

評価報告書

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)

受容体結合試験資料編纂委員会

令和2年(2020年)2月18日

受容体結合試験資料編纂委員会

小野 敦 (委員長：岡山大学)

井口 泰泉 (横浜市立大学)

青柳 智子 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

北嶋 聡 (国立医薬品食品衛生研究所)

児玉 進 (岡山大学)

略語

CAB:	Chemical Advisory Board
CERI:	Chemicals Evaluation and Research Institute
CV:	Coefficient of Variation
DBP:	Di- <i>n</i> -Butyl Phthalate
E2:	17 β -estradiol
EPA:	Environmental Protection Agency
ER:	Estrogen Receptor
ER α :	Estrogen Receptor Alpha
ER β :	Estrogen Receptor Beta
FW:	Freyberger-Wilson
GLP:	Good Laboratory Practice
hER α :	Human Estrogen Receptor Alpha
hrER:	Human Recombinant Estrogen Receptor
hrER α :	Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha
IC50:	The half maximal effective concentration of an inhibitory test chemical
ICCVAM:	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
LBD:	Ligand Binding Domain
MMTV:	Mouse Mammary Tumor Virus
NICEATM:	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development
OECD CF:	Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters
OECD EDTA TF:	Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force
OTES:	Octyltriethoxysilane
PBTG:	Performance Based Test Guideline
PS:	Performance Standard
RLU:	Relative Light Units
SD:	Standard Deviation
STTA:	Stably Transfected Transactivation Assay
TA:	Transactivation
TG:	Test Guideline
VMG-NA:	Validation Management Group for Non-Animal testing

要旨

性能標準(PS)に基づく性能準拠試験法ガイドライン(PBTG)として経済協力開発機構(OECD)で承認された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^{1,2)}は、*in vitro*で化学物質のエストロゲン受容体(ER)に対する結合活性を生体内リガンドであるエストラジオールとの競合結合活性を指標として検出するスクリーニング試験法であり、化学物質のERへの作用による生体反応の起点であるER結合活性を評価することが出来る。本PBTGには、国際的な多施設バリデーション研究により、試験法の妥当性と信頼性が証明された2種の試験法(FWアッセイおよび化学物質評価研究機構(CERI)アッセイ)が参照試験法として記載されている。また、本PBTGには、試験の目的である化学物質のhrER結合親和性を検出する類似試験法の開発とバリデーション研究のためのPSが設定されており、PSを満たすことが示された新規の類似試験法を追加することが可能である。本試験法に記載されている2つの試験法についての再現性や信頼性および試験法としての科学的妥当性と規制試験法としての妥当性については、米国環境保護庁(米国EPA)の主導により日米欧6施設の参加(CERIアッセイについてはうち5施設が参加)による国際バリデーション研究の結果をもとに、OECD第三者評価により評価され、OECD内分泌かく乱物質の試験と評価に関するタスクフォース(OECD EDTA TF)で提案されたOECD内分泌かく乱物質の試験法と評価に関する概念枠組み(OECD CF)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 *in vitro* 試験法としてOECD TG493が成立した。本試験法の課題として、本試験法は化学物質のERへの結合活性を評価できるのみ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できないという点があげられる。本試験法はあくまでもスクリーニング法であり、ERを介して惹起されると想定される有害影響を確定評価する試験法と組み合わせて評価を行うことで今後の化学物質管理に大きく貢献すると考えられる。

1. 本試験法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

ER 結合親和性化学物質の検出のための、hrER *in vitro* 試験法^{1,2)} に関する PBTGは、*in vitro* で化学物質の ER に対する結合親和性を検出するスクリーニング試験法である。本試験法ガイドライン(TG)は、OECD のガイダンス文書「Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment」³⁾ に規定されるバリデーション研究の原則に従った新たな類似試験または改良試験の開発を促進する PBTG であり、参照試験法として国際的な多施設バリデーション研究により¹⁾ 試験法の妥当性と信頼性が証明された下記の 2 つの機序および機能的に同等の試験法が示されている。

- ・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(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(以下、CERIアッセイ)¹⁾

本 PBTG には、試験の目的である化学物質のヒト組み換えヒトエストロゲンアルファ受容体(hrER α)結合親和性を検出する類似試験法の開発とバリデーション研究のための PS²⁾ が設定されており、現行の PBTG を適時修正して新規類似試験法を追加することが可能である。ただし、類似試験法の追加は PS に示された参照物質 23 物質(表1-1)を用いたバリデーション研究により再現性や信頼性の基準を満たすことを示して合意された後にのみ可能である。

環境中や市場に流通する多くの化学物質が内分泌系に影響する生物活性を有することが示されており、そうした化学物質による内分泌系のかく乱による潜在的なヒト健康や環境に対する影響が指摘されている。OECD では、1998年に重点活動項目の1つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のための TG の整備のため、OECD EDTA TF を設置し、化学物質の内分泌かく乱作用評価のための試験法を OECD CF として整理し、既存 TG の改訂と、新規 TG の整備を進めている。OECD CF は、それぞれ生物学的複雑性の異なる 5 つのレベルから構成されており、本 TG は、レベル 2 の「機構に関する情報をもたらす *in vitro* 試験」に示されている該当するホルモン受容体結合試験法である。化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングに有用な指標として、OECD CF では化学物質のホルモン受容体との結合性または受容体を介した内分泌機能の活性化および阻害を測定する方法が示されている。エストロゲン活性*に関する試験法としては[†]、これまでに *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、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。

*エストロゲン活性：化学物質がエストロゲン受容体結合において 17 β -エストラジオールを模す能力。hrER α への結合は本 PBTG で検出することができる。

表 1-1 hrER α 結合試験(TG 493)の性能標準の参照物質 23 物質

No.	Chemical Name	CAS RN	Expected Response #	Concentration Range Tested(M)	FW Assay Classification	CERI Assay Classification	MESH Chemical Class	Product Class
1	17 β -Estradiol	50-28-2	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
2	17 α -ethynyl estradiol	57-63-6	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
3	Diethylstilbestrol (DES)	56-53-1	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Cyclic), Phenol	Pharmaceutical, Veterinary Agent
4	Meso-Hexestrol	84-16-2	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Binder	Binder	Hydrocarbon (cyclic), Phenol	Pharmaceutical, Veterinary Agent
5	Zearalenone	17924-92-4	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Hydrocarbon (heterocyclic), Lactone	Natural Product
6	Tamoxifen	10540-29-1	<i>Strong Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Cyclic)	Pharmaceutical, Veterinary Agent
7	Norethynodrel or (Norethindrone) ^a	68-23-5 (68-22-4)a	<i>Moderate Binder</i>	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁴	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
8	Genistein	446-72-0	<i>Moderate Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Hydrocarbon (heterocyclic), Flavonoid	Natural Product
9	Equol	531-95-3	<i>Moderate Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Phytoestrogen Metabolite	Natural Product
10	Butyl paraben (n-butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Paraben	Preservative
11	Nonylphenol (mixture)	84852-15-3	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Alkylphenol,	Intermediate Compound
12	o,p'-DDT ^d	789-02-6	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Organochlorine	Insecticide
13	5 α - dihydrotestosterone	521-18-6	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Steroid, Nonphenolic	Natural Product
14	Bisphenol A (BPA)	80-05-7	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Phenol	Chemical Intermediate
15	4-n-heptylphenol	1987-50-4	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Equivocal	Binder	Alkylphenol	Intermediate
16	Kepone (Chlordecone)	143-50-0	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Halogenated)	Pesticide
17	Enterolactone	78473-71-9	<i>Weak Binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Binder	Binder	Phytoestrogen	Natural Product
18	* Di-n-butyl phthalate (DBP)	84-74-2	<i>Non-binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Non-Binder*	Non-Binder*	Hydrocarbon (cyclic), Ester	Plasticizer, Chemical
19	Octyltriethoxysilane	2943-75-1	<i>Non-binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Non-Binder	Non-Binder	Silane	Surface modifier
20	Corticosterone ^c	50-22-6	<i>Non-binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Non-binder	Non-Binder	Steroid	Natural Product
21	Benz(a)anthracene	56-55-3	<i>Non-Binder^b</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Non-Binder	Non-Binder	Aromatic Hydrocarbon	Intermediate
22	Progesterone ^c	57-83-0	<i>Non-binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Non-Binder	Non-Binder	Steroid	Natural Product
23	Atrazine ^c	1912-24-9	<i>Non-binder</i>	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻⁴	Non-Binder	Non-Binder	Heterocyclic compound	Herbicide

Abbreviations: DES, diethylstilbestrol; HPTE, 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, an intermediate by-product of methoxychlor; o,p'-DDT, 1,1,1-trichloro-2,2-[o-chlorophenyl]-2-[p-chlorophenyl]ethane

#: The expected response for each chemical was based upon published data from in vitro studies and were reviewed by a Chemical Advisory Board whose members were not directly associated with the validation study for the FW and CERI hrER Binding Assays. Chemicals were selected to represent multiple chemical classes and cover a range of binding affinity potencies commonly associated with ER agonist activity. When tested in the FW or CERI hrER Assays, the LogIC50 for strong binders typically ranged from -9 to -7 (M), moderate -7.1 to -6.0 (M) and weak < -5.9 (M).

