

- (2009)
- 2) 小島 肇：培養皮膚モデルバリデーション研究、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
 - 3) 小島 肇：動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム
「安全性試験における動物実験代替法—国内外の動向と代替法開発の現状—」、大宮 (2009)
 - 4) 小島 肇：動物実験代替法における培養細胞の利用：合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
 - 5) 小島 肇：バリデーション試験の今後の予定について、コメン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)
 - 6) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇：培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡(2009)
 - 7) 小島 肇：OECD Test Guideline収載モデルとしてのLabCyte EPI-MODLの可能性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (2009)
 - 8) Kojima, H. : 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) Kojima, H., Matsui, T., Kohara, A., Yoshida, A. and Nakamura, Y.: GCCP initiatives in Japan, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 15) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y.: Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 16) Wind, M., Blakey, D., Kojima, H., Kreysa, J. and Stokes, W.: What is the international cooperation on alternative test methods (ICATM) and what is its role?, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 17) Kojima, H. : JaCVAM's role in the 3Rs and ICATM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 18) Kojima, H. : Recent progress and future directions at JaCVAM, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 19) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 20) Takeyoshi, M., Kojima, H., Omori, T., Sozu, T. and Yoshimura, I.: Validation study for non-radioisotopic local lymph node assay based on BrdU incorporation (LLNA-BrdU), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 21) Kojima, H., Ando Y., Yamaguchi Y., Kosaka T., Suzuki T., Yuasa A., Watanabe Y., Shinoda S., Idehara K., Yoshimura I., Miyaoka E., Ishiyama K., Kato M., Omori T. : Validation of LabCyte EPI-MODEL24, an *In Vitro* Assay for Detecting Skin Irritants, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 22) Yamamoto, N., Hirano, K., Kato, M., Hata, K., Horiguchi, M., Taniguchi, K. and Kojima, H.: Cell surface maker of corneal epithelium stem cells and culture, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 23) Lowther, D., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Prinsen, M., Tice, R., Allen, D. and McCall, D.: International acceptance of *in vitro* alternative ocular safety testing methods: the isolated chicken eye (ICE) test method (Draft OECD TG 438), 7th World Congress

- on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 24) Merrill, J., Wind, M., Stokes, W., Barroso, J., Zuang, V., Amcoff, P., Kojima, H., Jacobs, A., McCall, D. Allen D. and Tice, R.,: International acceptance of *in vitro* alternative ocular safety testing methods: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test method (Draft OECD TG 437), 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 25) 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)
 - 26) 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)
 - 27) Kojima, H., Arai S. and Hojo M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
 - 28) 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)
 - 29) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schechtman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the *in vitro* alkaline comet assay, 25th ICEM , Florence (2009)
 - 30) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schechtman, 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)
 - 31) 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)
 - 32) 小島 肇：*In vitro* 安全性・機能性評価及び作用メカニズム・新規物質探索研究の最前線、第22回動物細胞工学シンポジウム、東京 (2009)
 - 33) 小島 肇：医薬部外品の承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会、日本産業皮膚衛生協会 秋季研修会、京都 (2009)
 - 34) Kojima, H.: Japanese views in the 3Rs in the 21st century, ZEBET's 20th Anniversary Symposium, Berlin, Germany (2009)
 - 35) Kojima, H.: Organization of JaCVAM and its activity, KoCVAM International Symposium and 6th Congress of KSAAE, Seoul (2009)
 - 36) Kojima, H.: Utilization of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 37) Kojima, H.: Japanese approach to regulatory acceptance of new skin sensitization testings with considerations to animal welfare and 3Rs, The 17th ICDS (International Contact Dermatitis Symposium) and the 10th APEODS (Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium), Kyoto (2009)
 - 38) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森崇：培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 39) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷺田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：医薬部外品の承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 40) 小島 肇、井上 達、増田光輝、秋田正治、大野泰雄：動物実験代替法公定化のためのJaCVAM 提案書、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 41) 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)
 - 42) 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研究、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
 - 43) 小島 肇、笠松俊夫：IWGT 報告 トピック3：予測性の高い *in vitro* 試験の提案、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)
 - 44) 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)
- 45) 小島 肇、北條麻紀、新井晶子：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイと細胞毒性の関係、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡(2009)
 - 46) 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)
 - 47) 伊藤正俊、関東裕美、鷲崎久美子、松永佳世子、矢上晶子、中川真美子、加藤則人、河合恵一、滝脇弘嗣、吉村 功、小島 肇：パッチテストによる皮膚一次刺激性評価(2)、第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、京都(2009)
 - 48) 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)
 - 49) 小島 肇、飯島正文、松永佳世子、佐々 斉、板垣 宏、岡本裕子、西山直宏、小野寺博志、見田 活、鷲田 淳、益山光一、増田光輝、大野泰雄：あり方検討会設立の経緯及び動物実験代替法の現状、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わる資料のあり方検討委員会報告、東京(2009)
 - 50) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代分離培養法及び遺伝子導入法の検討、日本組織培養学会第82回大会、栃木(2009)
 - 51) 山本直樹、平野耕治、谷川篤宏、加藤雅一、畠賢一郎、小島 肇、綾木雅彦、堀口正之、谷口孝喜：角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法及び遺伝子導入法の検討、第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸(2009)
 - 52) 小島 肇：今後の展望、JaCVAM第3回ワークショップ、h-CLATシンポジウム、東京(2010)
 - 53) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo, M.: Adequate conditions for performance of comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
 - 54) W Stokes, M Wind, D Blakey, J Kreysa, H Kojima, E Anklam: Establishment of the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) and Its Role in the Validation and Regulatory Acceptance of Globally Harmonized Safety Assessment Methods, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
 - 55) 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, 49th Annual SOT meeting, Salt Lake City (2010)
 - 56) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之：マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第114回日本眼科学会総会(2010.4)
 - 57) 小島 肇：ヒトiPS細胞を用いた新規*in vitro*毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー(2010.5)
 - 58) 小島 肇：パネルディスカッション 新しい感作性及び局所刺激性(皮膚・眼)試験法のOECDテストガイドライン、日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄(2010.6)
 - 59) 小島 肇：医薬部外品、化粧品のRegulatory Scienceの展望、第11回光老化研究会、東京慈恵会医科大学(2010.7)
 - 60) Kojima.H.: Global impact of 3Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
 - 61) Kojima.H., Inoue, T. and Ohno.Y.: JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
 - 62) 小島 肇：昨今の国際バリデーション研究の進捗、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第5回教育セミナー(2010.8)
 - 63) 小島 肇：皮膚感作性試験のインビトロ代替法の現状、日本免疫毒性学会学術大会、独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール(2010.9)
 - 64) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M.: Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010.9)
 - 65) 小島 肇：パイロジェン試験、大阪医薬品協会技術研究委員会、大阪(2010)
 - 66) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討 第3報、日本環境変異原学会第39回大会、つくば(2010.11)
 - 67) 宇野芳文、小島 肇：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(第2報)、日本環境変異原学会第39回大会、つくば(2010.11)
 - 68) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一：培養

