

第 18 章 BGlLuc 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

表 2 アゴニストアッセイ技術実証物質

Substance	CAS RN [*]	Expected Response [*]	BGlLuc ER TA Mean EC50 (M) ^b	MeSH Chemical Class ^c	Product Class ^d
Ethyl paraben	120-47-8	POS	2.48×10^{-5}	Carboxylic Acid, Phenol	Pharmaceutical, Preservative
Kaempferol	520-18-3	POS	3.99×10^{-6}	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	POS	1.98×10^{-6}	Carboxylic Acid, Ester, Phthalic Acid	Plasticizer, Industrial Chemical
Apigenin	520-36-5	POS	1.85×10^{-6}	Heterocyclic Compound	Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate
Daidzein	486-66-8	POS	8.71×10^{-7}	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Bisphenol A	80-05-7	POS	5.33×10^{-7}	Phenol	Chemical Intermediate, Flame Retardant, Fungicide
Genistein	446-72-0	POS	2.71×10^{-7}	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product, Pharmaceutical
Coumestrol	479-13-0	POS	8.77×10^{-8}	Heterocyclic Compound	Natural Product
17 α -Estradiol	57-91-0	POS	1.54×10^{-9}	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Estrone	53-16-7	POS	2.57×10^{-10}	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	3.34×10^{-11}	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical, Veterinary Agent
17 α -Ethinyl estradiol	57-63-6	POS	7.31×10^{-12}	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Atrazine	1912-24-9	NEG	-	Heterocyclic Compound	Herbicide
Corticosterone	50-22-6	NEG	-	Steroid	Pharmaceutical
Linuron	330-55-2	NEG	-	Urea	Herbicide
Spironolactone	52-01-7	NEG	-	Lactone, Steroid	Pharmaceutical

^{*} : CAS RN : Chemical Abstracts Service Registry Number

^{*} : NEG : negative, POS : positive (LUMI-CELL ER (BGlLuc ER TA) 試験法の Independent Scientific Peer Review Panel Report で報告された ICCVAM コンセンサスデータ)

^b : BGlLuc ER TA バリデーション試験参加施設の平均 EC50 値

^c : 米国国立医学図書館の Medical Subject Headings (MeSH) に基づく分類 (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

^d : 米国国立医学図書館の Hazardous Substances Database に基づく分類 (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

3.6 発光強度の測定

発光強度は、一般的なインジェクター付きのルミノメーターを用いて 300~650 nm の範囲で測定を行う。各ウェルの発光強度は、ウェルあたりの RLU (Relative Light Units) で記録する。

表3 アンタゴニストアッセイ技術実証物質

Substance	CAS RN*	Expected Response ^a	BG1Luc ER TA Mean IC50 (M) ^b	MeSH Chemical Class ^c	Product Class ^d
Tamoxifen	10540-29-1	POS	8.17×10^{-7}	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	2.08×10^{-7}	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
Raloxifene HCl	82640-04-8	POS	1.19×10^{-9}	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
17 α -Ethinyl estradiol	57-63-6	NEG	-	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Apigenin	520-36-5	NEG	-	Heterocyclic Compound	Dye, Natural Product, Intermediate
Chrysin	480-40-0	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Coumestrol	479-13-0	NEG	-	Heterocyclic Compound	Natural Product
Genistein	446-72-0	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product, Pharmaceutical
Kaempferol	520-18-3	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Resveratrol	501-36-0	NEG	-	Hydrocarbon (Cyclic)	Natural Product

* : CAS RN : Chemical Abstracts Service Registry Number

^a : NEG : negative, POS : positive (LUMI-CELL ER (BG1Luc ER TA) 試験法の Independent Scientific Peer Review Panel Report で報告された ICCVAM コンセンサスデータ)

^b : BG1Luc ER TA バリデーション試験参加施設の平均 IC50 値

^c : 米国国立医学図書館の Medical Subject Headings (MeSH) に基づく分類 (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

^d : 米国国立医学図書館の Hazardous Substances Database に基づく分類 (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

3.7 用量設定試験

用量設定試験では、結果をもとに本試験における最大測定濃度および希釈系列の希釈倍率（本試験では、5倍もしくは2倍を用いる）を決定する。

アゴニスト試験、アンタゴニスト試験のいずれにおいても、用量設定試験および本試験それぞれで細胞生存率の評価を行う。細胞生存率の評価は、目視判定によるスコアリング法（3.1.5参照）の他、一般的な定量的評価法を用いることも可能である。目視判定によるスコアが2以上もしくは細胞毒性試験により20%以上の生存率阻害を引き起こす被験物質濃度は、評価に用いない。

3.7.1 プレートデザイン

アゴニストアッセイ、アンタゴニストアッセイそれぞれの用量設定試験における96ウェルプレートのプレートデザインを図1.2に示す。用量設定試験では、1プレートあたり6被験物質の測定が可能である。

3.1.3項で調整した、細胞播種後19~24時間前培養した96ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡で細胞生存率について目視判定を行い、全てのウェルの細胞生存

第 18 章 BGIuc 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

率スコアが1と判定されたプレートのみを測定に用いる。

プロットングペーパーの上にプレートを転倒して、軽く叩きつけてウェルに残った培養液を除去する。

3.2 および 3.3 項で調整したコントロールおよび被験物質を含む EFM を図 1, 2 のプレートデザインに従って、各 200 μ L/ウェルの用量で添加し、細胞への化学物質暴露を行い、インキュベーターで 19~24 時間培養してルシフェラーゼ活性を測定する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-1	TS2-1	TS2-1	TS3-1	TS3-1	TS4-1	TS4-1	TS5-1	TS5-1	TS6-1	TS6-1
B	TS1-2	TS1-2	TS2-2	TS2-2	TS3-2	TS3-2	TS4-2	TS4-2	TS5-2	TS5-2	TS6-2	TS6-2
C	TS1-3	TS1-3	TS2-3	TS2-3	TS3-3	TS3-3	TS4-3	TS4-3	TS5-3	TS5-3	TS6-3	TS6-3
D	TS1-4	TS1-4	TS2-4	TS2-4	TS3-4	TS3-4	TS4-4	TS4-4	TS5-4	TS5-4	TS6-4	TS6-4
E	TS1-5	TS1-5	TS2-5	TS2-5	TS3-5	TS3-5	TS4-5	TS4-5	TS5-5	TS5-5	TS6-5	TS6-5
F	TS1-6	TS1-6	TS2-6	TS2-6	TS3-6	TS3-6	TS4-6	TS4-6	TS5-6	TS5-6	TS6-6	TS6-6
G	TS1-7	TS1-7	TS2-7	TS2-7	TS3-7	TS3-7	TS4-7	TS4-7	TS5-7	TS5-7	TS6-7	TS6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

図 1 アゴニストアッセイ用量設定試験における 96 ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1%v/v EFM.)

