺伝毒性試験である③*in vivo* コメットアッセイ、④*in vitro* コメットアッセイの国際バリデーションを実施する。また、し、⑤遺伝子組み換え動物を用いる遺伝毒性試験 (トランスジェニックアッセイ) の調査研究を実施する。また、*in vitro* 皮膚感作性試験である⑥ヒト樹状細胞株を用いた検出法方法 (h-CLAT) の国際バリデーションを実施する。3 年間で、トランスジェニックアッセイ以外のバリデーションを終了する目標を持って、本研究を進めているが、開発段階の異なる試験法のバリデーションを同時かつ同様のレベルで進める事は不可能である。そこで、平成 21 年度は、*in vivo* コメットアッセイおよび内分泌かく乱化学物質に対する 2 つのレポーターアッセイの研究を中心に、国際的なバリデーションを推進している。

これらの結果を受け、上記試験法の OECD テストガイドラインの成立を目指すものである。その過程において、ECVAM や ICCVAM のような欧米の代替法研究機関や国際機関 (OECD) と十分な意見交換を行い、公的な試験法を確立するための手順の経験を積み、今後の国際的な新規試験法バリデーションと国際的ガイドライン作成を円滑に行うための枠組みと手順・手続きの確立を目指している。

B. 研究方法

バリデーションの過程は、参加予定施設に技術移転を行うとともに、プロトコルを確立する段階であるプレバリデーションと、再現性と予測性を多施設で明らかにする本バリデーションに区別され、これらを段階的に進め、必要に応じて両者を行き来するのである。以下、この用語を用いて説明する。

1) 内分泌かく乱化学物質スクリーニング法

STTA 法については、そのアンタゴニスト測定法について JaCVAM が中心となって、JaCVAM、ECVAM および米国 EPA のメンバーより構成されるスタディー・マネージメントチームを組織し、日本、欧州、韓国の 5 施設における 3task 段階の task からなる国際バリデーション試験を実施している。本年度は、Task 2 において技術的な問題が示唆された韓国 MiFDS について現地査察および技術指導を行うとともに問題解決のための追加試験を行った。一方、Task 2 をクリアした国内 3 施設において 12 のコード化被験物質を用いた Task 3 を実施し、3 施設で一致する結果を得た。一方、Lumi-cell 法につ

いては、米国 NICEATM が事務局となって日米欧 3 施設の参加により 4 段階の Phase からなるバリデーションを実施している。なお、本研究班に先立つ研究における実施された、Phase II b において各施設からの評価結果が一致しない被験物質が多く認められた。本年度は、その原因について検討するための追加測定試験を実施した。さらに引き続き、Phase III を実施した。

2) 遺伝毒性試験

コメットアッセイについては、昨年度までに実施された「厚生労働科学研究 リスク研究事業」において、日本環境変異原学会、/ 哺乳類変異原性 (MMS) 研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを実施してきた。その過程で明らかになったプロトコルの相違、特に判定方法の不統一を解消し、国際的な基準の統一を図るため、図解集 (カラーアトラス) の作成を行っている開始した。

さらに、*in vivo* 試験に関しては、昨年度までに実施されたプレバリデーション結果を解析し、参加機関で検討した結果、本バリデーションのためのプロトコルを確定できた。そこで、参加 13 施設 (うち、国内 4 施設) の協力を得て、4 物質をもちいて施設間の再現性を評価するため、の本バリデーションを実施した。その結果から、良好な施設間再現性が得られることを確認できた。次段階として、合計 39 の被験物質を配布して予測性を確認するための本バリデーションを開始した。

また、*in vitro* 試験に関しては、昨年度から実施されていた 2 回のプレバリデーションにおいて、参加 5 施設 (うち、国内 1 施設) が 10 物質を用いて行われた実施した結果を解析した。

トランスジェニック (TG) アッセイについては、能美ら (Environ. Mol. Mutagen. 1996, 28, 465) が開発した試験方法である F344 gpt delta ラットの用いる TG ラット遺伝毒性試験について、技術普及とバリデーションに関する基盤的知見を得ることを目的とした共同研究を実施した。共同研究には国内約 10 施設が参加した。まず、参加施設に共通の陽性・陰性対照として F344 gpt delta ラット凍結組織を配布し、TG アッセイ遺伝子変異を検出するための技術的検討を行った。陽性対照としてはジエチルニトロサミン (DEN) 20 mg/kg を毎週 1 回、13 週間腹腔内投与したラット肝臓を用いた。陰性対照は溶媒対照群のラット肝臓を用いた。組織からのゲノム DNA 抽出、*in vitro* パッケージングによるレポーター遺伝子の回収効率、および gpt アッセイによる突然変異頻度の測定を行ったについて検討した。

次に、本試験では、発がん物質 (2,4-ジアミノトルエン (DAT)、アリストロキア酸、亜硫化ニッケル) および非発がん物質 (2,6-DAT) の *in vivo* 遺伝毒性を

検索した。参加施設を3グループに分け、2,4-DAT および 2,6-DAT、アリストロキア酸、亜硫化ニッケルの *in vivo* 遺伝毒性を検索した。

3) 皮膚感作性試験

ECVAM(欧州動物実験代替法バリデーションセンター)と共同で3試験法(ペプチド結合試験および2種の細胞試験)のバリデーションを開始した。細胞試験の一つであるh-CLATは、日本で開発され「厚生労働科学研究 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス研究事業」でプレバリデーションを実施し、試験法を確立したものである。

日本から2施設(花王(株)および(株)資生堂)に参加協力を依頼した。日本で行った h-CLAT のプレバリデーションは日本主導で進めた。結果をベースに3回の実行委員会を経て審議し、バリデーションの計画が固まり、3月に技術講習会を開催した。

4) バリデーションの手順に関する研究

上記のバリデーションの過程および進行中の形質転換試験 Bhas バリデーション研究や ECVAM の眼刺激性バリデーションへの参画を通して、国際機関と十分な意見交換を行った。その過程で、公的な試験法をガイドライン化するための手順の確立、具体的にはバリデーションを円滑に行うための枠組み・手続きの確立する上で、大きな比重を占める被験物質の選択に関する研究を行った。

倫理面への配慮

本研究は動物実験に関する3Rの精神を尊重した替わる新しい *in vitro* 安全性試験法の開発、主に *in vitro* 試験法の開発を主目的とするものである。動物を用いる際は動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留める。臨床試験やヒト由来資料試料利用試験研究は行わない。

C. 研究結果

1) 内分泌かく乱化学物質スクリーニング法

STTA 法においては、小野 敦研究分担者および CERI の担当者 2 名が 6 月に NiFDS を訪れ、技術指導を実施した。さらに、12 月には NiFDS の研究者が CERI を訪れ、技術研修を行う受けるとともに、問題解決のための追加試験を実施した。その結果、アッセイに用いる血清と細胞ロットとの組み合わせが HeLa9903 細胞の反応性に影響するが明らかとなった。一方、Task 2 をクリアした国内 3 施設におけるおいて、コード化した 12 被験物質を用いた Task 3 を実施した。その結果、E2 に対する相対転写活性化倍率を抑制する濃度 IC 値は 3 施設で良く一致した。ただし、1 施設の参照物質の測定結果が、性

