

ANNEX 1

Definitions

Alkaline single cell gel electrophoresis: Sensitive technique for the detection of primary DNA damage at the level of individual cell/nucleus

Comet: The shape that nucleoids adopt after submitted to one electrophoretic field, due to its similarity to comets: the head is the nucleus and the tail is constituted by the DNA migrating out of the nucleus in the electric field.

A critical variable/parameter: This is a protocol variable for which a small change can have a large impact on the conclusion of the assay. Critical variables can be tissue-specific. Critical variables should not be altered, especially within a test, without consideration of how the alteration will alter an assay response, for example as indicated by the magnitude and variability in positive and negative controls. The test report should list alterations of critical variables made during the test or compared to the standard protocol for the laboratory and provide a justification for each alteration.

Tail intensity or % tail DNA: This corresponds to the intensity of the comet tail relative to the total intensity (head plus tail). It reflects the amount of DNA breakage, expressed as a percentage.

ANNEX 2

The Factorial Design for Identifying Sex Differences in the *in vivo* Comet Assay*The factorial design and its analysis*

1. In this design, a minimum of 5 males and 5 females are tested at each concentration level resulting in a design using a minimum of 40 animals (20 males and 20 females, plus relevant positive controls.)
2. The design, which is one of the simpler factorial designs, is equivalent to a two-way analysis of variance with sex and concentration level as the main effects. The data can be analysed using many standard statistical software packages such as SPSS, SAS, STATA, Genstat as well as using R.
3. The analysis partitions the variability in the dataset into that between the sexes, between the concentrations and that related to the interaction between the sexes and the concentrations. Each of the terms is tested against an estimate of the variability between the replicate animals within the groups of animals of the same sex given the same concentration. Full details of the underlying methodology are available in many standard statistical textbooks (see references) and in the 'help' facilities provided with statistical packages.
4. The analysis proceeds by inspecting the sex x concentration interaction term in the ANOVA table¹. In the absence of a significant interaction term the combined values across sexes or across concentration levels provide valid statistical tests between the levels based upon the pooled within group variability term of the ANOVA.
5. The analysis continues by partitioning the estimate of the between concentrations variability into contrasts which provide for a test for linear and quadratic contrasts of the responses across the concentration levels. When there is a significant sex x concentration interaction this term can also be partitioned into linear x sex and quadratic x sex interaction contrasts. These terms provide tests of whether the concentration responses are parallel for the two sexes or whether there is a differential response between the two sexes.
6. The estimate of the pooled within group variability can be used to provide pair-wise tests of the difference between means. These comparisons could be made between the means for the two sexes and between the means for the different concentration level such as for comparisons with the negative control levels. In those cases where there is a significant interaction comparisons can be made between the means of different concentrations within a sex or between the means of the sexes at the same concentration.

¹ Statisticians who take a modelling approach such as using General Linear Models (GLMs) may approach the analysis in a different but comparable way but will not necessarily derive the traditional ANOVA table which dates back to algorithmic approaches to calculating the statistics developed in a pre-computer age.

References

There are many statistical textbooks which discuss the theory, design, methodology, analysis and interpretation of factorial designs ranging from the simplest two factor analyses to the more complex forms used in Design of Experiment methodology. The following is a non-exhaustive list. Some books provide worked examples of comparable designs, in some cases with code for running the analyses using various software packages.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

ANNEX 3

Current Limitations of the Assay

Due to the current status of knowledge, several limitations are associated with the *in vivo* comet assay. It is expected that these limitations will be reduced or more narrowly defined as there is more experience with application of the assay to answer safety issues in a regulatory context.

1. Some types of DNA damage may be short-lived, i.e. may be repaired too quickly to be observed 24 hours or more after the last dose. There is no identifiable list of the types of short-lived damages, nor of the substances which are likely to cause this type of damage, nor is it known over what time period this type of damage can be detected. The optimum sampling time(s) may also be substance- or route-specific and sampling times should be determined from kinetic data (for example the time, T_{max} , at which the peak plasma or tissue concentration is achieved), when such data are available. Most of the validation studies supporting this guideline specified necropsy 2 or 3 hours following administration of the final dose. Most studies in the published literature describe administration of the final dose between 2 and 6 hours prior to sacrifice. Therefore these experiences were used as the basis for the recommendation in the test guideline that, in the absence of data indicating otherwise, the final dose should be administered at a specified time point between 2 and 6 hours prior to necropsy.
2. There are no identifiable study data that examine the sensitivity of the test for the detection of short-lived DNA damage following administration in food or drinking water compared to administration by gavage. DNA damage has been detected following administration in feed and drinking water, but there are relatively few such reports compared to the much greater experience with gavage and i.p. administration. Thus the sensitivity of the assay may be reduced for substances which induce short-lived damage administered through feed or drinking water.
3. No inter-laboratory studies have been conducted in tissues other than liver and stomach, therefore no recommendation has been established for how to achieve a sensitive and reproducible response in tissues other than liver, such as expected positive and negative control ranges. For the liver, agreement on setting a lower limit to the negative control value also could not be reached.
4. Although there are several publications demonstrating the confounding effect of cytotoxicity *in vitro*, very little data have been published *in vivo* and therefore no single measure of cytotoxicity could be recommended. Histopathological changes such as inflammation, cell infiltration, apoptotic or necrotic changes have been associated with increases in DNA migration however, as demonstrated by the JaCVAM validation trial (OECD, 2014), these changes do not always result in positive comet findings and consequently no definitive list of histopathological changes that are always associated with increased DNA migration is available. Hedgehogs (or clouds, ghost cells) have previously been suggested as an indicator of cytotoxicity, however, the etiology of the hedgehogs is uncertain. Data exist which suggest that they can be caused by substance-related cytotoxicity, mechanical/enzyme-induced damage initiated during sample preparation (Guerard et al., 2014) and/or a more extreme effect of test chemical genotoxicity. Other data seem to show they are due to extensive, but perhaps repairable DNA damage (Lorenzo et al., 2013).
5. Tissues or cell nuclei have been successfully frozen for later analysis. This usually results in a measurable effect on the response to the vehicle and positive control (Recio et al., 2010; Recio et al., 2012; Jackson et al., 2013). If used, the laboratory should demonstrate competency in freezing methodologies and confirm acceptable low ranges of % tail DNA in target tissues of vehicle

treated animals, and that positive responses can still be detected. In the literature, the freezing of tissues has been described using different methods. However, currently there is no agreement on how to best freeze and thaw tissues, and how to assess whether a potentially altered response may affect the sensitivity of the test.