- 皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京 (2010.12)
- 69) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水孝¹⁾、森本隆史、林 和彦、坂口 斉：眼刺激性試験代替法 (STE 試験) バリデーション研究 第 3 報、日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京 (2010.12)
- 70) 小島 肇、北條麻紀：3 次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京 (2010.12)
- 71) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発—発癌性、発生毒性、免疫毒性—今後の展望、日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京 (2010.12)
- 72) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第 10 回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪 (2011.1)
- 73) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向、日本動物実験代替法学会・JaCVAM 合同ワークショップ 動物実験の 3R における国際動向、東京 (2011.2)
- 74) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第 15 回勉強会ワークショップ、大阪 (2011.2)
- 75) Kojima, H.: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM contributions and Future Plans, Information Session: The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM): Translating Science to Provide Improved Public Health Safety Assessment Tools, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 76) Kojima, H. and Hojyo, M.: Optimal conditions for performance of the comet assay using a three-dimensional human epidermal model, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 77) W Casey, P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, E Grignard, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes.: Final Results of an International Validation Study of an *In Vitro* ER TA Test Method in BG-1 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 78) F Deal, W Casey, P Ceger, D Allen, C Yang, M Nakamura, H Kojima, A Ono, HJ Yoon, SY Ha⁷⁾, W Stokes: International Validation Study of an *In Vitro* Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF-7 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 79) J Kulpa-Eddy, R McFarland, R Isbrucker, M Halder, H Kojima, B Jones, NW Johnson, D Allen, E Lipscomb, S Morefield, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 80) 小島 肇：日本における動物実験代替法の現状、シンポジウム S2H27 アジアにおける動物実験代替法の展開、第 84 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜 (2011.3)
- 81) 小島 肇：動物実験代替法の行政的受け入れと国際協調、シンポジウム S30 レギュラトリーサイエンスは社会にどう役立っているか—薬学系人材の役割と活躍の場を知る—、日本薬学会第 131 回年会、静岡 (2011.3)
- 82) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
- 83) 小島 肇：安全性評価のための *in vitro* 試験法を確立するために何をなすべきか、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター (2011.5)
- 84) 山本直樹、平野耕治、小島 肇、住友万里子、山下宏美、中村政志、原 和宏、谷川篤宏、谷口考喜、堀口正之：ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター (2011.5)
- 85) 小島 肇：医薬品・医療機器の許認可に求められる安全性試験、第 7 回大阪大学医工連携シンポジウム 第 2 回 MEI 産学官連携部門勉強会講演会 大阪大学銀杏会館 (2011.6)
- 86) Yamamoto, N., Hirano, K., Sumitomo, M., Yamashita, H., Nakamura, M., Hara, K., Tanikawa, A., Horiguchi, M., Taniguchi K. and Kojima, H. : Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line, 2011 In Vitro Biology Meeting, Raleigh, North Carolina, USA (2011.6)
- 87) Kojima, H.: Current and future of correlation with japan and Korea on alternative to animal experiments, 8th Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
- 88) 小島 肇：代替法から *in vitro* toxicology への発想転換、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜 (2011.7)
- 89) 小島 肇：動物実験代替法の申請資料への活用、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第 6 回教育セミナー、タワーホール船堀 (2011.7)
- 90) 小島 肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧品の安全性評価における代替法、千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウ

- ム(第4回)、化学会館・Fホール (2011.7)
- 91) Kojima, H.: Section II-11 The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 92) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 93) Kojima, H., Yamakage, K., Oba, S., Tsuge, H., Aoki, M.: Preliminary study of the revision of Japanese Pharmacopoeia test for rubber closure for aqueous infusions, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 94) Ono, A., Takeyoshi, M., Bremer, S., Jacobs, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 95) Hayashi, K., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Watanabe, S. and Kojima, H.: Inter-laboratory phase II validation study of *in vitro* eye irritation test; Short Time Exposure (STE) test, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 96) Nakamura, M., Suzuki, T., Shinoda, S., Kato, M. and Kojima, H.: Additional validation of alternative skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24 of cultured skin, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 97) McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in human vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 98) Kulpa-Eddy, J., McFarland, R., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in veterinary vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 99) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G., Spielmann H. and Telley, L.: AltTox.org: communication platform for 21st century toxicology, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 100) Shuichi Hamada, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazuyo Zaizen, Satoru Kawakami, Jin Tanaka, Hirotaka Matsumoto, Tomohiro Nakai, Hiroshi Suzuki, Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Soichiro Hagio, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi, Yousuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Kazunori Narumi, Hironao Takasawa, Izumi Ogawa, Wakako Ohyama, Madoka Nakajima, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Makoto Hayashi, and Masa Honma, Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats-Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, (2011.10)
- 101) Kojima, H.: Necessity of validation study of new or updated test methods for hazard assessment, Workshop on Validation of 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxic Test, Guangzhou, China (2011.11)
- 102) Kojima, H.: JaCVAM update, シンポジウム動物実験代替法センターの国際協調、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 103) 小島 肇: 厚生労働省の新規対応、シンポジウム日本における代替法研究の新しい胎動、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 104) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 105) 丸山 裕子、湯浅 敦子、日置孝徳、笠原 利彦、小島 肇: LLNA BrdU-ELISA におけるリンパ節細胞懸濁液調製方法の最適化に関する検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 106) 篠田伸介、萩原沙織、山口能宏、中村 牧、笠原利彦、芝井亜弥、加藤雅一、小島 肇: 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験法の追加共同研究、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 107) 内野 正、竹澤俊明、山下 邦彦、小島 肇、五十嵐良明、西村哲治: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法モデルの基礎的検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 108) 山口宏之、竹澤俊明、小島 肇: コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に構築したヒト角膜上皮モデルの有用性: 化学物質暴露後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として眼刺激性を外挿する新しいアプローチ、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)

- 109) 加藤 義直、山本 直樹、山下 宏美、佐藤 淳、水谷 宏、中田 悟、小島 肇：新規不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた眼刺刺激性試験代替法への取り組み、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、仙台 (2011.11)
- 110) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島 肇、林 真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究)、日本環境変異原学会 第 40 回大会、東京 (2011.11)
- 111) 宇野芳文、小島 肇、林 真：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 (第 3 報)、日本環境変異原学会 第 40 回大会、東京 (2011.11)
- 112) 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、東京(2011.12)
- 113) 小島 肇：動物実験代替法の国際的動向と JaCVAM 活動について、日本輸入化粧品協会技術部会、東京 (2011.12)
- 114) 小島 肇：毒性発現機序からみたリスク評価の現実 「毒性試験の代替に病理が果たす役割」、第 28 回日本毒性病理学会総会、東京 (2012.2)
- 115) 小島 肇：生物学的製剤基準とワクチンの品質確保にどこまで動物実験は有用か、国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた、東京 (2012.2)
- 116) 小野 敦 *in vitro* 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ (パネルディスカッション - *In vitro* トキシコロジー試験法の行政的な受け入れ) ”第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) 2010.6
- 117) Ono, A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, K. Matsuno*1, M. Kawabata, K. Yajima, T. Matsuyama, E. Kamata, M. Ema. "Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats" XII International congress of toxicology (Barcelona. Spain) 2010.7
- 118) T. Nohmi, Possible mechanisms underlying practical threshold for genotoxic carcinogens, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 119) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imal, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, T. Nohmi, M. Honma, Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 120) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, *In vivo* mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 121) T. Inoue, M. Tasaki, Y. Ishii, T. Okamura, Y. Suzuki, M. Jin, D. Hibi, T. Nohmi, T. Umemura, A. Nishikawa, Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 122) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, The aromatic amine 2,4-DAT induced point mutations in the target organ of carcinogenicity in F344 *gpt* delta rat, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 123) R. Ohta, H. Sui, T. Shiragiku, A. Akahori, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 1) Distinguishable of hepatic carcinogens from a non-carcinogen, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 124) O. Tajima, S. Yamada, Y. Kawamura, H. Hayashi, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 2) Evaluation of genotoxicity of aristolochic acid, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 125) T. Noguchi, T. Kamigaito, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, K. Masumura, M. Hasuko, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 3) Evaluation of genotoxicity of Nickel subsulfide by intratracheal instillation, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 126) K. Masumura, T. Nohmi, Inserted position of lambda EG10 transgene on *gpt* delta transgenic mouse genome, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 127) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of capsaicine and silymarin in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of

- Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 128) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on 1,2-dimethylhydrazine-induced mutagenesis and carcinogenesis in the colon of *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
- 129) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, Genotoxicity and pre-neoplastic lesions induced by 2,4-diaminotoluene in the liver of F344 *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
- 130) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma, T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λ EG10 DNA in *gpt* delta transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 131) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions accumulate in a different manner with aging of *gpt* delta transgenic mice, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 132) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt* delta transgenic rat for one-year feeding, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 133) Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M.: Establishment of simple *in vitro* Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 134) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity, The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology. (2009.8)
- 135) 本間正充; *In vitro* 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価. 日本環境変異原学会第38回大会(2009.11)
- 136) 本間正充; *In vitro* 遺伝毒性試験の問題点と将来: 第17回HAB研究機構学術年会 (2010. 5)
- 137) 本間 正充; 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス: 第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 138) 本間 正充; リスク評価における *in vitro* 遺伝毒性試験の役割: 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6)
- 139) Honma, M.; Novel approach for *in vitro* genotoxicity assessment: Novel Approaches in preclinical safety evaluation: Development and progress (2010.9)
- 140) Honma, M.; JaCVAM *in vitro* Comet assay international collaborative study (JaCVAM *in vitro*. International Symposium "Recent Advance in Comet Assay", (2010.11)
- 141) 田中仁、益森勝志、中嶋圓、林真; Comet Assay Atlas, 第39回日本環境変異原学会 (2010.11)J.
- 149) Tanaka, M. Ueda, S. Masumori, M. Nakajima, M. Hayashi: Comet assay atlas, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2011.8)
- 142) 福室 真仁, 田中 仁, 益森 勝志, 中嶋 圓, 林 真, 石田 雄二, 加国 雅和, 立野(向谷) 知世: ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス®) を利用した小核試験及びコメットアッセイ, 第40回日本環境変異原学会 (2011.11)
- 143) Chise Tateno, Yuji Ishida, Masakazu Kakuni, Shinji Fukumuro, Jin Tanaka, Shoji Masumori, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi: Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver (PXB mice®), 51th Society of Toxicology (2012.3)
- 144) M. Naya, N. Kobayashi, M. Ema, S. Kasamoto, M. Fukumuro, S. Takami, M. Nakajima, M. Hayashi, and J. Nakanishi: *In Vivo* genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using Comet assay following intratracheal instillation in rats, 51th Society of Toxicology (2012.3)
- 145) T Morita, M Hayashi, M Nakajima, N Tanaka, DJ Tweats, K Morikawa, T Sofuni, Practical decision tree for germ cell mutagens in GHS classification, 10th ICEM, Firenze, Italy, Aug. 2009.
- 146) T Morita, Concentration: Considering the 1 mM Limit, Experience and Data from Japan, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), Aug.17-19, 2009.
- 147) Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Akihiro Wakata, Shigeki Sawada, and Makoto Hayashi, Appropriate top concentration and evaluation of cytotoxicity in *in vitro* mammalian cell genotoxicity tests, 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS), Shimizu, Symposium, 2009.11.
- 148) 森田 健、森川 馨: GHS分類における専門家判断の適用、第37回日本トキシコロジー学会、沖縄 (2010)
- 149) 森田 健、本間正充、福島久美子、森川 馨: *In vitro* 染色体異常試験における1 mMの上限濃度は一般化学物質においても許容できるか? 第39回日本環境変異原学会、つくば (2010)
- 150) 森田 健、本間正充、森川 馨: 一般化学物質における哺乳類培養細胞を用いる遺伝毒性試験の最高濃度、日本薬学会第131年会、静岡 (2011)
- 151) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Analysis of *in vitro* chromosomal aberration test data with CHL cells for reducing top test concentration for industrial chemicals, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.

- 152) 森田 健、生殖細胞変異原性に関する国際的規制動向、第 40 回日本環境変異原学会、シンポジウム、東京、2011.11
- 153) 大野泰雄：代謝物の安全性評価と FDA 及び ICH の指針について、第 37 回日本トキシコロジー学会シンポジウム(2010. 6. 17)
- 154) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法) の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第 23 回大会シンポジウムのオーガナイズ(2010. 12. 5)
- 155) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性。日本薬理学会(2010. 3. 23 誌上発表)
- 156) Ohno. Y., Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1st Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 157) 大野泰雄、ICH M3(R2) ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011, 7. 13)
- 158) 大野泰雄、MD 試験および探索的 IND をめぐ
る最近の国際的動向、APDD シンポジウム
(2011. 12. 16)
- 159) 大野泰雄、安全性評価における動物実験と in vitro 代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会(111208)
- 160) Ohno, Y., Reliability of Data for New Drug Application in Japan –Non-GLP Tests–, Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)

G. 知的所有権の取得状況

G-1. 特許取得

特になし

G-2. 実用新案登録

特になし

G-3. その他

特になし

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 で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプトアルフレームワークのレベル 2 に示されている *in vitro* スクリーニング試験法のうち、行政的有用性が期待される 3 種の試験法について、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て信頼性・再現性の検証を行い、得られた結果をもとに OECD ガイドライン化の提案を行うことを目的とした研究を実施した。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) については、そのアンタゴニスト測定法について国内 3 施設及び欧州、韓国各 1 施設の参加により 3 タスクからなるバリデーション試験を開始したが、海外ラボで認められた問題の解決に時間がかかり、海外 2 施設及び国内 1 施設において試験継続が困難になった。その後、追加で参加した国内 1 施設においても Task2 で設定したクライテリア値を Task3 で再現できず、リードラボにおいて細胞や血清の再検討を実施した。米国で開発された Lumi-cell 法 (BG1 アッセイ) については、日米欧 3 施設の参加により 4 フェーズからなるバリデーションを実施し、得られた結果をもとにプロトコルを最終化し、バリデーション結果を基にした ICCVAM ガイドラインが成立した。さらに、OECD ガイドライン案及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案を ICCVAM から OECD に提案した。さらに、我が国で開発されたアンドロゲン受容体転写活性化法 (AR EcoScreen 法) について、過去に実施された国内バリデーション結果をもとにバリデーションレポート及びガイドライン案を OECD に提案し、OECD ピアレビューの結果を受けて追加バリデーション試験実施の検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、化学物質による内分泌かく乱性評価のための国際的な枠組みとして 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 5 段階からなるコンセプトアルフレームワークのレベル 2 に分類される *in vitro* 試験法である転写活性化試験法のうち、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 HeLa 細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対する試験法 (HeLa 法) 及び米国で開発された Lumi-cell 法 (BG1 アッセイ)、さらに我が国で開発されたアンドロゲン受容体に対する転写活性化試験法について欧米の研究機関と協力して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実施した。

B. 研究方法

1) HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 (ER) アンタゴニスト測定法バリデーション試験:

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繋いだ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、TG455 ガイドライン化にあたり OECD より要求された 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たバリデーション試