*: The use and classification of Di-n-butyl phthalate (DBP) as a non-binder was based on testing up to 10⁻⁴ M because the chemical was observed to be insoluble at 10⁻³M (e.g. turbidity) in some laboratories during the pre-validation studies. When DBP was tested up to 10⁻³M as a coded chemical, it was classified as 'equivocal' due to displacement of (3H)17 β -estradiol at highest in 3/5 laboratories using the CERI assay and 5/6 laboratories using the FW assay.

a: Norethindrone is provided as an alternate for the control weak binder for cases when norethynodrel is unavailable.

b: During the validation study, benz(a)anthracene was reclassified as a non-binder (i.e., negative) based on published literature demonstrating that the in vitro estrogenic activity reported for this chemical is primarily dependent upon its metabolic activation. Enzymatic metabolic activation of the chemical would not be anticipated in the cell free hrER assays as used in this inter-validation study. Thus, the correct classification for this chemical is a 'non-binder' when used under the experimental conditions for the FW and CERI assays.

c: Chemicals were observed to be insoluble at 10⁻³M (e.g., turbidity) in some laboratories during the validation study.

d: Optional where o,p'-DDT is prohibited by regulatory authorities when replaced by chemical with comparable binding affinity.

参考文献(2) Table 1 を一部改変

本PBTGは、ERのリガンド結合部位と被験物質との特異的結合を検出するため、被験物質(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への結合能を被験物質の濃度を上昇させながら測定する競合結合試験としてデザインされている。ERに対して高い親和性を有する被験物質は、受容体親和性の低い化学物質と比べて、より低濃度で放射標識リガンドと競合する。ただし本試験法で評価できるのはあくまでも化学物質のER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できない。

参照試験法として示されている試験法のうちFWアッセイは完全長hrER α への結合における被験物質のE2に対する競合結合能を測定する手法であり、試験にはバキュロウイルスに感染させた昆虫細胞で作製、単離した完全長hrER α を用いる。FWアッセイに用いるhrER α は、市販(Thermo Fisher Scientific, USA, A15674)で入手可能である。一方、CERIアッセイはhrER α のLBDを用いた*in vitro* hrER α -LBD競合結合試験法であり、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質として*E. coli*で発現させたhrER α -LBDを用いる。CERIアッセイで用いるhrER α -LBDタンパク質はCERIによって作製されたものであり、入手可能である。CERIアッセイはFWアッセイと同様、hrER α へ結合する物質をスクリーニングする手法であり、hrER α -LBDへの結合における被験物質のE2に対する競合結合能を測定する。それぞれの試験プロトコルは2つの要素から構成されており、一つは試験に用いる組み換え受容体タンパク質と生理的リガンドであるE2との相互作用活性を明らかにする飽和結合試験であり、他の一つは、被験物質のERへの特異的結合性を評価するため放射標識リガンド($[^3\text{H}]$ -E2)と被験物質とのER結合への競合作用を確認する競合結合試験である。いずれのアッセイ法とも、定量的評価結果として、IC50(50%の $[^3\text{H}]$ -E2をhrER α から解離させるのに必要な被験物質の濃度)、hrER α に関する被験物質のE2に対する相対結合親和性などを求めることが可能である。化学物質のスクリーニングのための定性的評価結果として、結合曲線に関して設定された基準に従い被験物質をhrER α 結合物質、非結合物質、または判定不能に分類することが可能である。

これらの参照試験法として、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の主導により日米欧6施設の参加(CERIアッセイについてはうち5施設が参加)による国際バリデーション研究¹⁾が実施され、試験法の使用目的に対する妥当性と信頼性が証明されている。バリデーション研究では、サブタスク0からサブタスク4まで、段階的に実施された。サブタスク0においては、飽和結合試験によりアッセイに用いるヒトエストロゲンアルファ受容体(hrER α)タンパク質のリガンド結合能が試験実施性能の許容範囲を満たすことを全ての参加施設で確認した後、サブタスク1では、陽性・陰性対照の3物質(陽性2、陰性1)の測定、サブタスク2では陽性・陰性対照の3物質と非コード化9物質(陽性8、陰性1)、サブタスク3では陽性・陰性対照を含むコード化14物質(陽性9、陰性5)を被験物質として施設内および施設間再現性の評価が行われた。1試験施設では、誤判定および不定判定、承認基準を満たせないケースが多く認められたが、施設特有の問題であると判断され、他の参加施設の測定結果の再現性は良好であった。ラット子宮のサイトゾルを使用したER結合試験(TG OPPTS 890.1250: ER-RUC)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)を用いた解析

の結果、CERIおよびFWアッセイの「判定不能」を除く分類結果は100%一致しており、各試験法での陽性物質（ERに対して結合性をもつことが予測される物質）の一致率は、CERIおよびFWアッセイは共に100%(16/16)、ER-RUCアッセイは94.1%(16/17)であった。一方、陰性物質（ERに対して結合性を示さないと予測される物質）については、CERIおよびFWアッセイは共に5物質全てを陰性と判定した。一方、ER-RUCアッセイの判定結果の内訳は陰性1、偽陽性1、評価不能3であった。最終的に、「判定不能」を除く各々の試験法の正確度は、CERIおよびFWアッセイは共に100%(21/21)、一方、ER-RUCアッセイは94.4%(17/18)であった。なお、比較に用いた物質の予想される結果の妥当性は、OECD VMG-NAのメンバーのうち本バリデーション研究に直接関わっていない3名から構成されたCABにより確認された。

また、バリデーション研究開始時点のプロトコルで指定されていた弱結合陽性対照のノルエチノドレルおよび陰性対照（非結合性）のフタル酸ジ-n-ブチル(DBP)は、溶解性に問題があったため、追加のサブタスク4として2施設の参加によりコード化7物質を被験物質とした測定が実施され、弱結合性を示す陽性対照としてノルエチンドロンが、陰性対照としてオクチルトリエトキシシラン(OTES)が適切であることが示され、最終的なプロトコルでは、対照物質(基準エストロゲンE2、CAS 50-28-2)、弱結合物質(ノルエチノドレルやノルエチンドロンなど)、非結合物質(OTES)を用いて競合結合試験を実施することとされている。

なお、いずれの試験法とも放射性リガンドを用いるため、試験施設は放射性物質取扱に関する国の認可が必要であり、放射性同位元素および有害化学物質を扱う工程についてはすべて、国の法令で定められた規則および手順に従う必要がある。

2. 試験法の妥当性

2-1. 試験法の概略

2-1-1. 目的と原理

本試験法は内分泌かく乱物質のうちhrER α に作用(結合)する化学物質を検索し、その人体および自然界に対する有害影響を避けることを目的として開発された。本法は、hrER α に結合し、アゴニスト作用あるいはアンタゴニスト作用を示す化学物質のスクリーニング試験法であり、濃度を変えた試験物質(競合物質)の存在下において放射性同位元素 [^3H] で標識した内因性のリガンド(E2)とhrER α との結合能を測定し、被験物質のhrER α に対する結合親和性を推測するものである。

2-1-2. 標準測定条件

結合試験は受容体-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被験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つの主要要素からなる。

飽和結合試験は、競合結合試験に用いるhrER α の結合親和性(Kd)および活性受容体部位数(Bmax)を特徴付ける目的で実施される。CERIおよびFWアッセイプロトコルに記載されている飽和結合実験では、それぞれ規定の過剰濃度の非標識リガンド(E2)の存在下および非存在下で、8濃度の標識リガンドの結合量を評価する。活性結合部位を高濃度

の標識リガンドで飽和させた全結合および非特異的結合の両方を測定し、全結合から非特異的結合を差し引くことによって特異的結合量を計算する。KdおよびBmaxは、非線形回帰分析とこれに続くScatchardプロットにより求められる。

