

評価報告書

AR STTA 法：AR-EcoScreen™ 細胞を用いた アンドロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法

内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会

平成 30 年（2018 年）10 月 1 日

内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会

小野 宏（一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所）

井口泰泉（横浜市立大学）

小野 敦（岡山大学）

丸野内棣（藤田保健衛生大学）

用語集

Accuracy : 正確性

Advisory Group on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA AG) : 内分泌かく乱物質の試験・評価タスクフォース顧問団

Androgen Receptor (AR) : アンドロゲン受容体

Androgen Responsive Element (ARE) : アンドロゲン応答配列

AR STTA : AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法

Concordance : 一致度

Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters : 内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念フレームワーク

di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) : フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)

5 α -Dihydrotestosterone (DHT) : 5 α -ジヒドロテストステロン

Dimethylsulfoxide (DMSO) : ジメチルスルホキシド

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) : 欧州代替法評価センター

False negative rate : 偽陰性率

False positive rate : 偽陽性率

Good Laboratory Practice (GLP) : 優良試験所基準

Glucocorticoid Receptor (GR) : グルココルチコイド受容体

Hershberger assay : ハーシュバーガー試験

linerIC30/linerIC50 : アンタゴニスト試験において陽性被験物質がスパイクインアゴニストコントロール(500 pM DHT)の反応を 30%もしくは 50%阻害する濃度(直線回帰により求める)

Interagency Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) :

米国代替法評価省庁間連絡委員会

Inter-laboratory validation study : 施設間バリデーション試験

Intra-laboratory validation study : 施設内バリデーション試験

Japanese Center for Validation of Alternative Methods (JaCVAM) : 日本動物実験代替法評価センター

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS) : 国立食品医薬品安全評価研究所(韓国)

PC10/PC50 : アゴニスト試験において陽性被験物質が陽性コントロール(10 nM of DHT)の 10%もしくは 50%の反応を示す濃度(直線回帰により求める)

Performance-Based Test Guideline (PBTG) : 性能準拠試験法ガイドライン

Performance Standards (PS) : 性能標準

Reliability : 信頼性

Test Guideline (TG) : 試験法ガイドライン

Transcription Activation (TA) : 転写活性化

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) : 経済協力開発機構

OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors : OECD 内分泌かく乱物質の試験と評価の概念的枠組み

OECD Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment (OECD EDTA) : 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 Validation Management Group for Non-Animal Tests (OECD-VMG NA) : OECD 試験法バリデーション運営委員会非動物試験部会

Methyltrienolone (R1881) : メチルトリエノロン

Standard Operating Procedures (SOP) : 標準操作手順書

Standard Project Submission Form (SPSF) : 標準プロジェクト提出様式

Study Management Team (SMT) : 研究運営委員会

Validation study : バリデーション試験

要旨

AR STTA 法 (AR-EcoScreen™ 細胞を用いたアンドロゲン受容体 (AR) 恒常発現系転写活性化試験法) は、*in vitro* で化学物質の AR に対するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を検出するスクリーニング試験法であり、化学物質の AR への作用による RNA 転写活性化を検出することでアゴニストとアンタゴニストの活性を検査することが出来る。

本試験法の検査性能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、各 4 施設の参加による 2 回のバリデーション試験におけるアゴニスト試験・アンタゴニスト試験各 10 物質についての評価結果により検証された。さらに、本試験法は定量的評価法として開発され、バリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験のいずれにおいても定量的評価値の再現性も良好であることが示された。OECD のピアレビューでは、それらのバリデーションの結果をもとに、この試験法の正確性・信頼性が評価され、OECD-EDTA 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 OECD TG458 が成立した。

本試験法に関連した今後の課題として、本試験法における陽性反応が実際の生体影響をどの程度反映するものであるか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、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

AR STTA 法（詳しくは「AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体(AR)恒常発現系転写活性化試験法」; The Stably Transfected Transcription Activation (STTA) assay using the human AR-EcoScreen™ cell line) は、化学物質のアンドロゲン（および抗アンドロゲン）活性を化学発光により検出する *in vitro* 試験法の一つで、化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング評価のために開発された。本試験法は、我が国（日本）の大塚製薬株式会社で構築された AR-EcoScreen™細胞株を用いて、（一財）化学物質評価研究機構（以下、CERI と記す）が中心となって試験プロトコルが開発された。AR-EcoScreen™細胞は、CHO-K1 細胞に導入したヒト AR プラスミドとホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にラット前立腺 C3 遺伝子のアンドロゲン応答配列 (ARE) 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る。AR STTA 法は導入された AR の活性化によって起るレポーター遺伝子の転写活性の変化を化学発光により定量的に測定する試験系であり、細胞毒性評価を同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評価することが可能であるという利点を有する。AR-EcoScreen™細胞は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (<http://cellbank.nibiohn.go.jp/>) より入手可能である（細胞登録番号: JCRB1328）。AR STTA 法については、厚生労働省・経済産業省共同で OECD に SPSF が提案され、その後、実施された 2 回のバリデーション試験の結果をもとに、試験法ガイドライン (TG458) の成立に至った。

