

評価会議報告書

エストロゲン受容体(ER)結合親和性化学物質の検出のための、
ヒト組み換えエストロゲン受容体(hrER) *in vitro* 試験法に関する
性能準拠試験法ガイドライン(TG493)

JaCVAM 評価会議

令和 2 年(2020 年)6 月 25 日

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会) *
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
平林 容子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期 : 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 9 月 30 日

* : 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

** : 令和 2 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 9 月 30 日

経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) 試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) では、エストロゲン活性に関する試験法として、*in vitro* エストロゲン受容体転写活性化試験法 (OECD TG455) や *in vivo* 試験法として子宮肥大試験 (OECD TG440) が確立されているが、エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) を介した生体反応の起点となる化学物質と受容体・リガンド結合部位への特異的相互作用の簡便で迅速なスクリーニング法として組み換えタンパク質を用いた *in vitro* 結合試験法の開発が進められてきた。本試験法は、ER結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組み換えエストロゲン受容体 (Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha: hrER α) *in vitro* 試験法に関する性能準拠試験法ガイドライン (Performance Based Test Guideline: PBTG) であり、*in vitro* で化学物質 (競合物質) 存在下での放射標識リガンド ($[^3\text{H}]$ -17 β -エストラジオール、 $[^3\text{H}]$ -E2) のERへの結合能を化学物質の濃度を上昇させながら測定するスクリーニング試験法を含むガイドラインである。本PBTGには、以下の2種類の試験法が参照試験法として掲載されている。

・完全長ヒト組み換えER α を用いたFreyberger-Wilson (FW) の *in vitro* hrER α 結合試験 (以下、FWアッセイ)¹⁾

・ヒト組み換えリガンド結合ドメイン (Ligand Binding Domain: LBD) タンパク質を用いた化学物質評価研究機構 (Chemicals Evaluation and Research Institute: CERi) の *in vitro* hrER α -LBD 結合試験 (以下、CERi アッセイ)¹⁾

本試験法については、PBTGに掲載されている参照試験法について、日米欧5～6施設でバリデーション研究が実施され²⁾、施設内・施設間再現性が評価された。OECD 専門家会議でその正確性および信頼性が評価され、2015年に内分泌かく乱物質のスクリーニング評価に関する試験法として、OECD TG493が承認された¹⁾。

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) 評価会議は、JaCVAM 受容体結合試験資料編纂委員会により作成された、「エストロゲン受容体 (ER) 結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組換えエストロゲン受容体 (hrER) *in vitro* 試験法に関する性能準拠試験法ガイドライン (TG493) の評価報告書」(令和2年2月18日) を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称：

- ・完全長ヒト組み換え ER α を用いた Freyberger-Wilson (FW) の *in vitro* hrER α 結合試験
- ・ヒト組み換えリガンド結合ドメイン(LBD)タンパク質を用いた化学物質評価研究機構(CERi)の *in vitro* hrER α -LBD 結合試験

代替する対象毒性試験：なし。本試験法はスクリーニングとして用いるものである。

試験法の概略：FW および CERi アッセイは、ER 結合親和性化学物質を検出することを目的として開発された試験法である。これら試験は、①受容体ーリガンド相互作用パラメーターを特徴付ける飽和結合試験および②化学物質と標識リガンドとの間の競合

によって結合親和性を推定する競合結合試験の 2 つの主要要素から構成される。①飽和結合試験では、FW および CERI アッセイプロトコルで規定される過剰濃度の非標識リガンド(17β-estradiol)の存在下および非存在下で、放射標識リガンドの全結合量および非特異結合量が測定され、その差から特異的結合量が算出される。②競合結合試験では、飽和結合試験で得られた特異的結合量を踏まえ、FW アッセイでは 1 nM の放射標識リガンドが 20±5%、CERI アッセイでは 0.5 nM の放射標識リガンドが 40±10%の特異的結合を示す量の hrERα を用いて、化学物質存在下での放射標識リガンドの結合量が測定される。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法については、以下の①日米欧 5～6 施設による国際バリデーション研究²⁾ および② その一環として実施された試験方法の正確性・信頼性を確認するためのバリデーション試験²⁾の結果を基に、OECD において評価された。その結果、OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment で提案された OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters のレベル 2 に該当する内分泌かく乱物質のスクリーニング評価に有用な試験法として妥当性が認められ、OECD TG493 が承認された。