6. Recent work demonstrates that the list of critical variables is expected to continue to become shorter and the parameters for critical variables more precisely defined (Guerard et al., 2014).

References

Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

Jackson, P. et al. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

Lorenzo, Y. et al. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

Recio, L. et al. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
新規の安全性評価試験法を国際的なガイドラインにするための手法に関する研究
平成 24-26 年度 総合分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション
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チュ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として行政的有用性が期待される試験法について、国内外の研究機関との協力により多施設国際バリデーションを実施し、得られた結果より信頼性・再現性の評価を行い OECD ガイドライン提案を行うことを目的とした研究を行った。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) のアンタゴニスト試験法については、バリデーション試験において幾つかの参加施設で定量的評価のためのリファレンスクライテリアの逸脱が解消出来なかったことから、定性的評価法として OECD にガイドライン (TG455) アップデート案及びアンタゴニスト試験法パフォーマンススタンダード案の提案を行い、平成 26 年度末にガイドラインが成立する見込みである。一方、アンドロゲン受容体転写活性化法として我が国で開発された AR EcoScreen 法については、OECD ピアレビューにより要求された追加バリデーション試験を実施し、非常に再現性の良い結果を得た。得られた結果をもとに、バリデーションレポート及び OECD 新規ガイドライン案の OECD 提案を行い、平成 27 年度に WNT コメント募集が実施される予定である。

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チュ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 (ER STTA 法) 及び 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 STTA 法) について、国内外の研究機関と協力してバリデーション試験を実施し、得られた結果から信頼性や再現性が確認された試験法を OECD ガイドラインとして提案することを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1) ER STTA 法

ER STTA 法は、ヒト由来の細胞(HeLa 細胞)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開発された。本法による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 (OECD TG455) されており、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。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、UK-PHE (UK-PHE の SMT メンバーは、開始当初は ECVAM に所属) 及び米国 EPA の専門家、及び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 (図 1) し、3 タスクからなるバリデーション試験デザイン (図 2) に従ってバリデーション測定を行った。得られた結果の詳細解析を行い、SMT においてクライテリアの変更等について検討を行った後、バリデーションレポート及びガイドライン案、パフォーマンススタンダード案を作成して OECD に提出し、WNT レビューコメントへの対応について OECD VMG-NA 会議において同意された内容を反映した修正稿を OECD に再提出した。

2) AR STTA 法

AR STTA 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 STTA 法に用いる 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 (図 3)。本試験系については、本研究班開始以前に実施された国内 3 施設によるバリデーション試験結果を基にしたバリデーションレポート及び OECD ガイドライン案について OECD ピアレビューが実施され、試験化合物数が少ないため、ガイドライン化にあたっては追加バリデーション試験の実施が要求された。そこで、本研究では、OECD VMG-NA メンバーの協力により追加測定化合物の選定を行い、VMG-NA メンバーより構成される SMT を組織し、バリデーション試験計画を策定し、国内 3 施設、海外 (韓国) 1 施設の参加によるバリデーション測定を実施し、バリデーション試験結果の解析を行い、得られた結果をもとに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 へ提出した。

C. 研究結果

1) ER STTA 法

1. 1 バリデーション試験の実施

バリデーション試験には、最終的に計 6 施設が参加したが、海外から参加した 2 施設 (VITO (ベルギー)、KFDA (韓国)) は、各施設の理由によりタスク 2 終了前にバリデーション研究より離脱した。国内 2 施設 (CERI、大塚) は、クライテリアを満たす結果を得てバリデーション測定を終了したが、国内 1 施設 (カネカ) の測定結果は、Task3 の多くでリファレンスク

ライテリアの逸脱が認められたが、カネカの *in vitro* 事業からの撤退により追加測定が不可能となった。

さらに、追加でバリデーション試験に参加した国内 1 施設（日吉）では、Task2 においては、最終的に一部のクライテリアを逸脱するものの再現性の高い 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。しかし、引き続き Task3 では、バリデーション計画で予定した 5 測定結果において、データ採用基準であるクオリティークライテリアを満たすものの、定量性を保証するためのリファレンスクライテリアを全て満たす結果を得ることは出来なかった（表 1）。

1. 2 コード化被験物質の活性評価結果の比較

Task3 におけるコード化被験物質の測定を実施した国内 4 施設の測定結果のうち、クオリティークライテリアを満たす採用プレートの結果からコード化被験物質のアンタゴニスト活性評価結果の比較を行った（表 2）。2 物質を除いて陽性/陰性判定結果は全施設で一致した。判定が一致しない結果となった物質のうち Atrazine では、日吉のみ 2 測定で IC30 が検出されたため陽性判定となったが、1 測定は陰性判定であった。一方、Dibenzol[a,h]anthracene では、CERI のみ陰性判定となったが、CERI 以外の測定結果でも IC30 のみが検出されてのみで、CERI の測定結果でも 1 測定では IC30 を検出した。全施設の測定結果からの判定は、これら 2 物質を含む全物質で期待された判定結果と一致した。すでに OECD ガイドライン化（TG457）されている BG1 細胞のバリデーション測定で結果が示されている 15 物質についての判定結果を表 3

