

施出来る上、通常の細胞毒性検出法では評価が難しい被験物質によるルシフェラーゼ発光への影響をすることが可能であるという利点を有する。本試験系については、本研究班開始以前に CERI が中心となって国内 3 施設の参加によりバリデーション試験が実施されており、本研究班では既に実施済みのバリデーション結果を基にしたバリデーションレポート及び OECD ガイドライン案を昨年度 OECD に提出した。今年度は OECD ピアレビューコメントへの対応及びピアレビューで要求された追加バリデーション試験について、その実施計画を検討した。

## C. 研究結果

### 1. HeLa 法：

#### 1. 1 進捗状況

昨年度までの研究により、バリデーション開始当初の参加 5 施設及び新たに参加した 1 施設（日吉）の全てが、タスク 1（アゴニスト試験）においてクライテリアを満たすデータの取得に成功した。しかし、本研究の目的であるアンタゴニスト試験では、海外施設のうち ECVAM から委託により参加していた VITO は、バリデーション試験が当初予定より遅れたため契約期間の終了に伴い測定の継続が困難となり、また、KFDA は当初の技術的な問題点がほぼ解決し、Task2 実施可能な状況となったもののやはりスケジュールの延長等に伴い測定継続が困難となりタスク 2 完了前にバリデーション試験から撤退した。一方、リードラボ（CERI）及び国内参加施設の大塚製薬は、タスク 3 までの全ての測定においてクライテリアを満たすデータを取得して試験を終了した。残る国内参加施設の一つであるカネカは、Task3 までの予定していた全ての測定を一度終了したものの、データ解析の結果、一部の結果においてリファレンスプレートがクライテリアを満たしていないことから、再測定が必要であることが判明したものの、カネカが *in vitro* 事業から撤退したため追加の測定は不可能となった。OECD GD34 に定めるバリデーション要件を満たすためには、さらに最低 1 施設における測定結果が必要であるとの判断から、Lumi-Cell 法バリデーション参加施設であった株式会社日吉にバリデーションへの参加を打診し、新たに参加施設として昨年度より測定を開始し、上述のごとく Task1（アゴニスト測定）を完了し、Task2 に移行した。日吉の Task2 測定では、国内 3 施設の Task2 データを基にした暫定クライテリアを使用した。測定結果は、当初、多くの項目でクライテリアを逸脱しており、継代における問題などが示唆されたためその改善について検討した結果、最終的に一部のクライテリアを逸脱するも

の再現性の高い 5 回測定結果が得られたことから、許容されるべき範囲の施設間誤差と判断し、これらのデータを採用して Task2 を終了した。採用された 5 測定結果を反映してクライテリアを更新し、また、検討により明らかになった継代における注意点をプロトコルに追加した。アップデートされたプロトコル及びクライテリアについて SMT の合意が得られたことから、これらに従い日吉における Task3 を実施することとなった。

#### 1. 2 日吉における Task3 測定

日吉における Task3 測定では、リファレンスプレートの測定は、濃度決定試験を含む合計 5 測定が実施され、1 回目（濃度決定試験）を除いて、2 回目以降の結果では、いずれの測定結果でも共通する項目（OHT の IC30 及び RU486 の IC30,IC50）でクライテリアを逸脱した（表 1）。一方、表 2 には、コード化合物の判定結果を既に Task3 が終了している 2 施設と比較して示す。日吉の測定結果は、リファレンスプレートがクライテリアを逸脱していることからプロトコル上、不採用ではあるがコード化合物の陽性・陰性判定結果は、2 施設と良く一致した。

Task3 測定において、特に 2 測定目以降でクライテリアを満たすことが出来なかった原因について 1 測定目とそれ以降の測定の違いを検討した結果、1 測定目とそれ以降では、使用した細胞の系列が異なり、1 測定目で用いた細胞は、Task2 後半で使用した細胞の継代であるのに対して、それ以外の測定においては、新たに眠起した細胞系列を用いていた（図 1）。系列のの違いが原因であると特定されたわけではないが、継代の系列による細胞特性（反応性）の違いが疑われた。しかも、これらの細胞は、オリジナルは 1 系列であり CERI で培養されて分割して凍結されたものであることから、凍結や眠起もしくはその後継代によって差が生じた可能性が示唆された。さらに、同系列の細胞では、CERI においてもクライテリアを逸脱する結果となることが多く、さらに CERI においては別系列の細胞が保存されていなかったことから、HeLa9903 細胞を構築した住友化学より、別ロットの細胞供給を得てリファレンスプレートのみ測定を実施した。日吉では 2 種類のロットの細胞を入手して測定を実施したところ、いずれのロットも一部の項目を除きクライテリアを満たしたが、1 ロット（ER2J2011.6.8）を継代して実施した 2 回目測定結果では、多くの項目でクライテリアを逸脱し、やはり継代の問題が示唆された（図 2）。これらの結果から、日吉における Task3 データのクライテリア逸脱の原因は、細胞もしくは継代によるものと考えられたため、本系を開発し

た CERI にて測定系の再構築（細胞や血清の再選択）を実施することとなった。

### 1. 3 CERIにおける測定系の再構築

CERI では、日吉における検討結果を踏まえ新たに住友化学から別ロットの細胞を幾つか入手して最も適した細胞、血清の選択を実施した。その結果、クライテリアの全項目を再現良く満たす結果を示すロットとして Lot.10732 が選択された。Lot.10732 での測定結果を図 3 に示した。今後、再構築により再現良くクライテリアを満たすことが確認されたロットの細胞及び血清を日吉に供給して、予備測定の後、改めて Task3 測定を再開する予定である。

### 2、Lumi-Cell 法：

Lumi-Cell 法バリデーションに関しては、昨年度、全てのバリデーション測定が終了し、その結果を反映した最終プロトコルについて SMT の合意が得られた。本年度は、バリデーション試験結果を基に、ICCVAM ガイドラインの第三者レビューが実施され、本研究班では、レビュードキュメントの作成や第三者レビューに協力した。さらに、第三者レビューでは大きな問題点の指摘はなく、ICCVAM ガイドラインが成立したことをうけ、ICCVAM ガイドラインをもとにした、BG1 アッセイの OECD ガイドライン案（アゴニスト・アンタゴニスト）とアゴニスト評価系については OECD ガイドラインとなっている STTA 法（OECD TG455）と BG1 アッセイを統合したパフォーマンススペーステストガイドライン（PBTG）案を ICCVAM と共同で作成し、それぞれのガイドライン案については ICCVAM から OECD に正式に提案を行い、VMG-NA 会議において最終化に向けた議論を行った。VMG-NA に提案された、PBTG 案及び Performance Standards 案をそれぞれ添付資料 1、2 に示した。VMG-NA 会議においては、BG1 アッセイガイドラインについては、既に成立した ICCVAM ガイドラインを基にしていることからあまり議論は行われず、議論の焦点は主に PBTG における Proficiency Chemicals リスト及び Performance Standards における Reference Chemicals リストについてであった。PBTG における Proficiency Chemicals は、新たにいずれかの系（STTA、BG1）で測定を実施する試験施設が、技術的習熟度を示すため予め測定を実施すべき化合物であり、Performance Standards は、同じ目的の新たな測定系の開発（バリデーション）にあたって、必要となる条件を定めるものであり、Reference Chemicals は新たな測定系のバリデーションにおいて測定されるべき化合物である。

PBTG における Proficiency Chemicals は、Performance Standards における Reference Chemicals のサブセットとなっており、STTA 及び BG1 双方のバリデーション試験で測定が実施されている化合物リスト（添付資料 1 の Table 1）をもとに、なるべく幅広い化合物構造や活性強度をカバーするとともに、入手や使用の容易さ等の観点から、最終的に Reference Chemicals として 22 化合物（添付資料 2 の Table 1）、Proficiency Chemicals として 14 化合物（添付資料 1 の Table 2）について合意を得た。また、Performance Standards 当初案では、施設内再現性及び施設間再現性の確認において、いずれも 22 化合物の測定実施を求める案となっていたが、必要以上に多すぎるとの意見が出され、その後の電話会議において施設内再現性確認においては、リスト内から 8 化合物、施設間再現性については、残り 14 物質の測定を行うことで VMG-NA メンバー合意を得ており、WNT 提出案において該当部分の修正が行われることとなった。

### 3、AR-EcoScreen 法：

#### 3. 1 バリデーションレポート案及びガイドライン案に対する OECD ピアレビュー

AR 転写活性化測定法については、昨年度、本研究班開始以前に国内 3 施設で実施されたアゴニスト、アンタゴニスト測定のバリデーション結果をもとにしたバリデーションレポート及びガイドライン案を作成してピアレビューのため OECD に提案した。本年度は、OECD ピアレビューで指摘されたコメントへの対応を実施した。OECD ピアレビューレポートを添付資料 3 に、ピアレビューコメント対応表を表 3 に示した。殆どのコメントは、レポートの記載の追加や修正で対応可能であった。しかし、バリデーション試験化合物数がアゴニスト・アンタゴニスト各 5 化合物と少なく、試験結果でカバー出来る活性レンジが十分でないとの指摘が出され、VMG-NA 会議においてもコメントは妥当でありガイドライン化のためには追加試験が必要であるとの結論が示された。