E2-1~E2-4* : E2 標準希釈系列

TSx-1~TSx-7* : 被験物質希釈系列 (x は、被験物質番号)

*E2, 被験物質の -以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも -1 が最高濃度、

-2 以下は数字の順に低濃度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-1	TS2-1	TS2-1	TS3-1	TS3-1	TS4-1	TS4-1	TS5-1	TS5-1	TS6-1	TS6-1
B	TS1-2	TS1-2	TS2-2	TS2-2	TS3-2	TS3-2	TS4-2	TS4-2	TS5-2	TS5-2	TS6-2	TS6-2
C	TS1-3	TS1-3	TS2-3	TS2-3	TS3-3	TS3-3	TS4-3	TS4-3	TS5-3	TS5-3	TS6-3	TS6-3
D	TS1-4	TS1-4	TS2-4	TS2-4	TS3-4	TS3-4	TS4-4	TS4-4	TS5-4	TS5-4	TS6-4	TS6-4
E	TS1-5	TS1-5	TS2-5	TS2-5	TS3-5	TS3-5	TS4-5	TS4-5	TS5-5	TS5-5	TS6-5	TS6-5
F	TS1-6	TS1-6	TS2-6	TS2-6	TS3-6	TS3-6	TS4-6	TS4-6	TS5-6	TS5-6	TS6-6	TS6-6
G	TS1-7	TS1-7	TS2-7	TS2-7	TS3-7	TS3-7	TS4-7	TS4-7	TS5-7	TS5-7	TS6-7	TS6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

図 2 アンタゴニストアッセイ用量設定試験における 96 ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1%v/v EFM.)

E2 : E2 コントロール (9.18×10^{-11} M)

Ral-1~Ral-3* : Ral/E2 標準希釈系列

TSx-1~TSx-7* : 被験物質希釈系列 (x は、被験物質番号)

*Ral, 被験物質の -以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも -1 が最高濃度、-2 以下は数字の順に低濃度

**VC 以外の全てのウェルは、E2 9.18×10^{-11} M 共存

3.7.2 アゴニスト用量設定試験の評価

アゴニスト本試験における測定開始（最大）濃度、希釈倍率を以下に従って決定する。

- ・全ての測定濃度においてDMSOコントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える反応（ $\text{mean} + 3\text{SD}$ ）が検出されない場合、本試験では溶解可能な最大濃度を開始濃度として希釈倍率2倍で11濃度の測定を行う。
- ・いずれかの測定濃度においてDMSOコントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える反応（ $\text{mean} + 3\text{SD}$ ）が検出された場合、本試験では用量設定試験で最大反応が検出された濃度の10倍以上高い濃度を測定開始濃度とする。希釈倍率は、用量設定試験結果から、2倍希釈で用量反応曲線を完全にカバー出来ると判断できる場合には2倍、そうでない場合は5倍とする。
- ・用量設定試験で2相性の反応を示した場合、本試験における測定では両方の相を含むように開始濃度および希釈倍率を決定する。

3.7.3 アンタゴニスト用量設定試験の評価

アンタゴニスト本試験における測定開始（最大）濃度、希釈倍率を以下に従って決定する。

- ・全ての測定濃度においてE2コントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える阻害（ $\text{mean} - 3\text{SD}$ ）が検出されない場合、本試験では溶解可能な最大濃度を開始濃度として希釈倍率2倍で11濃度の測定を行う。
- ・いずれかの測定濃度においてE2コントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える阻害（ $\text{mean} - 3\text{SD}$ ）が検出された場合、本試験における開始濃度は、①用量設定試験において最も強い阻害反応が認められた濃度、②最大溶解濃度、③細胞毒性を示す最も低い濃度、のいずれかに従って決定する。希釈倍率は用量設定試験結果から、2倍希釈で用量反応曲線を完全にカバー出来ると判断できる場合には2倍、そうでない場合は5倍とする。

3.8 本試験

アゴニストアッセイ、アンタゴニストアッセイそれぞれの本試験におけるプレートデザインを図3.4に示す。本試験では、96穴プレート1プレートあたり2被験物質の測定が可能である。

3.1.3項で調整した、細胞播種後19~24時間前培養した96ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡で細胞生存率について目視判定を行い、全てのウェルの細胞生存率スコアが1と判定されたプレートのみを測定に用いる。

- ・プロットングペーパーの上にプレートを転倒して、軽く叩きつけてウェルに残った培養液を除去する。

3.2および3.3項で調整したコントロールおよび被験物質を含むEFMを図3.4のプレートデザインに従って、各200 μL /ウェルの用量で添加し、細胞への化学物質暴露を行い、インキュベーターで19~24時間培養してルシフェラーゼ活性を測定する。

第 18 章 BGluc 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
B	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
C	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
D	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	VC
E	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Meth
F	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

図 3 アゴニストアッセイ本試験における 96 ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1% v/v EFM.)
 Meth : p,p'-methoxychlor コントロール
 E2-1~E2-11* : E2 標準希釈系列
 TSx-1~TSx-11* : 被験物質希釈系列 (x は, 被験物質番号)
 *E2, 被験物質の -以降の数字は, 濃度段階を示しており, いずれも -1 が最高濃度, -2 以下は数字の順に低濃度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
B	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
C	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
D	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	VC
E	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Tam
F	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