能基準を満たさず、現時点では保留として取り扱っている。

一方、Lumi-cell 法については、米国 NICEATM が事務局となって日米欧 3 施設の参加により 4 Phase からなるバリデーションを実施している。なお、先立つ研究における、おいて、Phase II b において各施設からの評価結果が一致しない化合物が多く認められた。ことから、本年度は、その原因について検討を明らかにするための、評価結果の一致しない化合物について追加測定を実施した結果、用量設定試験における細胞毒性や溶解性の評価のばらつきが原因であることが明らかとなり、これに対応するためプロトコル変更を行った。さらに引き続き、Phase III を実施し、全ての施設が予定したデータの取得をほぼ終了した。日本では(株)日吉が、40 の被験物質を用いたバリデーションを実施した。

2) 遺伝毒性試験

プレバリデーションまでの過程でコメットアッセイ試験の結果が安定しない原因が種々明らかになり、その大きな原因の一つがコメット結果の判定方法の不統一によると判断とされた。そこで本問題を解消し、国際的な基準の統一を図るため、図解集(カラーアトラス)の作成を行っている開始した。実験者の判定基準を明確にするため、現在、MMS 研究会が数百枚の写真から選んだ 150 例の画像を用意し、参加施設に配布して判定させている。得られたコンセンサスをもとに、判定基準を明示したカラーアトラスを作成している。

in vivo 試験に関しては、プレバリデーション結果を全参加施設で解析・協議し、プロトコルを確定できた。昨年度まで、プロトコルの確定のためにプレバリデーションを3度も行わなければならなかった原因の一つは、標本作製するための電気泳動条件の相違であった。初期の段階では参加施設の多くが、それぞれに確立した条件を設定採用しており、プロトコルへの詳細な実験条件記載を拒んだ。彼らを納得させるためにはバリデーション結果を比較・協議するしかなく、全施設が納得し、厳密な条件を定めるために時間を要したものである。

確定できたプロトコルを用いて、4 物質(エチルメタンсульフォネート、2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)、ニトロソジメチルアミン、マンニトール)を参加 13 施設に配布し、施設間再現性を本バリデーションで検討した。得られた結果を解析したところ、施設間で再現性の良い安定的な結果が得られた。予測性の面では、2-AAF の結果を除き、予想通りの濃度依存性、予測性が確認できた。2-AAF の問題については、最終確定されたプロトコルを用い、合計 39 の被験物質を配布して他の遺伝毒性との予測性を検討するための次段階の本バリデーション

ンで合わせ検討していく予定である。

in vitro 試験に関しては、昨年度から実施されていたプレバリデーション結果を解析した。その結果、2回の共同研究の結果、*in vitro* コメット試験の標準プロトコールの大枠は確立はできたと考える。しかしながら、大きな問題点として、細胞毒性評価法と、それに基づく最高用量の設定法に関してはさらなる検討が必要である。また、*in vitro* コメット法は通常の *in vitro* 遺伝毒性試験に比べて、陽性反応を得るためには高用量、強細胞毒性条件が必要であること、S9による代謝活性化法はあまり有効では無いことが明らかとなった。今度はこれら限界を見極めた上で、プロトコールを改良し、バリデーション研究をさらに継続させるていく予定である。

TG アッセイについては、能美らが開発した F344 gpt delta ラットの開発研究進捗状況を IWGT (International Workshop on Genotoxicology Testing) "Strategy for genotoxicity testing" で報告した。特に、他の *in vivo* 遺伝毒性試験(小核試験、コメット試験)との統合の可能性について討論にした。

共同研究においては、参加施設を3グループに分け、2,4-DAT および 2,6-DAT、アリストロキア酸、亜硫化ニッケルの *in vivo* 遺伝毒性を検索した。現在、各被験物質の動物実験が終了し、変異解析を進めている。

3) 皮膚感作性試験

ECVAMの主催するバリデーション実行委員会において、h-CLATを含む3試験法のバリデーションの研究計画について議論した。3回の会議にて、実験スケジュール、被験物質数、被験物質の種類、繰り返しの回数等が主に議論された。その結果、プレバリデーションの計画が固まり、3月に技術講習会が開催された(計画では、技術講習会の開始がプレバリデーションの開始である)。欧州からの2名/施設、2施設合計4名に対して、花王および資生堂の研究員が技術指導を実施した。

4) バリデーションの手順に関する研究

公的な試験法をガイドライン化するために必要なバリデーションを進めるにあたり、コメットアッセイおよび皮膚感作性試験の被験物質選定のためにそれぞれのバリデーション実行委員会で議論を重ねた。これらの試験法以外でも、ECVAMで進めている眼刺激性試験代替法、形質転換試験 Bhas バリデーションの被験物質の選定に携わった。選定にあたって、限られた予算・規模の中でいくつかの被験物質を選ぶかが、すべての試験法に当てはまる問題点であった。バリデーションの最終目的は試験法の再現性および予測性の確認であるため、できれば40物質程度を選ぶことが適切とされている。しか

し、予算の関係でその規模を満たせない場合、再現性か予測性かどちらに重きをおくかで被験物質の選定数が異なる。数が少ない場合には、さらに、毒性強度、物性、安定性などの因子を考慮して、どのような種類の物質を選ぶかがバリデーション結果を利用するに際し、大きな影響を及ぼす。これらの適正なバランスについて、国際的な問題として議論に加わった。

これら多くの議論をまとめると、限られた予算規模の中で科学的に妥当な形で当該試験法を評価するためには、「予測性」に重きをおき、「再現性」については毒性強度等について配慮して選択した少数の物質を用い、試験法に習熟した少数の施設のみでバリデーションを実施し少数の被験物質を用いて判断、「予測性」の検討のためには、なるべく多くの被験物質を割り当てるというようなバリデーションを計画することが現在の国際的な傾向になっている。

D. 考察

バリデーションは実施さえすれば半年～一年ほどで良い結果が得られると多くの方々が誤解している。これまでの経験では、その誤解が最終的な試験法の評価を遅らせる原因になっている。バリデーションとは、特定の研究室や企業等が開発した試験法を他施設に技術移転し、その間に明らかになった問題を解決するためにプロトコールのを修正・確立した上で、施設間再現性および予測性を段階的に確認する段階的な作業ものである。一つでも躓けば、前の段階に戻って再検討する必要があり、予想以上に時間と費用が掛かる作業である。

バリデーションの中で、プロトコールの確定は最重要課題の一つであり、そのためにプレバリデーションが企画される。試験法開発者の思い込みが邪魔をしたり、開発者で十分な初期的な検討がなされていないかったりした場合には、開発者以外ではうまくいかないことが多い。結果として、多くの研究機関の協力とそれに必要な時間や経費を浪費することになる。また、国際的な統一無いままに、多くの施設がすでに条件を決めてルーチン化している場合にはプロトコール確定のためのプレバリデーションが難航する。この統一ができない場合、得られた結果の公的な利用は困難である。

昨年度まではコメットアッセイのプロトコール確立に予想以上の時間を要した。本年度においても、STTA法において、プロトコールの移転性が悪く、韓国の施設の習熟に時間を要したこと、さらにプロトコールの中でデータの採用基準の見直しが必要であることが明らかになり、バリデーションを終了させることができなかった。

本研究班の目的は試験法の公定化に当たってこのような手順や問題点を明らかにしていくことであり、

バリデーションがスムーズに終了しなかったことは残念であるが、改良の必要がある試験法をあぶりだす役割を十分に果たしていると考えていることができた。もちろん、これらの試験法を見捨てる訳ではないが、将来の問題点を明確にして改良につなげている点で、より効率的適切な試験法開発研究を成し遂げていると自己評価している。