#### 3. 2 追加バリデーション試験実施の検討

OECD ピアレビューコメントへの対応として、追加バリデーション試験実施に向けて、以前のバリデーション試験におけるリードラボである CERI とバリデーション実施の可否や実施体制、試験デザイン等について検討を行った。検討の結果、追加バリデーションは、既に実施済みのバリデーション試験と同一のプロトコルにより実施することとし、実施化合物については、VMG-NA メンバーに提案を求め、VMG-NA メンバーで組織さ

れた化合物選択のための小グループにより表4に示す化合物が提案された。また、実施組織として、SMTをJaCVAMが中心となって設置し、参加試験施設については、CERIをリードラボとしてその他は原則として以前のバリデーション参加施設とすることとした。ただし、以前の参加ラボのうち1施設は測定ラボを閉鎖してしまっていることから別施設を選択する必要がある、同種の測定系であるHeLa細胞バリデーション参加施設を軸に1施設を検討することとなった。また、VMG-NA会議の後、韓国KFDAからJaCVAMに対してバリデーション試験への参加希望が示され、技術トレーニングの後、予備測定を実施して結果がクライテリアを満たすことを確認出来た後、参加を承認することとした。ただし、バリデーション試験の実施時期については、実施のための予算が未確定であることから、SPSFを共同提出した経済産業省の担当部局と協議の上、必要な予算が確定出来た段階で試験をスタートする予定である。

#### D. 考察

HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション試験では、これまでに海外2施設が当初予定していたスケジュールの遅延等から継続参加が困難になりいずれもTask2完了前にバリデーション試験から離脱している。また、国内1施設(カネカ)は、予定していた全ての測定を一度終了していたが、詳細解析の結果、Task3の一部の結果においてリファレンスプレートがTask2で設定した暫定クライテリアを完全には満たしていないことから正式データとして採用するためには、再測定が必要であるが、*in vitro* 事業から撤退したため追加の測定は不可能となっている。結果としてTask3を完了した施設は、CERI及び大塚の2施設のみであったためOECD GD34に定めるバリデーション必要要件を満たすため、昨年度より追加施設としてLumi-Cell法バリデーション参加施設である日吉における測定を開始した。Task1として実施したアゴニストアッセイでは、これまで日吉を含む全ての参加施設がTG455で定める評価クライテリアを満たすデータの取得に成功していることから、本バリデーション試験の目的ではないものの、HeLa9903細胞のアゴニスト測定プロトコルであるTG455の頑強性を示す結果と考察された。一方、アンタゴニスト測定においては、これまで海外2施設においてリファレンス化合物で再現良くクライテリアを満たす測定結果が得られておらず、日吉においても初期の測定結果では、多くの項目でクライテリアを逸脱した。さらに、継代による反応性低下が顕著に認められるなど培養における問題も示唆されたが、最終的に一部クライテリアを

逸脱するものの再現性の良い測定結果を得たことから暫定クライテリアをアップデートして、本年度、SMTの合意を得てTask3を実施したものの、測定結果はアップデートされたクライテリアを再び逸脱するものであった。日吉のTask3結果においてコード化合物の判定結果は、カネカと同様、クライテリアを満たすCERI、大塚の判定結果と良く一致することから、系の目的に照らしてクライテリアのさらなる緩和や項目の削減も検討の余地はあるが、根拠となる結果もなくクライテリアを拡大するのは問題があると考えられる。さらに、これまでの測定結果は、細胞の継代により反応性が変化してしまう可能性を示唆しており、継代による活性低下などは海外施設においても問題となった現象であることから、ガイドライン化にあたって解決すべき問題と考察された。そこで、細胞を構築した住友化学より新たなロットの細胞供給を受けてCERIにおいて測定系の再構築を実施し、再現性よくクライテリアを満たす条件を構築に成功した。今後、これらの細胞や血清を用いて日吉における再測定を行う予定をしており、アンタゴニスト測定プロトコルの信頼性や頑強性については、その結果を待って議論されるべきである。

Lumi-Cell法は、予定したバリデーション測定が全て終了し、本年度、結果をもとに提案されたICCVAMガイドラインが第三者レビューを得て成立した。なお、ガイドライン化にあたって、測定法の名称は、BG1細胞アッセイとされた。本年度は、さらにBG1細胞アッセイガイドライン案及びアゴニスト測定法についてBG1アッセイとHeLa9903細胞アッセイを包含したPBTG案をOECDガイドライン案としてICCVAMからの提案を行った。VMG-NA会議では、BG1アッセイガイドライン案は、ICCVAMガイドラインと同一であることから、大きな議論にはならず、早期に成立すると思われる。一方、PBTG案については、STTA法(HeLa細胞アッセイ)とBG1アッセイでは、プロトコルや評価クライテリアの設定に大きな違いがあるため、それらの部分については、基本的には各プロトコルに従うこととしたため、VMG-NAでは、主にReference Chemicals、Proficiency Chemicalsリストについて非常に多くの時間をかけて論議され合意を得た。HeLa細胞系では、本研究班で実施しているアンタゴニストアッセイバリデーションが終了しておらず、今回のPBTG案は、アゴニストアッセイのみとなってしまうが、HeLa細胞アンタゴニストバリデーションが終了した際には、アンタゴニスト系についてもBG1アッセイを含むPBTGについて検討する必要がある。その際、エストロゲン受容体については、比較的多くの化合物がアゴニスト活

性を示すことから、アゴニストアッセイの PBTG ではそれぞれのバリデーション試験で測定済みの化合物の重複も多く Reference Chemicals、Proficiency Chemicals はそれぞれ 22、14 化合物が選択されたが、エストロゲン受容体アンタゴニスト活性を有する化合物が少ないため、各バリデーション試験における特に陽性化合物が少なく (HeLa 法バリデーションでは Task3 におけるコード化合物のうち 9 化合物が陽性であるが BG1 アッセイガイドラインにのレファレンス化合物のうち陽性化合物は 3 化合物のみである)、アンタゴニスト PBTG 作成の際の懸案となる可能性が高い。

陽性化合物が少ない問題については、同じく本研究班でガイドライン化を進めている AR アッセイでも同様である。AR アッセイについては、過去に行われたバリデーション試験結果について、ガイドライン化にあたり測定された化合物数が少ないとのコメントを OECD ピアレビューにて受け、追加バリデーションを実施する必要がある。追加バリデーション実施に向けて、まずは、予算面での検討が必要であるが、実施に先立って VMG-NA メンバーから提案されたバリデーション対象化合物には、非常に高額な化合物が含まれておりガイドラインにおけるリファレンス化合物として適当ではないと考えられることから追加バリデーション実施にあたっては検討が必要であると考察される。バリデーション試験において測定を実施すべき化合物数は、系により一律には決められないと思われるが、今後の試験系開発を加速するためには、何らかの基準が必要と考えられる。

#### E. 結論

本研究は、生殖毒性を始めとした様々な毒性の原因となる分子イベントである化学物質による内分泌かく乱性を迅速評価するための *in vitro* スクリーニング法について他施設バリデーション研究による再現性、信頼性についての検証を行い、OECD ガイドライン化を行うことを目的としている。OECD では、加盟国が行政的に利用可能な内分泌かく乱性の評価手法の開発整備を推進するため、5 段階からなるコンセプチュアルフレームワークに基づきスクリーニングレベルから確定試験に至る試験法開発を進めており、本研究で対象とする *in vitro* スクリーニング系は、そのうちレベル 2 に相当する。内分泌かく乱化学物質については、様々な問題が指摘されつつも、規制の根拠として国際的にコンセンサスの得られた試験法が無いため、内分泌かく乱性の観点からの化学物質によるヒトや環境へのリスクを的確に評価し回避するために OECD フレームワークに示される各試

験法のガイドライン化は重要である。本研究班で検討進めてきた、各試験法については、バリデーション試験により示された問題の解決等のため試験進捗は当初計画より遅れているものの、これまでの成果として BG1 アッセイ (Lumi-Cell 法) については、本年度、ICCVAM ガイドラインが成立し、OECD ガイドライン提案をするに至った。また、アゴニスト測定系については、既に成立している TG455 の PBTG 化に向けたドラフトガイドライン案の提出に至った。また、HeLa アンタゴニスト測定系については、バリデーション試験終了に至らなかったものの、国際的に受入れられる試験法とするためにはプロトコルの問題点を解決し、頑強な測定系とすることが重要であり、本研究で明らかとなった問題点の解決は、本研究班の研究目的に沿うものである。我が国では、現在のところ内分泌かく乱性による化学物質規制は検討されていないものの、非常に初期の段階からこの問題に取り組んできた経緯から、これまで OECD ガイドライン策定に多大な貢献をしてきている。本研究班における *in vitro* 評価法のガイドライン化においても非常に期待されており、早期のガイドライン化に向けた積極的な取り組みが今後も重要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表
  - 1) A. Ono, M. Takeyoshi, S. Bremer, M. Jacobs, S. C. Laws, T. Sozu, H. Kojima  
"Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line." The 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (Canada, Montreal) 2011.8
  - 2) 中村 昌文、武吉 正博、小野 敦、小島 肇  
"国際的バリデーションの行われた三種類のエストロゲン様活性測定法の比較検証" 環境ホルモン学会第 14 回研究発表会 (東京) 2011.12

#### 添付資料

添付資料 1 : DRAFT PROPOSAL FOR AN UPDATED TG 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists.

