

LUMI-cell ER アッセイ法の国際的バリデーション(第二報)

中村 昌文¹、半田洋士¹、小野敦²、小島肇²

¹ 株式会社 日吉、² 国立医薬品食品衛生研究所

既存および新規化学物質は極めて多くあり、それらの安全性評価を速やかに行う必要がある。しかし、それらを従来の動物を用いる安全性試験法で評価するのは時間がかかるだけでなく、経済性や研究資源の配分、動物福祉の面から問題であり、効率的かつ倫理的な新規試験法が求められ、多くの方法が開発されている。本研究では我が国および欧米で開発された安全性試験法の内、化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある方法について、欧米の研究機関と協力して検討し、国際的に受け入れられる方法を確立することを目的として、米国 ICCVAM および欧州 ECVAM と共同による国際バリデーションを実施して有用性について検証を行っている。内分泌かく乱化学物質の *in vitro* の検索方法であるレポーターアッセイ試験系の国際バリデーションにおいて、米国 XDS 社により開発されたヒト卵巣がん細胞 (BG1Luc4E2 細胞) にルシフェラーゼ遺伝子を導入した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 Lumi-cell ER 法のバリデーション試験測定を実施を行い、Phase II までを報告する。アゴニスト作用は、対照物質 17 β -estradiol(以下、E2)を被検液、アンタゴニスト作用は Raloxifene 及び E2(以下、Ral/E2)を被検液として、RPMI 培地及び DMEM 培地で培養・播種したプレートにて暴露後の活性を評価する方法である。精度管理試料として、アゴニスト作用は、Methoxychlor をコントロール 1、アンタゴニスト作用は、E2 をコントロール 1、Flavone 及び E2(以下、Fl/E2)をコントロール 2 を各プレートに入れた。

Phase I では、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の試験を用いて、Lumi-cell ER アッセイの熟練度合いを示し、ラボ内の繰り返し性及びラボ内・ラボ間の再現性を示し、個々の実験を行って(アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコルそれぞれ 10 回)経歴データベースを作成した。

Phase II では、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に加えて、被検試薬を用いて、個々の実験を行って(それぞれ 3 回)経歴データベースを作成した。

本試験では、採用基準が細かく設定され、アゴニストでは、DMSO コントロール、標準(E2)の EC₅₀、Induction(E2÷DMSO 比)、コントロールの各範囲、アンタゴニストでは、DMSO コントロール、標準(Ral/E2)の IC₅₀、Reduction(Ral/E2÷DMSO 比)、コントロール 1 及び 2 の各範囲を各ラボで作成する必要であった。

Phase I ~ II の結果より、問題となった点として、1) 細胞の継代数 50 代までの使用期限を 25 代までの継代数の少ない細胞使用を行うことで、突発的な活性などを極力軽減させばらつきを無くすことが必要である。2) アッセイデータでの採用基準(Criteria)が個別ラボでの指標であり、測定をするたびに変動をしていくため、今後複数ラボでの共通化を図ることが必要である。今後、上記の件を検証しながら Phase III では、全 80 物質(アゴニスト試験 40 物質、アンタゴニスト試験 40 物質)の試験を 1 回の測定試験を行う予定であり、次回報告したい。

International validation study program for LUMI CELL ER Assay (second report)

Masafumi Nakamura¹, Hiroshi Handa¹, Atsushi Ono², Hajime Kojima²

¹Hiyoshi Corporation, ²National Institute of Health Sciences

There are so many kinds of known and new chemical substances in the environment and immediate safety evaluation is being required. However it takes time to do the safety evaluation by traditional safety testing method using animals and also there are other problems such as economical or research resource, and animal welfare aspect. Hence more efficient and ethical new method is required and many methods are being developed. In this study, among safety testing methods developed in Japan and Europe or in USA, a safety testing method for chemical substances which can be selected as official testing method was selected and international evaluation were performed with US ICCVA and EU ECVAM to establish a method which can be internationally accepted.

Followings were the problems from the result of the Phase I and II of the study. 1) It is necessary to decrease possible accidental cell activity and eliminate variability by limiting the cell subculture time from 50 times to 25 times. 2) Criteria using the assay data are indicator for each individual laboratory and it changes as analysis time increase. Therefore it is necessary to set common criteria for multiple laboratories. In the Phase III, while evaluating above points we will perform test for 80 substances, 40 agonist and 40 antagonist and hope to report the result in the next occasion.