験を実施した。バリデーション試験実施にあたり国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)が中心となりJaCVAM、ECVAM、EFSA及び米国 EPA からの専門家、さらには生物統計専門家として寒水孝司博士(京都大学)を含むメンバーからなる Study Management Team (SMT)を組織し、本研究班では、バリデーション試験全体の進捗管理、各施設からの試験結果の収集と解析及びを行うとともに得られた結果をもとに評価クライテリアの最適化を含む必要なプロトコールの調整を行った。アンタゴニスト試験プロトコール及びバリデーション試験デザインは、本試験を開発した化学物質評価研究機構 (CERI) において作成された案をもとに SMT の承認を得て最終化された。バリデーション試験は、本試験法を開発した CERI をリードラボとして、その他、海外 2 施設 (VITO (ベルギー)、KFDA (韓国)) 及び国内 2 施設 (大塚製薬、カネカ) の計 5 施設により 3 タスクからなるバリデーション測定を開始した。また、平成 22 年度から新たに株式会社 日吉がバリデーション施設として参加し、バリデーション測定を開始し、日吉において実施した Task2 データをもとにクライテリアを更新した。平成 23 年度、日吉で Task3 試験を開始したもののクライテリア値を再現できず、原因解明のため HeLa9903 細胞を構築した住友化学より別ロットの細胞を入手して検討した結果、試験系 (細胞) 自体の問題が疑われたため、解決のためリードラボである CERI において、細胞や培地を含む試験条件の再検討を実施した。

2) Lumi-cell ER (BG1 細胞) アッセイ :

Lumi-cell ER アッセイ法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc.(XDS 社)により開発されたエストロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。ヒト卵巣がん細胞 (BG1 細胞) にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、化学物質による内在性エストロゲンレセプター(ER)への作用をルシフェラーゼ活性により検出する。本法については、米国 ICCVAM/NICEATM が中心となって、米国 ICCVAM から提案されたプロトコールに従いアゴニスト・アンタゴニスト両法について 4 フェーズからなる国際バリデーションを実施した。SMT には、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM、欧州 ECVAM 及び韓国 KoCVAM (平成 22 年度より) が参加し、試験施設として米国、日本、欧州の 3 施設 (XDS、ECVAM、日吉) が参加した。本研究班では、我が国の参加施設である株式会社・日吉において実施された測定結果の信頼性保証のためデータレビューを行うとともに、SMT 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、得られた結果をもとにプロトコールの最適化について議論するとともに、バリデーションレポート及び ICCVAM ガイドライン案の第三者レビューに協力した。さらに平成 23 年度には、ICCVAM ガイドラインをもとに、OECD に対して本試験法のガイドライン案 (アゴニスト・アンタゴニスト) 及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案の ICCVAM からの提案に協力するとともに、OECD VMG-NA 会議において最終化に向けた議論を行った。

3) AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 :

AR-EcoScreen 試験法は、アンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。AR-EcoScreen 細胞は、CHO-K1 細胞にヒトアンドロゲン受容体と蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミドおよび細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞株であり、細胞毒性評価を単一のプレート上で実施出来る上、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いた。そこで、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 ガイドライン案を作成し OECD に提案し、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の実施計画について検討した。

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) Task1 結果

Task1 では、OECD ガイドライン TG455 に従い、アゴニストアッセイにおけるリファレンス化合物の測定を実施した。追加で参加した日吉を含む全 6 施設ともエッジ効果の検討試験結果からエッジ効果は認められなかったため、以降の測定では 96 穴全てを用いるフォーマットで以降の測定を行うこととした。また、全ての参加施設において評価クライテリアを満たすデータの取得に成功した。全参加施設からのデータの評価クライテリアの比較を図 1 に示した。

1. 2) 国内3施設におけるTask2結果からのクライテリアの設定

Task2測定において、国内参加施設のうち大塚は予めCERIの施設内データをもとに設定した暫定クライテリアを満たす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。Task2をクリアした国内3施設の合計13回の測定結果の平均 \pm 2SDにより設定した暫定クライテリアの更新がSMTにて承認された。国内3施設のTask2結果から更新されたクライテリアを表1に示した。また、CERIにおけるプレバリデーション結果から陰性参照化合物として設定されていたコルチコステロンについては、一部の測定結果で擬陽性が示されたため、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再検討の結果、フルタミドに変更された。

1. 3) 海外2施設でのTask2における問題

海外の2施設(VITO、KFDA)では、予め設定した性能基準に近い再現性の良い測定結果を得ることが出来ず、得られた測定結果の信頼性の問題が示された。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ことから、調整済みの市販の培養用超純水の使用をプロトコルに追加した。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測定継続が困難となりTask2終了前にバリデーション試験から離脱した。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実施し、技術的な問題はほぼクリアし、再現性の良い結果が得られるようになったものの、やはりバリデーション期間が当初予定より延長したことなどから参加の継続が困難となりTask2終了前にバリデーション試験から離脱した。

1. 4) 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。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採用は保留となった。また、カネカはその後、in vitro事業から撤退したため、追加測定は困難となった。

1. 5) 日吉におけるTask2

日吉におけるTask2では、継代による細胞活性の低下(fold changeや発光強度の低下)、国内3施設の結果を基に設定された暫定クライテリアからの多項目における逸脱等の問題が認められたため、問題の解決の検討も含め全14回の測定を実施し、一部のクライテリアを逸脱するものの8~10及び13,14回目の測定結果は再現性が高く信頼出来ると判断されこれらのデータを採用しTask2を終了した。クライテリアは、日吉のTask2採用データと国内3施設のデータの平均値 \pm 2SDに再度アップデートされた(表1)。また、日吉での検討結果により明らかになった継代における培地交換頻度やトリプシン処理時間に関する注意点のプロトコルへの追加記載によるアップデートを行い、いずれもSMTで承認された。