また、数々のバリデーションに共通しているもう一つの重要課題は、被験物質数およびその選択である。本問題については、試験法の利用目的と適用する被験物質の範囲をどこまでにするかに関する考えも絡み、それぞれのバリデーション実行委員会でも、コンセンサスを取ることに苦勞した。

これらの試験法確立の諸問題については、全ての試験法に共通の問題点であることから、議論を重ねて国際的に解決していくことは今後の国際バリデーションの遂行のために良い経験となる。問題提起や対応などについて、実際のバリデーション経験の多い日本の貢献度は高い。我が国発の方法で、本研究班で扱う試験法の開発については、日本がリーダーシップを取ってコンセンサスを得、試験法を公定化していきたいと考えている。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質スクリーニング法である①STTA 法、②Lumi-Cell 法の国際バリデーションを実施し、Lumi-Cell 法のバリデーションを終了した。遺伝毒性試験である③*in vivo* コメットアッセイ、④*in vitro* コメットアッセイの国際バリデーションを実施している。また、⑤トランスジェニックアッセイの調査研究を実施した。*in vitro* 皮膚感作性試験である⑥h-CLAT の国際プレバリデーションを開始した。

これらの試験法からの情報に加え、進行中の形質転換試験 Bhas アッセイや ECVAM の眼刺激性試験バリデーションへの参画を通して、バリデーションの手順に関する研究として、本年はバリデーションに用いる被験物質の選定に関する手順について検討した。その結果、十分な被験物質を繰り返し実施できない場合、施設間再現性よりも妥当性を重視する傾向が示された。科学的に妥当な範囲で可能な限り経費を削減するために、施設間再現性の検討は最小限の物質数で検討し、試験法の適応範囲を明らかにするために被験物質数を多くする方向での検討が進められる傾向があることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野泰雄、秋田正治: 世界と日本における動物実験代替法に関する動向、日皮協ジャーナル、32、36-41 (2009)

- 2) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y.: Assessment of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; Results of the first Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 27-35(2008)
- 3) 大野泰雄: 薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点、薬学雑誌 128 (5) 735-740(2008)
- 4) 小島肇夫: 動物実験代替法に関する 2008 年の国際動向、Fragrance Journal、2009-1、65-69 (2009)
- 5) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol. Cutan. Allergol., 3(1)、1-6 (2009)
- 6) 小島肇夫: 動物実験の3Rs における国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第 7 号、p37-50(2009)
- 7) 小島肇夫: REACH における環境影響試験、Fragrance Journal 2009-8、46-51(2009)
- 8) 小島肇夫: 現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20(2009)
- 9) 小島 肇: アレルゴロジー VS トキシコロジー、皮膚アレルギーの旅 Vol.7, No.1、p1-7、(2008)
- 10) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、日本薬理学会会誌、130、505-509(2008)
- 11) Kojima, H.: JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, 483 (2008)
- 12) 小島肇夫: EU における動物実験代替法の現状と REACH 対策、日皮協ジャーナル、30(2) 156-162(2008)
- 13) 小島肇夫: 皮膚感作性試験代替法の現状、Visual Dermatology、7(3)、328-331(2008)
- 14) 小島肇夫: 安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128(5)747-752. (2008)
- 15) 小島肇夫: 動物実験の3Rs における国内外の動向、ファルマシア、44(9)、857-861(2008)
- 16) 小島肇夫: REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックステージ、2(5)、1-4 (2008)

2. 学会発表

- 1) 小島 肇: バリデーション試験の今後の予定について、コメットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会 MMS 研究会 第

- 54 回定例会、熱川(2009)
- 2) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 3) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R.: An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
 - 4) Kojima, H.: Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 5) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacob, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: The International validation study for the ER alpha STTA antagonist assay using HeLa9903, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 6) Allen, D., Deal, F., Ceger, P., Gordon, J., Pazos, P., deLange, L., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Tice, R. and Stokes W.: Testing of coded substances for a multi-phases international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 7) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 8) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 9) Stokes, W., Wind, M., Matheson, J., Jacob, A., Casati, S., Kojima, H., Allen, D., Burns, T., Salicru, E., Strickland, J. and Tice, R., Internationally harmonized performance standards (PS) for the murine local lymph node assay (LLNA), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 10) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 11) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25th ICEM, Florence (2009)
 - 12) 小島 肇: 動物実験代替法における国内外の動向、日本薬学会関東支部大会、埼玉(2009)
 - 13) 小野 敦、武吉正博、Susanne Bremer、Miriam Jacob、Susan C. Laws、寒水孝司、小島 肇: HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪(2009)
 - 14) 本間正充、山影康次、Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島 肇: In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション、第 22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪(2009)
 - 15) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真: コメットアッセイの国際バリデーション、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡(2009)
 - 16) JaCVAM: コメットアッセイ国際バリデーションプロジェクトチーム: インビボコメットアッセイ: JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第 38 回大会、清水・静岡(2009)
 - 17) 中村昌文、半田洋士、小野敦、小島肇: Lumi-cell ER アッセイ法の国際バリデーション(第二報)、第12回環境ホルモン学会研究発表会、東京(2009)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

研究課題名：国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究

分担研究課題名：内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーションおよび
検証のための化合物測定の実施

研究分担者： 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室

研究要旨

本研究では、OECD-EDTA で提案されたコンセプチュアルフレームワークのレベル 2 に示される化学物質の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法のうち、行政的有用性が期待される試験法として、我が国で開発された HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 α (ER α) 転写活性化試験法 (HeLa 法) および米国で開発された BG1 細胞を用いた転写活性化試験法である Lumi-cell 法について、OECD ガイドライン化に向けて、欧米の研究機関と協力し、多施設国際バリデーションを実施し、その信頼性・再現性の検証を行うことを目的とした研究を実施した。HeLa 法については、そのアンタゴニスト測定法について JaCVAM が中心となって、JaCVAM、ECVAM および米国 EPA のメンバーより構成されるスタディーマネージメントチームを組織し、日本、欧州、韓国の 5 施設における 3 タスクからなる国際バリデーション試験を実施している。本年度は、Task2 において技術的な問題が示唆された韓国 KFDA について現地査察および技術指導を行うとともに問題解決のための追加試験を行い、アッセイに用いる血清と細胞ロットとの組み合わせが HeLa9903 細胞の反応性に影響するが明らかとなった。一方、Task2 をクリアした国内 3 施設においてコード化化合物を用いた Task3 を実施し、コード化化合物の評価については、3 施設で一致する結果を得た。一方、Lumi-cell 法については、米国 NICEATM が事務局となって日米欧 3 施設の参加により 4Phase からなるバリデーションを実施している。先立つ研究における、Phase II b において各施設からの評価結果が一致しない化合物が多く認められた。本年度は、原因について検討するための評価結果の一致しない化合物について追加測定を実施した結果、用量設定試験における細胞毒性や溶解性の評価のばらつきが原因であることが明らかとなり、これに対応するためプロトコル変更を行った。さらに引き続き、Phase III を実施し全ての施設が、予定したデータの取得をほぼ終了した。

A. 研究目的

近年、化学物質のヒト健康影響に関して内分泌かく乱性などの新たな問題が懸念されており新規化学物質のみならず既存化学物質の安全性再評価が求められている。しかし、対象となる化学物質の数は極めて多く、それら全ての安全性評価を従来のような動物を用いる試験で評価するのは時間や