添付資料 2 : Draft Performance Standards for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Agonists (For TG

455).

添付資料 3 : Peer review report for the validation of the stably transfected transcriptional activation assay for the detection of the androgenic and anti-androgenic activity of chemicals.

		1回目(濃度決定)		応答反応1		応答反応2		応答反応3-1		応答反応3-2	
Fold Induction		6.1	> 6 Pass	7.9	> 6 Pass	8.2	> 6 Pass	13.9	> 6 Pass	8.5	> 6 Pass
RTA of 1nM E2		122.82	Pass	125.97	Pass	123.24	Pass	129.34	Pass	178.03	Pass
RTA of 1 $\mu$ M OHT		11.18	Pass	14.18	Pass	20.97	Pass	24.42	Pass	41.21	Fail
RTA of 100 $\mu$ M Dig.		-18.81	Pass	-14.19	Pass	-13.34	Pass	-7.48	Pass	-12.81	Pass
OHT	log(IIn.IC30)	-8.83	in $\pm$ 2SD	-8.55	Fail	-8.41	Fail	-8.47	Fail	-8.60	Fail
	log(IIn.IC50)	-8.53	in $\pm$ 2SD	-8.31	in $\pm$ 2SD	-8.20	in $\pm$ 2SD	-8.22	in $\pm$ 2SD	-8.19	in $\pm$ 2SD
TAM	log(IIn.IC30)	-6.67	in $\pm$ 2SD	-6.55	in $\pm$ 2SD	-6.42	in $\pm$ 2SD	-6.42	in $\pm$ 2SD	-6.44	in $\pm$ 2SD
	log(IIn.IC50)	-6.39	in $\pm$ 2SD	-6.26	in $\pm$ 2SD	-6.10	in $\pm$ 2SD	-6.15	in $\pm$ 2SD	-	Fail
RU486	log(IIn.IC30)	-5.72	in $\pm$ 2SD	-5.34	Fail	-5.36	Fail	-5.17	Fail	-5.59	in $\pm$ 2SD
	log(IIn.IC50)	-5.20	in $\pm$ 2SD	-	Fail	-	Fail	-	Fail	-5.09	Fail
Flu.	log(IIn.IC30)	-4.49	Fail	-4.43	Pass	-4.02	Pass	-4.46	Pass	-4.49	Pass
	log(IIn.IC50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-4.12	Pass

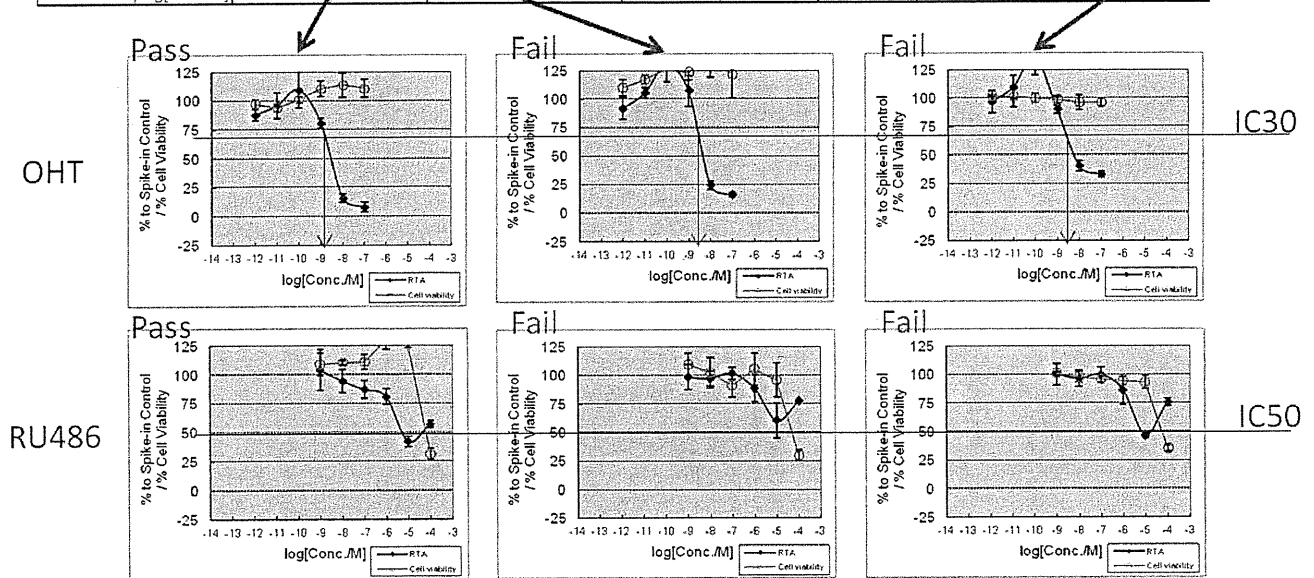


表1 日吉 Task3におけるリファレンスプレートクライテリア

下段のグラフは、クライテリアをパスした例と逸脱例の反応曲線を示す。応答反応 1,2,3 の結果では OHT IC30 がいずれもクライテリアより高濃度側に逸脱した。また、応答反応 1,2,3-1 では、RU486 の IC50 が不検出、応答反応 3-2 では高濃度側に逸脱した。

Chemical ID Name Expected effect	Laboratory	Judge	Judge of each assay	Log(Tox IC20)	Log(ln IC30)	Log(ln IC50)	
ATG001 ICI 182,780 Strong	CERI	Posi	Posi		-9.93	-9.58	
			Posi		-9.93	-9.62	
			Posi		-9.98	-9.63	
			Posi		-10.00	-9.69	
	Otsuka 1st test	Posi	Posi		-9.95	-9.51	
			Posi		-9.74	-9.46	
			Posi		-9.88	-9.49	
	Otsuka 2nd test	Posi	Posi		-10.00	-9.75	
			Posi		-10.10	-9.84	
	Hiyoshi	Posi	Posi		-9.55		
			Posi		-9.69	-9.29	
				Posi		-9.54	-9.15
ATG002 RU-486 Mild	CERI	Posi	Posi	-4.69	-5.68	-5.32	
			Posi	-4.63	-5.64	-5.24	
			Posi	-4.69	-5.51	-5.21	
			Posi	-4.73	-5.65	-5.24	
	Otsuka 1st test	Posi	Posi		-5.81	-5.15	
			Posi	-4.24	-5.61	-5.12	
			Posi		-4.16	-5.29	
	Otsuka 2nd test	Posi	Posi		-4.67	-6.10	-5.42
			Posi		-4.92	-6.07	-5.29
			Posi		-4.87	-5.94	-5.38
	Hiyoshi	Posi	Posi		-4.91	-5.59	-5.04
			weakPosi		-4.76	-5.54	
		weakPosi		-4.67	-5.59		
ATG003 4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol Mild	CERI	Posi	Nega	-4.79	-4.57	-4.42	
			Nega	-4.79	-4.40	-4.29	
			Nega	-4.80	-4.40	-4.29	
			Nega	-4.71	-4.39	-4.28	
	Otsuka	Posi	Nega		-4.76	-4.46	-4.33
			Nega		-4.84	-4.36	-4.25
			Nega		-4.67	-4.50	-4.33
	Hiyoshi	Posi	Nega		-4.72	-4.64	-4.47
			Nega		-4.79	-4.66	-4.47
			Nega		-4.70	-4.40	-4.29
	ATG004 Methylpiperdinylpyrazole dihydrochloride Mild	CERI	Posi	Posi		-8.07	-7.74
				Posi		-8.44	-8.05
Posi					-8.20	-7.86	
Otsuka		Posi	Posi		-5.50	-7.52	-7.26
			Posi		-5.63	-7.57	-7.31
			Posi		-5.47	-7.38	-7.19
Hiyoshi		Posi	Posi		-7.80	-7.54	
			Posi		-7.71	-7.46	
			Posi		-7.62	-7.40	
ATG005 4-Hydroxytamoxifen Moderate		CERI	Posi	Posi		-9.51	-9.23
				Posi		-9.09	-8.60
				Posi		-8.94	-8.47
	Posi				-9.13	-8.72	
	Otsuka 1st test	Posi	Posi		-8.81	-8.50	
			Posi		-8.61	-8.37	
			Posi		-8.73	-8.47	
	Otsuka 2nd test	Posi	Posi		-8.74	-8.21	
			Posi		-8.77	-8.26	
			Posi		-8.81	-8.31	
	Hiyoshi	Posi	Posi		-8.50	-8.26	
			Posi		-8.40	-8.18	
Posi				-8.52	-8.28		
ATG006 Raloxifene HCl Moderate	CERI	Posi	Posi		-9.63	-9.34	
			Posi		-9.82	-9.55	
			Posi		-9.65	-9.41	
	Otsuka	Posi	Posi		-9.42	-9.21	
			Posi		-9.40	-9.18	
			Posi		-9.17	-8.74	
	Hiyoshi	Posi	Posi		-8.98	-8.68	
			Posi		-9.02	-8.69	
			Posi		-9.33	-9.03	
	ATG007 Clomiphene citrate(cis and trans mixture) Moderate-mild	CERI	Posi	Posi	-5.06	-7.58	-7.06
				Posi	-5.11	-6.95	-6.48
				Posi	-5.16	-7.03	-6.47
Posi				-5.10	-7.01	-6.50	
Otsuka		Posi	weakPosi		-4.97	-6.32	-5.03
			weakPosi		-5.12	-5.65	-4.98
			Posi		-5.05	-6.38	-5.66
Hiyoshi		Posi	Posi		-5.27	-6.65	-6.32
			Posi		-5.35	-6.54	-6.20
			weakPosi		-5.07	-6.71	-4.75
ATG008 Dibutyl phthalate Negative		CERI	Nega	Nega		-4.38	-4.45
				Nega		-4.53	
	weakPosi				-4.37	-4.47	
	Nega				-4.16	-4.28	
	Otsuka	Nega	Nega				
			Nega		-4.02	-3.93	
			Nega				
	Hiyoshi	Nega	weakPosi		-3.71		
			Nega		-4.10	-3.99	
			Nega		-3.49		
	ATG009 Atrazine Negative	CERI	Nega	Nega		-3.95	-3.85
				Nega		-5.29	-4.12
Nega					-3.84	-4.20	
Otsuka		Nega	Nega		-4.08	-4.47	-3.88
			weakPosi		-4.37	-4.58	
			Nega		-4.10		
Hiyoshi		Posi	weakPosi			-3.90	
			weakPosi			-4.05	
			weakPosi			-4.00	
ATG010 Flutamide Negative		CERI	Nega	Nega	-4.72	-4.55	-4.10
				Nega	-4.75	-4.38	-3.91
				Nega	-5.33	-4.50	-3.97
	Nega			-4.67	-4.63	-3.99	
	Otsuka 1st test	Nega	Nega		-6.84	-4.22	-3.55
			Nega		-4.87	-3.74	-3.14
			Nega		-4.10	-3.24	
	Otsuka 2nd test	Nega	weakPosi		-3.82	-3.83	-3.10
			Nega		-3.85	-3.74	-2.97
			Nega		-3.62	-3.56	-2.95
	Hiyoshi	Nega	Nega		-4.08	-4.37	-3.92
			Nega		-4.18	-4.42	-3.80
		Nega		-4.51	-4.32	-4.03	