1. 6) 日吉におけるTask3測定とCERIにおける測定系の再構築

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2)。一方、表3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。検討の結果、日吉におけるTask3データのクライテリア逸脱の原因は、アッセイに使用した細胞そのもの、もしくは継代時のトリプシン処理時間や培地交換頻度による細胞の反応性変化によるものと考えられた。そのため、HeLa9903細胞を構築した住友化学より新たなロットの細胞の供給を受け、CERIにて測定系の再検討を実施し、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。今後、再構築された条件（細胞、血清）を用いて日吉における Task3 を再開する予定である。

2) Lumi-cell ER アッセイ :

2. 1) バリデーション試験結果と ICCVAM ガイドライン

LumiCell バリデーションに関しては、平成 22 年度までに予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了した。データ解析の結果、アンタゴニストアッセイにおいて多くの化合物で高濃度域における非特異的なルシフェラーゼ活性低下が観察されたことに伴う最高濃度の低減化、アゴニスト・アンタゴニストアッセイにおける活性判定基準について、基準値をコントロール背景値の $\pm 3SD$ から $\pm 2000RLU$ に変更し、さらに従来は 1 点でも基準を超えれば陽性判定するとしていたのに対して、少なくとも 3 点以上からなる用量-反応曲線により判定するとの変更案が事務局より提案され SMT 電話会議においてメンバーの合意を得た。バリデーション結果を反映した最終プロトコルを基にした ICCVAM ガイドライン案について第三者レビューが実施され、ICCVAM ガイドラインが成立した。

2. 2) BG1 アッセイ OECD ガイドラインと エストロゲンアゴニスト PBTG の提案

さらに、平成 23 年度には、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）（参考資料 1）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（参考資料 2）及びパフォーマンススタンダード案（参考資料 3）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 会議においては、主に PBTG における Proficiency Chemicals リスト及び Performance Standards における Reference Chemicals リストについて議論が行われ、最終的に Reference Chemicals として 22 化合物、Proficiency Chemicals として 14 化合物について合意を得た。

3) AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 :

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、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。バリデーションレポートに対する OECD 第三者ピアレビュー（参考資料 4）では、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 ピアレビューの指摘を受けて、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、参加試験施設は、原則として以前のバリデーション参加施設とするが、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の参加を求める。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した上で参加を承認することとした。

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) によるアンタゴニスト測定法および米国で開発された Lumi-cell 法 (BG1 アッセイ) について、またアンドロゲン受容体に対するレポーターアッセイ試験法として、我が国で開発された AR-Ecoscreen 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。

HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション試験は、当初、国内 3 施設、海外 2 施設で開始したが、海外 2 施設では測定結果の再現性の問題解決に時間がかかり当初予定していたスケジュールより遅延したことなど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た。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クライテリアを完全には満たしていないことから再測定が必要となった、in vitro 事業からの撤退により追加測定は不可能となった。一方、残る国内 2 施設では、予定していた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済みである。しかし、2 施設のみデータでは施設間再現性の評価に十分ではないことから、平成 22 年度より追加施設として LumiCell バリデーション参加施設であった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、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、TG455 の頑強性を示す結果と考察された。一方、日吉におけるアンタゴニスト測定においては、Task2 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、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。その後、培養法の検討から、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日吉データを含めクライテリアをアップデートして、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、原因としてアッセイに使用した細胞そのもの、もしくは継代時のトリプシン処理時間や培地交換頻度による細胞の反応性変化によるものと考えられた。そのため、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、これらの条件を用いて日吉における Task3 の再測定を行う予定である。継代による反応性の極端な低下などは、海外 2 施設でも認められた問題であり、国際的に信頼されるガイドラインとするためには、この問題の原因解決は、重要である。本バリデーション試験は、問題の原因検討のため当初予定より大幅に遅れているが、バリデーション試験を実施して問題が明らかになったことで本研究を実施した意義は非常に大きいと考えられる。

LumiCell アッセイは、米国で開発された HeLa 法と同様の ER 転写活性化法であるが日米欧 3 極の代替法開発のための組織（JaCVAM、ECVAM、ICCVAM）における国際共同開発の枠組みの一環

として ICCVAM で計画したバリデーション研究協力を実施した。バリデーション試験においては、当初設定した評価クライテリアにより不採用となるデータが頻発する等の問題で計画は予定より遅れたものの、予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了し、データ解析の結果、特にアンタゴニストアッセイにおいては、高濃度域でほとんどの化合物が陽性判定となる等の問題があったが、測定における最高濃度の変更や判定基準変更等の大幅なプロトコルの修正が SMT で承認され、変更されたプロトコル案を基に提案された 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。最終年度には、ICCVAM ガイドラインを基に 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 ガイドライン案を ICCVAM と共同で作成し、ICCVAM から OECD への提案を行った。OECD ガイドラインの成立は今後であるが、アンタゴニストアッセイについては、陽性化合物が少なく（HeLa アッセイ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）、今後、アンタゴニスト法の PBTG 作成の際の懸案となる可能性が高いと考察された。

AR アッセイについては、過去に国内で実施されたバリデーション試験結果をもとにしたバリデーションレポートについて、OECD ピアレビューにお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く、追加バリデーションが要求された。追加バリデーション実施にあたって、まずは、実施体制や予算面での検討が必要であるが、追加バリデーション対象化合物として VMG-NA メンバーから提案された化合物には、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再検討が必要であると考察された。

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トフレームワ

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、国際的にコンセンサスの得られた試験法が存在せず、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。

