

ヒトエストロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出する BG1Luc ER TA 法の
評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 25 年 6 月 11 日

JaCVAM 評価会議

吉田武美 (日本毒性学会) : 座長
浅野哲秀 (日本環境変異原学会)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
一鬼 勉 (日本化学工業協会) *
大島健幸 (日本化学工業協会)
大野泰雄 (座長推薦) *
小笠原弘道 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
小野寺博志 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
黒澤 努 (日本動物実験代替法学会)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
谷田智子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
西川秋佳 (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)
長谷川隆一 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
増田光輝 (座長推薦)
山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構) *
横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
吉田 緑 (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 病理部)
吉村 功 (座長推薦)
渡部一人 (日本製薬工業協会)

任期：平成 24 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

*：平成 25 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

以上

内分泌攪乱物質が大きな問題となってから、物質のエストロゲン様作用を測定する *in vitro* 試験法の開発が社会的に求められてきた。BG1LucER TA 法（以下「当該試験法」）は、この社会的要請に応じて開発された試験法の一つで、化学物質が ヒトエストロゲン受容体（ER）に対して活性物質（agonist）あるいは拮抗性物質（antagonist）であることを検出して、エストロゲン活性あるいは拮抗作用を示す内分泌攪乱性の予測に役立つものとして提案されたものである¹⁾。当該試験法に対して従来試験法と言えるものは確立していない。しかし、内分泌攪乱性を規定する毒性ないし生物活性についてはまだ十分には特定されていない部分が残されており、ICCVAM の“*In vitro* ER and AR binding and TA reference substances list²⁾”では、複数の根拠を総合して内分泌攪乱性物質を分類している。

米国では 2012 年に ICCVAM が当該試験法の評価結果を報告している¹⁾。OECD においても 2012 年 10 月 2 日にこれをガイドライン TG457 に取り入れている³⁾。これに対して日本では、JaCVAM の評価委員会が当該試験法の評価を行い、平成 24 年 11 月に結果を報告している⁴⁾。以下に示すのは、この報告に基づいた JaCVAM 評価会議の評価結果である。

1. 当該試験法は、どのような従来試験法を代替するものか。または、どのような毒性を評価あるいは予測するものか。

化学物質のエストロゲン活性を検出しようとする *in vivo* の従来試験法としては、げっ歯類を用いた子宮肥大試験がある。化学物質のエストロゲン活性を検出しようとする *in vitro* の試験法としては、エストロゲン受容体結合性試験と、ヒトエストロゲン- α 受容体安定導入細胞を用いる転写活性化試験（Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay; ER- α STTA; OECD TG455）がある。当該試験法はこれらと類似の役割が期待されているものである。

2. 当該試験法と従来試験法の間にはどのような科学的つながりがあるか。

測定指標は異なるが、エストロゲン活性または拮抗性を基礎とするという意味で、当該試験法の科学的メカニズムは、げっ歯類子宮肥大試験と共通である。

類似の試験法である ER- α STTA 法は、活性物質が ER と結合することによって誘導される DNA 転写活性化をレポーター遺伝子（Luciferase）の活性化による luciferin の発光を指標として測定するものであり、当該試験法の原理はこれと共通である。

類似の試験法であるエストロゲン受容体結合性試験は、被験物質と ER との結合性を測定するものであるが、結合した物質が ER を刺激するのかりガンドに拮抗するのかが判別できないところが当該試験法と異なっている。

3. 当該試験法とそのデータは、透明で独立な科学的評価を受けているか。

EU (ECVAM) と日本 (JaCVAM) を併せて ICCVAM が組織した運営委員会の管理の下で、3 試験施設（米国の Xenobiotic Detection Systems, Inc.、ECVAM Joint Research Centre、日本の日吉株式会社）による検証試験が実施された。被験物質は、ICCVAM がエストロゲンおよびアンドロゲンに関する *in vitro* 試験法の評価に用いるべき物質として 2003 年に発表した 78 物質である²⁾。判定に必要な用量反応曲線が得られず、エストロゲン活性・拮抗性の有無が判定困難であった 7 物質が、この検証試験の解析・評価から除外されたことは、当該試験法の利用に当たって留意すべきことである。

この試験における当該試験法の正確性は、ER 活性 35 物質において、感度が 96% (27/28)、特異度が 100% (7/7) で、一致率は 97% (34/35) であった。ER 拮抗性 25 物質においては、感度が 100% (3/3)、特異度も 100% (22/22) で、一致率は 100% (25/25) であった。

この試験結果についての国際的第三者評価において、当該試験法は、ER 活性および ER 拮抗性を検出する *in vitro* 試験法として適正なものであるとされている。

よって、当該試験法とそのデータは透明で独立な科学的評価を受けていると言える。

4. 当該試験法は、従来試験法の代替法として、どのような物質または製品を評価することを目的としているか。

代替すべき試験法は確立されていないが、当該試験法の評価対象となるのは、医薬品、動物用医薬品、農薬、産業化学物質等である。ただし、不溶性物質および揮発性物質に対応する試験手順は確立されていない。

5. 当該試験法は、ハザード評価あるいはリスク評価のどちらに有用であるか。

当該試験法は、現時点ではハザード評価に有用である。

なお、当該試験法は、被験物質の濃度に応じた活性の測定が可能であるから、リスク評価に使用できる可能性はあるが、まだ検証が行われていないので、有用性は不明である。

6. 当該試験法は、目的とする物質または製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法は、化学物質の ER 活性および ER 拮抗性を調べることができる。当該試験法は、基本的なプロトコルとして、試験物質を DMSO に溶解して適用しており、DMSO に不溶の物質および揮発性物質に適用できるかどうかは、検討がなされていないので不明である。

7. 当該試験法はプロトコルの微細な変更に対して頑健であるか。

検証試験に参加した 3 施設での施設内再現性は 12 被験物質について 100%であった。ER 活性物質における施設間再現性は 67% (8/12)、ER 拮抗性物質での施設間再現性も 100% (12/12) であったので、ある程度の頑健性は期待できる。

8. 当該試験法の技術習得は、適切な訓練を経ている担当者にとって容易なものであるか。

この試験に必要な技術は、培養細胞を用いる試験法一般の技術および細胞の発光を測定する技術であり、適切な訓練によって容易に習得できるものである。

9. 当該試験法は、従来試験法と比べて時間的経費的に優れているか。

当該試験法のために必要な機器は、通常の細胞培養に要する装置のほか、細胞発光の測定に用いる光度計であり、高価なものではない。試験に要する時間は、凍結保存された細胞を融解して増殖するのに 48~72 時間、試験用培地に細胞を播種してさらに 48~72 時間、試験物質と接触させて Luciferase 活性化を誘導するのに 19~24 時間を要するが、その後は細胞を融解させて発光を測定し、データを集計解析するのみである。これらの作業に要する時間は他の *in vitro* 類似試験法と変わらない。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質または製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は培養細胞を用いる *in vitro* 試験法であり、他の類似試験法と同じ程度に、行政上利用可能である。

参考文献

- 1) ICCVAM Test Method Evaluation Report. The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals. (NIH Publication No. 11-7814; 2011)
- 2) ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. (NIH Publication No: 03-4503; 2003)
- 3) OECD TG457 : BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. (2012)
- 4) BG1LucER TA (LUMI-CELL ER) 法 : *in vitro* ヒトエストロゲン受容体活性物質試験法の評価報告 (平成 24 年 11 月)