表 2 コード化合物判定結果の比較

Chemical ID Name Expected effect	Laboratory	Judge	Judge of each assay	Log(Tox IC20)	Log(lin IC30)	Log(lin IC50)
ATG011 4,4'- Cyclohexylidenebis phenol Mild	CERI	Nega	Nega	-4.60	-4.35	-4.21
			Nega	-4.55	-4.27	-4.16
			Nega	-4.66	-4.20	-4.10
			Nega	-4.65	-4.22	-4.12
	Otsuka	Nega	Nega	-4.36	-4.09	-3.96
			Nega	-4.29	-3.90	
			Nega	-4.79	-4.09	-4.00
	Hiyoshi	Nega	Nega	-4.66	-4.43	-4.28
			Nega	-4.65	-4.35	-4.19
Nega			-4.67	-4.21	-4.12	
ATG012 4,4'-[1-[4-[1-(4- Hydroxyphenyl)-1- methylethyl]phenyl ]ethylidene]bis[phe no] Mild	CERI	Posi	Posi	-4.88	-6.26	-5.75
			Posi	-5.53	-6.64	-6.18
			Posi	-4.97	-6.63	-6.01
	Otsuka	Posi	Posi	-4.85	-5.78	-5.41
			Posi	-4.91	-6.37	-5.73
			Posi	-4.93	-5.75	-5.41
	Hiyoshi	Posi	Posi	-4.81	-5.74	-5.48
			Posi	-4.87	-5.75	-5.45
			Posi	-4.82	-5.81	-5.42
ATG013 Apigenin Negative	CERI	Nega	Nega	-4.97		
			Nega	-4.79		
			Nega	-4.98		
	Otsuka	Nega	Nega	-4.03		
			weakPosi	-4.18		
	Hiyoshi	Nega	Nega	-3.78	-2.89	
Nega			-4.78			
Nega	-4.71	-3.87				
ATG014 Genistein to be negative	CERI	Nega	Nega	-4.48		
			Nega	-4.32		
			Nega	-4.72		
			Nega	-4.56		
	Otsuka	Nega	Nega	-3.93		
			Nega	-4.21		
Hiyoshi	Nega	Nega	-4.62			
		Nega	-4.65			
Nega	-4.58					
ATG015 Dibenzo[a,h]anthra cene not tested	CERI	Posi	weakPosi			
			Nega			
	Otsuka	Posi	weakPosi		-8.30	
			weakPosi		-8.05	
			weakPosi		-8.37	
	Hiyoshi	Posi	weakPosi		-8.86	
Nega						
weakPosi		-8.31				
weakPosi		-8.50				

Chemical ID Name Expected effect	Laboratory	Judge	Judge of each assay	Log(Tox IC20)	Log(lin IC30)	Log(lin IC50)	
ATG016 p-n-nonylphenol not tested	CERI	Nega	Nega	-4.57	-4.25	-4.11	
			Nega	-4.47	-4.30	-4.16	
			Nega	-5.23	-4.29	-4.15	
			Nega	-4.59	-4.28	-4.15	
	Otsuka	Nega	Nega	-3.51	-3.23	-3.09	
			Nega	-3.39	-3.26	-3.12	
			Nega	-3.42			
	Hiyoshi	Nega	Nega	-4.39			
			Nega	-4.49	-3.65	-3.42	
Nega			-5.50	-5.30	-5.16		
ATG017 Flavone to be negative	CERI	Nega	Nega	-4.69	-3.09	-3.00	
			Nega	-4.58	-3.13	-3.04	
			Nega	-4.43	-3.11	-3.02	
	Otsuka	Nega	Nega	-5.01			
			Nega	-5.33			
			Nega	-5.28			
Hiyoshi	Nega	Nega	-4.60				
		Nega	-4.50				
Nega	-4.43						
ATG018 Resveratrol to be negative	CERI	Nega	Nega	-4.51	-2.99	-2.93	
			Nega	-3.99	-2.94	-2.90	
			Nega	-4.72	-2.91	-2.87	
			Nega	-4.38	-2.95	-2.91	
	Otsuka	Nega	Posi		-3.57	-3.37	
			Nega	-5.96	-3.78	-3.71	
Hiyoshi	Nega	Nega	-3.32	-3.69	-3.46		
		Nega	-4.33				
Nega	-4.43						
Nega	-3.54						
ATG019 Fenarimol not tested	CERI	Nega	Nega	-4.27	-3.94	-3.69	
			Nega	-4.36	-3.73	-3.52	
			Nega	-4.38	-3.73	-3.53	
			Nega	-4.14	-3.66	-3.49	
	Hiyoshi	Nega	Nega	-4.35	-3.89	-3.63	
			Nega	-4.29	-3.91	-3.65	
Nega	-5.61	-4.56	-4.40				
ATG020 17b-estradiol to be negative	CERI	Nega	Nega	-5.37			
			Nega	-5.27			
			Nega	-5.51			
	Otsuka	1st test	Nega	Nega	-5.48		
				Nega	-3.56		
	Otsuka	2nd test	Nega	Nega	-5.80		
				Nega	-5.70		
	Hiyoshi	Nega	Nega	Nega	-5.50		
Nega				-5.46			
Nega				-5.40			
Nega	-5.56						

表2 コード化合物判定結果の比較 (続き)



Comments	Responses
<p>A dedicated inter-laboratory study should be carried out, using the final test protocol to test substances covering a broad range of activity, especially including non-active substances and weak agonists and antagonists. The number of substances already tested (five test chemicals) in the inter-laboratory validation, and the affinity range that they cover, is not sufficient;</p>	<p>Japan is willing to conduct an additional validation study. However the budget is limited, so we hope a constructive discussion to make efficient study plan.</p>
<p>a) Advantages of the AR-STTA assay over similar AR activation assays (i.e., lack of Glucocorticoid receptors in this cell line eliminates cross-talk with AR, and more discussion of positive results in AR-STTA that are negative in AR binding assays),</p>	<p>Some information about GR was already included in the validation report. The following sentences will be included in the validation report.</p> <p>AR Ecoscreen cell employs androgen responsive element (ARE) from prostate C3 gene-responsive element driven by a minimal heat shock protein promoter. This construct is confirmed to have minimal induction of GR mediated responses. AR Ecoscreen has great advantage to provide AR specific response with minimal GR crosstalk.</p>
<p>b) Potential interference of partial agonists with antagonist effects, and proposed solutions to elucidate such interference,</p>	<p>Partial agonism effect of partial agonist occurs in dose dependent phenomenon. The antagonist assay is design to evaluate with 6 concentrations. So multi-concentration approach could elucidate this issue.</p>
<p>c) Potential impacts of differences between protocols used for the pre-validation and the inter-laboratory validation studies</p>	<p>Cell line: No impacts. As both pre- and inter-laboratory validations used the same cell line (AR-EcoScreen™)</p> <p>Cytotoxicity Evaluation: No impacts.</p> <p>cLuc-EcoScreen™ cell line was used to evaluate cytotoxicity in the pre-validation study. However, no classification differences were observed between the pre-validation and multi-lab validation studies based on 5 chemicals used tested in the multi-lab validation.</p>
<p>d) The lack of a cytotoxicity measurement in the agonist assay, which masks identification of true negatives from false negatives;</p>	<p>In both pre- and inter-laboratory validations, both agonistic and antagonistic activities were measured for all test chemicals. In antagonistic assay, cytotoxicity test is conducted in parallel. Therefore, cytotoxicity can be evaluated based on the data.</p>