に示した。15 物質のうち RU-486(Mifepristone)以外の判定結果は 100%一致した。RU-486 については、ER STTA 法では陽性、BG1Luc 法では陰性の結果が示されているが、これは BG1Luc のプロトコールにおける測定最高濃度が 10^{-6} M までと限定されていることが原因であると考えられる。また、ER STTA 法においても、後述のとおり施設によっては IC30 値が検出されておらず、活性が弱いため検出出来る限界濃度が測定可能な最高濃度に近いと推測される。

1. 3 リファレンスクライテリアの比較

国内 4 施設の Task3 測定結果のうちクオリティークライテリアを満たしたリファレンスプレートにおけるリファレンスクライテリア（表 1）について、カネカ、日吉の測定結果では、全クライテリアを満たす測定結果は得られておらず、さらに RU-486 の IC50 値は多くの結果で不検出であった。IC30, IC50 値の比較から、測定値は各施設内では安定しており、測定値のばらつきよりもむしろ、施設間での差がリファレンスクライテリア逸脱の原因として考えられた。また、各施設の測定結果の反応カーブは、クライテリアの逸脱の有無に関わらず大差はなく、コード化被験物質の判定結果から定性（陽性/陰性）判定に与える影響はほとんど無いと判断された。

1. 4 SMT 及び OECD VMG-NA での議論

得られた解析結果をもとに SMT で議論を行い、以下のように結論された。本系は定量的測定系として設計されており、リファレンスクライテリアは、定量値（IC30, IC50）の精度管理のため設けられている。バリデーション測定結果から、測定された IC30 や IC50 値に施設間差が認められたことから、本系の定量値の信

頼性については十分な検証が出来たとはいえないものの、クオリティクライテリアを満たす測定結果からのコード化被験物質の定性判定結果は、施設間で完全に一致することから定性判定法としての信頼性は実証されたと判断された。このことからアンタゴニスト試験法については、当初設定したクライテリアの変更等を行ったうえで定性的評価を行う系としてガイドライン化する方針について SMT 及び OECD VMG-NA 会議で合意された。

1.5 バリデーションレポート、OECD ガイドライン、パフォーマンススタンダードの作成

SMT 及び OECD VMG-NA 会議での合意内容に従い、バリデーションレポート案及びガイドライン (TG) 案、パフォーマンススタンダード (PS) 案を作成した。ER STTA アンタゴニスト試験法については、既に成立しているアゴニスト試験法ガイドライン(TG455)提案時のレビューにおいて追加が要求されたものであることから、バリデーションレポートについては、既に提出済みのアゴニスト試験法バリデーションレポートを part A として、本研究班で作成したアンタゴニスト試験法バリデーションレポートを part B として、TG 案について TG455 のアップデートとして、PS 案については、アゴニスト試験法の PS とは独立した案として提案を行った。OECD 提出後、WNT レビューにより TG 案、PS 案に対して米国、日本及び英国よりコメントが出された。いずれのコメントも主に記載の修正等であったため、コメントを反映した TG、PS 修正案について OECD VMG-NA 会議では、更なるコメント募集を行わず、次回の WNT で承認を得る方針で合意された。また、アンタゴニスト試験法を追加した TG455 アップデートの成立後、TG457 を廃止することについて VMG-NA 会議で合意

された (図 4)。

2) AR STTA 法

2.1 バリデーション試験

OECD VMG-NA よりアンドロゲン作用検出法もしくはレポーターアッセイ系に詳しいメンバーの協力により、以下に示す 5 名からなる Study Management Team (SMT) を組織し、バリデーション試験計画 (図 5) の策定を行った。

The AR-STTA 2nd validation study management team

- Atsushi Ono (NIHS, Japan)
- Masahiro Takeyoshi (CERI-Japan)
- Anne Marie Vinggaard (Technical University of Denmark)
- Jenny Odum (Regulatory Science Associate)
- Susan Laws (US EPA)

本バリデーション試験は、以前に行われたバリデーション試験結果に対する OECD ピアレビューコメントへの対応として、被験物質の追加を行うことを目的としており、アゴニスト・アンタゴニスト各系で測定を行う各 5 被験物質は、VMG-NA 内で組織された化合物選択小グループからの提案をうけて、表 4 に示す物質を選択した。バリデーション試験には、国内 3 施設・国外 1 施設 (韓国 NiFDS) が参加した。バリデーション試験では、フェーズ 1 で、リファレンス化合物の測定を行い、フェーズ 2 で、コード化被験物質の測定を行う計画とした。また、アゴニスト試験のリファレンス化合物として設定されていた R-1881 が入手不可であったことから Mestanolone を代替として選択し、国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに Mestanolone のリファレンスクライテリアを設定し、NiFDS のフェーズ 1 試験結果で適用

性の確認を行い、フェーズ 2 試験のクライテリアとして用いることとした。

2. 2 エッジ効果の検討

トレーニングフェーズにおける検証試験では、全施設でクライテリアを満たす結果の取得に成功した。検証試験にあわせて、各施設の測定機器固有のエッジ効果について確認を行った結果、いずれの施設においてもエッジ効果は認められなかった（表 5）。

2. 3 フェーズ 1

フェーズ 1 では、アゴニスト・アンタゴニスト評価系のリファレンス化合物（各 3 物質）の測定を行った。アゴニストアッセイにおいて、各施設ともクオリティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす 3 測定結果を得た（表 6）。Mestanolone のリファレンスクライテリアを国内 3 施設の 9 測定結果から平均±2SD で設定した。NiFDS の 3 測定結果は、Mestanolone のクライテリアも満たしており、本測定系の安定性・再現性の高さを示す結果となった。さらに、アンタゴニストアッセイにおいても、国内 3 施設ではクオリティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす 3 測定結果を得た（表 7）。NiFDS では、3 測定実施し、1 測定で fold induction の基準値が 5 以上であるのに対して 4.95 と若干低い結果であったがリファレンスクライテリアについては全て基準を満たしており、無視できるレベルの逸脱と判断された。他の 2 測定について全てのクライテリアを満たしていることから 3 測定でフェーズ 1 を終了した。