費用の面だけでなく動物福祉の面からも問題であり、効率的かつ倫理的な新規試験法が求められており、各国で多くの方法が開発・提案されているが、行政的に用いられる評価法の開発に関しては、国際協調のもとで議論を行い将来に渡って広く有効な手法として提案、確立していくべきである。新規試験法について OECD ではバリデーションと行政的受け

入れに関する基準を示しているが、多くの試験法を我が国のみで開発し OECD 基準を満たすバリデーションを行うことは容易ではない。

本研究では、OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォース (EDTA : Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment) により示されたコンセプチュアルフレームワークのレベル 2 に分類される化学物質の内分泌かく乱性 in vitro 試験法のうち、行政的有用性が期待される試験法として、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試験法のうち我が国で開発された HeLa 細胞をベースにした試験法 (HeLa 法) および米国で開発された Lumi-cell 法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施し、得られた結果から信頼性や再現性が確認された手法について、最終的に OECD ガイドラインとして提案することを目的とした研究を行った。

このうち HeLa 法は、ヒト由来の細胞 (HeLa cell) に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応答配列とルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。本法は、厚生労働省および経済産業省における研究により我が国において開発が進められてきており、アゴニスト活性評価法については、国内における多施設バリデーション結果を基に、2009 年に OECD ガイドライン化された (OECD TG455)。本研究では、HeLa-9903 細胞を用いたアンタゴニスト活性評価法のガイドライン化に向け JaCVAM、ECVAM および米国 EPA メンバーから構成されるバリデーションマネジメントチームを組織し、日本、欧州、韓国 FDA の 3 施設において 3 タスクからなる国際バリデーション試験を実施している。これまでに、Task1 においては全ての参加施設がアゴニストアッセイの評価基準を満たす結果を得ることに成功したが、Task2 におけるアンタゴニストアッセイでは海外 2 施設で評価基準を満たす結果を得ることが出来なかった。本年度は、アンタゴニスト測定における技術的な問題が示唆された韓国 KFDA の技術指導及び問題解決のための追加試験を行うとともに、Task2 を終了した国内 3 施設における Task2 結果をもとにした性能評価基準値の更新および Task3 測定を実施した。

一方、Lumi-cell ER アッセイ法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc. (XDS 社) により開発された方法で、ヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンとエストロゲンレセプター (ER) との結合をルシフェラーゼ活性により検出する。本法についてはこれまでアゴニスト・アンタゴニスト法のいずれについても多施設バリデーション試験が実施されていなかったことから、米国 ICCVAM の提案を受けて、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM および欧州 ECVAM と共同で米国、日本、欧州の 3 施設において 4Phase からなる国際バリデーションを実施している。これまでに Phase II b までの測定が終了しており、本年度は、3 施設からの Phase II b 結果をもとにした追加試験の実施と Phase III 試験を実施して試験間での結果の再現性、試験法としての信頼性、結果の妥当性などについて検討した。

B. 研究方法

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

1.1 バリデーション試験実施体制

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) を組織して、実験の進行に関する情報の収集、解析及び状況に応じた指示を行った。SMT は小島肇博士 (国立医薬品食品衛生研究所・新試験法評価室 (JaCVAM))、小野敦博士 (国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室)、Miriam Jacobs 博士 (ECVAM)、Susan C. Laws 博士 (US-EPA)、寒水孝司博士 (大阪大学) の 5 名で構成され、さらに菅野純博士 (国立医薬品食品衛生研究所) 及び OECD VMG non-animal メンバーをアドバイザーとした。実験の技術面の支援に関しては本法の開発施設である化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 (試験責任者: 武吉正博、赤堀有美、宮浦英樹) をリードラボとして、試験計画書の作成、参加施設に対する実験指導、結果の解析、実験進行に伴う技術的問題点の把握及び問題解決のための技術支援を実施した。バリデーション試験は、本測定系を開発した化学物質評価研究機構をリードラボとして、欧州 ECVAM の推薦によるベルギー VITO、

韓国 FDA および経済産業省における国内多施設バリデーション試験参加施設であった大塚製薬、カネカの計 5 施設の参加により開始した(図 1-1)。しかし、VITO については、Task2 測定を終了する前に ECVAM との契約期限が終了し、ECVAM との契約期限の延期が困難となったため Task2 途中でバリデーション試験から離脱した。これに伴いバリデーション組織を図 1-2 のとおり変更した。なお、全ての施設におけるバリデーション試験実施の取りまとめを、本研究班(JaCVAM)で行った。

参加施設の詳細は下記に示した。

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 R
esearchmanager 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

1.2 バリデーション実施計画

バリデーション試験の実施は、試験系を開発した化学物質評価研究機構における施設内バリデーション結果に基づき、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ルに従い実施した。現時点での最新のプロトコルを添付資料1として示した。バリデーション試験は Task1 から Task3 の 3 段階に分割して実施した。すなわち、Task1 では、

既にガイドライン化(OECD TG455)されたアゴニストアッセイにおけるリファレンス化合物(17β-Estradiol、17α-Estradiol、Corticosterone)のアゴニスト測定を実施し、ガイドラインで規定する性能評価基準を満たすデータの取得により参加施設の測定技術レベルの確認を行った。引き続きTask2では、アンタゴニストのリファレンス化合物を用いた測定を、Task3 ではコード化合物についてのアンタゴニスト測定実施による再現性と評価結果の妥当性の確認を行った。標準物質を含む被験化合物および溶媒(DMSO)は JaCVAM より、同一ロットのものが配布された。

1.3 Task2

Task2 は Task1 でアゴニスト測定が実施可能と判断された試験施設において、アンタゴニスト活性測定実施に必要な技術レベルの確認および Task-3 において用いる性能基準値の設定を目的とした。

Task2 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、陰性対照物質として 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)を用いて実験を行った。Task2 では最大5回までの実験を実施し、プロトコルに設定した各参照化合物の性能基準を満たす実験が 3 回以上となった時点、もしくは、性能基準を逸脱した場合であっても、試験施設内で再現性が高く化合物の活性評価において再現性の高い結果が得られた施設については Task2 をクリアするものと評価した。バリデーションプロトコルに設定されたアンタゴニスト実験の性能基準は、リードラボである化学物質評価研究機構において実施された施設内試験結果のみに由来する暫定基準であるため Task2 をクリアした試験施設全体の試験結果から基準値のを更新して、Task3 における性能基準を設定した。また、Task2 試験結果から非作用物質として選択した Cor が、複数の試験結果において擬陽性となり、リファレンス化合物として適当ではないため、ガイドラインにおける非作用リファレンス物質の検討をリードラボにおいて実施した。

1.4 Task3

Task3 は、アンタゴニスト試験プロトコルの再現性、結果の妥当性、特異性等を評価する目的で、Task2 をクリアした試験施設においてコード化された化合物の測定を実施した。測定化合物は、JaCVAM よりコード化されて各試験施設に配布した。Task3 測定化合物全体および試験グループごとの背景データから期待される活性分布を図1-3に示した。Task3 における測定結果の採用基準としては、Task2 をクリアした国内3施設のTask2結果を基に設定した性能基準を用いた。Task3 測定においては、測定日毎にTask2と同じ標準物質(陰性対照物質は、フルタミドに変更された)を測定するプレートの測定を同時に行い、標準物質測定プレートが、性能基準を満し、かつ測定プレートがプレート採用基準を同時に満たした場合にデータを採用することとした。