競合結合実験では、FWアッセイでは1 nMの標識リガンドが20±5%、CERIアッセイでは0.5 nMの標識リガンドが40±10%の特異的結合を示す量のhrERαを用いて異なる濃度の被験物質の存在下で標識リガンドの結合量を測定する。親和性は平衡状態で標識リガンドの特異的結合を50%阻害する化学物質の濃度(IC50)によって定量評価される。したがって、被験物質の結合曲線の特性が十分に示されるよう、Logistic式における「頂点(TOP)」と「底値(BOTTOM)」を含まれるよう最終的な結果はLogIC50の両側に十分な濃度範囲を確保する必要がある。

また、対照物質(基準エストロゲンE2)、弱結合物質(ノルエチノドレルまたはノルエチンドロン)、非結合物質(原則OTESであるが、DBPを用いることもできる)の結合親和性を測定し、試験法の当該条件下での有効性および実験間での比較の指標とする。

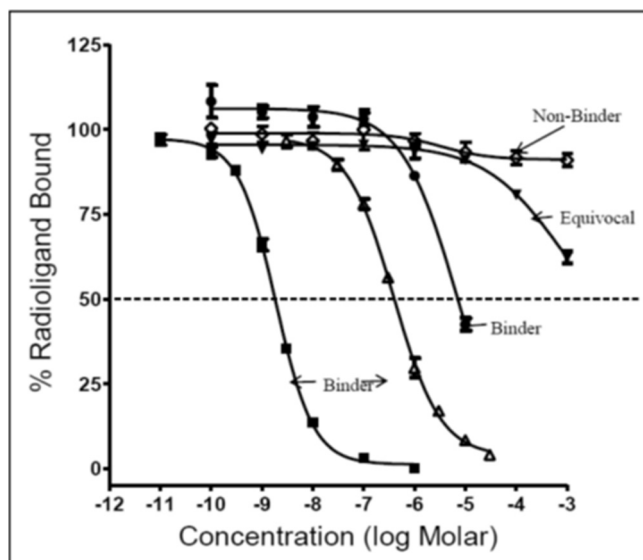


図2-1 競合結合試験における評価例

2-2. 生物学的妥当性

ERの内因性のリガンドであるE2のERとの結合は標的遺伝子の転写を活性化し、最終的には生理学的作用をもたらす。したがって、ERとリガンドの結合は一連の生物応答の起点であり、この試験法は生体系におけるエストロゲンシグナル伝達に必要な最初の分子的現象を反映している。また、不適切なERシグナル伝達は、ホルモン依存性がん発症リスクの増加、生殖能力の低下および胎児の成長および発達の変化などの影響をもたらすことも報告されている⁴⁾。

検証試験の競合結合試験から得られた結果は、既存の論文、ER結合および試験方法に関する総説等⁵⁻¹⁰⁾を基にまとめられた予想される結果と比較され、その妥当性が確認された。

ER結合試験は、内因性エストロゲンと競合してERに競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ことが歴史的に証明されており、その実用性および *in vivo* の反応と密接に関連することが科学的資料に記載されている^{11, 12)}。

2-3. ER 結合試験法の注意点

結合試験に共通の注意点として、以下が挙げられる。

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に十分な知識を有した熟練した作業者によって実施される必要がある。

結合試験の結果は被験物質の *in vitro* 系における受容体への結合に関するものであり、*in vivo* での内分泌システムへの影響に直接外挿することはできず、アゴニストとアンタゴニストの区別もできない。また、界面活性剤やアッセイ緩衝液の pH を変化させる物質では正しい結果を得ることができない可能性がある。

3. バリデーショ研究に用いた物質の分類と結果の妥当性

両アッセイともに、飽和結合試験(サブタスク 0)では [³H]-E2 について、競合結合試験(サブタスク 1~3)では陽性対照(ER 結合高親和性化学物質: E2、弱結合: ノルエチノドレル)および陰性対照(非結合: DBP)を含むのべ 29 物質(表 3-1 および表 3-2 参照)について試験が実施された。また、適切な弱結合および非結合対照物質の探索のため、オプションとして 7 物質(表 3-1 および表 3-2 参照)が追加され競合試験(サブタスク 4)が実施された。

表3-1バリデーショ研究に用いた物質数

	競合結合試験			
	サブタスク1	サブタスク2	サブタスク3	サブタスク4 (オプション)
物質数	対照物質 3 物質	対照物質 3 物質 + 9 物質	14 物質 (対照物質 3 物質含む)	7 物質
コード化 ¹⁾ /非コード化 ²⁾ の区別	非コード化	非コード化	コード化	コード化
陽性物質 ³⁾ 数	2 物質	10 物質	9 物質	4 物質
陰性物質 ⁴⁾ 数	1 物質	2 物質	5 物質	3 物質

¹⁾ 試験に際し物質の本体が何であるかわからないように、また結果を予測できないようにするためにコードを付して試験施設に配付される被験物質。コード化には、試験を実施するに当たり、意図的、非意図的に結果を偏らせることを防ぐ役割がある。

²⁾ 試験に際し物質名が明記された状態で試験施設に配付される被験物質。

³⁾ ERに対して強い又は弱い結合性をもつことが予測される物質。

⁴⁾ ERに対して結合性を示さないと予測される物質。

表 3-2 バリデーション研究に用いた物質名

Subtask 1 (controls, uncoded)			
Test chemical	CAS #d	Expected binding affinity †	Expected Classification FW and CER1 assays
17β-Estradiol	50-28-2	Strong	Binder
Norethynodrel	68-23-5	Moderate	Binder
Di-n-butyl phthalate (DBP)	84-74-2	Negative	Non-binder
Subtask 2 (uncoded chemicals)			
*17β-Estradiol	50-28-2	Strong	Binder
*Norethynodrel	68-23-5	Moderate	Binder
* Di-n-butyl phthalate (DBP)	84-74-2	Negative	Non-binder
Diethylstilbestrol (DES)	56-53-1	Very strong	Binder
17α-ethynyl estradiol	57-63-6	Very strong	Binder
Meso-Hexestrol	84-16-2	Strong	Binder
Genistein	446-72-0	Moderate	Binder
Equol	531-95-3	Moderate	Binder
Butyl paraben (n-butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	Weak	Binder
Nonylphenol (mixture)	84852-15-3	Weak	Binder
o,p'-DDT ^a	789-02-6	Weak	Binder
Corticosterone	50-22-6	Negative	Non-binder
Subtask 3 (coded chemicals)			
*17β-Estradiol	50-28-2	Strong	Binder
*Norethynodrel	68-23-5	Moderate	Binder
* Di-n-butyl phthalate (DBP)	84-74-2	Negative	Non-binder
Zearalenone	17924-92-4	Strong	Binder
Tamoxifen	10540-29-1	Strong	Binder
5α-dihydrotestosterone ^b	521-18-6	Weak	Binder
Bisphenol A	80-05-7	Weak	Binder
4-n-heptylphenol	1987-50-4	Weak	Binder
Kepone (Chlordecone)	143-50-0	Weak	Binder
Benz(a)anthracene	56-55-3	Weak	Non-binder1
Enterolactone	78473-71-9	Weak	Binder
Progesterone	57-83-0	Negative	Non-binder
Octyltriethoxysilane	2943-75-1	Negative	Non-binder
Atrazine	1912-24-9	Negative	Non-binder
Subtask 4*, ‡ (optional, coded chemicals)			
Bisphenol A	80-05-7	Weak	Binder
Genistein	446-72-0	Weak	Binder
HPTE ^c	2971-36-0	Weak	Binder
Norethindrone	68-22-4	Weak	Binder
Corticosterone	50-22-6	Negative	Non-binder
Dexamethasone	50-02-2	Negative	Non-binder
Octyltriethoxysilane	2943-75-1	Negative	Non-binder

*Controls (reference estrogen (17 β -estradiol, weak binder (norethynodrel), non-binder (DBP)) were used in each run, uncoded, for subtasks 1, 2, 3 and 4.

^Controls were also submitted to the laboratories as “coded test chemicals” (subtask 3) and were tested up to 1mM.

†Expected ER binding affinity as defined by the CAB for subtasks 1, 2 and 3 (Appendix D).

‡The CAB did not review the chemicals used in subtask 4. Chemicals were approved by the SMT based upon strong historical documentation in published literature.

¹ Benz(a)anthracene was reclassified as a non-binder based on additional information regarding its in vitro ER binding activity that became available after the review of the chemical list by the CAB. (See footnote 3 for additional information and references).