図 4 アンタゴニストアッセイ本試験における 96 ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1% v/v EFM.)
 E2 : E2 コントロール (9.18×10^{-11} M)
 Tam : Tam/E2 標準液
 Ral-1~Ral-9* : Ral/E2 標準希釈系列
 TSx-1~TSx-11* : 被験物質希釈系列 (x は, 被験物質番号)
 *Ral, 被験物質の -以降の数字は, 濃度段階を示しており, いずれも -1 が最高濃度, -2 以下は数字の順に低濃度
 **VC 以外の全てのウェルは, E2 9.18×10^{-11} M 共存

4 試験結果の採用基準

4.1 アゴニスト用量設定試験

- ・誘導率: 各プレートの誘導率として E2 標準の平均最大 RLU と媒体 (DMSO) コントロールの平均 RLU の比を求める。通常, 誘導率は 5 倍程度となるが, 4 倍以上であれば採用す

る。

- ・DMSO コントロール：媒体コントロール RLU 値は、背景データにおける媒体コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。

※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.2 アゴニスト本試験

用量設定試験の採用基準に加えて下記の基準を満たさなければならない。

- ・E2 標準曲線：E2 標準の濃度反応曲線がシグモイド曲線を示し、3 測定濃度以上が直線領域に含まれること。
- ・Meth 陽性コントロール：Meth コントロールの平均 RLU が、DMSO コントロールの平均値より標準偏差の 3 倍以上高い値であること。

※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.3 アンタゴニスト用量設定試験

- ・阻害率：各プレートの阻害率は、Ral/E2 標準の平均最大 RLU と Ral/E2 標準の平均最小 RLU との比を求める。通常、阻害率は通常 5 倍程度となるが、3 倍以上であれば採用する。
- ・E2 コントロール：E2 コントロール RLU 値は、背景データにおける E2 コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。

- ・DMSO コントロール：媒体コントロール RLU 値は、背景データにおける媒体コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。

※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.4 アンタゴニスト本試験

用量設定試験の採用基準に加えて下記の基準を満たさなければならない。

- ・Ral/E2 標準曲線：Ral/E2 標準の濃度反応曲線がシグモイド曲線を示し、3 測定濃度以上が直線領域に含まれること。
- ・Tam/E2 陽性コントロール：Tam/E2 コントロールの平均 RLU が、E2 コントロールの平均値より標準偏差の 3 倍以上低い値であること。

※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

5 データ解析と陽性（陰性）判定基準

5.1 データ解析

ルミノメーター測定値を解析テンプレートのスプレッドシートに張り付けた後、解析から除外すべきウェルが無いかを確認する。

第18章 BGluc細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

以下には、スプレッドシートを用いた解析の概略を示す。詳細については、本書添付CDのスプレッドシート入力例およびICCVAMウェブサイト^{14,15)}で公開されているプロトコルを参考にする。

5.2 用量設定試験

5.2.1 アゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・被験物質の平均 EC50 値を計算する

5.2.2 アンタゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・Ral/E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・被験物質の平均 IC50 値を計算する

5.3 本試験

5.3.1 アゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・E2 標準および被験物質の平均 EC50 値を計算する
- ・Meth 標準の平均補正 RLU を計算する

5.3.2 アンタゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・Ral/E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・Ral/E2 標準および被験物質の平均 IC50 値を計算する
- ・Tam/E2 標準の平均補正 RLU を計算する
- ・E2 標準の平均値を計算する

5.4 陽性（陰性）判定基準

5.4.1 アゴニストアッセイ

(a) 陽性

- ・ベースラインから正（増加）方向の反応を経て定常状態もしくはピークとなる用量反応曲線を示す被験物質を陽性と判定する。場合によっては、測定濃度範囲に陽性反応の用量反応曲線の一部のみが含まれる物質も陽性と判定する。
- ・反応の直線部分は、ベースラインとなる測定点を除く標準偏差のエラーバーが重ならない3つ以上の測定点を含む。
- ・測定された反応の最大値が基準となるエストロゲンの最大反応の20%以上である。（エストロゲンの最大反応を10000RLUに調整した場合、2000RLU以上の反応が検出されなければならない。）
- ・可能であればEC50値を算出する。

(b) 陰性

- ・全ての測定濃度における補正RLUが、DMSOコントロールの平均RLU値から標準偏差の3倍以内であった場合は陰性と判定する。

(c) 判定不能

- ・測定結果が、陽性・陰性いずれの基準にも適合しない場合には、判定不能として再試験を実施する。

5.4.2 アンタゴニストアッセイ

(a) 陽性

- ・被験物質の用量反応曲線が、ベースラインから負（減少）方向の反応を示す。
- ・反応の直線部分が標準偏差のエラーバーが重ならないベースラインとなる測定点を除く3つ以上の測定点を含む。
- ・基準となるエストロゲンの最大反応（Ral/E2系列の最大反応）の80%以下までの阻害効果が検出される。（エストロゲンの最大反応を10000RLUに調整した場合、8000RLU以下の反応が検出されなければならない。）
- ・細胞毒性を示さない最高被験物質濃度は、 1×10^{-5} M以下でなければならない。
- ・可能であればIC50値を算出する。

(b) 陰性

- ・ 1×10^{-5} M以下の全ての測定濃度における補正RLUがエストロゲンの最大反応の80%以下とならなかった場合は陰性と判断する。

(c) 判定不能

- ・測定結果が、陽性・陰性いずれの基準にも適合しない場合には、判定不能として再試験を実施する。

5.5 EC50/IC50 の算出

陽性反応が検出された場合には、アゴニスト試験における EC50 (50%効果濃度) およびアンタゴニスト試験における IC50 (50%阻害濃度) を測定された濃度反応データから求める。

1 濃度以上で陽性反応を示した被験物質について Hill 式もしくは適切な他の反応モデル式を用いて求める。

Hill 式は、以下に示す被験物質濃度と反応における典型的なシグモイド曲線を表す 4 パラメータのロジスティック数学モデルである。

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

Y : 反応 (すなわち RLU)