1.5 アンタゴニスト測定データの解析

各濃度区の発光強度の値から溶媒対照区 (VC) の平均値から差し引き、算出された 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。測定対象化合物によって 30 あるいは 50%以上の RTA の低下が認められた場合、2つの濃度区における RTA の直性回帰により、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。また、全濃度区の相対転写活性化倍率を用いて、以下の式への非線形フィッティングにより IC50 を算出した。

IC50 値の算出には GraphPad Prism Ver. 4 (GraphPad Software 社) を用いた。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})$$

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

HillSlope: 傾き

X: 対数濃度 (M)

Y: 相対転写活性化倍率の抑制率 (%)

ただし、同時に行った細胞毒性試験において、生存率が 80%以下となる化合物濃度区については、細胞毒性による活性低下と判断して、上記、評価基準値の計算から除外した。また、計算対象となるい

ずれの濃度区においても 50%以上の阻害が認められない (lin.IC50 が検出出来ない) 場合には、フィッティングによる IC50 値の計算は行わないこととした。

1.6 韓国 NiFDS/KFDA の技術、設備等の妥当性の確認及び問題の原因解明と対応

1.6.1 韓国 NiFDS/FDA における現地調査と技術指導

韓国 NiFDS/FDA では、Task2 において技術的課題が示唆されたため、問題点を明らかにし課題の解決を図るため、リードラボの試験担当者とともに NiFDS/KFDA における現地調査と技術指導を行った。以下の項目について技術、設備等の妥当性の確認を行った。

- ・被験物質調製手技
- ・培養試薬類調製手技
- ・アッセイ(細胞継代、播種)手技
- ・アッセイ(被験物質添加)手技
- ・測定試薬調製手技
- ・培地交換手技
- ・アッセイ(ルシフェラーゼ化学発光測定)手技
- ・DCC-FBS 調製手技
- ・データ解析

1.6.2 細胞ストックおよび DCC-FBS に関する検討と韓国 NiFDS/KFDA 担当者の来日による手技の再確認

現地調査の結果から、測定における問題の原因と考えられた細胞ストックおよび DCC-FBS について検討を行った。すなわち韓国 NiFDS/FDA の細胞ストックは、JCRB より購入し、2 継代目で凍結保存、現地調査時はこれを解凍しトータルで 8 継代目の細胞を供していた。不具合の原因のひとつとして、細胞自体の活性が疑われたため、現地調査後、CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の活性を同時に測定し、比較を行った。また、韓国 NiFDS/FDA では、現地調査時、細胞培養培地に使用する dextran-coated-charcoal (DCC)処理ウシ胎児血清(DCCFBS)を市販の Hyclone 社製のものを使用していた。プロトコールでは、市販 DCC-FBS 自体の使用は、結果が品質保証クライテリアを満たせば使用してもよいことになっているが、不具合の原因のひとつとして、これが疑われたため、現地調

査後、リードラボで調製した DCC-FBS を韓国 NiFDS/FDA に送付し、これを用いたアッセイの確認を実施した。またさらに、これらの検討の後、韓国 NiFDS/KFDA 担当者が来日し、リードラボにおいて手技の再確認を実施した。

1.7 測定結果の信頼性に影響を与える要因の検討

OHT、TAMの IC 値が Task2 結果をもとに定めた基準値をクリア出来ない問題について、考えられる原因(化合物ストック、細胞のロット、血清のロット等)について明らかにするため、JaCVAM より新たに OHT、TAM を送付して KFDA、CERI の化合物ストック溶液との比較を行うとともに、新たなロットの細胞や血清を用いた測定をリードラボにおいて実施して結果に大きく影響を与える項目について検討した。

2. Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験の実施

Lumicell アッセイは、米国 ICCVAM が事務局となって、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM および欧州 ECVAM の参加による Study management team を組織し、米国、日本、欧州の 3 施設において 4Phase からなる国際バリデーションを実施している。バリデーション試験組織図を図 2-1 に示した。バリデーション試験については、本研究班に先立つ研究において、これまでに図 2-2 に示すバリデーション計画のうち Phase II b までの測定が終了しており、本年度は、バリデーション計画における Phase II b 試験の追加測定および Phase III 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おいて日米欧 3 施設からの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 Lumi-cell ER アッセイ法の測定フロー

Lumi-cell ER アッセイ法の測定フロー及び試薬については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 により提供されたものを用いた。標準及びコントロールの前処理はルミセルプロトコールの記載に従った。標準的な試験フローを図 2-3 に、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を図 2-4 に示した。我が国におけるバリデーション測定の実施は、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。

2.2 Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II b 追加試験

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 化合物を用いた Phase II b 試験においてバリデーション参加施設間で評価結果が一致しない化合物について、その原因を明らかにする目的で追加測定を行った。日本の参加施設である日吉においては、アンタゴニストアッセイの 2 化合物について濃度設定試験結果をもとに測定されて濃度域が他の施設より低かったことが評価結果の不一致の原因であることが示唆されたため、高濃度域からの追加測定が SMT より指示された。

また、ECVAM においてはアゴニストアッセイの 2 化合物について試薬のコンタミが疑われたため、XDS 社においてはアンタゴニストアッセイの 4 化合物について細胞毒性濃度の評価結果が他の 2 施設と異なったため再測定を実施した。

2.3 Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase III

コード化されたアゴニスト用及びアンタゴニスト用各 41 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 1 回(/各化合物)行い、それぞれアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性についての Dose response curve および EC50 もしくは IC50 を得た。溶解性試験においては、Phase II b および Phase II b 追加試験結果をもとに培地添加時の析出についての検討は無視して、溶媒(DMSO)への溶解性のみから、Range finding testing における測定濃度を決定した。得られた結果をもとに化合物の活性評価を行い、日米欧 3 施設からの結果を

もとに評価結果の再現性、信頼性について検討した。

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 国内 3 施設における Task2 結果からの性能基準値の更新

Task2 測定において、国内参加施設のうち大塚は予め設定した暫定性能評価基準を満たす 3 測定結果を得て Task2 を終了した。また、CERI およびカネカは、性能評価基準を一部の項目で若干逸脱したため 5 試行まで測定を実施したが、いずれの施設における結果も施設内での再現性を示しており、また基準を逸脱する項目も一部であることから施設間差であると判断されるとの SMT の承認を得て Task2 測定を終了した。アンタゴニストアッセイにおける暫定性能基準値は、リードラボである CERI おいて実施された施設内試験結果をもとに設定されたものであったため、Task2 をクリアした国内 3 施設の合計 13 回の測定結果をもとに施設間のばらつきを考慮した基準値の更新を行った。Task2 実施前の暫定基準値と更新された基準値の比較を表 1-1 に示した。国内 3 施設の全 13 試行におけるプレート採用基準項目の測定結果は、Fold Induction は平均 10.35 (最小 : 8.3 ~ 最大 : 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) であった。Fold Induction は、全ての試験結果で暫定基準の 6 倍を超える結果が得られていたが、海外 2 施設における測定では多くの結果で 6 倍をクリア出来ないこと及びアゴニストアッセイの基準値が 4 倍であることから採用基準値を 4 倍以上として、信頼性の高い評価結果を得るための推奨値を 6 倍以上とした。これらの評価項目についての 3 施設からの Task2 測定結果の分布を図 1-4 に示した。一方、参照化合物の性能基準値 (Lin.IC50 値、Lin.IC30 値、IC50 値) については、全 13 試行の平均±2SD を更新性能基準値として採用した。性能基準値の 3 施設からの Task2 測定結果の分布を図 1-5 に示した。性能評価基準値の更新は、SMT に了承され、引き続き Task3 試験及び海外施設の Task2,3 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)。また、陰性参照化合物として設定した Cor については、一部の測定結果で擬陽性が示されたことから、Cor の Task2 測定結果について評価対象外とし、陰性参照化合物については新たに選択し直すこととした。