^ao,p'-DDT: 1,1,1-trichloro-2-[o-chlorophenyl]-2-[p-chlorophenyl]ethane

^b5 α -dihydrotestosterone: 5 α -DHT or 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one
19-Norethindrone (Norethindrone)

^cHPTE: 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, a metabolite of methoxychlor

^dCAS: Chemical Abstracts Service Registry number.

競合試験(サブタスク1～3)で用いられた29物質のうち、21物質が陽性、8物質が陰性物質であり、オプションの競合試験(サブタスク4)では、4物質が陽性、3物質が陰性物質である。陽性物質には強結合性を有する物質とともに弱結合物質も含まれている。

これらバリデーション研究に用いられた物質には、多様な用途の化学物質から代表的なER強結合性、弱結合および非結合物質が含まれていることから選択は妥当と判断される。

なお、競合試験(サブタスク1～3)に用いた物質の妥当性は、OECD VMG-NAのメンバーのうち本バリデーション研究に直接関わっていない3名から構成されたCABにより確認された(Appendix 1参照)。JaCVAM受容体結合試験資料編纂委員会は、CABの判断はいずれも妥当であり、バリデーションに用いられた化合物セットはER結合アッセイの評価に十分なケミカルスペースを確保出来ており、バリデーションは適切に実施されたと評価した。

4. 試験法のデータと結果の有用性

バリデーションでは競合試験(サブタスク1～3)において29物質(陽性21物質、陰性8物質)の測定が実施され、さらに、オプションとして実施されたサブタスク4において、陽性4物質、陰性3物質の測定が実施された。

両アッセイのバリデーション研究に用いられた化学物質は、既知見情報や入手の容易さ等をもとに可能な限り広範な用途・構造の物質が選択されており、それら陽性物質には強結合性を有する物質とともに弱結合物質も含まれており、本バリデーション研究で得られた評価結果は各アッセイ系の特性を示す有用な情報である。

また、両アッセイのバリデーション試験で評価が行われた化学物質の既知見情報から想定される結合活性および構造による分類(ステロイド類、ベンゼン環を一つ有する化合物類等)については、TG493の習熟度確認物質リスト(表1-1)として試験濃度域および各アッセイでの評価結果とともに示されており、これらの情報は新たな関連試験系開発の参照物質として有用である。

5. 試験方法の再現性

CERI アッセイには 5 施設 (A-E) が、FW アッセイには CERI アッセイに参加した 5 施設と施設 F を含めた 6 施設が、バリデーション研究に参加した。

(A : University of Missouri-Columbia, B : Lovelace Respiratory Research Institute, C : CERI, D : Bayer HealthCare, Bayer Pharma AG, E : CeeTox, F : University of Konstanz)

5-1. 飽和結合試験(サブタスク 0)

8 濃度段階の $[^3\text{H}]\text{-E2}$ の hrER α に対する全結合量、非特異的結合量および特異的結合量を測定し、測定結果をもとに再現性が評価された。両アッセイの全ての測定 (CERI アッセイ : 17、FW アッセイ : 20) で、ER の標識リガンドによる飽和と強い結合性を有する単一のリガンド結合部位を有することが確認された。両アッセイ共に、全施設にて妥当な Kd 値が報告された (CERI アッセイ : 各施設平均 = 0.244 ~ 0.758 nM、全体平均 \pm SD = 0.451 \pm 0.16 nM ; FW アッセイ : 各施設平均 = 0.230 ~ 0.707 nM、全体平均 = 0.423 \pm 0.20 nM)。特定の施設 (FW アッセイ : 施設 F) への輸送過程における受容体サンプルの分解が原因とされる場合を除き、殆どの施設が競合結合試験に必要なアッセイ条件を担保する活性受容体濃度を得た。CERI アッセイの場合、推奨される承認基準は (1) 標識リガンド 0.5 nM 存在下の全特異的結合量は 40 \pm 10%、(2) 標識リガンド 4.0 nM 使用時の非特異的結合量は全結合の 35% 未満であるのに対して、参加 5 施設の平均値 \pm SD はそれぞれ 33 \pm 5.4%、46 \pm 7.6% であった。FW アッセイの場合、推奨される承認基準は (1) 標識リガンド 1.0 nM 存在下の全特異的結合量は 20 \pm 10%、(2) 標識リガンド 3.0 nM 使用時の非特異的結合量は全結合の 35% 未満であるのに対して、参加 6 施設の平均値 \pm SD はそれぞれ 20 \pm 7.7%、21 \pm 10.2% であった。従って、両アッセイで、共に参加施設の実施性能は概ね許容範囲内であった (表 5-1、5-2、5-3、5-4 参照)。

表 5-1 CERI アッセイ、hrER α への標識リガンド (0.5 nM) の特異的結合の割合

	CeeTox (%)	Lovelace (%)	Missouri (%)	Bayer (%)	CERI (%)
Run 1	21	27	23	40	45
Run 2	15	33	43	19	39
Run 3	21	27	33	34	43
Run 4	49		50		
Mean \pm SD (n)	27 \pm 15.3 (4)	29 \pm 3.5 (3)	38 \pm 12.2 (4)	31 \pm 10.8 (3)	42 \pm 3.1 (3)

参考文献(1) Table 14 を引用。

表 5-2 CERI アッセイ、hrER α への標識リガンド (4 nM) の非特異的結合の割合

	CeeTox (%)	Lovelace (%)	Missouri (%)	Bayer (%)	CERI (%)
Run 1	60	64	65	35	50
Run 2	50	53	25	42	48
Run 3	60	51	34	35	47
Run 4	22		37		
Mean \pm SD (n)	48 \pm 18.0 (4)	56 \pm 7.6 (3)	40 \pm 17.3 (4)	37 \pm 4.0 (3)	48 \pm 1.5 (3)

参考文献(1) Table 15 を引用。

表 5-3 FW アッセイ、hrER α への標識リガンド(1.0 nM)の特異的結合の割合

	CeeTox (%)	Lovelace (%)	Missouri (%)	Bayer (%)	CERI (%)	Konstanz (%)
Run 1	27	33	22	23	22	6 ^a
Run 2	21	30	17	20	21	5 ^a
Run 3	23	23	16	24	16	5 ^a
Run 4			15			8 ^b
Mean \pm SD	24 \pm 3.1	29 \pm 5.1	18 \pm 3.1	22 \pm 2.1	20 \pm 3.2	6 \pm 1.4

^a 実施施設から受容体分解の可能性が報告された (U. Konstanz)。

^b 新しいバッチの受容体を使用して測定を実施した (U. Konstanz)。

参考文献(1) Table 18 を引用。

表 5-4 FW アッセイ、hrER α への標識リガンド(3 nM)の非特異的結合の割合

	CeeTox (%)	Lovelace (%)	Missouri (%)	Bayer (%)	CERI (%)	Konstanz (%)
Run 1	12	8	7	31	21	35 ^a
Run 2	12	9	9	32	24	45 ^a
Run 3	14	11	21	26	28	41 ^a
Run 4			17			16 ^b
Mean \pm SD (n)	13 \pm 1.2 (3)	9 \pm 1.5 (3)	14 \pm 6.6 (4)	30 \pm 3.2 (3)	24 \pm 3.5 (3)	34 \pm 12.8 (3)

^a 実施施設から受容体分解の可能性が報告された (U. Konstanz)。

^b 新しいバッチの受容体を使用して測定を実施した (U. Konstanz)。

参考文献(1) Table 19 を引用。

5-2. 競合結合試験(サブタスク 1～3)

段階的に技術的難易度が高まる一連のサブタスクでは、8 濃度段階の被験物質の存在下、単一濃度の [³H]-E2 の hrER α に対する結合量を測定する競合アッセイの測定結果をもとに施設内および施設間での再現性の評価が行われた。

5-2-1. サブタスク 1

3つの非コード化被験物質陽性対照(強結合性: E2、弱結合性: ノルエチノドレル)および陰性対照(非結合性: DBP)の測定結果をもとに再現性が評価された。結合競合曲線の「頂点」、「底値」および「傾き」を注視するとの助言以外のデータ分析に関する定量的な承認基準の指示は無く、各施設は、アッセイパフォーマンスの評価尺度(表 5-5 参照)に基づき「承認」し得ると判断した3回の測定データと共に、全測定データの提出を求められた。両アッセイ共に、承認基準を満たした場合はいずれの被験物質も正しく判定し、アッセイ間で各々の陽性対照の LogIC₅₀ が良く一致していた。CERI アッセイについて、E2 とノルエチノドレルおよび DBP の許容測定数の割合(許容測定数/全測定数)は、それぞれ27/28、27/28および25/28であった。一方、FW アッセイについて、E2 は20/23、ノルエチノドレルは21/22、DBP は24/24であった。全施設の全体平均値 LogIC₅₀ (平均値 \pm SD) と R² 値(平均値 \pm SD)は、CERI アッセイについて、E2 は-9.03 \pm 0.20、0.97 \pm 0.06(許容測定数: 27)、ノルエチノドレルは-6.14 \pm 0.28、0.98 \pm 0.02(許容測定数: 27)であった(表 5-6 参照)。また、施設毎の LogIC₅₀ の SD 値は E2 とノルエチノドレルそれぞれ、最大で0.442