X : 対数濃度

B : 最小反応

T : 最大反応

logEC50 (もしくは logIC50) : 50% 反応を示す対数濃度

Hillslope : カーブの傾きを示すパラメータ

測定結果がモデルに最も良く適合する各パラメータを適当な統計ソフトウェア (Graphpad Prism [GraphPad Software, Inc., CA, USA]) 等を用いて計算する。

5.6 はずれ値の判定

EC50/IC50 の算出においては、Qtest等^{14,15)}によるはずれ値の統計学的判断による使用不可のウェルの判定を実施することが推奨される。また、E2 標準に関しては、補正 RLU 値が背景データベースの該当濃度における補正 RLU から 20% 以上逸脱する場合は、はずれ値として解析から除外する。

5.7 結果報告書

結果報告書には、以下の事項を記載する。

被験物質および標準物質 :

- 識別データ (CAS 番号, 製造者, 純度, 既知の不純物, ロット番号など)
- 物理化学的特性 (揮発性, 安定性, 溶解性など)
- 混合物の場合は, 成分や相対比など

細胞 :

- 細胞の供給源
- 解凍時の細胞継代数
- 解凍後の細胞継代数

動物実験代替安全性試験プロトコル集

- 細胞維持のための培養に関する情報

試験条件：

- 細胞毒性データと媒体への溶解限度
- 被験物質の濃度
- 媒体の最終暴露濃度と被験物質添加量
- インキュベーション温度、湿度、CO₂濃度
- 暴露期間
- 被験物質暴露時の細胞密度

試験結果採用基準：

用量設定試験：

- DMSO コントロール RLU 値 (平均値, SD, CV)
- 各プレートの誘導率, 阻害率
- E2 標準の RLU 値 (アンタゴニストアッセイのみ)
- 各プレートの採用・不採用判定結果 (不採用の場合は, 基準を逸脱した項目)

本試験：

- DMSO コントロール RLU 値 (平均値, SD, CV)
- 各プレートの誘導率, 阻害率
- 陽性コントロールの結果
- 標準物質の結果
- E2 標準の RLU 値 (アンタゴニストアッセイのみ)
- 各プレートの採用・不採用判定結果 (不採用の場合は, 基準を逸脱した項目)

結果：

- 発光シグナルの実測定値および補正值
- 本試験における各被験物質の希釈倍率 (1:2 または 1:5)
- 被験物質の陽性・陰性判定結果 (陽性, 陰性もしくは判定不能)
- IC₅₀/EC₅₀ 値 (計算可能な場合)
- 統計的解析 (SEM, SD, CV または 95%CI などのエラー尺度を対象とした統計解析を実施した場合, 解析の対象としたエラー尺度と計算方法などについて記載)

考察：

結論：

6 適用限界

本試験法で評価される、ER を介した転写活性化過程は、内分泌かく乱による健康影響の重要なメカニズムの1つと考えられているが、この他にも重要な内分泌かく乱メカニズム¹⁹⁾が存在し

第18章 BGLuc細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

ており、本試験の結果を直接 *in vivo* に外挿することは出来ない。本試験の結果は、内分泌かく乱による有害健康影響を有する可能性のある化学物質のスクリーニングまたは詳細評価の優先順位付け、もしくは、内分泌かく乱性評価における証拠の重み付けアプローチに使用される。

本試験法では、媒体（DMSO等）に溶解可能な化学物質であれば測定可能であるが、媒体もしくは細胞培地と反応性を有する化学物質や強い細胞毒性物質は測定することは出来ない。

7 その他注意事項

化学発光は、高いS/N比が得られることから様々な測定に用いられている²⁰⁾。本試験では、ホタルルシフェラーゼ酵素を阻害する化学物質やタンパク安定化により発光強度を増強する作用のある化学物質は、測定結果に影響を与える可能性がある²⁰⁾。また、同種の測定系では1 μ M以上の植物エストロゲンによりルシフェラーゼレポーター遺伝子の過活性化により受容体非介在性の発光シグナルが生じることが報告されている^{4,21)}。よって、用量反応曲線の低濃度領域で真の活性が認められた場合であっても、高濃度領域での活性については、植物エストロゲン類似の過活性化や非特異的阻害の可能性について注意深く検討する必要がある²²⁾。

また、本試験法のアンタゴニスト試験では、バリデーション試験において高濃度領域でのルシフェラーゼ活性の非特異的阻害が認められた¹²⁾ことから、本試験法で評価可能な被験物質最大濃度は、媒体への溶解性が良好かつ細胞毒性が認められない場合、アゴニスト試験では1 mg/mL（約1 mM）、アンタゴニスト試験では20 μ g/mL（約10 μ M）である。

【参考文献】

- 1) OECD, Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD, Paris (2011)
- 2) E. Sonneveld *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **89**, 173 (2006)
- 3) JM. Rogers *et al.*, *In Vitro Mol. Toxicol.*, **13**, 67 (2000)
- 4) A. Escande *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1459 (2006)
- 5) J-A. Gustafsson, *Journal of Endocrinology*, **163**, 379 (1999)
- 6) S. Ogawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 122 (1998)
- 7) E. Enmark *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 4258 (1997)
- 8) M. Takeyoshi *et al.*, *Toxicology Letters*, **126**, 91 (2002)
- 9) P. Pujol *et al.*, *Cancer Res.*, **58**, 5367 (1998)
- 10) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/BGLucER-TA-TMER-Combined.pdf
- 11) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 457, OECD Publishing, Paris (2012)
- 12) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/ERTA-TMER.htm>
- 13) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB1-AgonProtocol.pdf
- 14) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB2-AntagProtocol.pdf

動物実験代替安全性試験プロトコル集

- 15) M. Balls *et al.*, *ALTEX*, 23 (Suppl), 270 (2006)
- 16) S. Coecke *et al.*, *Altern. Lab. Anim.*, 33, 261 (2005)
- 17) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/BG1Luc/AnnexG/1-CellViabMan.pdf>
- 18) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/BG1Luc/AnnexG/2-CytotoxReport.pdf>
- 19) MM. Tabb, B. Blumberg, *Mol. Endocrinol.*, 20, 475 (2006)
- 20) N. Thorne *et al.*, *Chemistry and Biology*, 17, 646 (2010)
- 21) GG. Kuiper *et al.*, *Endocrinology*, 139, 4252 (1998)
- 22) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 455, OECD Publishing, Paris (2009)