<p>e) Add acceptance and assessment criteria for the positive control (5<math>\alpha</math>-Dihydrotestosterone (DHT)),</p>	<p>When the validation study was started, the acceptance and assessment criteria were not defined. The criteria described in the Test Guideline, was able to determine by analyzing the results of validation study.</p> <p>Or</p> <p>This information (criteria of DHT) is provided in Table 1-1 in the draft TG.</p> <p>As positive control (10 nM of DHT), its fold induction must be <math>\geq 6.4</math>.</p>
<p>f) precisely define the decision criteria for classification, especially considering cytotoxic effects (e.g. introduce the option of equivocal/not conclusive results, since cytotoxicity can interfere with the detection of androgenic and especially anti-androgenic responses),</p>	<p>As described in paragraph 26 in the draft TG, concentrations where the cytotoxicity was observed need to be omitted from the data evaluation. Therefore, cytotoxic effects do not affect the classification.</p>
<p>g) Explore the biological and statistical appropriateness of the PC10 in more detail,</p>	<p><u>Biological appropriateness</u>: The PC10 was employed as the criterion of detection of androgenic activity in the ICCVAM list. Our group have confidence about the biological appropriateness of the ICCVAM list.</p> <p>Furthermore, as described in a paragraph 93 of the AR Validation Report, relationship between our results and ICCVAM list was analysed in a two-by-two table, the statistical appropriateness of the result was confirmed.</p> <p><u>Statistical appropriateness</u>: PC10 is a useful simple parameter with significance without complicated statistical processing. In order to make PC10 significant, PC10 must be greater than <math>1 + 2SD</math> (mean fold-induction of VC + <math>2SD</math> of VC)</p>
<p>The cell line should be made freely available.</p>	<p>The cell line can be obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank as a reference No. JCRB1328, upon signing a Material Transfer Agreement (MTA)</p>

表3 AR STTA バリデーションレポートへの OECD ピアレビューコメント対応表 (前ページから続く)

AR AGONIST	CASNR	ICCVAM Agonist	ECo-Screen Agonist	ECVAM (CALUX and PALM)	POS/ NEG	Mode of action (MoA)	Targets	Test system	Remarks	Chemical/Product Class	Comment
17 $\alpha$ -ethinyl estradiol	57-63-6				NEG				steroid NEG in Araki (2005)		
Testosterone	58-22-0				POS				strong, EC50~1 nM in Araki (2005)		Principally okay, but suggest to replace by methyltestosterone (same degree of ER binding, but metabolically more stable) in order to have concordance with Susan's list.
17 $\beta$ -estradiol	50-28-2	P			POS	17 $\beta$ -estradiol is a natural estrogen hormone. 17 $\beta$ -estradiol affects testicular function by declining sperm and alters the status of condensed chromatin in testicular spermatozoa. Reduction in the serum gonadotropins, testosterone, in weights of reproductive organs has been observed as well.	No relevant data available. Prenatal and postnatal alterations have been observed. 17 $\beta$ -estradiol increases number of cystic follicles in the ovary; causes hypertrophy of the endometrium and endometrial glands in the uterus; testes weights and absolute epididymis weights are increased; epididymal sperm concentrations are reduced and undescended testes are increased.	PALM	weak AR agonist, AR agonist and antagonist	steroid, phenolic, Natural estrogen hormone	4) 17 $\beta$ -estradiol is the most potent endogenous ER agonist, but is also an AR agonist and AR antagonist. Its qualitative response for AR agonism across all MCRG studies was 10 out of 11. It is about 200 to 300 times less potent than T and DHT.
Kepone	143-50-0	N	N		NEG				binds to AR, Non-steroid NEG in Araki (2005)	organochlorine	Kepone is a pesticide and found negative for AR agonism in MCRG studies, 2 out of 2. Although it has binding affinity for both the ER and AR, it was negative for ER agonism and ER antagonism and only once found positive for AR antagonism.
Medroxyprogesterone acetate(MPA)	71-58-9	P	P		POS				weak/moderate AR agonist	steroid, nonphenolic	5) MPA is a synthetic steroid. Its qualitative response for AR agonism across all MCRG studies was 4 out of 4. It is about 20-40 times less potent than T and DHT.

表4 VMG-NA メンバーから提案された AR STTA 追加バリデーション候補化合物 (アゴニストアッセイ用)

AR ANTAGONIST	CASNR	ICCVAM Agonist	ECo-Screen Agonist	ECVAM (CALUX and PALM)	POS/ NEG	Mode of action (MoA)	Targets			Test system	Remarks	Chemical/Product Class	Comment
Atrazine	1912-24-9				NEG						negative, Non-steroid NEG in Araki (2005)		
Coumestrole	479-13-0	N			NEG						ER agonist	coumestan	14) Coumestrol is a pure ER agonist and was found negative AR antagonism in MCRG studies, 1 out of 1. Also negative for AR agonism (see above).
Flutamide	13311-84-7	P		P	POS	Flutamide is a non-steroid AR binder. After absorption, it is quickly $\alpha$ -hydroxylated to its primary active form hydroxyflutamide.	Flutamide affects testosterone-dependent organs. It decreases fertility, being likely the result of impaired spermatogenesis and a dysfunction of accessory sex organs.	A slight prolongation of the estrous cycle was also observed.	Treatment with flutamide produces ventral prostate agenesis and testicular nondescent. Flutamide exposure significantly increases areola/nipple retention in male rats. Prenatal flutamide exposure results in dose-responsive increases in cryptorchidism. Hypospadias has been observed as well as decrease in the weights of the seminal vesicles, levator ani, testes, and epididymides in a dose-dependent manner. Epididymal malformations have been observed [209].	PALMAR-CALUX	strong /AR antagonist	steroid, nonphenolic, Antandrogenic pharmaceutical	9) Flutamide is a well-known pure AR antagonist. Its qualitative response for AR antagonism across all MCRG studies was 3 out of 3.  Weak antagonist in vitro. Maybe not first choice, as the active metabolite was already tested.  Flutamide is the perfect reference, as it is the only pure AR antagonist known, its hydroxy-metabolite is more active, but also displays AR agonism! Therefore, flutamide the best choice.
Prochloraz	67747-09-5			P	POS	Prochloraz is an AR binder. It has an antiandrogen activity in the Hershberger assay. It inhibits the conversion of progesterone to	No relevant data available	Adverse effects of prochloraz on gestation periods have been observed.	Prochloraz exposure decreases growth of androgen-dependent tissues and increases LH secretion from the pituitary.	PALM, AR-CALUX,	weak AR antagonist, (IC50~1-10 $\mu$ M)	Fungicide	Was not tested in the validation effort, but definitely is a weak AR antagonist. Should be included.  No, weak anti-androgen, but not per definition by the AR but rather in steroidogenesis. Not a good reference compound.
Vinclozolin	50471-44-8			P	POS	Vinclozolin is an AR binder with androgenic activity.	Vinclozolin reduces fertility, and impaired adult spermatogenesis.	Vinclozolin does not affect the estrous cycle, mating, fertility, pregnancy, parturition, nor nursing behaviour.	Vinclozolin induces clear anti-androgenic effects in offspring. Vinclozolin reduces spermatogenic capacity, the testicular sperm count number, as well as the epididymal sperm number and motility. Transient exposure of neonates to vinclozolin delays puberty and inhibits androgen-dependent male reproductive tract development.	PALM, AR-CALUX	metabolism pb AR antagonist, weak, IC50~0.4 $\mu$ M in Araki (2005)	Pesticide, Fungicide	

表4 VMG-NA メンバーから提案された AR STTA 追加バリデーション候補化合物 (アンタゴニストアッセイ用)