2. 4 フェーズ 2

フェーズ 2 では、アゴニスト・アンタゴニスト評価系のコード化被験物質の測定を行った。

いずれの評価系においても、全ての施設で 3 測定を実施し全ての測定結果でクオリティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす結果を得た（表 6, 7）。コード化被験物質の試験結果ではアゴニストアッセイにおいて、17β-estradiol で北海道、NiFDS の 2 施設では PC50 が検出されたのに対して残る 2 施設（CERI、住友化学）では、PC10 は検出されたものの PC50 は検出されなかった（図 6）。詳細な解析から、反応カーブそのものに施設間でほとんど差は無いものの、住友化学では、最大濃度における反応が若干低いことが、また、CERI では最高濃度が他の施設と比較して低いことが原因と判明した。アンタゴニストアッセイでは、陽性物質の Prochloraz について CERI 以外の 3 施設では、IC50 が検出されているのに対して CERI では、陰性判定となった（図 7）。解析の結果、2 物質ともに CERI では測定最高濃度が、他施設に比べ低いことが原因と考えられた。両物質について CERI において最高濃度を 1 段階高く設定して実施した追加測定結果（図 8）では、いずれの物質とも IC50 が検出され、その値は他施設とほぼ一致した。

2. 5 バリデーションレポート、OECD ガイドラインの作成

バリデーション試験結果の解析により、いずれの参加施設とも非常に再現性（施設内、施設間とも）の良い結果が得られたことにより、本試験系の信頼性・再現性が確認された。バリデーション試験で明らかになった問題点として、フェーズ 2 で実施したコード化化合物のアンタゴニスト測定結果において、溶解性試験により施設ごとに設定した最高測定濃度が低かったため、陽性判定されるべき被験物質について陰性の結果となった施設があった。高濃度での追加測定結果から、明らかに測定濃度設定の間

題であり、最高濃度設定の注意点として、多少の析出が認められても出来るだけ高い濃度での測定実施を行うようプロトコールに記載することとした。得られた結果をもとにバリデーションレポート案を作成し、VMG-NA 会議において報告を行ったが、レポート提出が会議直前であったため、レポートそのものについては詳細な議論は行われなかったが、バリデーション試験結果については、非常に良い結果を得ていることから、早急にガイドライン案を作成して OECD へ提出することが合意された。バリデーションレポート案及びガイドライン案を作成して OECD 事務局に提出した。

D. 考察

本研究では、OECD において化学物質による内分泌かく乱性評価のための試験法として必要とされている *in vitro* 試験法である転写活性化試験法として、いずれも我が国で開発された、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化試験法 (STTA 法) について、バリデーション試験の取り纏めを行い、得られた結果をもとに信頼性・再現性が示された手法について OECD ガイドライン化するための研究を進めてきた。

ER STTA 法のアンタゴニスト試験法バリデーションでは、Task3 測定を実施した 4 施設のうち国内 2 施設 (カネカ、日吉) では、予定した 5 測定以上実施したが、リファレンスクライテリアを完全に満たす測定結果を得ることは出来なかった。しかし、コード化被験物質定性的 (陽性・陰性) 判定結果は、クライテリアを満たすデータの取得に成功した 2 施設 (CERI、大塚) の結果とほぼ一致しており、本評価系の第一の目的である、評価対象の物質の ER アンタゴニスト作用の有無の判定に関して、日吉及びカネカの結果は十分評価可能で

あることを示す結果と考察された。この結果より、プレートごとに設定されたクオリティークライテリアを満たすデータであれば定性的評価における信頼性は担保されると判断された。さらに、コード化被験物質について測定された IC50 値や IC30 値に施設間で大きな差は認められなかったことから逸脱の原因は、測定値のばらつきによるものよりむしろ施設間差によるものと考察された。結果として得られたバリデーション試験結果のみから、定量的信頼性を担保するためのリファレンスクライテリアを設定することは困難と判断された。これらの結果より本系は定量的評価可能な評価系として開発されたが、定性的評価系としてガイドライン提案することで SMT の合意を得た。また、バリデーションプロトコールにおいてはリファレンス化合物として陽性 3 物質、陰性 3 物質が設定されていたが、ガイドライン提案ではリファレンスクライテリアを廃止し、陽性・陰性各 1 物質について測定を行い、それぞれの定性的 (陽性・陰性) 判定が行えること信頼性評価基準として用いることで SMT 及び VMG-NA 会議において合意が得られた。本系については SMT 及び VMG-NA 会議における合意に従い、OECD にガイドライン (TG455) アップデート案及びアンタゴニスト試験法パフォーマンススタンダード案の提案を行い、平成 26 年度末にガイドラインが成立する見込みである。

AR STTA 法に関しては、本研究以前に実施された国内バリデーション試験結果に対する OECD ピアレビューにおいて、測定実施物質が少ないとの指摘から要求された追加バリデーション試験のため VMG-NA メンバーからなる SMT を組織し、SMT で合意された試験計画に従いバリデーション試験を実施した。追加バリデーション試験における被験物質選定は、

VMG-NA メンバーの協力により行われ、本系での背景データがない物質についてリードラボである CERI において予備測定を行い決定した。バリデーション試験開始は予算上の都合から当初の予定より遅れたが、被験物質の選定に十分な検討が行えたことは、バリデーション試験における良好な成績につながったと考察される。