JaCVAM 受容体結合資料編纂委員会はこれらの資料を用いて評価し、報告書としてまとめたものを評価資料とした。

本試験法は、化学物質が hrERα に対し、アゴニスト作用を及ぼすかアンタゴニスト作用を及ぼすかの判定はできないものの、hrERα への結合に対し、極めて良好な特異性を有する試験法であると考えられることから、本試験法は hrERα への結合作用を有する化学物質をスクリーニングする方法として、科学的な妥当性があると考えられる。

① 国際バリデーション研究：

FW アッセイについては、Freyberger と Wilson により作成されたプロトコルに基づいて、CERI アッセイについては CERI により作成されたプロトコルに基づいて、米国 EPA の主導により、FW アッセイについては日米欧 6 施設、CERI アッセイについては日米欧 5 施設の参加による国際バリデーション研究が実施された。バリデーション研究は、飽和結合試験および競合結合試験が実施され、競合結合試験では 29 物質（陽性 21 物質、陰性 8 物質）について検討された。

② 試験方法の正確性・信頼性を確認するための検証試験：

ラット子宮のサイトゾルを用いた ER 結合試験 (Estrogen Receptor Binding Assay Using Rat Uterine Cytosol: ER-RUC アッセイ)³⁾の結果が入手可能かつ ER 反応性が明確な 22 物質（陽性 17、陰性 5）を用いて、検証試験が実施された。その結果、陽性 17 物質について、「判定不能」を除く一致率は、ER-RUC アッセイで 94.1% (16/17)、FW および CERI アッセイでいずれも 100% (16/16) であった。さらに、陰性 5 物質について、ER-RUC アッセイで陰性 1、偽陽性 1、評価不能 3 であったのに対し、FW および

CERI アッセイでは全て陰性であった。以上の結果、「判定不能」を除く各々の試験法の正確度について、ER-RUC アッセイは 94.4% (17/18)、FW および CERI アッセイは共に 100% (21/21) であった。

以上より、FW および CERI アッセイ共に、米国 Environmental Protection Agency (EPA) の現行の TG OPPTS 890.1250 と同等以上の性能標準を満たすことが示された。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、hrER α へ結合活性を良好な特異性をもって検出できる点が優れている。

バリデーション研究に用いた物質の内、ER-RUC アッセイとの比較に用いた物質において、ER との結合性が適切に評価できた化合物 (equivocal と判定された 1 物質を除く 21 物質) では感度と特異度は良好な値を示しているが、例数を増やして正確な数値を求める必要がある。また、ER-RUC アッセイと同等以上の性能標準を満たすことも示されている。しかしながら、本試験法で評価できるのはあくまでも化学物質の hrER α への結合活性であり、化学物質のアゴニスト・アンタゴニスト活性を区別することは出来ず、本試験法で陽性と判定される化学物質が生体内でどのような影響を示すかについては評価することができない。なお、本試験法を行う上で、以下の点に留意する必要がある。

- 本試験法は放射性物質を取り扱う試験である。
- 未知の化学物質を試験する際に試験で用いる濃度は 1 mM を超えてはならない。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、放射標識リガンドを使用することから、放射性同位体の取り扱い可能な施設およびそれについての十分な知識を有した熟練した作業員による作業が必要であると考えられるものの、①生きた動物を用いないという点で 3Rs の精神に合致していること、②内因性エストロゲンと競合して ER に結合する可能性のある化学物質を迅速に同定するための、有用かつ単純なツールであると考えられることから、本試験法の社会的受け入れ性は高いと考える。

行政上の利用性：

本試験法は、ER への結合活性を有する化学物質を同定するための簡便で迅速な *in vitro* のスクリーニング法として活用することができると考える。

参考文献（最終アクセス日：2020年2月25日）

- 1) OECD(2015) Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity. Available at:<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242623-en.pdf?expires=1577340271&id=id&accname=guest&checksum=AA652957D886AA1F986DE09814282317>
- 2) OECD (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/MONO\(2015\)35.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/MONO(2015)35.pdf)
- 3) Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1250: Estrogen Receptor Binding Assay Using Rat Uterine Cytosol (ER-RUC). Available at: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100SHEC.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2006+Thru+2010&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C06thru10%5CTxt%5C00000038%5CP100SHEC.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>