第3章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価

小野 敦*

1 はじめに：化学物質の内分泌かく乱性の *in silico* 評価を 取り巻く状況

1990年代に入り、環境中に放出された様々な化学物質が野生生物やヒトの内分泌系をかく乱することによる有害影響（毒性）を示唆する報告が相次いだことなどから1996年に内分泌かく乱化学物質に関する初めての国際会議（Weybridge会議）が開催され、内分泌かく乱物質に対する国際的な研究戦略が提案された¹⁾。その後、世界保健機構・国際化学物質安全計画（WHO・IPCS）により、内分泌かく乱化学物質は「内分泌系の機能を変化させることにより、健全な生物個体やその子孫、あるいは集団（またはその一部）の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と定義されている²⁾。

EUの化学物質規制であるREACHでは、内分泌かく乱性を発がん性、変異原性及び生殖発生毒性とならぶ高懸念物質（SVHC）の判断基準としており、2011年には内分泌かく乱性のために懸念のある初めての化学物質としてオクチルフェノールをSVHC候補リストに掲載した³⁾。また、米国EPAでは「内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会」（EDSTAC）の勧告⁴⁾に基づき、2段階（Tier 1, 2）からなる内分泌かく乱スクリーニングプログラム（EDSP）により、2009年に農薬を中心とした第1次リスト掲載の67化学物質を対象にTier 1試験命令の発出を行い⁵⁾、2013年には、109化合物からなる第2次リストを公開した⁶⁾。

内分泌系は、生殖機能を始め免疫機能や脳機能等様々な生理的活動の調節に関わっていることから、内分泌かく乱により想定される有害影響⁷⁾は多岐にわたる上、それらの有害影響は従来の試験法では検出が困難である。そのため、既に市場に出回っている数万種の化学物質すべてについて改めて評価が必要であるとされており、コンピュータによる予測法、いわゆる *in silico* 手法の活用が期待されている。EU REACHでは、評価にあたっては *in vitro* 試験法とあわせて *in silico* 手法の利用を促進しており、米国EPAではEDSPにおけるTier 1スクリーニングの対象物質の優先順位付けに *in silico* 手法を用いている。我が国においては、詳細試験法が確立されていない事などから、現在のところ内分泌かく乱性の観点からの化学物質規制は行われていないが、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書追補その2において示された試験スキームにおける詳細試験実施の優先順位付けのためのスクリーニング試験法の一つとして *in silico* 試験法が挙げられている⁸⁾。OECD（経済協力開発機構）では、1998年に

* Atsushi Ono 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

重点活動項目の1つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび詳細試験のテストガイドラインの整備を開始した。スクリーニングから確定試験までに有用と考えられる試験法を5レベルからなる“内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質の試験および評価に関する OECD 概念枠組み”として整理し（2011年に3レベルに再整理された）、各レベルにおける試験法のガイドラインの整備を進めている⁹⁾。*In silico*手法は、そのうち既存情報の収集等とともに、レベル2以降の試験実施の必要性を検討するための手段としてレベル1に位置づけられている。

2 化学物質による内分泌かく乱性の *in silico* 評価

内分泌かく乱化学物質の暴露によりヒトで起こり得ると想定されている有害影響は、生殖発生毒性を始め、神経発達、発がん、免疫系疾患、骨障害、代謝障害など多様である³⁾。しかも、それぞれの障害は、内分泌かく乱以外のメカニズムでも起こり得るため、内分泌かく乱性とヒトにおける障害の因果関係が完全に証明された化学物質は限られており、内分泌かく乱による有害影響そのものを *in silico* 予測することは、ほぼ不可能である。内分泌かく乱影響に限らずヒトにおける障害や毒性試験で検出されるフェノタイプは、いずれも様々なメカニズムによる生体反応の結果として示される現象であり、*in vivo* フェノタイプそのものの *in silico* 予測の信頼性は、作用既知の構造類似物質からのリードアクロスによる方法以外ではあまり高くない。

一方、化学物質による内分泌かく乱のメカニズムのうち最も重要と考えられている作用はホルモン受容体を介した作用である。エストロゲンを始めとした性ホルモンは、受容体を介して様々な生体反応を調節している。ホルモン受容体は核内受容体であり、リガンド結合によりターゲット遺伝子の転写活性を調節することで細胞の成長・分化・代謝などを調節している¹⁰⁾。核内受容体は、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、およびコルチコステロイドなど各種ステロイドホルモン受容体を始め、レチノイン酸、甲状腺ホルモン、ビタミンDおよびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体など100種以上からなるスーパーファミリーを構成している¹¹⁾。

ホルモン受容体に結合する性質を有する化学物質は、生体内でホルモン様作用もしくはホルモン作用を阻害して正常なホルモンシグナルをかく乱することで有害作用を発現すると考えられている。さらに、核内受容体を介した作用は、多段階の遺伝子発現の変動を惹起することにより理論的には、たとえ数分子の化学物質であってもその作用を発現することが可能であることから、従来の試験法では有害性が検出されない低用量の化学物質暴露によっても有害影響を発現する可能性が指摘されている。これまでの研究から、特にエストロゲン受容体には非常に多くの化学物質が結合することが示されているが、それら化学物質の構造は多岐にわたる。

核内受容体は、内分泌かく乱性だけでなく創薬ターゲットとしても重要であり、結合活性を有する化合物のスクリーニング手段として様々な *in silico* 手法の研究が行われている。それらの *in silico* 手法は、化学物質の受容体への結合活性を評価するものであり、生体内における有害作

第3章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価

用の有無を判定することは出来ないため、厳密には内分泌かく乱性の評価モデルとは言えない。しかし、受容体を介した内分泌かく乱ポテンシャルの有無を評価することにより、詳細試験のための優先順位付けを行う目的やエビデンスの重み付けアプローチを補強する目的においては、内分泌かく乱性の評価法として有用である。