と0.259であった。一方、FWアッセイについて、E2は -8.89 ± 0.18 、 0.97 ± 0.03 (許容測定数：20)、ノルエチノドレルについては -6.25 ± 0.34 、 0.98 ± 0.02 (許容測定数：21)であった(表5-6参照)。さらに、施設毎のLogIC50のSD値はE2とノルエチノドレルそれぞれ、最大で0.255と0.401であった。なお、両アッセイの承認基準を満たさない測定結果の多くの場合においても、競合結合曲線の「頂点」が100%予測値と著しく乖離していたが、それらは明確な標識リガンドのER結合に対する濃度依存的な阻害を示し、適切なLogIC50を得ていた。従って、両アッセイで、共に施設内と施設間それぞれにおける定性的および定量的な再現性が示された。

表 5-5 飽和結合試験および競合結合試験のアッセイパフォーマンスの評価尺度

Saturation Binding	
1.	Did the specific binding curve reach a plateau with increasing concentrations of [³ H]17β-estradiol?
2.	Was the ratio of specific binding to total radioligand used in the assay within the limits recommended for the assay?
3.	Was non-specific binding within the limits as recommended for the assay?
4.	When data were analyzed using the recommended non-linear regression model with a correction for ligand depletion, was fit for the data linear when displayed using a Scatchard (Rosenthal) plot?
Competitive Binding	
1.	Did increasing concentrations of the reference estrogen (17β-estradiol) displace [³ H]17β-estradiol from the hrERα in a manner consistent with a one-site competitive binding model?
2.	Was the IC ₅₀ for the reference estrogen consistent across multiple runs?
3.	Was the ratio of specific binding to total radioligand used in the assay within the recommended range for the assay?
4.	Did the negative control (Di-n-butyl phthalate) displace less than 25% of the [³ H]17β- estradiol?
5.	Did comparison of solvent and buffer controls confirm that the solvent does not have any effect on ER binding?

参考文献(1) Table 9 を引用。

表 5-6 CERi アッセイと FW アッセイの比較、サブタスク 1 (対照物質)

	CERi Assay Mean ± SD (n)	FW Assay Mean ± SD (n)
Reference estrogen (17β-estradiol)		
LogIC50	-9.03 ± 0.20 (27)	-8.88 ± 0.18 (23)
R ²	0.97 ± 0.06 (27)	0.97 ± 0.03 (23)
Weak Binder (Norethynodrel)		
Log IC50	-6.14 ± 0.28 (27)	-6.22 ± 0.34 (24)
R ²	0.98 ± 0.02 (27)	0.98 ± 0.02 (24)
Non-binder Di-n-butyl phthalate ^a		
Non-binder	27/29 total runs ^b	24/24 total runs ^b

^a 対照非結合物質として、最大 10⁻⁴M まで試験した。

^b 全測定回数に対する DBP を非結合物質と判定した測定回数を記す。

参考文献(1) Table 31 を引用。

5-2-2. サブタスク 2

ER 結合性が明確な 9 つの非コード化被験物質の測定結果をもとに再現性が評価された。測定データの分析は、(1) 陽性対照の曲線フィットパラメータに基づく許容判別と (2) 各試験施設の許容判定を共に満たす測定結果に限定され、測定毎に被験物質を分類判定した。なお、技術的検討を受け、「判定不能」に分類された被験物質に対して 10%ルール[‡]を適用させた後[§]、再分析された測定結果を含む。両アッセイにおいて、共に 9 物質の各施設における分類結果を総合すると、結合物質と非結合物質を問わず予想結果と一致しており、両アッセイで、共に施設間における非コード化被験物質の定性的な再現性が示された(表 5-7、5-8 参照)。施設 B では、両アッセイ共に分類判定に不正確な点があったが、施設特有の問題と判断された。詳細な技術的検討の結果、分類判定の不正確さの要因として、(1) 10%ルールの不適切な適用、(2) 4 パラメータロジスティック回帰分析へのデータの不適合性、(3) 最適数に満たない許容可能な測定結果を基にした分類の限界、などが挙げられ、これらの理由から、最終的な分類前に段階的な分析アプローチの導入が推奨された。

表 5-7 CERI アッセイ、サブタスク 2 (非コード化被験物質の分類判定)

Chemical	<i>Expected Result</i>	CeeTox	Lovelace	Missouri	Bayer	CERI	Simple Average
Butyl paraben	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Corticosterone	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Equivocal	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
o, p'-DDT	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Diethylstilbestrol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Ethynyl estradiol	<i>Binder</i>	Binder	Equivocal	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Equol	<i>Binder</i>	Binder	Equivocal	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Genistein	<i>Binder</i>	Binder	Equivocal	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Meso-Hexestrol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Nonylphenol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>

緑色背景は、予想される結果との不一致を示す。
参考文献(1) Table 32 を引用。

[‡] 10%ルール：^[3H]-17β-エストラジオールの特異的結合の割合について、反復試験の平均値が低濃度で認められた平均値よりも 10%以上大きい場合、解析のデータポイントから除外する選択肢。

表 5-8 FW アッセイ、サブタスク 2 (非コード化被験物質の分類判定)

Chemical	Expected Result	CeeTox	Lovelace	Missouri	Bayer	CERI	Konstanz	Simple Average
Butyl paraben	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Corticosterone	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-binder	<i>Non-Binder</i>
o, p'-DDT ^b	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Diethylstibesterol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Ethynyl estradiol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Equol	<i>Binder</i>	Binder	§	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Genistein	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Meso-Hexestrol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Nonylphenol	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>

緑色背景は、予想される結果との不一致を示す。

[§] 許容基準を満たす測定結果の提出なし。

^bo,p'-DDT: 1,1,1-trichloro-2-[o-chlorophenyl]-2-[p-chlorophenyl]ethan

参考文献(1) Table 33 を引用。

5-2-3. サブタスク3

ER 結合性が明確な14のコード化被験物質の測定結果をもとに施設内および施設間再現性の評価が行われた。データ分析と分類判定はサブタスク 2 と同様に実施した。全体として、両アッセイにおいて、共に14物質の各施設における分類結果の単純平均は、結合物質と非結合物質を問わず予想結果と良く一致しており (CERI アッセイ : 12 物質で一致、FW アッセイ : 12 物質で一致)、両アッセイで、共に施設間におけるコード化被験物質の良好な定性的な再現性が示された (表 5-9、5-10 参照)。なお、これらの単純平均は、測定回数を考慮した加重平均と一致していた。特記すべき点として、両アッセイにおいてコード化被験物質として評価した場合、DBP(陰性)は「判定不能 : equivocal」と分類され、各施設で出された分類判定の総合結果は予測結果と一致しなかった。この要因として、(1) 反応液中の溶解度限界と (2) 最大溶解濃度での ER に対する結合性が、依然として不確定であることが挙げられた。ヘプチルフェノール(弱結合性)は CERI アッセイにおいて分類判定の総合結果は「判定不能」と分類されたが、非常に弱い陽性物質では、十分な高濃度域で評価ができず、完全な競合結合曲線が得られないため正しく分類できない場合が指摘された。なお、本物質は FW アッセイでは当初、各施設における分類結果の単純平均に基づいて「結合物質 : Binder」と判定されていたが、CERI アッセイと同様に十分な高濃度域で評価ができず、完全な競合結合曲線が得られないため、「判定不能 : equivocal」に変更された。また、E2 の様に非常に強い陽性物質では、完全な結合曲線を得るためにより低濃度の結果が含まれるべきであると指摘された。これらの結果を受けて、分類判定の不正確さについてサブタスク 2 と同様の要因が挙げられた他、最終的な分類前に段階的な分析アプローチの導入が強く推奨された。また、施設 B では誤判定および不定判定、承認基準を満たせないケースが多く認められたが、施設特有の問題であると判断された。

表 5-9 CERI アッセイ、サブタスク 3 (コード化被験物質の分類判定)