バリデーション試験においては、リファレンス化合物の測定結果については、アゴニスト・アンタゴニスト両アッセイとも施設内・施設間とも非常に安定しており、本バリデーション試験結果から計算された平均±2SD は、非常にばらつきの少ない測定結果を示した。そのため、本バリデーション試験で新たにアゴニストアッセイのリファレンス物質とした Mestanolone について国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに設定したリファレンスクライテリアは、アゴニストアッセイのもう 1 物質の陽性リファレンス物質である Dihydrotestosterone のクライテリアと比べて狭い許容範囲となったが、今回のバリデーション試験フェーズ 2 では全施設でクライテリアを満たす測定結果が得られていることから問題は無いと判断された。フェーズ 2 における、コード化合物の測定結果については、アゴニストアッセイでは、全施設の結果が完全に一致したのに対して、アンタゴニストアッセイにおいては、1 施設で測定最高濃度の違いによりコード化陽性 1 物質の作用が検出されず、最高濃度設定についてプロトコールにおける記載の見直しを行った。

なお、OECD VMG-NA 会議において、本バリデーション試験は、前述のごとく既に OECD 提出済みのバリデーションレポートに対するコメント対応であることからバリデーションレポートは、先のレポートの addendum

としてガイドライン案とともに提出すること及び、ガイドライン案については、バリデーションが終了している AR 転写活性化系が本系のみであることから、単独のガイドライン案として提出する方針に合意が得られ、合意に従い SMT メンバーの協力により、バリデーションレポート、OECD ガイドライン案を作成し、OECD へ提出した。バリデーションレポート案及びガイドライン案については、来年度、WNT コメント募集を行い、その結果をもとに、次回の VMG-NA 会議で最終化に向けた議論を行う予定をしている。

E. 結論

本研究では、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* スクリーニング法である 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 (ER STTA 法) 及びアンドロゲン受容体に対する転写活性化試験法である AR EcoScreen 法 (AR STTA 法) について、OECD ガイドライン化に向けた研究を実施した。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、スクリーニングレベルから確定試験に至るコンセプチュアルフレームワークに基づく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 に相当するものであり、また、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書で示された 2 段階からなる試験スキームにおいては、第 1 段階におけるスクリーニング手法のひとつでもある。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の規制は行われていないものの、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

ら我が国が提案する両評価系について OECD ガイドライン化が国際的に期待されている。

AR STTA 法については、複数の施設で最終的に定量性を担保する目的として設定したりファレンスクライテリアを満たすデータの取得が出来ない結果となったが、定性的評価についてのほぼ完全な再現性が得られ、定性的評価法としてガイドライン提案について OECD VMG-NA の合意が得られた。一方、AR STTA 法バリデーション試験においては、被験物質の選定や SMT メンバーとして VMG-NA メンバーからの協力が得られ、非常に再現性の良い結果を得た。新たな試験法のバリデーションやガイドライン化には、バリデーションの方法論だけではなく、当該試験系をよく理解した専門家の協力体制が不可欠であり、さらに OECD ガイドラインを始めとした国際ガイドライン化においては、関係各国の専門家を交えた議論が重要である。本研究で対象とした ER STTA 法、AR STTA 法はいずれも我が国で開発された試験法であるが、そのバリデーション試験実施やガイドライン化においては、OECD 加盟各国の専門家会合である VMG-NA メンバーから助言・提案や SMT 参画等による非常に多くの協力を得ることが出来た。今後、新たな試験法のガイドライン化にあたっては、試験法そのもののリスク評価における有用性や信頼性が示されることはもとより、バリデーションからガイドライン化にいたるプロセスにおいて、各試験法に対応した協力体制の整備が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

小野 敦 他 26 名, . 動物実験代替安全性試験プロトコル集 (監修 ; 小島肇夫) 第 18 章 BG1Luc 細胞を用いるエストロゲン受容

体転写活性化試験法. pp.228-242, シーエムシー出版 (東京) .2013.

小野 敦 他 34 名, . (2013). バイオテクノロジーシリーズ: *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 (監修 ; 小島肇夫) 第 3 章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価. pp.29-35, シーエムシー出版 (東京) .2013.

2) 雑誌

小野 敦 ; 効能の高い化粧品原料の安全性リスク評価に対する考え方; *Cosmetic stage*, 9,(1) 21-26 (2014)

H. Kato, S. Fujii, M. Takahashi, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose ; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats.; *Environ Toxicol*, (2014)

M. Ema, K. Endoh, R. Fukushima, S. Fujii, H. Hara, M. Hirata-Koizumi, A. Hirose, H. Hojo, M. Horimoto et al. ; Historical control data on developmental toxicity studies in rodents.; *Congenit Anom*, 54,150-161 (2014)

M. Takahashi, S. Ishida, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose ; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats.; *J Toxicol Sci*, 39,(1) 97-108 (2014)

M. Matsumoto, M. Yamaguchi, Y. Yoshida, M. Senuma, H. Takashima, T. Kawamura, H. Kato, M. Takahashi, M. Hirata-Koizumi, A. Ono, K. Yokoyama and A. Hirose (2013) An antioxidant, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD), affects labor and delivery in rats: a 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test. *Food Chem Toxicol* 56, 290-296.