3 エストロゲン受容体結合の *in silico* 評価法

生物活性の *in silico* 予測は、化学物質の生物学的活性を含む性質がその物質固有の性質によって説明可能であり、従って化学構造からの予測や既知の類似化合物の活性からの推定が可能であるとの前提に立っている¹²⁾。化学構造からの生物活性の予測手法には、分子記述子を用いた定量的構造活性相関 (QSAR) 及び構造活性相関 (SAR) モデルを始め、特定の部分構造から活性の有無を判定するアラートシステムや複数の判断基準を組み合わせたエキスパートシステム、類似化学構造のグルーピングによるリードアクロス等の方法があるが、いずれも既知情報を基にした経験的な判断に基づくものである。そのため、予測の信頼性や適用性は予測モデルやアラート構築に用いられた化学構造の数と生物活性の情報の質に依存する。さらには、十分な情報の無いエンドポイントにはモデル構築そのものが出来ない。

内分泌かく乱性に関しては、全てのホルモン受容体 (核内受容体) がターゲットとなり得る。しかしながら、エストロゲン受容体 (ER) については非常に多くの *in silico* 予測の報告があるのに対し、その他の受容体についての報告はあまり多くない。これは、ER が内分泌かく乱のターゲットとして特に重要と考えられているためでもあるが、その他のホルモン受容体については、*in silico* 解析に利用可能な情報、すなわち受容体への結合が報告されている化学物質が ER に比べ少ないためでもある。これまでに ER 結合の *in silico* 予測には様々な手法を用いた報告があるが、以下では、リガンドの受容体への結合が鍵と鍵穴のような関係にあるという特徴を利用した2種の手法を紹介する。その他の報告や予測に利用可能な市販ソフトウェアについては、欧州委員会共同研究センター (JRC: Joint Research Center) より詳細なレビューが公表されているのでそちらを参照するとよい¹³⁻¹⁵⁾。

3.1 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

CoMFA は、分子の立体構造を直接反映した QSAR 解析を行うために開発された QSAR 計算手法である¹⁶⁾。CoMFA では活性分子の3次元構造を重ね合わせた後、各分子の立体及び静電ポテンシャルから CoMFA フィールドと呼ばれる3次元構造記述子を求め、さらに CoMFA フィールドと各分子の活性値との関係を PLS (Partial Least Square) 法¹⁶⁾により統計解析して、活性予測式を構築して活性予測を行う。CoMFA 解析では、単に活性予測を行うだけでなく、リガンド側からの結合部位の構造予測や活性の高い化学物質に要求される置換基の立体的、静電的性質などを解析することが可能である。CoMFA を用いた ER 結合化学物質の解析の結果、エスト

ラジオールの3位と17β位の-OH基の陰性電荷がERへの強い結合に重要であることが示されている¹⁷⁾。注意すべき点として、CoMFA解析における分子の重ね合わせには幾つかの手法があるが、手法の選択は主観的であり、CoMFAによるQSAR予測は、重ね合わせに用いた分子構造及び分子の重ね合わせ手法の影響を受けやすいことが挙げられる。

3.2 3次元ドッキングモデル

ERのリガンド結合部位については、3次元結晶構造¹⁸⁾が報告されていることから、リガンド結合ポケット構造を基にした3次元ドッキングモデル^{19, 20)}が報告されている。3次元ドッキングモデルは受容体構造を基に構築されるため、前述のCoMFAや古典的QSAR手法と比較してモデル構築に用いた化学物質構造の制約を受けにくく、多岐にわたる構造に適用可能である。以下では、3次元ドッキングモデルの予測精度を示す例として、著者らが分子設計研究所と共同で板井らの開発した手法を用いて構築したER 3次元ドッキングモデル²⁰⁾の予測精度について検討した結果を示す。

図1は、*in vitro*試験データ（ER結合試験及びERレポーター試験）の入手が可能な化学物質について、3次元ドッキングモデルで予測された活性値と実際の試験結果の陽性・陰性判定の比較を行ったROC解析（Receiver Operating Characteristic Analysis）の結果である。ER結合試験及びERレポーター試験の結果については、化学物質総合情報提供システム（CHRIP：Chemical Risk Information Platform）²¹⁾公開データ及び独自に測定したデータを解析に用いた。また、3次元ドッキングモデル自体はER結合活性を評価するものであるが、ER結合試験（ERレポーター試験についても同様）にはある程度の実験エラーが想定されることから、ERレポー

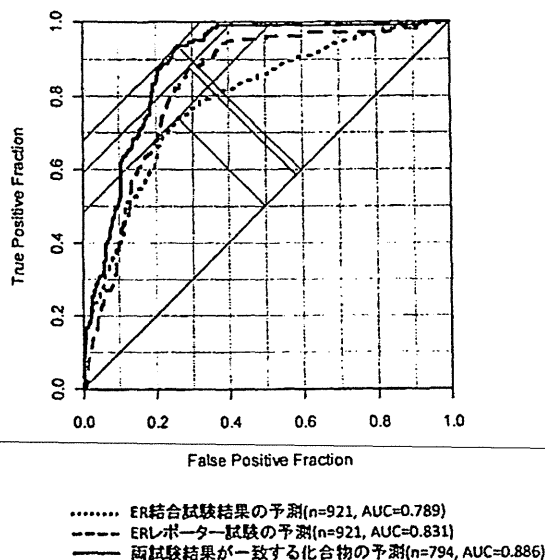


図1 3次元ドッキングモデルによるER結合活性予測精度の検証

第3章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価

ター試験についても併せて評価を行い、さらに両試験の結果が一致する化合物を真の陽性・陰性物質と仮定して判定した結果についても示した。ER 結合試験もしくは ER レポーター試験のみを判定対象とした場合には、真陽性率（縦軸）は 100% とはならないが、両試験の結果が一致する化合物のみを判定対象とした場合、 $AUC=0.886$ となり、偽陽性率=0.4 程度を許容すれば、ほぼ 100% の陽性化合物の抽出が可能であることを示している。スクリーニング目的においては偽陰性を極力排除出来ることが望ましく、結果は 3 次元ドッキングモデルの有用性を示している。