Chemical	Expected Result	CeeTox	Lovelace	Missouri	Bayer	CERI	Simple Average
Atrazine	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Equivocal	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Bisphenol A	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Benz(a)anthracene	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Non-binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Dibutyl phthalate-TC	<i>Non-Binder</i>	Binder	Equivocal	Non-Binder	Binder	Non-Binder	<i>Equivocal</i>
Dihydrotestosterone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Equivocal	Binder	Binder	<i>Binder</i>
^a 17B-estradiol-TC	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Enterolactone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Equivocal	Binder	Equivocal	<i>Binder</i>
Heptylphenol	<i>Binder</i>	Binder	Equivocal	Equivocal	Binder	Equivocal	<i>Equivocal</i>
Kepone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
^a Norethynodrel-TC	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Octyltriethoxysilane	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Progesterone	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Tamoxifen	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Zearalenone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>

緑色背景は、予想される結果と不一致を示す。

^a 対照物質をコード化被験物質として試験した。

参考文献(1) Table 34 を引用。

表 5-10 FW アッセイ、サブタスク 3 (コード化被験物質の分類判定)

Chemical	Expected Result	CeeTox	Lovelace	Missouri	Bayer	CERI	Konstanz	Simple Average
Atrazine	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	§	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Equivocal	<i>Non-Binder</i>
Bisphenol A	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Benz(a)anthracene_DMSO	<i>Non-Binder^b</i>	Equivocal	§	Non-Binder		Non-Binder		<i>Non-Binder</i>
Benz(a)anthracene_EtOH	<i>Non-Binder^b</i>			Non-Binder	Non-Binder		Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Di-n-butylphthalate [†]	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Di-n-butyl phthalate - TC ^a	<i>Non-Binder</i>	Equivocal	§	Equivocal	Equivocal	Equivocal	Equivocal	<i>Equivocal</i>
Dihydrotestosterone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
17-β-estradiol-TC ^a	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Enterolactone	<i>Binder</i>	Binder	§	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Heptylphenol	<i>Binder</i>	Equivocal	Binder	Non-Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Equivocal</i>
Kepone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Norethynodrel-TC ^a	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Octyltriethoxysilane	<i>Non-Binder</i>	Equivocal	§	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Progesterone	<i>Non-Binder</i>	Non-Binder	Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	<i>Non-Binder</i>
Tamoxifen	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>
Zearalenone	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	Binder	<i>Binder</i>

緑色背景は、予想される結果と不一致を示す。

^a 対照物質をコード化被験物質として、通常、溶解限界濃度または最大 $10^{-3}M$ まで試験した。

[§] 許容基準を満たす測定結果の提出なし。

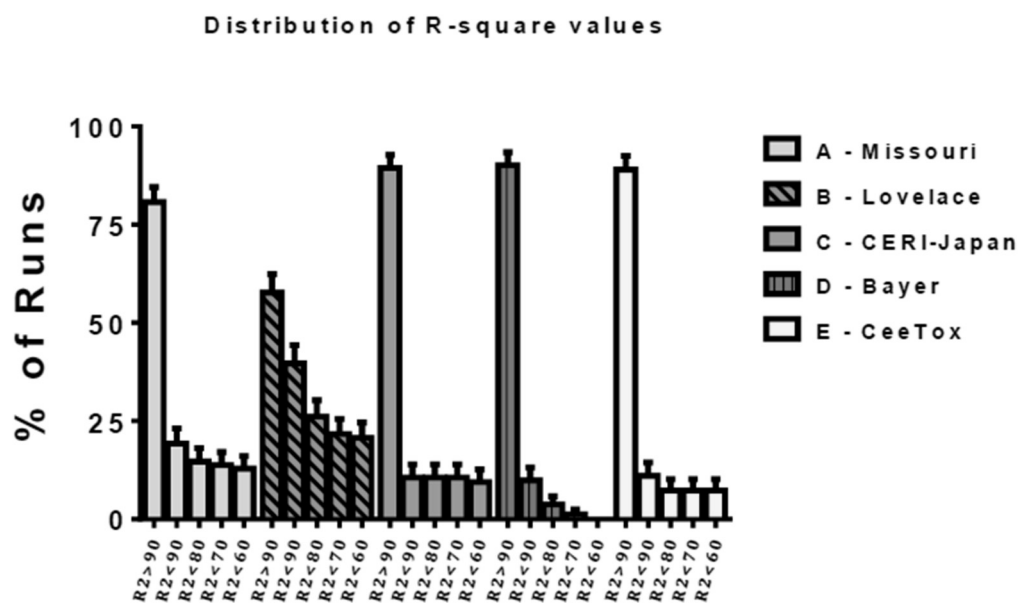
[†] DBP は陰性対照 (非結合物質) として、最大 $10^{-4}M$ まで試験した。

参考文献(1) Table 35 を引用。

5-2-4. R²値に基づいた評価

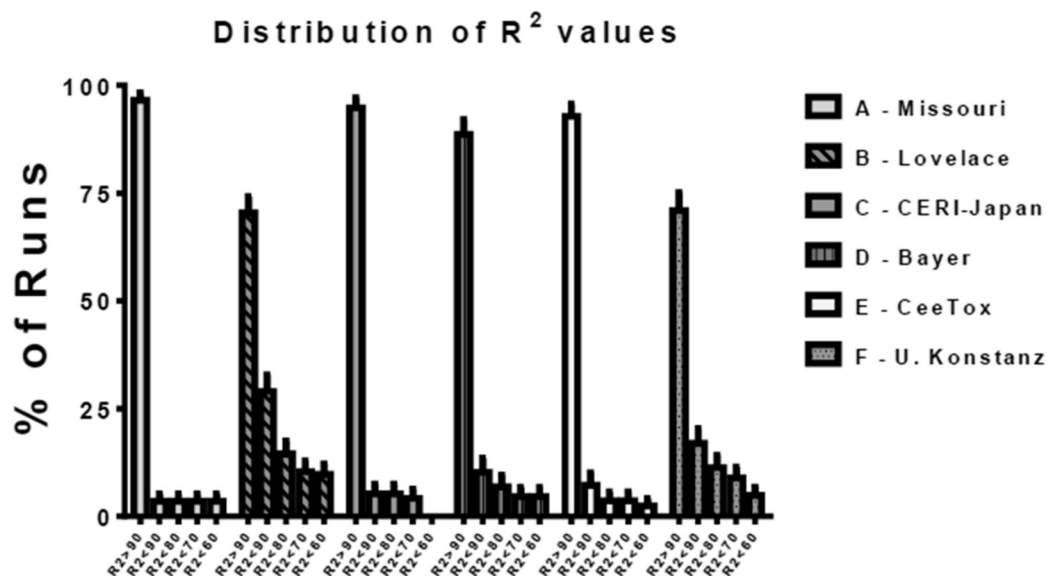
より包括的な施設内および施設間における再現性の評価を目的として、陽性対照のデータ許容の有無を問わず、実施施設が各プロトコルの承認基準に基づき除外したものを除く全ての測定データを適用させて、測定データのモデルへの適合の指標となる R² 値を用いた評価が行われた。データ分析において、各測定の R² 値が0.9(または90%)以上の場合を「良好」と判定した。

CERI アッセイについて、施設毎の全測定結果の R² 値の分布を比較すると、施設 B を除く 4 施設では、8 割超が「良好」と判定され、平均値が各々95%以上、変動係数(CV)値は6.5%以下であった(図 5-1 参照)。施設 B では、「良好」は 6 割弱にとどまり、平均値と CV 値はそれぞれ91.8%と11.9%であった。施設毎の予測陽性物質の正判定率(R²>0.9以上)の比較では、施設 A では80%以上、施設 C-E では90%超であったが、施設 B では~70%と他 4 施設と比べて偽陰性率が有意に高かった。また、施設 A および C では偽陽性判定は無く、他 3 施設の偽陽性率は約5-12%の範囲であった。特筆すべき点として、DBP を被験物質とした場合(10⁻³Mまで試験)が「偽陽性」の約半分を占めた。FW アッセイでは、4 施設において「良好」判定が高い割合を占めたが、施設 B と F では 7 割程度にとどまった(A : 96.6%、B : 70.3%、C : 94.8%、D : 88.6%、E : 92.8%、F : 71.0%)(図 5-2 参照)。施設毎の平均 R² 値は、施設 B を除く 4 施設で95%以上、施設 B は93%であった。また、それらの施設毎の CV 値は、最低値0.8%(施設 A)、最大値9.4%(施設 B)、残り 4 施設では 5.5~8.4%の範囲に収まった。施設毎の予測陽性物質の正判定率(R²>0.9以上)を比較すると、4 施設では90%を超えた(偽陰性率、2-7%)一方、施設 B と施設 F では、それぞれ85%(偽陰性率、15%)、75%(偽陰性率、25%)と有意に低かった。また、施設 A および F では偽陽性判定は無く、他 4 施設の偽陽性も2.3-7.6%の範囲に収まった。従って、R² 値に基づく分析の結果、一部の施設で技術的問題が見受けられたが、全体として、両アッセイでは、共にコード化を問わず、良好な定性的な再現性が示された。