M. Takahashi, K. Yabe, H. Kato, T. Kawamura,

- M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose (2013) Reproductive and developmental toxicity screening test of 3-cyanopyridine in rats. *Reprod Toxicol* **35**, 7-16.
2. 学会発表
- A. Ono :Toxicogenomics as alternative of traditional toxicological endpoints. *Korean Society for Alternatives to Animal Experiments 11th Annual Meeting* (2014.11, Korea)
- A. Ono, M. Takeyoshi, Y. Maeda, N. Suzuki, H. Kojima, S. Takeuchi, J. Hong, H. Lee, A. Vinggaard, J. Odum, S. Laws and H. Kojima :Inter-laboratory validation study of Androgen receptor stably transfected transcriptional activation (STTA) assay for new OECD test guideline. *The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences* (2014.8, プラハ、チェコ)
- 小野 敦 :トキシコゲノミクスによる肝毒性バイオマーカー. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- A. Ono, M. Hirata-Koizumi, R. Ise, H. Kato, T. Matsuyama, M. Ema and A. Hirose :Gender-related difference in the toxic susceptibility of rats to an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole: a role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. *49th Congress of the European Societies of Toxicology* (2013.8, Interlaken, Switzerland)
- A. Ono, M. Takahashi, K. Yabe, H. Kato, T. Kawamura, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi and A. Hirose :The Japanese existing chemical safety survey program : Reproductive toxicity of 3-cyanopyridine in rats.. *XIII International Congress of Toxicology (ICT2013)* (2013.7, Seoul, Korea)
- 小野 敦, 平田 睦子, 加藤 寛人, 伊勢 良太, 広瀬 明彦 :2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazoleによる肝毒性メカニズムのトランスクリプトーム解析. 2013,第40回日本毒性学会学術年会
- G. 知的財産所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

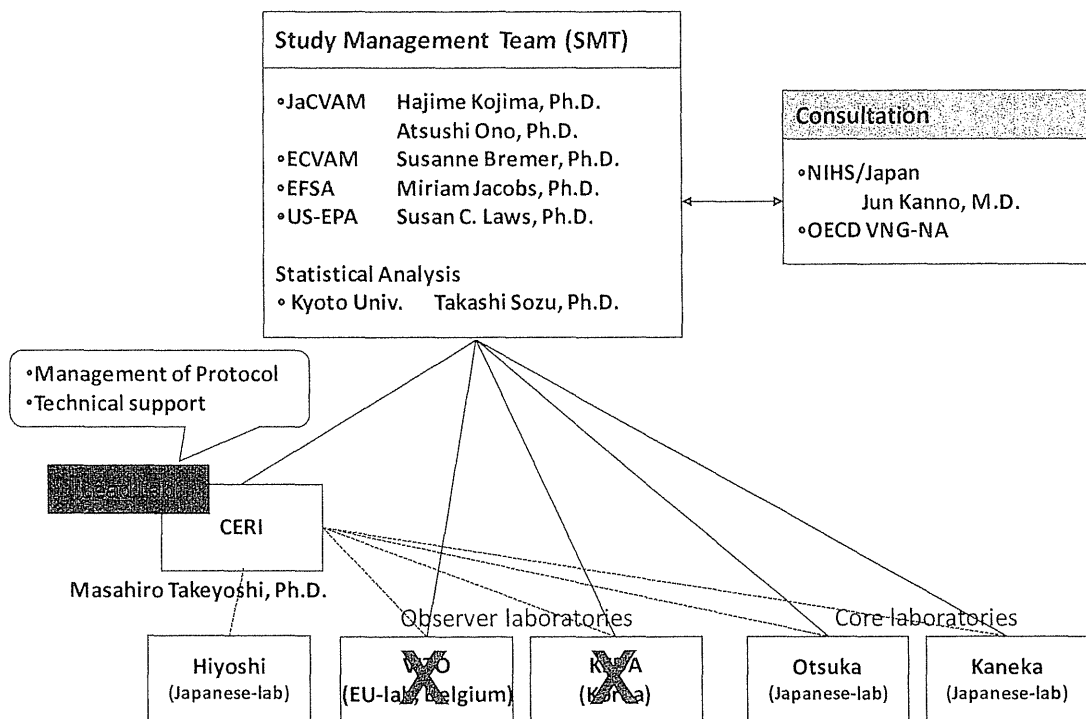


図 1 ER STTA アンタゴニスト試験のバリデーション組織図

Tasks	Purpose	Note
Start chemical distribution from JaCVAM.		
Start cell culturing at each lab and prepare cell stocks.		
Task-1	Confirm the edge effects (establish the plate layout)	no edge effects → use 96-well edge effects are expected → not use edge wells
	Confirm if the test system is properly setup, and the participating lab can demonstrate the basic assay performance.	Test un-coded 3 chemicals in "Agonist" Assay.
Task-2	Confirm lab performance for "Antagonist" (ATG) assay (including range finding test, cytotoxicity (cytotox.) test)	Test un-coded 4 chemicals in "Antagonist" Assay.
Task-3	Test coded chemicals in "Antagonist" (ATG) assay	• Test "anti-estrogenic" activities of coded 20 chemicals/lab.

図 2 ER STTA アンタゴニスト試験のバリデーション試験デザイン

✦ AR EcoScreen™ cell line was developed by Otsuka Pharm. Co., Ltd.

- ✦ Host cell line: CHO-K1 (derived from Ovary of Chinese hamster)
- ✦ No functional ER α , ER β , AR, TR α and TR β (Confirmed by mock transfection assay)
- ✦ Commercially available system