STTA 細胞系図

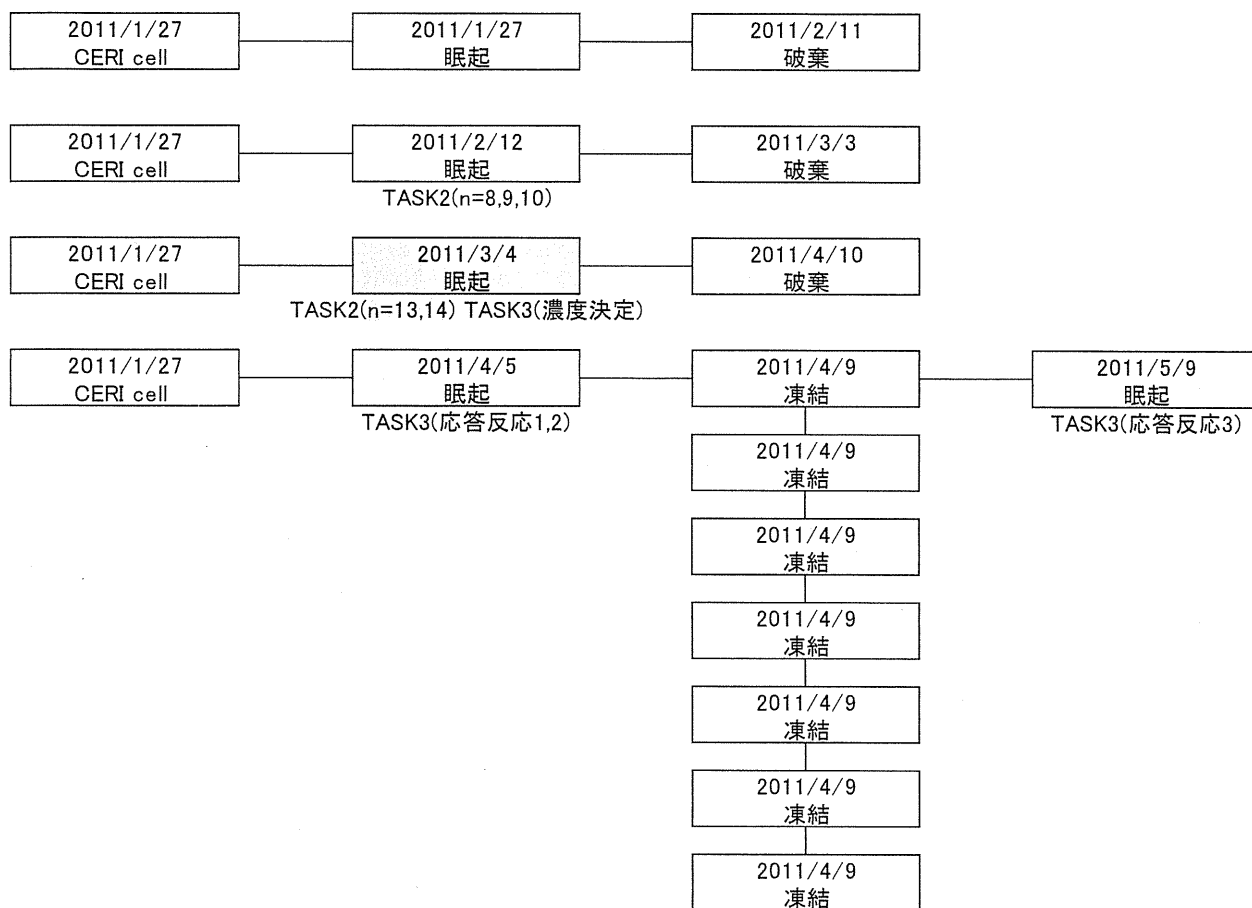
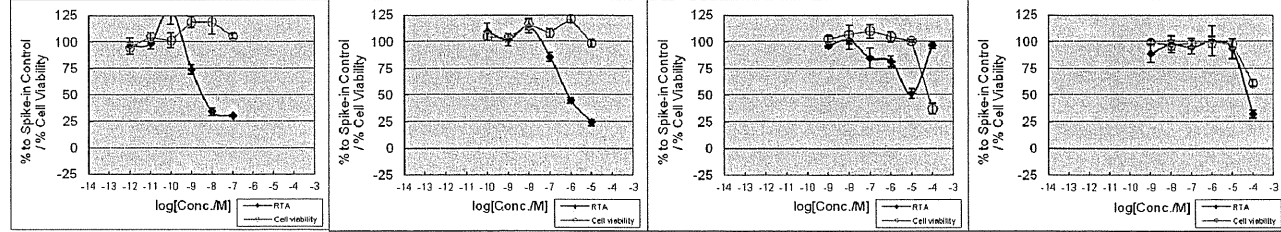


図1 日吉 Task3 で使用した細胞の継代図

## ロット1 - ER2J2011.6.8

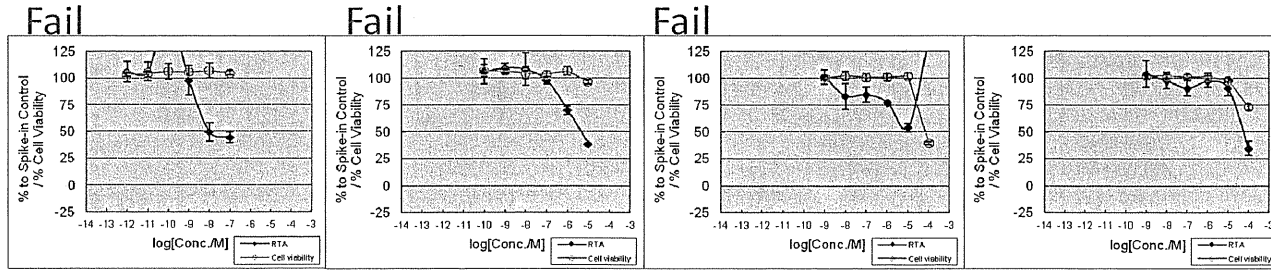
### 1回目

Fold Induction	14.7	> 6 Pass	
RTA of 1nME2	175.72	Pass	
RTA of 1µM OHT	37.36	Pass	
RTA of 100 µM Dig.	-6.46	Pass	
OHT	log[lin.IC30]	-8.90 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-8.40 in ±2SD	
TAM	log[lin.IC30]	-6.61 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-6.12 in ±2SD	
RU486	log[lin.IC30]	-5.61 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-	Fail
Flu.	log[lin.IC30]	-4.62	Pass
	log[lin.IC50]	-4.29	Pass



### 2回目

Fold Induction	9.5	> 6 Pass	
RTA of 1nME2	229.36	Pass	
RTA of 1µM OHT	51.94	Fail	
RTA of 100 µM Dig.	-9.76	Pass	
OHT	log[lin.IC30]	-8.42 Fail	
	log[lin.IC50]	-8.01 Fail	
TAM	log[lin.IC30]	-5.99 Fail	
	log[lin.IC50]	-5.36 Fail	
RU486	log[lin.IC30]	-5.67 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-	Fail
Flu.	log[lin.IC30]	-4.63	Pass
	log[lin.IC50]	-4.27	Pass



## ロット2 - ER α修 2-J 000118

Fold Induction	12.4	> 6 Pass	
RTA of 1nME2	174.35	Pass	
RTA of 1µM OHT	21.05	Pass	
RTA of 100 µM Dig.	-7.44	Pass	
OHT	log[lin.IC30]	-8.96 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-8.54 in ±2SD	
TAM	log[lin.IC30]	-6.61 in ±2SD	
	log[lin.IC50]	-6.24 in ±2SD	
RU486	log[lin.IC30]	-5.39	Fail
	log[lin.IC50]	-	Fail
Flu.	log[lin.IC30]	-4.78	Pass
	log[lin.IC50]	-4.17	Pass

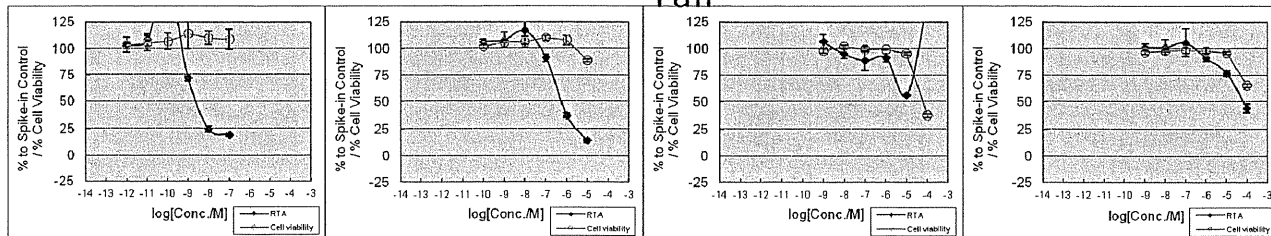
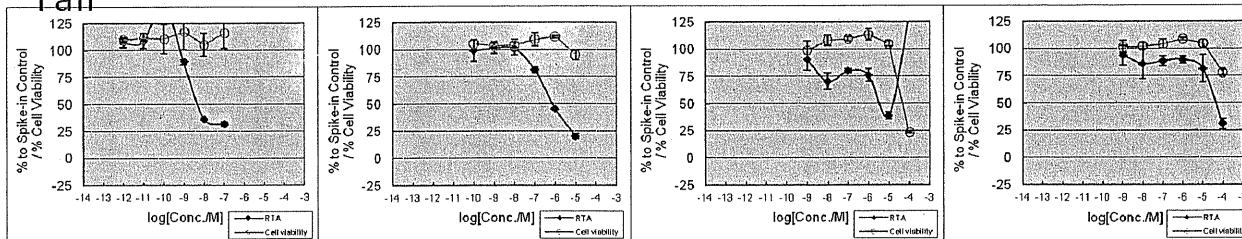