本研究班で検討を進めてきた、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 (Lumicell アッセイ) 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、国際的に受け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。一方、アンドロゲン受容体作用を評価する AR Ecoscreen 法については、過去に実施されたバリデーション試験について実施化合物数が少ないとの評価が示され、今後、追加バリデーションが必要となった。これらの試験法はいずれも既存の試験法を代替する方法ではなく、OECD ガイドラインとしては、毒性そのものではなく毒性メカニズムを評価するという新たな試験法である。そのため、エストロゲン受容体アンタゴニストやアンドロゲン受容体作用についてリファレンスとなる物質が限られており、バリデーション試験における対象化合物の選定も課題であった。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であると考えられる。

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

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, Ono A, Hirose A. "Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake." *Regul Toxicol Pharmacol*. 58(2):237-42.(2010)

2. 学会発表

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

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

小野 敦 " *in vitro* 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ

(パネルディスカッション - *In vitro* トキシコロジー試験法の行政的な受け入れ)"

第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) 2010.6

A. Ono, A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, K. Matsuno*1, M. Kawabata, K. Yajima, T. Matsuyama, E. Kamata, M. Ema. "Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats" XII International congress of toxicology (Barcelona, Spain) 2010.7

F.Deal, W.Casey, P.Ceger, D.Allen, C.Yang, M.Nakamura, H.Kojima, A.Ono, H.Yoon, S.Han, W.Stokes "International Validation Study of an *in vitro* Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell" 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3

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. 添付資料

添付資料 1 : DRAFT PROPOSAL FOR A NEW TEST GUIDELINE: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists

添付資料 2 : 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 3 : Draft Performance Standards for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Agonists (For TG 455).

添付資料 4 : 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.

Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

	1st	2nd	3rd	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD
Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2)	> 6	≥ 4	≥ 4	4.1 ~ 14.8 5.5 ~ 13.2	2.7 ~ 16.1 4.6 ~ 14.1	1.4 ~ 17.4 3.6 ~ 15.1
RTA of 1 nM E2	> 100%	≥ 100%	≥ 100%	122.8 ~ 208.9 131.1 ~ 196.8	112.1 ~ 219.7 122.9 ~ 205	101.3 ~ 230.4 114.7 ~ 213.2
RTA of 1 μM OHT	< 16.9%	≤ 39.4%	≤ 40.6%	3.2 ~ 40.6 3.6 ~ 38.8	-1.5 ~ 45.3 -0.8 ~ 43.2	-6.2 ~ 49.9 -5.3 ~ 47.7
RTA of 100 μM Dig.	< 0%	≤ 0%	≤ 0%	-23.5 ~ -1.3 -21.1 ~ -3.7	-26.3 ~ 1.5 -23.3 ~ -1.5	-29.1 ~ 4.2 -25.5 ~ 0.7

Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals)

		1st	2nd	3rd	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD
OHT	log [lin.IC30]	-9.86 ~ -8.76	-9.62 ~ -8.73	-9.58 ~ -8.63	-9.58 ~ -8.63 -9.47 ~ -8.74	-9.70 ~ -8.51 -9.56 ~ -8.65	-9.82 ~ -8.39 -9.65 ~ -8.56
	log [lin.IC50]	-9.79 ~ -8.28	-9.46 ~ -8.16	-9.36 ~ -8.09	-9.36 ~ -8.09 -9.29 ~ -8.16	-9.52 ~ -7.93 -9.43 ~ -8.02	-9.68 ~ -7.77 -9.57 ~ -7.88
	log [var.IC50]	-9.15 ~ -8.94	-9.32 ~ -8.20	-9.26 ~ -8.12	-9.26 ~ -8.12 -9.23 ~ -8.13	-9.40 ~ -7.98 -9.36 ~ -7.99	-9.54 ~ -7.84 -9.50 ~ -7.85
TAM	log [lin.IC30]	-7.88 ~ -6.99	-7.55 ~ -6.84	-7.68 ~ -6.37	-7.68 ~ -6.37 -7.66 ~ -6.42	-7.84 ~ -6.20 -7.82 ~ -6.26	-8.01 ~ -6.04 -7.97 ~ -6.11
	log [lin.IC50]	-7.48 ~ -6.50	-7.08 ~ -6.26	-7.14 ~ -5.90	-7.14 ~ -5.90 -7.11 ~ -5.96	-7.30 ~ -5.75 -7.25 ~ -5.82	-7.45 ~ -5.59 -7.40 ~ -5.68
	log [var.IC50]	-7.17 ~ -6.77	-7.02 ~ -6.32	-7.21 ~ -5.78	-7.21 ~ -5.78 -7.18 ~ -5.84	-7.39 ~ -5.60 -7.34 ~ -5.68	-7.57 ~ -5.42 -7.51 ~ -5.51
RU486	log [lin.IC30]	-6.20 ~ -5.32	-6.18 ~ -5.41	-6.10 ~ -5.41	-6.10 ~ -5.41 -6.04 ~ -5.48	-6.19 ~ -5.32 -6.11 ~ -5.41	-6.28 ~ -5.23 -6.18 ~ -5.34
	log [lin.IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08	-5.57 ~ -5.10	-5.57 ~ -5.10 -5.51 ~ -5.13	-5.63 ~ -5.04 -5.56 ~ -5.09	-5.69 ~ -4.98 -5.61 ~ -5.04
	log [var.IC50]	-6.22 ~ -5.32	-5.56 ~ -4.86	-5.51 ~ -4.91	-5.51 ~ -4.91 -5.40 ~ -5.00	-5.58 ~ -4.84 -5.45 ~ -4.95	-5.66 ~ -4.77 -5.50 ~ -4.90
1st: Corticosterone 2nd, 3rd: Fultamide	log [lin.IC30]	-	-	-	-	-	-
	log [lin.IC50]	-	-	-	-	-	-
	log [var.IC50]	-	-	-	-	-	-