**AR-EcoScreen™ cell line
For BOTH AR Activity and Cytotoxicity Evaluations**

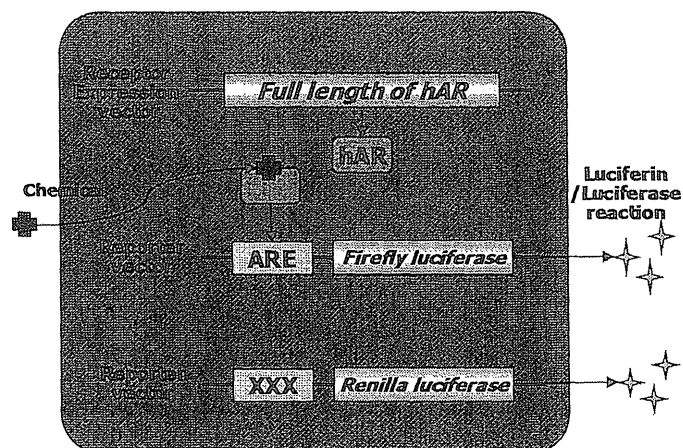


図 3 AR-EcoScreen 細胞

表1 ER STTA アンタゴニストバリデーションTask3におけるリファレンスクライテリア測定値 (赤字はクライテリアを逸脱した項目)

lab	Task	ID	4OH-Tamoxifen		Tamoxifen		RU-486		Flutamide		
			IC30	IC50	IC30	IC50	IC30	IC50	IC30	IC50	
			9.58	8.63	9.36	8.09	7.68	6.37	7.14	5.90	6.10
CERI	Task3a	1	-9.542	-9.277	-7.573	-7.21	-6.115	-5.608	ND	ND	
	Task3a	2	-8.958	-8.494	-7.003	-6.445	-5.761	-5.359	ND	ND	
	Task3a	3	-9.038	-8.563	-6.982	-6.382	-5.721	-5.397	ND	ND	
	Task3a	4	-9.129	-8.683	-7.358	-6.764	-6.095	-5.583	ND	ND	
	Task3b	2	-9.058	-8.604	-6.655	-6.273	ND	ND	ND	ND	
	Task3b	3	-9.128	-8.678	-7.036	-6.466	-5.815	-5.271	ND	ND	
	Task3b	4	-9.16	-8.683	-7.055	-6.46	-5.907	-5.416	ND	ND	
	Task3b	5	-8.895	-8.355	-6.777	-6.175	-5.691	-5.28	ND	ND	
	Task3b	6	-9.05	-8.508	-7.149	-6.383	-5.843	-5.415	ND	ND	
	Task3b	7	-8.515	-8.085	-6.685	ND	-5.895	-5.405	ND	ND	
	Task3b	8	-9.178	-8.832	-7.318	-6.833	-5.862	-5.446	ND	ND	
Task3b	9	-9.027	-8.6	-7.193	-6.68	-5.893	-5.347	ND	ND		
Task3b	10	-8.917	-8.431	-6.893	-6.322	-5.903	-5.28	ND	ND		
	Mean		-9.046	-8.599	-7.052	-6.533	-5.875	-5.401			
	SD		0.227	0.275	0.269	0.290	0.129	0.108			
OTSUKA	Task3a	1	-8.743	-8.453	-6.922	-6.598	-5.726	-5.36	ND	ND	
	Task3a	2	-8.798	-8.535	-6.898	-6.627	-5.477	-5.202	ND	ND	
	Task3a	3	-8.818	-8.558	-6.942	-6.566	-5.467	-5.185	ND	ND	
	Task3b	1	-8.928	-8.352	-6.867	-6.376	-5.696	-5.276	ND	ND	
	Task3b	2	-8.736	-8.369	-6.849	-6.439	-5.811	-5.192	ND	ND	
	Task3b	3	-8.905	-8.402	-7.064	-6.454	-5.767	-5.324	ND	ND	
		Mean		-8.821	-8.445	-6.924	-6.510	-5.657	-5.257		
	SD		0.080	0.086	0.077	0.101	0.149	0.075			
KANEKA	Task3a	1	-9.465	-9.3	-7.501	-7.221	-5.395	-5.097	ND	ND	
	Task2a	2	-8.51	-8.277	-6.426	-6.047	-5.342	ND	ND	ND	
	Task3a	3	-8.32	-8.054	-6.188	ND	-5.264	ND	ND	ND	
	Task3a	4	-8.495	-8.105	-6.586	-6.075	-5.716	-5.378	ND	ND	
	Task3a	5	-8.361	-8.106	-6.13	ND	-5.441	ND	-4.7	ND	
		Mean		-8.630	-8.368	-6.566	-6.448	-5.432	-5.238		
	SD		0.474	0.528	0.554	0.670	0.172	0.199			
HIYOSHI	Task3a	1	-8.548	-8.307	-6.548	-6.256	-5.338	ND	ND	ND	
	Task3a	2	-8.415	-8.199	-6.422	-6.096	-5.359	ND	ND	ND	
	Task3a	3	-8.472	-8.225	-6.417	-6.146	-5.173	ND	ND	ND	
	Task3a	4	-8.6	-8.206	-6.361	-5.506	-5.504	ND	ND	ND	
	Task3b	1	-8.544	-8.292	-6.373	-6.009	-5.713	ND	ND	ND	
	Task3b	2	-8.483	-8.167	-6.126	-5.556	-5.341	ND	ND	ND	
	Task3b	3	-8.633	-8.239	-6.266	-5.788	-5.359	ND	ND	ND	
	Task3b	5	-8.343	-8.051	-6.059	ND	-5.197	ND	ND	ND	
		Mean		-8.505	-8.211	-6.322	-5.908	-5.373	NA		
	SD		0.096	0.080	0.163	0.295	0.172	NA			
	No. of values		32	32	32	28	31	20			
	Total mean		-8.803	-8.437	-6.769	-6.363	-5.632	-5.341			
	Total SD		0.324	0.305	0.414	0.401	0.263	0.126			
	Minimum		-9.542	-9.300	-7.573	-7.221	-6.115	-5.608			
	Maximum		-8.320	-8.051	-6.059	-5.506	-5.173	-5.097			
	Mean+2SD		-8.156	-7.828	-5.942	-5.561	-5.107	-5.088			
	Mean-2SD		-9.450	-9.046	-7.596	-7.165	-6.157	-5.594			