図2 住友化学から新たに入手した細胞での測定結果

Lot.10732 – 20120125

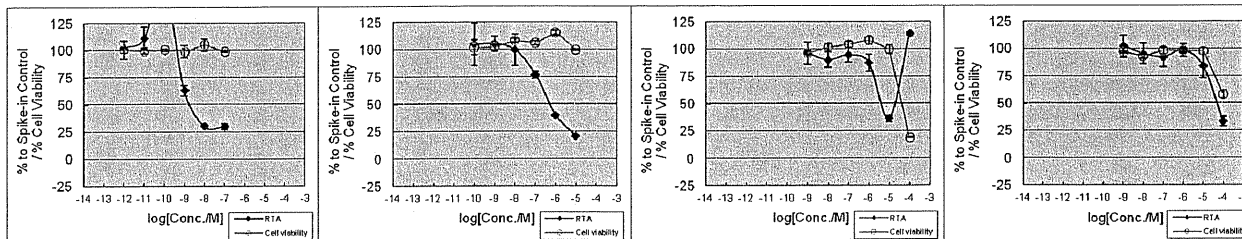
Fold Induction	10.6	> 6 Pass
RTA of 1nME2	216.49	Pass
RTA of 1μM OHT	30.24	Pass
RTA of 100 μM Dig.	-8.71	Pass
OHT	log[lin.IC30]	-8.63 Fail
	log[lin.IC50]	-8.25 in ±2SD
TAM	log[lin.IC30]	-6.68 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-6.13 in ±2SD
RU486	log[lin.IC30]	-5.83 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-5.29 in ±2SD
Flu.	log[lin.IC30]	-4.77 Pass
	log[lin.IC50]	-4.38 Pass

Fail



Lot.10732 – 20120208

Fold Induction	17.6	> 6 Pass
RTA of 1nME2	253.20	Pass
RTA of 1μM OHT	26.43	Pass
RTA of 100 μM Dig.	-4.54	Pass
OHT	log[lin.IC30]	-9.07 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-8.60 in ±2SD
TAM	log[lin.IC30]	-6.81 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-6.28 in ±2SD
RU486	log[lin.IC30]	-5.66 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-5.27 in ±2SD
Flu.	log[lin.IC30]	-4.73 Pass
	log[lin.IC50]	-4.33 Pass



Lot.10732 – 20120210

Fold Induction	10.6	> 6 Pass
RTA of 1nME2	203.75	Pass
RTA of 1μM OHT	31.85	Pass
RTA of 100 μM Dig.	-9.16	Pass
OHT	log[lin.IC30]	-8.83 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-8.36 in ±2SD
TAM	log[lin.IC30]	-6.83 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-6.14 in ±2SD
RU486	log[lin.IC30]	-5.91 in ±2SD
	log[lin.IC50]	-5.35 in ±2SD
Flu.	log[lin.IC30]	-4.95 Pass
	log[lin.IC50]	-4.52 Pass

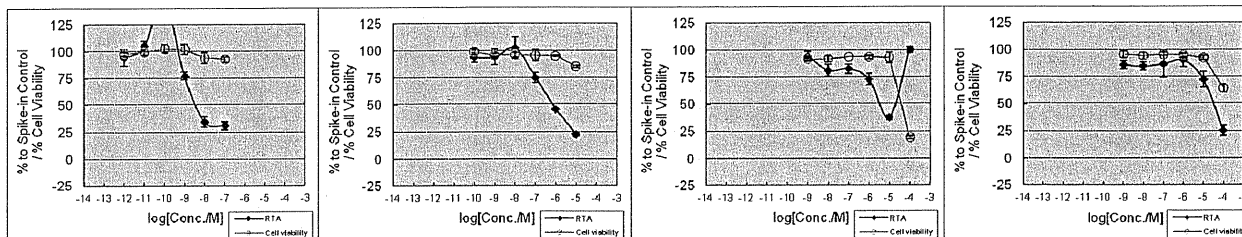


図3 CER1 での測定系再構築結果

22 December 2011

## OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

### DRAFT PROPOSAL FOR AN UPDATED TG 455

#### Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists

#### GENERAL INTRODUCTION

##### *Performance-Based Test Guideline*

1. This Performance-Based Test Guideline (PBTG) comprises several mechanistic and functionally similar test methods for the identification of estrogen receptor (i.e., ER $\alpha$ , and/or ER $\beta$ ) agonists and should facilitate the development of new similar or modified test methods in accordance with the principles for validation set forth in the OECD Guidance Document (GD) on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). The fully validated reference test methods (Annex 2 and Annex 3) that provide the basis for this PBTG are:

- The Stably Transfected TA assay (STTA) using the (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903 cell line (2) and
- The BG1Luc ER TA assay (3) using the BG1Luc-4E2 cell line which predominately expresses hER $\alpha$  with some contribution from hER $\beta$  (4) (5).

Performance standards (PS) (6) are available to facilitate the development and validation of similar test methods for the same hazard endpoint and allow for timely amendment of this PBTG so that new similar test methods can be added to an updated PBTG only after review and agreement that performance standards are met.

##### *Background and principles of the test methods included in the PBTG*

2. The OECD initiated a high-priority activity in 1998 to revise existing, and to develop new, Test Guidelines for the screening and testing of potential endocrine disrupting chemicals. The OECD conceptual framework (CF) for testing and assessment of potential endocrine disrupting chemicals was revised in 2011. The original and revised CFs are included as Annexes in the Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (7). The revised CF comprises five levels, each level corresponding to a difference level of biological complexity. The ER Transactivation (TA) assays described in this PBTG are level 2, which includes "*in vitro* assays providing data about selected endocrine mechanism(s)/pathway(s)". This PBTG is for *in vitro* Transactivation (TA) test methods designed to identify estrogen receptor (ER) agonists.

3. The interaction of estrogens with ERs can affect transcription of estrogen-controlled genes, which can lead to the induction or inhibition of cellular processes, including those necessary for cell proliferation, normal fetal development, and reproductive function (8) (9) (10). Perturbation of normal estrogenic systems may have the potential to trigger adverse effects on normal development (ontogenesis), reproductive health and the integrity of the reproductive system.



4. *In vitro* TA assays are based on a direct or indirect interaction of the chemical with a specific receptor that regulates the transcription of a reporter gene product. Such assays have been used extensively to evaluate gene expression regulated by specific nuclear receptors, such as ERs (11) (12) (13) (14) (15). They have been proposed for the detection of estrogenic transactivation regulated by the ER (16) (17) (18). There are at least two subtypes of nuclear ERs, termed  $\alpha$  and  $\beta$ , which are encoded by distinct genes and with different tissue distributions, relative ligand binding affinities and biological functions (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25). Nuclear ER $\alpha$  mediates the classic estrogenic response (26) (27) (28) (29), and therefore most models currently being developed to measure ER activation are specific to ER $\alpha$ . The assays are used to identify chemicals that activate the ER following ligand binding, after which the receptor-ligand complex binds to specific DNA response elements and transactivates a reporter gene, resulting in increased cellular expression of a marker protein. Different reporter responses can be used in these test methods. In luciferase based systems, the luciferase enzyme transforms the luciferin substrate to a bioluminescent product that can be quantitatively measured with a luminometer. Other examples of common reporters are fluorescent protein and the *LacZ* gene, which encodes  $\beta$ -galactosidase, an enzyme that can transform the colourless substrate X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-galactopyranoside) into a blue product that can be quantified with a spectrophotometer. These reporters can be evaluated quickly and inexpensively with commercially available test kits.

5. Validation studies of the STTA and the BG1Luc TA assays have demonstrated their relevance and reliability for their intended purpose (3) (4) (5) (30). Performance standards for luminescence-based ER TA assays using ovarian cells lines are included in ICCVAM Test Method Evaluation Report The LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (8). These performance standards have been modified to be applicable to both the STTA and BG1 methods (2).

6. Definitions and abbreviations used in this Test Guideline are described in [Annex 1](#).

#### ***Scope and limitations related to the TA assays***

7. These test methods are being proposed for screening and prioritisation purposes, but can also provide mechanistic information that can be used in a weight of evidence approach. They address TA induced by chemical binding to the ERs in an *in vitro* system. Thus, results should not be directly extrapolated to the complex signaling and regulation of the intact endocrine system *in vivo*.

8. TA mediated by the ERs is considered one of the key mechanisms of endocrine disruption (ED), although there are other mechanisms through which ED can occur, including (i) interactions with other receptors and enzymatic systems within the endocrine system, (ii) hormone synthesis, (iii) metabolic activation and/or inactivation of hormones, (iv) distribution of hormones to target tissues, and (v) clearance of hormones from the body. None of the test methods under this PBTG addresses these modes of action.

9. This PBTG addresses the ability of chemicals to activate (*i.e.* act as agonists) but not to suppress ER-dependent transcription (*i.e.* act as antagonists). Therefore, chemicals that are negative in these test methods should be evaluated in an ER binding assay or in an assay known to detect ER antagonists before concluding that the chemical does not bind to the receptor. In addition, the assay is only likely to inform on the agonist activity of the parent molecule bearing in mind the limited metabolising capacities of the *in vitro* cell systems. Considering that only single substances were used during the validation, the applicability to test mixtures has not been addressed.