参考文献(1) Figure 14(A)を抜粋引用。

図 5-1 CERI アッセイ、施設毎における全測定結果の R² 値分布比較



参考文献(1) Figure 16(A)を抜粋引用。

図 5-2 FW アッセイ、施設毎における全測定結果の R² 値分布比較

5-2-5. サブタスク4

両アッセイの実施に適用可能な弱結合性および非結合性対照物質の探索を目的として、2施設(施設 A および E)において7物質(6物質に各々2つのコード、および1物質に4つのコードを付した)が合計16の独立したコード化被験物質として提供され、それらの競合結合試験が実施された。両施設は共に、どちらのアッセイを使用した場合においても、各々コード化被験物質を正しく分類判定した。なお、幾つかの被験物質で溶解度の問題が認められたものの、弱結合性物質の分類判定には影響が無かった。サブタスク4の結果から、アッセイに最適な弱結合性物質としてノルエチンドロンが選択され、DBPの代替えとなる最も有望な陰性対照としてOTESが同定された。これらの結果を受けて、両アッセイを使用する場合のより適切なデータの分析と解釈には、(1)被験物質の溶解限界の決定とその分類判定への影響の確認と(2)10%ルールが適用されるケースの適切な判別が重要であることが示された。

6.試験方法の正確性・信頼性

CERIおよびFWアッセイによる評価結果の信頼性の検証のため、各々の施設で実施された全被験物質のhrER α への結合能の評価を基にした最終分類結果を用いて、米国EPAの現行Tier Iスクリーニング試験群に含まれるラット子宮のサイトゾルを使用したER結合試験(TG OPPTS 890.1250:ER-RUC)の結果が比較された(表6-1参照)。なお、比較には、3種の試験法全てにおいて結合試験データが入手可能であったER結合性が明確な22物質(予測陽性:17、予測陰性:5)を用いた。「判定不能」を除き、3アッセイの分類判定結果を比較したところ、それぞれCERIおよびFWアッセイの結果は、予想されたERに対する結合親和性の強弱を問わず、全ての被験物質の分類において100%一致していた。各々の試験法の陽性物質の一致率は、CERIおよびFWアッセイは共に100%(16/16)、ER-RUCアッセイは94.1%(16/17)であった。陰性物質については、CERIおよびFWアッセイは共に5物質全てを陰性と判定した一方、ER-RUCアッセイの判定結果の内訳は陰性1、偽陽性1、評価不能3であった。また、「判定不能」を除く各々の試験法の正確度は、CERIおよびFWアッセイは共に100%(21/21)、ER-RUCアッセイは94.4%(17/18)であった。従って、CERIおよびFWアッセイ共に、米国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。

表 6-1 FW アッセイ、CERI アッセイおよびテストガイドライン OPPTS 890.1250 を用いた
化学物質分類判定の性能比較

Chemical Name	CAS RN	Expected Response	FW Assay	CERI Assay	TG OPPTS 890.1250	MESH Chemical Class	Product Class
17β-Estradiol	50-28-2	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Norethynodrel	68-23-5	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
*Di-n-butyl phthalate	84-74-2	<i>Non-binder</i>	Non-Binder**†	Non-Binder**†	Not Tested	Ester, Phthalic Acid	Plasticizer, Chemical Intermediate
DES	56-53-1	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Cyclic)	Pharmaceutical, Veterinary Agent
17α-ethynylestradiol	57-63-6	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Meso-Hexestrol	84-16-2	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Cyclic)	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Genistein	446-72-0	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Equol	531-95-3	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Phytoestrogen Metabolite	
Butyl paraben (n butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Paraben	
Nonylphenol (mixture)	84852-15-3	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Alkylphenol, Intermediate Compound	
o,p'-DDT	789-02-6	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Organochlorine	
Corticosterone	50-22-6	<i>Non-binder*</i>	Non-binder	Non-Binder	Binder	Steroid	Natural Product
Zearalenone	17924-92-4	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Resorcylic Acid Lactone, Mycotoxin	
Tamoxifen	10540-29-1	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Antiestrogen	Pharmaceutical, Veterinary Agent
5α-dihydrotestosterone	521-18-6	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Equivocal	Steroid, Nonphenolic	
Bisphenol A	80-05-7	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Phenol	Chemical Intermediate
4-n-heptylphenol	1987-50-4	<i>Binder</i>	Equivocal	Equivocal	Binder	Alkylphenol	
Kepone (Chlordecone)	143-50-0	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Hydrocarbon, (Halogenated)	Pesticide
Benz(a)anthracene	56-55-3	<i>Non-Binder*</i>	Non-Binder	Non-Binder	Equivocal	Aromatic Hydrocarbon	
Enterolactone	78473-71-9	<i>Binder</i>	Binder	Binder	Binder	Phytoestrogen	
Progesterone	57-83-0	<i>Non-binder*</i>	Non-Binder	Non-Binder	Equivocal	Steroid	Natural Product
Octyltriethoxysilane	2943-75-1	<i>Non-binder</i>	Non-Binder	Non-Binder	Non-Binder	Silane	
Atrazine	1912-24-9	<i>Non-binder*</i>	Non-Binder	Non-Binder	Equivocal	Triazine	Herbicide

濃いグレーの背景は、予想される結果と不一致を示す。

**10⁻⁴M まで試験した場合、非結合物質に分類された。10⁻³M まで試験した場合、最大濃度で標識リガンドとの競合が検出されたことから「判定不能」に分類された (CERI アッセイ—5 施設中 3 施設、FW アッセイ—6 施設中 5 施設、表 5-8 および 5-9 参照)。

参考文献(1) Table 40 を改編引用。

7. データの質

本試験法のバリデーション研究における多施設間試験は、GLP (Good Laboratory Practice) に準拠した精神で試験責任者による科学的指導および管理下で実施されたものである。また、すべてのデータは取り纏めを行った米国 EPA に提出される前に、それぞれの試験施設において独立した品質保証担当者による査察が実施されており、データの質および信頼性は確保されていると考えられる。

8. 試験法の有用性、限界および提言

- 1) CERi および FW アッセイは原理の項でも述べた様に、放射性標識リガンド ($[^3\text{H}]\text{-E2}$) と被験物質との hrER α 結合への競合作用を確認することにより、化学物質と hrER α との直接的な結合を検出できる。しかし、被験物質が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。特異性は極めて良好である。混合物への応用については検討されていない。
- 2) 本試験法では放射性リガンドを用いるため、試験施設は放射性物質取り扱いに関する認可を要する。放射性同位元素および有害化学物質を扱う工程についてはすべて、国の法令で定められた規則および手順に従う必要がある。
- 3) 標準的な品質管理を実施し、受容体の活性、化学物質濃度の正しさ、信頼限界が複数の反復試験を通じて安定な状態に保たれ、かつ試験期間中、期待される hrER α 結合反応を示す性能が保持されていることを確認することが必要である。
- 4) 新たに試験を実施する試験施設は、予め hrER α 標品の特異性と活性を確認する飽和試験および E2 と TG に示された習熟度確認物質 (弱結合物質および非結合物質) を用いた競合結合試験を実施し、当該試験法を使用する習熟度のあることを証明する必要がある。さらに、異なる日に実施した 3 ~ 5 試験より得られた基準エストロゲン (E2) および対照物質の結果を含む履歴データベースを作成する必要がある。
- 5) 未知の化学物質を試験するには、予備試験を実施し、各被験物質の溶解限界を確認するとともに、試験実施に用いる適切な濃度範囲を特定する必要がある。各被験物質の溶解度はまず溶媒で決定し、さらに試験条件下で混濁や沈殿の有無を確認する。試験で用いる最高濃度は 1 mM を超えてはならない。
- 6) 望ましい溶媒として FW アッセイではエタノールが、CERi アッセイでは DMSO がそれぞれ示されているが、両アッセイともエタノール及び DMSO が使用可能である。各溶媒の試験ウェル内の最終濃度は、FW アッセイでは 1.5% (最大 2% を超えてはならない)、CERi アッセイでは、2.05% (最大 2.5% を超えてはならない) とされている。
- 7) hrER α 結合試験 (CERi および FW アッセイ) は、スクリーニングのための試験法であり、化学物質の安全性評価に用いる際には、他の *in vitro* および *in vivo* 評価系等との結果と併せて実際の生体影響について総合的に判断を行うべきである。