表1 Task2 結果から更新された性能評価クライテリア

1st 列は、CERI におけるプレバリデーション結果から設定された暫定クライテリア、2nd 列は、初期参加 3 施設 (CERI、大塚、カネカ) の測定結果の平均値±2SD から設定したクライテリア、3rd 列は、3 施設の測定結果と日吉の測定結果を含めて平均値±2SD から再設定されたクライテリア

		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 μ M OHT		11.18	Pass	14.18	Pass	20.97	Pass	24.42	Pass	41.21	Fail
RTA of 100 μ M Dig.		-18.81	Pass	-14.19	Pass	-13.34	Pass	-7.48	Pass	-12.81	Pass
OHT	log[In.IC30]	-8.83	in \pm 2SD	-8.55	Fail	-8.41	Fail	-8.47	Fail	-8.60	Fail
	log[In.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[In.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[In.IC50]	-6.39	in \pm 2SD	-6.26	in \pm 2SD	-6.10	in \pm 2SD	-6.15	in \pm 2SD	-	Fail
RU486	log[In.IC30]	-5.72	in \pm 2SD	-5.34	Fail	-5.36	Fail	-5.17	Fail	-5.59	in \pm 2SD
	log[In.IC50]	-5.20	in \pm 2SD	-	Fail	-	Fail	-	Fail	-5.09	Fail
Flu.	log[In.IC30]	-4.49	Fail	-4.43	Pass	-4.02	Pass	-4.46	Pass	-4.49	Pass
	log[In.IC50]	-	-	-	-	-	-	-	-	-4.12	Pass

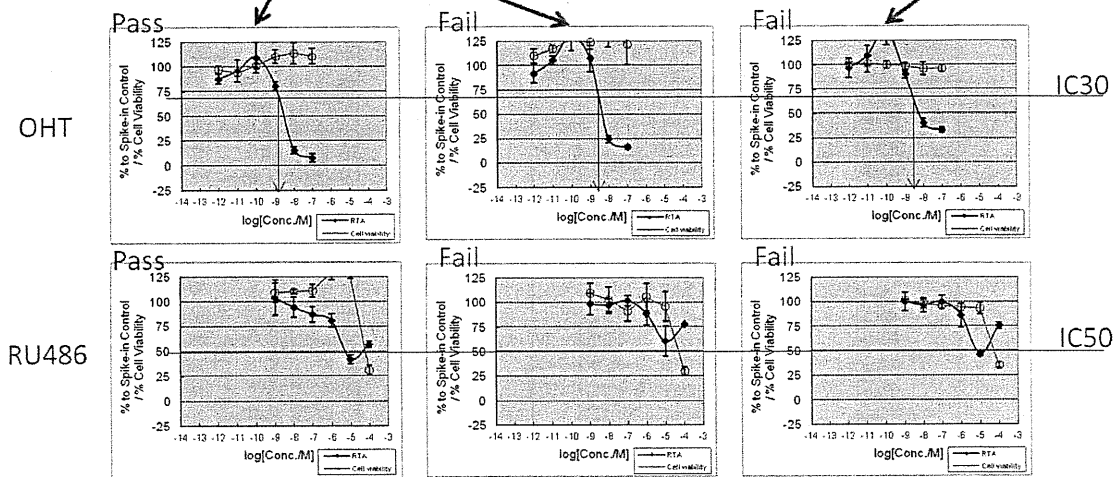


表2 日吉 Task3 におけるリファレンスプレートクライテリア

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(lm IC30)	Log(lm 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		
			Posi	-9.77	-9.50		
	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	-5.70	-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			

Chemical ID Name Expected effect	Laboratory	Judge	Judge of each assay	Log(Tox IC20)	Log(lm IC30)	Log(lm IC50)
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
	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	
	Otsuka	Nega	Nega	-4.16	-4.28	
			Nega			
			Nega	-4.02	-3.93	
	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3 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(ln IC30)	Log(ln 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]ethylene]bis[pheno l] 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		
			Nega	-3.78	-2.89	
Hiyoshi	Nega	Nega				
		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			
			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			
			weakPosi	-8.30		
	Otsuka	Posi	weakPosi		-8.05	
			weakPosi		-8.37	
			weakPosi		-8.86	
Hiyoshi	Posi	Nega				
		weakPosi		-8.31		
		weakPosi		-8.50		

Chemical ID Name Expected effect	Laboratory	Judge	Judge of each assay	Log(Tox IC20)	Log(ln IC30)	Log(ln 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
	Otsuka	Nega	Nega	-4.38	-2.95	-2.91
			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 17β-estradiol to be negative	CERI	Nega	Nega	-5.37		
			Nega	-5.27		
			Nega	-5.51		
			Nega	-5.48		
	Otsuka 1st test	Nega	Nega	-3.56		
			Nega			
	Otsuka 2nd test	Nega	Nega	-5.80		
			Nega	-5.70		
Hiyoshi	Nega	Nega	-5.50			
		Nega	-5.46			
		Nega	-5.40			
		Nega	-5.56			

表3 コード化合物判定結果の比較 (続き)

ARAGONIST	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 α -ethynyl 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 β -estradiol	50-28-2	P			POS	17 β -estradiol is a natural estrogen hormone. 17 β -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-Bestradiol 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 antagonist	steroid, phenolic, Natural estrogen hormone	4) 17 β -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)