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ヒト健康への影響や環境に対する影響が指摘されている。しかし、市場に流通する多くの化学物質については、内分泌系への作用の有無や程度について評価されていない。OECD（経済協力開発機構）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テストガイドラインの整備のため、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) 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 Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters として整理し、既存ガイドラインの改訂と、新規試験法ガイドラインの作成を開始した。OECD conceptual framework 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、本試験法ガイドラインは、レベル 2 の「機構に関する情報をもたらす *in vitro* 試験」に該当する転写活性化 (TA) 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、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注目された。アンドロゲン活性に関する試験法としては、すでに *in vivo* 試験法として「ハーシュバーガー試験」が確立され、バリデーション試験を行った上で国際的な TG (OECD TG441) となっているが、より簡便で迅速な非動物試験として培養細胞を用いる *in vitro* 試験法の開発が進められてきた。

物質の AR との結合性を *in vitro* で試験する方法には、生体または培養細胞から抽出した AR に対する化学物質の結合反応の測定法があり、たとえばラット腹側前立腺から抽出した AR を用いる「ラット前立腺サイトゾルアンドロゲン受容体結合性試験 (EPA OPPTS 890.1150)」が挙げられる。これは無細胞系の結合試験であり、詳細な用量反応関係を確認でき、物質の AR 結合活性を標準物質 (たとえば R1881) と比較して定量的に測定するものである。しかし、AR に対しては受容体活性化物質 (アゴニスト) だけでなく拮抗阻害物質 (アンタゴニスト) も結合性があるため結合性試験では両者の区別が出来ない。その区別のためには、化学物質と AR との結合により引き起こされる生物学的反応を評価する必要がある。AR による生物学的反応性の指標として生体に誘発されるアンドロゲン効果を測定する *in vivo* 試験 (ハーシュバーガー試験) が利用されているが、*in vitro* で、AR が化学物質と結合したのちに細胞内で起こる応答を検出することによりアゴニスト作用とアンタゴニスト作用を区別して評価可能である。活性物質と結合した細胞内 AR は、核内の ARE との結合を通じて関連タンパクをコードする遺伝子 (DNA) の転写を起こす。このような遺伝子を介する応答に必要な機構を有する細胞を用いた試験法は、迅速なスクリーニング評価法として有用である。

AR STTA 法は、アンドロゲン活性物質の AR への結合に続く下流遺伝子の転写活性化をエンドポイントとして検出する方法である。細胞には転写活性化を調べるために、当該受容体特異的応答配列と連結した位置 (下流) にレポーター遺伝子を組み込んでおき、転写活性化によるレポータータンパクの発現を発光基質の添加により検出する。このような細胞として、バリデーションが終了してガイドライン化された方法はないものの、Wilson らによって、ヒト乳がん細胞 MDA-MD-453 に AR 反応性のルシフェラーゼを恒常的に発現させた MDA-kb2 細胞が報告されている (Wilson et al., Toxicol. Sci., 66, 69-81, 2002)。しかし、MDA-kb2 細胞で用いられた MMTV (mouse mammary tumor virus) プロモーターの ARE は、AR のみでなくグルココルチコイド受容体 (GR) にも反応性を有するため、AR と GR の区別が出来ない。それに対して、AR-EcoScreen™ 細胞で用いられたラット前立腺 C3 遺伝子プロ

モーターの ARE は、GR への反応性をほとんど示さず、また、アンタゴニストの検出において AR-EcoScreen™ 細胞は、MDA-kb2 細胞よりも高感度であることが報告されている (Satoh et al., J. Health Sci., 51(5), 557–568, 2005)。

AR STTA 法の多施設バリデーション試験は、計 2 回実施された。2010 年に OECD に提出された第 1 回目のバリデーション報告書に対して、OECD ピアレビューにより参照物質となる化合物数が少ないことから追加バリデーション試験が要求されたことを受けて、追加の第 2 回バリデーション試験が実施された。

第 1 回バリデーション試験は、2004 年に CERI が中心となって、住友化学(株) (以下、住友化学と記す)、大塚製薬 (株) (以下、大塚製薬と記す)、(株)カネカテクノロジー(以下、カネカと記す)の国内 4 施設の参加により実施された。