22 December 2011

10. For informational purposes Table 1 provides the test results for the 34 chemicals that were tested in both of the fully validated test methods described in this PBTG. Of these chemicals, 26 are classified as definitive ER agonists and 8 negatives based upon published reports, including *in vitro* assays for ER binding and TA, and/or the uterotrophic assay (3) (18) (30) (32) (33) (34) (35). There was 100% agreement between the two test methods on the classifications of all the chemicals, and each chemical was correctly classified as an ER agonist or negative. Supplementary information on this group of chemicals as well as additional chemicals tested in the STTA and BG1 Luc ER TA test methods during the validation studies is provided in the Performance Standards for the ER TA (2), Annex 2 (Tables 1, 2 and 3).

**Table 1: Comparison of Results from STTA and BG1Luc ER TA Assays for Chemicals Tested in Both Assays and Classified as ER Agonists or Negatives**

Chemical	CASRN	STTA ER TA <sup>1</sup>			BG1Luc ER TA <sup>2</sup>		Data Source For Classification <sup>4</sup>		
		ER TA Activity	PC <sub>10</sub> Value (M)	PC <sub>50</sub> Value <sup>b</sup> (M)	ER TA Activity	EC <sub>50</sub> Value <sup>b,3</sup> (M)	Other ER TAs <sup>5</sup>	ER Binding	Uterotrophic
17-β Estradiol <sup>a</sup>	50-28-2	POS	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	POS	5.63 × 10 <sup>-12</sup>	POS(227/227)	POS	POS
17-α Estradiol <sup>a</sup>	57-91-0	POS	7.24 × 10 <sup>-11</sup>	6.44 × 10 <sup>-10</sup>	POS	1.40 × 10 <sup>-9</sup>	POS(11/11)	POS	POS
17-α Ethinyl estradiol <sup>a</sup>	57-63-6	POS	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	POS	4.20 × 10 <sup>-8</sup>	POS(22/22)	POS	POS
17-β-Trenbolone	10161-33-8	POS	1.78 × 10 <sup>-8</sup>	2.73 × 10 <sup>-7</sup>	POS	7.31 × 10 <sup>-12</sup>	POS(2/2)	NT	NT
19-Nortestosterone <sup>a</sup>	434-22-0	POS	9.64 × 10 <sup>-9</sup>	2.71 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1.80 × 10 <sup>-6</sup>	POS(4/4)	POS	POS
4-Cumylphenol <sup>a</sup>	599-64-4	POS	1.49 × 10 <sup>-7</sup>	1.60 × 10 <sup>-6</sup>	POS	3.20 × 10 <sup>-7</sup>	POS(5/5)	POS	NT
4- <i>tert</i> -Octylphenol <sup>a</sup>	140-66-9	POS	1.85 × 10 <sup>-9</sup>	7.37 × 10 <sup>-8</sup>	POS	3.19 × 10 <sup>-8</sup>	POS(21/24)	POS	POS
Apigenin <sup>a</sup>	520-36-5	POS	1.31 × 10 <sup>-7</sup>	5.71 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1.60 × 10 <sup>-6</sup>	POS(26/26)	POS	NT
Atrazine <sup>a</sup>	1912-24-9	NEG	-	-	NEG	-	NEG(30/30)	NEG	NT
Bisphenol A <sup>a</sup>	80-05-7	POS	2.02 × 10 <sup>-8</sup>	2.94 × 10 <sup>-7</sup>	POS	5.33 × 10 <sup>-7</sup>	POS(65/65)	POS	POS
Bisphenol B <sup>a</sup>	77-40-7	POS	2.36 × 10 <sup>-8</sup>	2.11 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1.95 × 10 <sup>-7</sup>	POS(6/6)	POS	POS
Butylbenzyl phthalate <sup>a</sup>	85-68-7	POS	1.14 × 10 <sup>-6</sup>	4.11 × 10 <sup>-6</sup>	POS	1.98 × 10 <sup>-6</sup>	POS(12/14)	POS	NEG
Corticosterone <sup>a</sup>	50-22-6	NEG	-	-	NEG	-	NEG(6/6)	NEG	NT
Coumestrol <sup>a</sup>	479-13-0	POS	1.23 × 10 <sup>-9</sup>	2.00 × 10 <sup>-8</sup>	POS	1.32 × 10 <sup>-7</sup>	POS(30/30)	POS	NT
Daidzein <sup>a</sup>	486-66-8	POS	1.76 × 10 <sup>-8</sup>	1.51 × 10 <sup>-7</sup>	POS	7.95 × 10 <sup>-7</sup>	POS(39/39)	POS	POS
Diethylstilbestrol <sup>a</sup>	56-53-1	POS	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	2.04 × 10 <sup>-11</sup>	POS	3.34 × 10 <sup>-11</sup>	POS(42/42)	POS	NT
Di-n-butyl phthalate	84-74-2	POS	4.09 × 10 <sup>-6</sup>		POS	4.09 × 10 <sup>-6</sup>	POS(6/11)	POS	NEG
Ethyl paraben	120-47-8	POS	5.00 × 10 <sup>-6</sup>	(no PC <sub>50</sub> )	POS	2.48 × 10 <sup>-5</sup>	POS		NT
Estrone <sup>a</sup>	53-16-7	POS	3.02 × 10 <sup>-11</sup>	5.88 × 10 <sup>-10</sup>	POS	2.34 × 10 <sup>-10</sup>	POS(26/28)	POS	POS
Genistein <sup>a</sup>	446-72-0	POS	2.24 × 10 <sup>-9</sup>	2.45 × 10 <sup>-8</sup>	POS	2.71 × 10 <sup>-7</sup>	POS(100/102)	POS	POS
Haloperidol	52-86-8	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
Kaempferol <sup>a</sup>	520-18-3	POS	1.36 × 10 <sup>-7</sup>	1.21 × 10 <sup>-6</sup>	POS	3.99 × 10 <sup>-6</sup>	POS(23/23)	POS	NT
Kepone <sup>a</sup>	143-50-0	POS	7.11 × 10 <sup>-7</sup>	7.68 × 10 <sup>-6</sup>	POS	4.91 × 10 <sup>-7</sup>	POS(14/18)	POS	NT
Ketoconazole	65277-42-1	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
Linuron <sup>a</sup>	330-55-2	NEG	-	-	NEG	-	NEG(8/8)	NEG	NT
<i>meso</i> -Hexestrol <sup>a</sup>	84-16-2	POS	<1.00 × 10 <sup>-11</sup>	2.75 × 10 <sup>-11</sup>	POS	1.65 × 10 <sup>-11</sup>	POS(4/4)	POS	NT
Methyl testosterone <sup>a</sup>	58-18-4	POS	1.73 × 10 <sup>-7</sup>	4.11 × 10 <sup>-6</sup>	POS	2.68 × 10 <sup>-6</sup>	POS(5/6)	POS	NT
Morin	480-16-0	POS	5.43 × 10 <sup>-7</sup>	4.16 × 10 <sup>-6</sup>	POS	2.37 × 10 <sup>-6</sup>	POS(2/2)	POS	NT
Norethynodrel <sup>a</sup>	68-23-5	POS	1.11 × 10 <sup>-11</sup>	1.50 × 10 <sup>-9</sup>	POS	9.39 × 10 <sup>-10</sup>	POS(5/5)	POS	NT
<i>p,p'</i> -Methoxychlor <sup>a</sup>	72-43-5	POS	1.23 × 10 <sup>-6</sup>	(no PC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	POS	1.92 × 10 <sup>-6</sup>	POS(24/27)	POS	POS
Phenobarbital <sup>a</sup>	57-30-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(2/2)	NEG	NT
Reserpine	50-55-5	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
Spironolactone <sup>a</sup>	52-01-7	NEG	-	-	NEG	-	NEG(4/4)	NEG	NT
Testosterone	58-22-0	POS	2.82 × 10 <sup>-8</sup>	9.78 × 10 <sup>-6</sup>	POS	1.75 × 10 <sup>-5</sup>	POS(5/10)	POS	NT

22 December 2011

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; M = molar; EC<sub>50</sub> = half maximal effective concentration of test chemical; NEG = negative; POS = positive; PC<sub>10</sub> (and PC<sub>50</sub>) = the concentration of a test chemical at which the response is 10% (or 50 % for PC<sub>50</sub>) of the response induced by the positive control (E2, 1nM) in each plate.

<sup>a</sup>Common chemicals tested in the STTA ER TA and BG1Luc ER TA that were designated as ER Agonists or negatives and used to evaluate accuracy in the BG1 Luc ER TA validation study ( ICCVAM BG1Luc ER TA Evaluation Report, Table 4-1 (3).

<sup>b</sup>Maximum concentration tested in the absence of limitations due to cytotoxicity or insolubility was  $1 \times 10^{-5}$  M (STTA ER TA) and  $1 \times 10^{-3}$  M (BG1Luc ER TA).

<sup>c</sup>Number in parenthesis represents the test results classified as positive (POS) or negative (NEG) over the total number of referenced studies.

<sup>1</sup>Values reported in Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30)

<sup>2</sup>ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

<sup>3</sup>Mean EC<sub>50</sub> values were calculated with values reported by the laboratories of the BG1Luc ER TA validation study (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) (3).

<sup>4</sup>Classification as an ER agonist or negative was based upon information in the ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31) as well as information obtained from publications published and reviewed after the completion of the ICCVAM BRDs (3) (18) (30) (32) (33) (34) (35).