1.2 アンタゴニストアッセイ陰性参照化合物の選択

リードラボでの施設内試験結果をもとに、オリジナルプロトコールにおいて陰性参照化合物として選択した Cor については、Task2 測定の結果から細胞毒性と細胞毒性に伴うルシフェラーゼシグナルの低下とのバランスにより、擬陽性結果を示すことが明らかとなったため、陰性参照化合物については新たに選択し直すこととした。そこで、幾つかの候補化合物についてリードラボで複数回の測定を行った。測定結果の一部を図 1-6 に示した。検討結果より、高濃度では細胞毒性を示し、再現性良く陰性結果を得ることが可能な化合物として Flutamide (Flu) を新たな陰性参照化合物として選択した。

1.3 海外 2 施設での Task2 測定における問題の検討

海外の 2 施設 (VITO、KFDA) では、基準を満たす結果を得ることが出来ず、さらに得られた測定結果については再現性や信頼性についても問題が示された。VITO においては、十分な Fold Induction が得られないこと及び細胞継代により反応性の急激な低下が観察されたため、測定に用いる細胞や FBS、試薬や器具の影響について追加検討を行った結果、培地調整に用いる超純水が測定に影響を与える可能性が示された (図 1-7)。この結果をもとに、以降の測定においては調整済みの市販の培養用超純水の使用を推奨プロトコールとすることとした。追加検討に時間がかかったことなどから、VITO は、Task2 終了前に ECVAM との契約期限が終了したため、測定継続が困難となり、バリデーション試験施設から離脱した。一方、KFDA については、測定結果などから試薬等の問題だけでなく技術的な問題が示唆されたため、リードラボの試験担当者とともに NiFDS/KFDA 現地での施設・設備の調査と技術指導を行うこととした。

1.3 韓国 NiFDS/KFDA の技術、設備等の妥当性の確認及び問題の原因解明と対応

韓国 NiFDS/KFDA にて KFDA 担当者と CERI 担当者が同時に独立して実施したアッセイ結果のうちアゴニストアッセイ結果を図 1-8 に、アンタゴニストアッセイ結果を図 1-9 に示した。アゴニストアッセイでは、KFDA、CERI 担当者とも Fold induction は基準値をクリアしないものの、参照化合物の濃度反応曲線はいずれの化合物についても良好で測定された PC50 値、PC10 値は性能評価基準値を満たす結果を得た。一方、アンタゴニストアッセイでは、いずれの担当者の結果もアゴニストアッセイ同様、Fold Induction が低く、参照化合物の性能評価基準値を満たす結果は得られなかった。結果から、同時実施したアッセイで双方の値に違いが認められなかったため、一方の操作手技自体に問題があるとは考えられず、fold induction が低い原因として、市販 DCC-FBS の使用、またはそれを用いて継代培養、ストックした細胞に問題がある可能性が疑われた。CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の活性を CERI にて同時に測定し、比較を行った。その結果、両者の細胞ストック自体は問題ないことが確認された(図 1-10)。CERI 調製 DCC-FBS を韓国 NiFDS/FDA に送付し、これを用いたアッセイの確認を実施した。その結果、CERI 調製 DCC-FBS を使用により、Task-3 で見直した基本クライテリアおよび RU486 はクリアし、ある程度改善することが確認されたが、OHT、TAM の IC 値は未達であった(図 1-11)。その後、韓国 NiFDS/KFDA 担当者が来日し、手技の再確認を CERI にて実施した。その結果、両者とも基本クライテリアおよび RU486 はクリアしたが、NiFDS 担当者では TAM、CERI 担当者では OHT 及び TAM の IC 値はクリアしなかった。・同時実施したアッセイで双方の値に違いが認められなかったため、一方の操作手技自体に問題があるとは考えられなかった。CERI 担当者においても、OHT 及び TAM が基準を満たさないことから、考えられる原因を洗い出し、検討を実施することとした。

1.4 測定結果の信頼性に影響を与える要因の検討

リードラボである、CERI 内部においても OHT 及び TAM の IC 値が Task2 結果をもとに設定した基

準値をクリア出来ない結果が頻発したため、考えられる要因として細胞 lot.、血清 lot.の測定結果への影響について検討を実施した。結果の概要を表 1-2 に示した。結果から、血清の lot.及び血清と細胞相性の問題であることが判明した。これを踏まえ、適合する血清 lot.を確保し、CERI にて DCC 処理後、韓国 KFDA に送付した。現在、韓国 NiFDS/KFDA にて送られた血清を用いた検討を行っている。

1.5 国内 3 施設における Task3 結果

Task2 をクリアした国内 3 施設において、バリデーション計画に従う Observer グループの Task3 測定を実施した。各参加施設には、コード化された 12 化合物が測定用化合物として JaCVAM より送付された。各試験施設に送付された化合物リストを表 1-3 に示した。測定に先だって、各試験施設では DMSO への溶解性試験及び最高 10mM からの濃度設定試験を実施し、測定された細胞毒性やルシフェラーゼ活性値をもとに最適測定濃度域を決定して本測定を実施した。本測定は、各化合物について Task2 結果をもとに更新された性能評価基準およびプレート採用基準を満たす 3 測定結果が得られた時点もしくは、最大 5 測定まで実施した時点で終了とした。

国内 3 施設における測定結果からのアンタゴニスト作用の評価結果を表 1-4 及び活性が認められた化合物の IC 値を図 1-12 に示した。コード化合物の評価結果および活性化化合物について測定された IC 値は、3 施設で良く一致した。一方、図 1-13 に化合物測定時に同時に測定したリファレンス化合物の IC 値の結果を示した。2 施設(大塚、CERI)においては、リファレンス化合物の IC 値が性能基準を満たす 3 測定結果の取得に成功したが、1 施設(カネカ)では 5 測定まで実施し、上記のとおりコード化合物評価結果については、他の試験施設と良く一致したものの、同時に実施したリファレンス化合物の測定結果が性能評価基準を満たす 3 測定が得られていないことから測定結果の取り扱いについては、Core グループの Task3 測定が終了するまで保留とし、現時点では参考データとして取り扱うこととした。

2. Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験の実施

2.1 Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II b 追加試験

本研究に先だって実施された Phase II b 試験における、コード化化合物のアゴニスト活性評価結果を図 2-5 に、アンタゴニスト活性評価結果を図 2-6 に示した。図 2-5、2-6 において赤字で示す評価結果は、3 施設のうち 1 施設からの結果が一致しなかったため一致しない原因について検討を行い、該当施設において再測定を実施した。

アゴニストアッセイにおいては、Atrazine、Vinclozolin の 2 化合物で ECVAM のみが陽性判定を報告した。ICCVAM データベース及び他の 2 施設の結果から、ECVAM の結果については擬陽性と判断され、また擬陽性の原因として試薬のコンタミが疑われたため、新たな化合物バイアルが事務局より送付され、測定を実施したところ、Atrazine については、再測定では陰性となった。Vinclozolin についても、再測定を実施中である。