表2 ER STTA アンタゴニストバリデーションTask3におけるコード化被験物質のアンタゴニスト活性評価結果

Code	Chemical name	Candidate effect	CERI	OTSUKA	KANEKA	HIYOSHI	Total
ATG001	ICI 182,780	Strong	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG002	Mifepristone(Mifeprex)=RU-486	Mild	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG003	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG004	Methylpiperdinylpyrazole dihydrochloride	Mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG005	4-Hydroxytamoxifen	Moderate	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG006	Raloxifene HCl	Moderate	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG007	Clomiphene citrate(cis and trans mixture)	Moderate/mild	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG008	Dibutyl phthalate	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG009	Atrazine	Negative	Negative	Negative		Positive	Negative (2/3)
ATG010	Flutamide	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG011	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG012	4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[pheno]	Mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG013	Apigenin	Negative	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG014	Genistein	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG015	Dibenzo[a,h]anthracene	Strong	Negative	Positive		Positive	Positive (2/2)
ATG016	p-n-nonylphenol	not tested	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG017	Flavone	to be negative	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG018	Resveratrol	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG019	Fenarimol	not tested	Negative			Negative	Negative (2/2)
ATG020	17 β -estradiol	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)

2x2 table analysis compared with candidate effects

Accuracy:	94%	100%	100%	94%	100% (97%)*
Sensitivity:	88%	100%	100%	100%	100% (97%)*
Specificity :	100%	100%	100%	88%	100% (97%)*

*: Values in parenthesis are calculated with all individual data derived in 4 laboratories (N=65).

表3 ER STTA 法と BG1Luc 法による化学物質のアンタゴニスト活性評価結果の比較

	Chemical ^a	CASRN	ER STTA assay ¹		BG1Luc ER TA assay ²		ER STTA candidate effects	ICCVAM ⁴ Consensus Classification	MeSH ⁵ Chemical Class	Product Class ⁶
			ER TA Activity	IC50 Value ^b (M)	ER TA Activity	IC50 Value ^{b3} (M)				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	3.97×10^{-9}	POS	2.08×10^{-7}	moderate POS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
2	Dibenzo[a,h] anthracene	53-70-3	POS	No IC50	POS	No IC50	POS	PP	Polycyclic Compound	Laboratory Chemical, Natural Product
3	Mifepristone	84371-65-3	POS	5.61×10^{-6}	NEG	-	mild POS	NEG	Steroid	Pharmaceutical
4	Raloxifene HCl	82640-04-8	POS	7.86×10^{-10}	POS	1.19×10^{-9}	moderate POS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	4.91×10^{-7}	POS	8.17×10^{-7}	POS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
6	17- β estradiol	50-28-2	NEG	-	NEG	-	to be negative	PN	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
7	Apigenin	520-36-5	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Heterocyclic Compound	Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate
8	Atrazine	1912-24-9	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Heterocyclic Compound	Herbicide
9	Di-n-butyl phthalate	84-74-2	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	Ester, Phthalic Acid	Cosmetic Ingredient, Industrial Chemical, Plasticizer
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-	NEG	-	not tested	PN	Heterocyclic Compound, Pyrimidine	Fungicide
11	Flavone	525-82-6	NEG	-	NEG	-	to be negative	PN	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product, Pharmaceutical
12	Flutamide	13311-84-7	NEG	-	NEG	-	NEG	PN	Amide	Pharmaceutical, Veterinary Agent
13	Genistein	446-72-0	NEG	-	NEG	-	to be negative	NEG	Flavonoid, Heterocyclic	Natural Product, Pharmaceutical
14	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	-	NEG	-	not tested	NEG	Phenol	Chemical Intermediate
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	NEG	-	to be negative	NEG	Hydrocarbon (Cyclic)	Natural Product

^a Common chemicals tested in the STTA and BG1Luc ER TA assays that were designated as ER antagonists or negatives and used to evaluate accuracy in the BG1Luc ER TA validation study (3)(31).

^b Maximum concentration tested in the absence of limitations due to cytotoxicity or insolubility was 1×10^{-3} M (STTA Assay) and 1×10^{-5} M (BG1Luc ER TA Assay).

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (31)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ Mean IC50 values were calculated with values reported by the laboratories of the BG1Luc ER TA validation study (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) (3).

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

⁵ Substances were assigned to one or more chemical classes using the U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), an internationally recognized standardized classification scheme (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶ Substances were assigned to one or more product classes using the U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

図 4 OECD VMG-NA で合意された ER STTA に関する今後の予定

Project 4. 34 TG STTA for anti-estrogenic activity of chemicals [JP]

- Validation completed in 2013 and report and draft TG available in spring 2014.
- TG 455 and TG 457 merged into a new TG 455 that includes both the ER agonist and ER antagonist components
- 1st WNT commenting round in July 2014 for:
 - The draft TG 455, updated to include test methods for the detection of anti-estrogenic activity of chemicals
 - The validation report of the human ER mediated reporter gene assay to detect antagonist activity using hER α -HeLa-9903 cell line,
 - The draft updated Performance Standards for STTA in vitro assays to detect ER antagonists
- Few comments received, will be addressed during autumn. Any remaining issues will be discussed at the VMG NA meeting (Paris, 2-4 December 2014)
- Draft updated TG expected to be submitted for approval to WNT in April 2015.

図 5 AR STTA バリデーション試験計画の概要

Study design

Training phase

- The technical transfer.
- Edge effect check of the facility in each laboratory.
- Proficiency test using minimal reference chemicals.

Phase 1

- Confirm the overall laboratory proficiency using same lots of reference chemicals.
- Collect data to set the reference criteria for mestanoione.

KFDA conduct assay using the same maker of reference chemicals obtained in Korea. The data from the KFDA will be used to confirm the validity of performance criteria.

Phase 2

- Provide the supplemental data according to previous Peer review comments.
- Evaluate the assay performance (within/between-laboratory reproducibility and predictive capacity) by testing 10 coded chemicals (each five for agonist and antagonist).