9. その他の試験方法の科学的な報告

内分泌かく乱に係ると考えられる ER に関わる試験法としては、被験物質の受容体への結合実験がまず考えられる。実際、本 PBTG (OECD TG493) で取り上げられている、hrER 結合親和性化学物質の検出のための、hrER *in vitro* 試験法は、二つの機序および機

能的に同等と評価された hrER α 結合物質確認試験法から成るが、いずれも非細胞系(cell-free)において、RI 標識リガンドに対する被験物質の競合的な結合阻害により、hrER α との結合能を調べる、というものである。結合実験では、化学物質との相互作用が容易となるように、受容体が水相に露出していることが望ましいが、この目的には細胞を破壊した cell-free が有利であり、実際、この系を用いた結合実験が本 TG にて提案されている。

一方、受容体と相互作用を示す化学物質には、受容体に結合して本来結合すべき生体内物質と同様の細胞内情報伝達系を作動する(活性化する)「アゴニスト」と、受容体に結合はするが本来結合すべき生体物質と異なり生体反応を起こさず、その結合によって本来結合すべき生体内物質と受容体の結合を阻害することで生体応答反応を起こさない「アンタゴニスト」があり、上述した結合実験のみでは、アゴニスト・アンタゴニスト両者の区別が困難である。さらに、非細胞系における結果は、細胞系の場合と一致しないという報告も多く、この理由として、細胞内への移行性による差異や細胞内に特有の結合を制御する因子の存在が示唆され、したがって、受容体との相互作用の検討には、細胞系を利用して調べるのが望ましい。

この点、hER α の転写活性を指標とするレポーターアッセイでは、アゴニスト・アンタゴニスト作用の有無を判定できる。現時点で hER α のレポーターアッセイに関する OECD TG として OECD TG455 が成立している。OECD TG455 もまた PBTG であり、参照試験法として ER STTA 法(hER α -HeLa-9903 細胞を用いた ER 恒常発現系転写活性化試験法)と VM7LucER TA 法(VM7Luc4E2 細胞を用いる ER 転写活性化(TA)試験)の 2 種の方法が示されている。

両方法の相違は、(1)ER STTA 法が hER α を HeLa 細胞に組み込んだものであるのに対し、VM7LucER TA 法では VM7 細胞に内在する hER を利用する、(2)ER STTA 法では、組み込まれた受容体は hER α のみであるが、VM7 細胞では ER α と ER β の双方を発現している。ただし、2 種の ER アイソフォーム(hER α 、hER β)に対して完全な選択性を示す化学物質は、知られておらず、定性的評価において両測定系の結果は、同等と考えられる。(3)VM7LucER TA 法のアンタゴニスト試験では、バリデーション研究において高濃度領域でのルシフェラーゼ活性の非特異的阻害が認められたことから、評価可能な被験物質の最大濃度は、20 μ g/mL(約10 μ M)に制限されているのに対して、ER STTA 法では、媒体への溶解性が良好かつ細胞毒性が認められない場合、アゴニスト・アンタゴニスト試験とも最大 1 mM まで評価可能である。

ER STTA 法については、CERI が、安定的形質移入による転写活性化試験の妥当性確認研究を、ヒトの子宮頸癌に由来する hER α -HeLa-9903 細胞株を用いて実施し、hER α を介してエストロゲンアゴニスト活性を検出する試みを行い、実施目的に関する試験の適合性および信頼性を証明している。この細胞株には、次の 2 種類を安定的に挿入されている：(i)hER α 発現ベクターおよび(ii)マウスのメタロチオネイン(MT)遺伝子のプロモーター部位である TATA エlement によって駆動される、アフリカツメガエルのパピロメタロチオネイン由来のエストロゲン応答 Element(ERE)のタンデムリピートを 5 個含むホタル・ルシフェラーゼのレポーター遺伝子。

もう一方の VM7LucER TA 法は、NICEATM および ICCVAM によって妥当性の確認がなされてきた。ヒト卵巣腺癌細胞株 VM7 において安定的に形質移入した hER 応答ルシ

フェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて *in vitro* hER アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する物質に関する濃度反応データを提供する。具体的には、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーターの上流に位置する4つのEREの制御の下でルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を安定的に形質移入したER応答ヒト卵巣腺癌細胞株VM7を利用して、*in vitro*のERアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する物質を検出する。アッセイには安定的に形質移入したVM7細胞株を使用する。さらにPSを満たす類似(me too)試験法として、ER α CALUX アッセイ(Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transactivation Assay for Detection of Estrogenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals using the ER α CALUX cell line)が記載されている。このアッセイは、BioDetection Systems BV(オランダ)によって妥当性の確認がなされてきた。CALUXとは、Chemical-Activated Luciferase Expressionの略であり、ヒト骨肉腫細胞株U-2 OSにおいて安定的に形質移入したER α CALUX細胞株を使用し、3つのERE制御による、hER応答ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて、*in vitro* hERアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を、ルシフェラーゼの活性(発光量)を測定することにより検出する。内因性のレポーター活性はほとんど検出されないと報告されている。

内分泌かく乱作用としては他にも、リガンド結合ポケット以外の部位でのER α との相互作用や、エストロゲンシグナル伝達に関連する他の受容体であるER β 、Gタンパク質共役エストロゲン受容体およびその他の受容体あるいは、内分泌系内の酵素系との相互作用なども考慮する必要があるが、現時点でこうした点を考慮したバリデーション研究が終了している試験系はない。

なお、2012年に改訂されたOECD CFは5つのレベル(level 1~5)から構成され、それぞれの異なったレベルの生物学的複雑性に対応している。上記のレポーターアッセイは、レベル2の「選択された内分泌機構/経路に関する情報をもたらす*in vitro*アッセイ(非哺乳類の方法)」に相当する。

10. 結論

ER結合親和性化学物質の検出のための、hrER *in vitro*試験法に関するPBTGは、*in vitro*で化学物質のERに対する結合親和性を生体内リガンドであるエストラジオールとの競合結合により検出するスクリーニング試験法である。現在、本PBTGには、2種の試験法(CERIおよびFWアッセイ)が参照試験法として掲載されている。また、本PBTGには、類似試験法の開発とバリデーション研究のためのPSが設定されており、PSを満たすことが示された新規の試験法を追加することが可能である。

現在、本PBTGに参照試験法として掲載されている2種の試験法についての科学的妥当性と規制試験法としての妥当性については、日米欧6施設の参加によるバリデーション研究において陽性21物質、陰性8物質を用いた評価が行われ、施設内・施設間再現性とも良好な結果が示されており、OECDの第三者評価では、それらバリデーション研究の結果をもとに本試験法の正確性・信頼性が評価され、OECD EDTA TFで提案されたOECD CF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OECD TG493が成立した。

本試験法による評価の課題として、本試験法で評価できるのはあくまでも化学物質の

ER 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出来ないという点があげられる。本試験法はあくまでもスクリーニング法であり、ER を介して惹起されると想定される有害影響を確定評価する試験法と組み合わせることで今後の化学物質管理に大きく貢献すると考えられる。

11. 利益相反(COI)について

利益相反の観点から、CERI アッセイが適切に評価されたことを受容体結合資料編纂委員会は確認した。

謝辞

本評価報告書を編纂するに当たり、武吉正博博士(一般財団法人 化学物質評価研究機構)より CERI アッセイに関する具体的な方法などを詳細に解説いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

- 1) 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.
- 2) OECD (2015), Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J-P., Giudice, LC., Hauser, R., Prins, GS., Soto, AM., Zoeller, RT., Gore, AC. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society ent. *Endocr. Rev.*, 30: 293–342.
- 5) ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 6) ICCVAM (2006), ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 7) Akahori, Y., Nakai, M., Yamasaki, K., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y., Ohtaki, M. (2008), Relationship between the results of in vitro receptor binding assay to human estrogen receptor alpha and in vivo uterotrophic assay: Comparative study with 65 selected chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- 8) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 67.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 9) Takeyoshi, M. (2006), Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For

Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

- 10) USEPA (2009). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines. OPPTS
- 11) 890.1250: Estrogen receptor binding assay using rat uterine cytosol (ER-RUC). Available at: <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0005>.
- 12) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. (2004), Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity, *Toxicol. Lett.*, 146: 111-120.