アンタゴニストアッセイでは、XDS 社では Apigenin、Atrazine、Genistein、Resveratrol の評価結果が、日本からの参加施設である日吉では、Flavone、Genistein の評価結果が、他の施設と一致しなかった。XDS 社の測定では、他の施設でアンタゴニスト活性が測定された濃度域で細胞毒性が観察されたため測定結果を不採用としていたため陰性と報告されていた。また、日吉では、やはり濃度設定試験における溶解性試験で培地添加による析出が認められたことから他の施設で活性が報告されている濃度域より低い濃度で測定を実施していた。図 2-7 に日吉で再測定を実施した Flavone の 1 回目、2 回目の測定結果および他の試験施設の測定結果を示した。日吉の 1 回目測定では、他の試験施設より 10 倍程度低い濃度域で測定を実施しており、2 回目測定においては他の試験施設と同程度の高濃度域まで測定を実施した結果、活性が検出された。XDS 社、日吉それぞれにおいて高濃度での再測定を実施した結果、いずれの化合物についてもアンタゴニスト活性陽性となり、最終的に全化合物の評価結果が 3 施設で一致した。この結果を受けて、LumiCell プロトコールでは濃度設定試験における溶解性試験は、DMSO と培地を用いることと

なっていたが DMSO のみに変更した。また、細胞毒性の評価の再現性について検討する必要が示唆された。日吉では、Phase II b 試験及び再試験が終了したことから、全ての試験結果を含む Study Report を作成し、これについて JaCVAM で監査を行い最終化して NICETAM に送付した(添付資料2)。

2.1 Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase III

Phase III 試験では、コード化されたアゴニスト用及びアンタゴニスト用各 41 化合物が NICETAM より送付され、各化合物について品質評価基準を満たすプレートデータを各 1 測定実施した。日吉では、既に測定が終了し全ての測定結果をまとめた Study Report を、JaCVAM で監査を行い最終化して NICETAM に送付した(添付資料3)。

現在、3 施設からの測定結果が得られているアゴニスト用 31 化合物の評価結果の再現性について図 2-8 に示す。Phase III 試験では、それぞれの化合物について各ラボ 1 測定しか測定を実施していないが、81% (25 化合物) について 3 施設の評価結果が一致した。現在、XDS 社、ECVAM における測定もほとんど終了しており、3 施設での測定結果が全て終了するのを待って詳細な解析を行い試験系としての再現性や信頼性について評価を行う予定をしている。

D. 考察

本研究では、化学物質の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法のうち、行政的有用性が期待される試験法として、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試験法のうち我が国で開発された HeLa 細胞をベースにした試験法 (HeLa 法) および米国で開発された Lumi-cell 法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施し、得られた結果から信頼性や再現性が確認された手法について、最終的に OECD ガイドラインとして提案することを目的とした研究を行っている。

HeLa 法では、OECD において 2009 年にテストガイドライン (TG455) が成立したアゴニスト試験系に加え、アンタゴニスト試験系をガイドライン化するため、日本、欧州 VITO、韓国 KFDA からの計 5 施設の参加により、Task1 から Task3 まで 3 段階からなるバリデーション試験を実施しており、本研究に

先立つ研究においてアゴニストアッセイを実施する Task1 においては全ての参加施設が評価基準を満たす結果を得ることに成功したが、Task2 におけるアンタゴニストアッセイでは海外 2 施設で評価基準を満たす結果を得ることが出来なかった。本年度は、海外参加施設において示されたアンタゴニスト測定課題解決のための検討を行った。

海外施設のうち、欧州 VITO は *in vitro* 試験経験が豊富であることから測定失敗の原因は技術的な問題ではなく測定に用いる試薬や器具によるものと推定され、それらの影響について検討した結果、培地調整に用いる超純水が測定に影響を与える可能性が示された。一方、韓国 KFDA については測定結果のばらつきなどから技術的な問題が示唆されたため、現地での試験施設査察や技術指導を実施するとともに測定に影響を与える因子について検討するための追加試験を実施した結果、試験施設や測定手技に問題は認められず、その後のリードラボにおける検討から、血清の lot. 及び血清と細胞相性の問題であることが判明した。現在、韓国 KFDA においては、CERI にて調整送付された適合血清 lot. を用いた検討を実施している。

VITO および KFDA ともにアゴニストアッセイでは、基準を満たす測定結果が得られていること、KFDA 訪問時の KFDA、CERI 担当者による測定結果においても、Fold Induction は低いもののアゴニストアッセイの参照物質については性能評価基準を満たす結果が示されていることから、アンタゴニストアッセイはアゴニストアッセイに比べて、十分な細胞の反応性が要求される系であることを示している。アッセイに用いる血清と細胞ロットとの組み合わせが HeLa9903 細胞の反応性に大きく影響することに関して、バリデーションレポートや OECD ガイドライン案作成時には、重要な注意事項として盛り込む必要があると考えられた。一方、国内 3 施設は Task2 をクリアする測定結果が得られたことから、3 施設の Task2 結果をもとに性能評価基準値の更新を行い、更新された基準値に従い Task3 測定を実施した。その結果、コード化合物のアンタゴニスト活性評価結果についての施設間再現性は良いものの 1 施設の試験結果は性能評価基準を逸脱していたため採用することが出来なかった。本試験系の目的である化学物質のアンタゴニスト活性評価に

関しては、施設間、施設内再現性を示しており、他の参加施設の結果を待って、試験結果の採用基準とともに、得られている結果の取り扱いについて再検討するべきであると考察された。

LumiCell 法については、これまでにバリデーション計画のうち Phase II b までの測定が終了しており、本年度は、バリデーション計画における Phase II b 試験の追加測定および Phase III 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おいて日米欧3施設からの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。Phase II b 試験においては、特にアンタゴニスト測定において多くの化合物で 3 施設での評価結果が一致しなかったが、濃度設定試験の見直しにより改善された。しかし、評価結果が一致しない原因の一つとなった細胞毒性の評価法として LumiCell 法では目視評価を採用しており実験者による評価のばらつきが懸念される。この点について現在進行中の Phase III におけるアンタゴニスト測定結果の施設間における評価結果の再現性の解析によりある程度明らかになると考えられる。また、本試験法では、品質評価基準値として各施設の背景値から算出された値を用いているが、そのため多施設で共通の評価基準値がなく、測定回数が増えるごとに基準幅が狭くなってしまふ。また、同じ試験施設でも測定機器が変わった場合には、背景データの再取得が必要となる。今後、ガイドライン化にあたっては品質評価基準値の設定方法について検討の余地があると考察された。

本研究班でバリデーションを進めている HeLa 法、LumiCell 法は、いずれも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試験法であり、その目的や測定原理は同じであるにもかかわらず測定プロトコールは、それぞれ独自に構築されてきたため、特に系の性能評価基準や測定結果の採用評価基準項目が大きく異なるため、OECD ガイドライン化にあたっては、プロトコールの調整も今後の課題となる可能性がある。

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 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、Task2 におけるアンタゴニストアッセイにおいて欧州、韓国の施設で評価基準を満たす結果を得ることが出来ない原因について検討した結果、アッセイに用いる血清と細胞ロットとの組み合わせが HeLa9903 細胞の反応性に影響することが明らかとなり、アッセイに用いる血清と細胞の選択基準等についてバリデーションレポートに記載すると共に、OECD ガイドライン案作成の際にも、本アッセイ実施における注意事項として盛り込む必要があると考えられた。国内 3 施設で実施した Task3 では化合物評価結果の施設間再現性は良いものの 1 施設の試験結果は性能評価基準を逸脱しており、他の参加施設の結果を待って取り扱いを検討することとした。