4 OECD QSAR Toolbox による ER 結合プロファイリング

文献等で報告されている *in silico* 手法の多くは、市販ソフトウェアを用いる場合が多い。それらの手法を利用するには市販ソフトウェアの購入が必要な上に、モデル構築に必要な全ての条件が示されていない場合も多く、予測モデルそのものがソフトウェアとともに市販されている場合を除き、同じモデルを再現するのは難しい。

OECD では、加盟各国の規制機関や関係者が共通に利用可能な *in silico* 安全性評価プラットフォームとして OECD QSAR Toolbox (OECD TB)²²⁾ の開発を進めている。OECD TB には、各国から提供された化学物質の化学構造情報や毒性情報とともに、加盟各国からの専門家によって構成される OECD TB マネージメントグループにより化学物質の安全性評価に有用であると判断された各種ツールが搭載されており、無償で提供されている。現在、配布されているバージョン (OECD TB ver3.1) では、内分泌かく乱関連のツールとして ER 結合プロファイラーが利用可能である。この ER 結合プロファイラーは、米国 EPA において前述の EDSP における Tire 1 対象物質の優先順位付けのために開発された ER 結合評価のためのエキスパートシステムを基にしており、OECD で実施された第 3 者レビュー会議²³⁾ 及び米国 EPA の科学専門委員会 (SAP: Scientific Advisory Panel)²⁴⁾ においてその有用性が評価されている。OECD TB の詳細については、前章に譲るが、以下では OECD TB の ER 結合プロファイラーを用いた解析例を紹介する。

米国 FDA・NCTR で測定された 232 化合物に関するラット子宮サイトゾールを用いた ER 結合結合試験の結果について、米国 EPA の Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database²⁵⁾ より化学構造ファイル (SD ファイル) を入手して ER 結合プロファイラーにより評価した結果を表 1 に示す。オリジナルの ER 結合エキスパートシステムは化学構造に関する多段階の質問項目からなる決定木型の評価モデルである。OECD TB では、そのうち ER 結合性が予測される構造的特徴が個別のアラートとして示されるが、結果ではいずれかのアラートが示された化学物質を全てアラート有りとしている。一方、いずれのアラート構造も有しない化学物質については、OECD TB では “No alert found” と示されるが、これはアラートを有しないということであり、ER 結合活性が陰性と判定されたわけではない。また、オリジナルのエキスパートモデルでは、OECD TB で “No alert found” となる物質の一部は “No binder” と判定されるが、大半は、 “Needs testing” と判定されることに注意が必要である。

表1 OECD QSAR ToolboxによるER結合プロファイリング結果とER結合試験結果の比較

		ER結合試験結果		
		active	inactive	inconclusive
ER expert system (OECD QSAR Toolbox)	アラート有り	39	17	5
	アラート無し	92	76	3

結果として、いずれかのアラートが有ると判定された化合物の約6割については、実験的にもER結合活性が認められているのに対し、“アラート無し”と判定された化学物質でも半数以上でER結合活性が認められている。現在の米国EPAのER結合エキスパートモデルは、抗菌剤211物質及び農薬成分393物質のニジマスER結合試験結果をもとに構築されているが、適用可能な化学構造の範囲が限られている。エキスパートシステムは、新たな決定木を追加することで比較的簡単に予測ルールの拡張が可能であり、今後、新たな知見を加えたモデルの拡張が期待される。

5 おわりに

内分泌かく乱性に限らず化学物質規制における*in silico*評価手法の利用については各国で検討が進められているものの、現時点では、その利用は詳細評価を行う化学物質の優先順位付け等に限られている。*In silico*手法のリスク評価そのものにおける実用化のためには、予測モデルの信頼性の向上はもとより、評価対象物質に対して得られた予測結果の信頼性の判断基準の設定やモデルの信頼性（偽陽性率、偽陰性率）に応じた予測結果の取り扱い、さらには*in vitro*評価法との組み合わせなど、安全性評価における新たな評価スキームの構築が望まれる。

文 献

- 1) EC : European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife (1996)
- 2) WHO/IPCS : Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors (2002)
- 3) ECHA : SVHC support document- 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenol, 4-tert-octylphenol (2011)
- 4) EDSTAC : Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, Final Report, Volume I-II (1998)
- 5) *Federal Register*, 74(71), 17477 (2009)
- 6) *Federal Register*, 78(115), 35922 (2013)

第3章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価

- 7) WHO : State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals (2012)
- 8) 厚生労働省 : 「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書追補その2, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/03/s0331-9.html>
- 9) OECD GD No.150 : Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (2012)
- 10) A. M. Brzozowski *et al.*, *Nature*, 389, 753 (1997)
- 11) M. Robinson-Rechavi *et al.*, *J. Cell Sci.*, 116, 585 (2003)
- 12) M. Johnson and G.M. Maggiora, *Concepts and Applications of Molecular Similarity*, Wiley, New York (1990)
- 13) Benfenati *et al.*, Validation of Selected, Non-Commercial (Q) SAR Models for Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding (2005)
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Final_report_Mario_Negri.pdf
- 14) E. Lo Piparo and A. Worth, : Review of QSAR Models and Software Tools for predicting Developmental and Reproductive Toxicity (2010)
http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14815/1/eur_24522_en.pdf
- 15) M. Fuat Gatnik and A. Worth, Review of Software Tools for Toxicity Prediction (2010)
http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14817/1/reqno_jrc59685_software_tools_for_toxicity_prediction%5b1%5d.pdf
- 16) R. D. Cramer *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5959 (1988)
- 17) L. M. Shi *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41, 186 (2001)
- 18) A. M. Brzozowski *et al.*, *Nature*, 389, 753 (1997)
- 19) R. D. Head *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 3959 (1996)
- 20) M. Y. Mizutani *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 60, 183 (2012)
- 21) 化学物質総合情報提供システム (CHRIP) : <http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>
- 22) OECD QSAR Toolbox :
<http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>
- 23) OECD Series on Testing and Assessment No. 111 : Report of the Expert Consultation to Evaluate an Estrogen Receptor Binding Affinity Model for Hazard Identification (2009)
- 24) U. S. EPA, SAP : Integrated Approaches to Testing and Assessment Strategies: Use of New Computational and Molecular Tools (2011)
<http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2011/may/052411minutes.pdf>
- 25) EPA DSSTox : <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/>

Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases

Akira Sassa,^{1,2} Nagisa Kamoshita¹, Tomonari Matsuda³,
Yuji Ishii⁴, Isao Kuraoka⁵, Takehiko Nohmi¹,
Toshihiro Ohta², Masamitsu Honma¹ and
Manabu Yasui^{1,*}

¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan, ²School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji-shi, Tokyo 192–0392, Japan, ³Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University, Otsu, Shiga 520–0811, Japan, ⁴Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan, ⁵Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560–8531, Japan.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-3-3700-1141 (ex. 434); Fax: +81-3-3700-2348; Email: m-yasui@nihs.go.jp

Received on June 15, 2012; revised on July 14, 2012; accepted on August 3, 2012

Many chronic inflammatory conditions are associated with an increased risk of cancer development. At the site of inflammation, cellular DNA is damaged by hypochlorous acid (HOCl), a potent oxidant generated by myeloperoxidase. 8-Chloro-2'-deoxyguanosine (8-Cl-dG) is a major DNA adduct formed by HOCl and has been detected from the liver DNA and urine of rats administered lipopolysaccharide in an inflammation model. Thus, the 8-Cl-dG lesion may be associated with the carcinogenesis of inflamed tissues. In this study, we explored the miscoding properties of the 8-Cl-dG adduct generated by human DNA polymerases (pols). Site-specifically modified oligodeoxynucleotide containing a single 8-Cl-dG was prepared and used as a template in primer extension reactions catalysed by human pol α , κ or η . Primer extension reactions catalysed by pol α and κ in the presence of all four dNTPs were slightly retarded at the 8-Cl-dG site, while pol η readily bypassed the lesion. The fully extended products were analysed to quantify the miscoding frequency and specificity of 8-Cl-dG using two-phased polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). During the primer extension reaction in the presence of four dNTPs, pol κ promoted one-base deletion (6.4%), accompanied by the misincorporation of 2'-deoxyguanosine monophosphate (5.5%), dAMP (3.7%), and dTMP (3.5%) opposite the lesion. Pol α and η , on the other hand, exclusively incorporated dCMP opposite the lesion. The steady-state kinetic studies supported the results obtained from the two-phased PAGE assay. These results indicate that 8-Cl-dG is a mutagenic lesion; the miscoding frequency and specificity varies depending on the DNA polymerase used. Thus, HOCl-induced 8-Cl-dG adduct may be involved in inflammation-driven carcinogenesis.

Introduction

Chronic infection by bacteria, virus or other microbes and subsequent inflammation have been implicated as risk factors for cancer development (1–3). In tissues with inflammation, phagocytic neutrophils, monocytes and macrophages secrete the heme protein myeloperoxidase (MPO), which generates the reactive oxidants

such as hypobromous acid and hypochlorous acid (HOCl) (4–8). These oxidants are important for host defense by oxidizing cellular constituents of invading microorganisms (9). Such highly reactive oxidants, however, can damage host tissues, as well as pathogens, and may lead to mutagenesis and carcinogenesis.

When neutrophils contact with a pathogen, it produces a respiratory burst characterised by intense uptake of oxygen. Most of the produced superoxide ($O_2^{\cdot-}$) is rapidly converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) spontaneously or by superoxide dismutase (10). MPO released by neutrophils utilises H_2O_2 to oxidise chloride at plasma concentrations of halide (Cl^- , 100 mM; Br^- , 20–100 μ M; I^- <1 μ M), resulting in the formation of the proinflammatory oxidant HOCl [Equation (1)] (6–8).



HOCl has been recognised for the ability to kill the pathogens by its strong oxidizing potential. This cytotoxic oxidant also induces significant increase in the cellular damage reflected by lipid peroxidation (11), protein oxidation (12–14) and DNA damage (15–17). 5-Chloro-2'-deoxyuridine (5-Cl-dU) is produced by MPO system in human inflammatory tissue (18–20). The accumulation of 5-Cl-dU has been shown to cause mutations, such as T:A \rightarrow C:G transition, and the sister chromatid exchange (21,22). HOCl is known to react with DNA to form 5-chloro-2'-deoxycytidine (16,23,24), which could potentially perturb epigenetic signals by mimicking 5-methylcytosine at the promoter region (25,26). 8-chloro-2'-deoxyadenosine (8-Cl-dA) and 8-chloro-2'-deoxyguanosine (8-Cl-dG) also have been identified in the reaction with HOCl (23). Recently, 8-Cl-dG has been detected from the hepatic DNA of lipopolysaccharide (LPS)-treated rats and the urine of hepatocellular carcinoma patients (27). Thus, 8-Cl-dG adduct may enhance genetic alterations, resulting in carcinogenesis at the inflammation sites.

Oligodeoxynucleotides site-specifically modified with 8-Cl-dG have been used as DNA templates for investigating the miscoding properties using bacterial DNA polymerases (pols), Klenow fragment of *E. coli* and the large fragment of DNA polymerase I of *Bacillus stearothermophilus* (28). Based on the previous report, both pols preferentially incorporated 2'-deoxycytidine monophosphate (dCMP), the correct base, opposite 8-Cl-dG; the miscoding events were investigated qualitatively by primer extension reactions in the presence of a single dNTP. No quantitative analysis, therefore, has been used for exploring miscoding events generated by 8-Cl-dG adduct using human DNA pols in the presence of all four dNTPs.

We present here the quantitative determination of miscoding specificities and frequencies occurring opposite the 8-Cl-dG lesion during *in vitro* DNA replication catalysed by human DNA pol α , κ and η using a two-phased gel electrophoresis methodology that can quantify base substitutions and deletions (29–31). Pol α is essential for chromosomal replication in human tissues. Pol κ and η are involved in potentially mutagenic translesion synthesis of various DNA adducts (32–37), which may be strongly associated to mutagenesis and tumorigenesis in human cells. In addition,