一方、LumiCell 法については、Phase II b 試験において特にアンタゴニスト測定において多くの化合物で 3 施設での評価結果が一致しなかったが、濃度設定の見直しにより改善された。しかし、本法では評価結果が一致しない原因の一つとなった細胞毒性の評価が目視評価のため実験者による評価のばらつきが懸念されるが、この点について現在進行中の Phase III 試験結果の解析が待たれる。また、本試験法プロトコールでは品質評価基準値として各施設の背景値を用いており、多施設で共通の評価基準値がなく、測定回数が増えるごとに基準幅が狭くなってしまうことについても、今後のガイドライン化においては検討する必要があると結論された。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

Ono A, Takeyoshi M, Bremer S, Jacobs M, Laws S,

Sozu T and Kojima H. "The International Validation Study for The ER alpha STTA Antagonist Assay Using Hela9903." The 7th World congress on alternative & animal use in the life sciences.(Rome, Italy).2009.9

F Deal, P Ceger, D Allen, J Gordon, P. Pazos, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, R Tice, W Stokes. "Testing of Coded Substances for a Multi-phased International Validation Study of an Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Assay." The 7th World congress on alternative & animal use in the life sciences.(Rome, Italy).2009.9

小野 敦, 武吉 正弘, Susanne Bremer, Miriam Jacobs, Susan C. Laws, 寒水 孝司, 小島 肇 "HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体転写活性化試験によるアンタゴニスト検出法の国際バリデーション" 第 22 回日本動物実験代替法学会総会(大阪)2009.11

P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, R Tice, W Stokes. "Testing of Coded Substances in the NICEATM/ECVAM/JaCVAM LUMI-CELL STTA Multiphase International Validation Study." Society of Toxicology 49th Annual meeting (SaltLakeCity, USA). 2010.3.

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: 委託事業実施報告書「内分泌かく乱物質スクリーニング HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲンアンタゴニスト検出法バリデーション試験に関する業務」(財団法人 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)

添付資料 2: DRAFT REPORT: LUMI-CELL ER
VALIDATION STUDY-PHASE II b VER.2

添付資料 3: DRAFT REPORT: LUMI-CELL ER
VALIDATION STUDY-PHASE III VER.2

厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）平成 21 年度分担研究報告書 図表
 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の実施

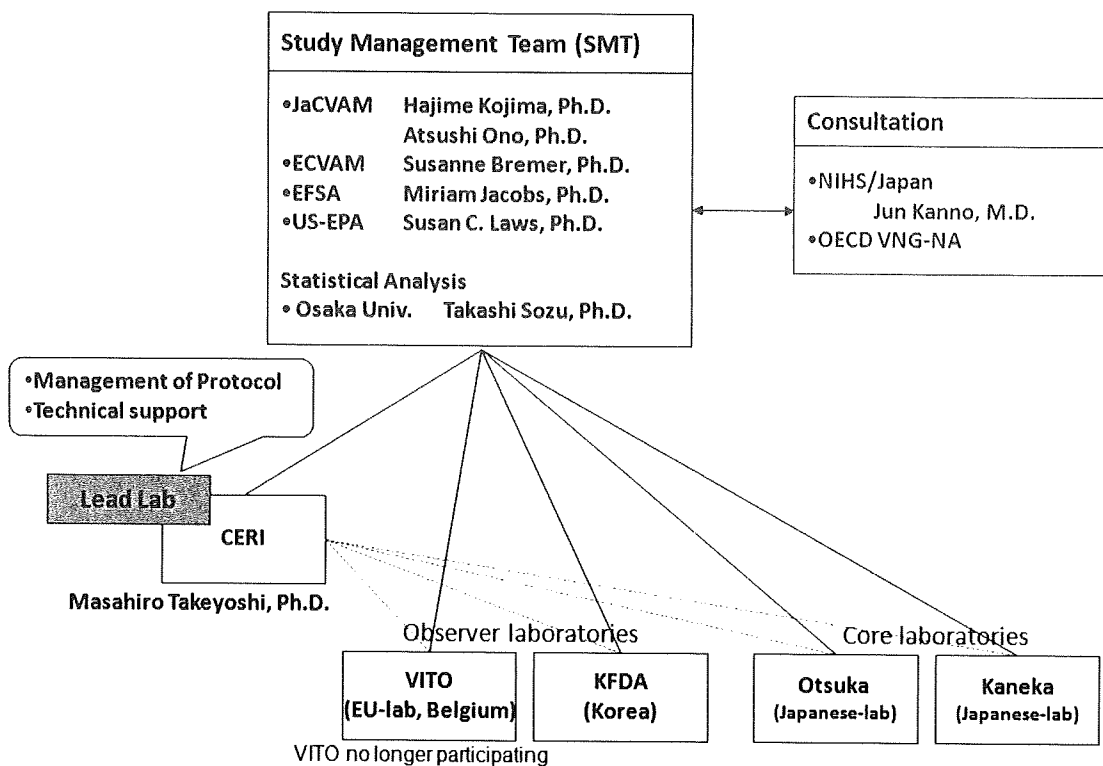


図 1-1 HeLa アンタゴニスト試験バリデーション組織図

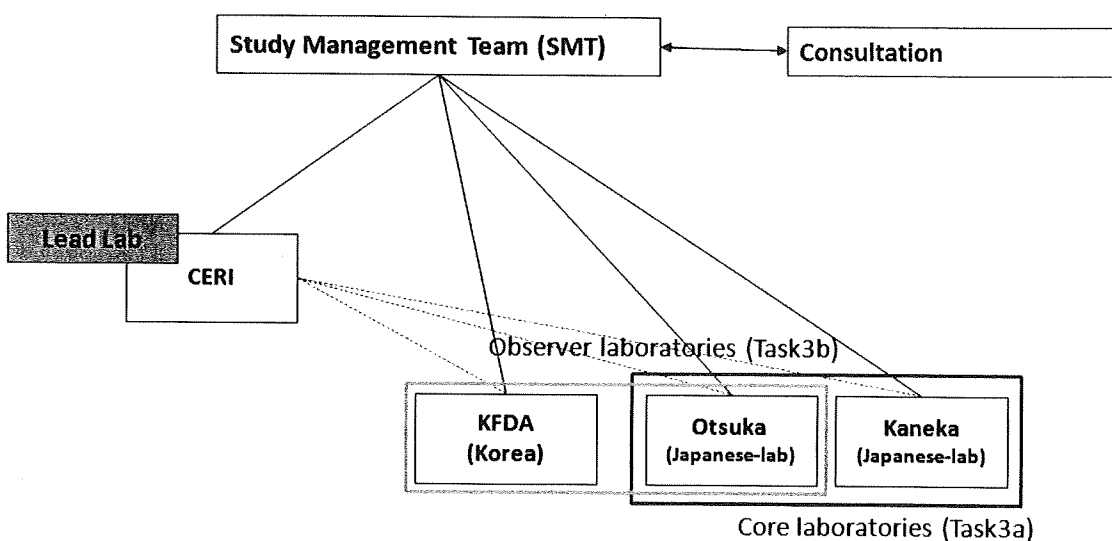


図 1-2 VITO の離脱により変更された HeLa アンタゴニスト試験バリデーション組織図