また、多施設バリデーション試験に先立ちプレバリデーションとして大塚製薬で実施された 40 物質の測定結果を用いて ICCVAM 報告 (ICCVAM, 2003) において *in vitro* AR TA アッセイ検証のための推奨物質として示された物質リスト (ICCVAM リスト) との比較、経済産業省委託により CERI で実施された AR 結合試験 (NITE CHRIP で公開されているデータをもとに、31 物質が比較に用いられた) との比較が行われ、いずれも一致率は良好であった。

本試験では、陽性対照 1 物質およびコード化された 4 物質の計 5 物質について、各施設でアゴニスト・アンタゴニスト試験の独立した 3 回繰り返し測定が実施され、アゴニスト試験、アンタゴニスト試験いずれにおいても良好な施設内、施設間再現性が示された。

第 1 回バリデーション報告書の OECD ピアレビューにおいて、AR STTA 法は、化学物質の *in vitro* AR アゴニスト・アンタゴニスト活性を検出する試験法として再現性・正確性が評価されたものの多施設バリデーション試験で測定された物質数が 5 物質 (うちアゴニスト・アンタゴニスト陽性物質は各 2 物質、1 物質はいずれも陰性であった) と限られており、将来、性能標準 (PS) を設定する際の参照物質として選択出来る物質数が少ないことから追加バリデーションが要求され、追加の第 2 回バリデーション試験が実施された。

追加バリデーション実施にあたり、OECD VMG-NA メンバーの協力により被験物質としてアゴニスト・アンタゴニスト各 5 物質が選定された。また第 1 回バリデーションで用いられた SOP においてアゴニスト陽性リファレンスコントロールとして設定された R1881 が日本国内で入手困難であることから、新たなアゴニスト陽性リファレンスコントロールとして Mestanolone (CAS: 521-11-9) が選定された。

追加の第 2 回バリデーション試験は、我が国 (日本) からの要請により OECD VMG-NA メンバーで組織された研究運営委員会 (SMT) が中心となって試験計画を策定し、国内 3 施設

(CERI、住友化学、北海道立衛生研究所)、海外 1 施設 (NIFDS、韓国) の参加による 2 フェーズからなる国際バリデーション試験として 2013 年より開始され、フェーズ 1 でリファレンス物質の測定が行われ、フェーズ 2 でコード化被験物質の測定が行われた。

また、アゴニスト試験のリファレンス化合物として新たに設定された Mestanolone のリファレンスクライテリアは、国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに設定され、NIFDS のフェーズ 1 試験およびフェーズ 2 試験で検証が行われた。第 2 回バリデーション試験においては、アゴニスト・アンタゴニスト試験ともに非常に良好な再現性 (施設内、施設間とも) が示され、本試験系の信頼性・再現性が確認された。

第 2 回バリデーション報告書については、第 1 回バリデーション報告書の追加文章として TG 案とともに 2014 年に OECD に提出された。TG 案については、他にバリデーションが終了している同等の試験法がないことから、AR-EcoScreen™ 細胞を利用した AR-STTA 法単独の TG 案として提案され、化学物質の *in vitro* AR アゴニスト・アンタゴニスト活性を検出するスクリーニング試験法として妥当性が認められ、2016 年に OECD TG458 として成立した。

2. 試験法の妥当性

2-1 試験法の概略

1) 目的と原理

本試験法は内分泌かく乱物質のうち AR に作用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、AR STTA 法はその一つで生体の AR 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をスクリーニングするために CHO-K1 細胞にヒト AR を恒常的に発現するプラスミドと ARE 下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドを導入・安定発現させ、被験物質を細胞に曝露させた後、AR 活性によるホタルルシフェラーゼ発現量の変化をルシフェリンを基質として発光を測定するものである。

2) 標準測定条件

次の点に留意する必要がある。

- a. 培養細胞の維持管理 : 培養細胞は全て無菌状態で取り扱う必要がある。準備段階の培養から、96 ウェル・プレート中の試験に至るまで、細胞がフラスコやウェル内で均一な密度になる様に維持されなければならない。OECD TG458 で示された培養方法および注意点を忠実に守ること、細胞濃度の調整方法なども含めて、培養細胞の扱い方

を前もって特別に訓練を受けておく必要がある。

- b. 比較対照の設定：被験物質の測定値は全て相対値で比較するので適切な濃度の 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) を常に同一の 96 ウェル・プレート上で測定し、それに対する相対値として表す。
- c. 被験物質：被験物質測定時には、プロトコルで規定される陽性・陰性の参照物質を同時に測定することが重要である。

2-2 妥当性の検討

- 1) 総合的検討：AR STTA 法で用いる AR-EcoScreen™ 細胞は、強制発現されたヒト AR を介したアゴニストおよびアンタゴニストの両者を検出可能な *in vitro* 系である。溶媒に溶解可能 (DMSO 以外を用いる場合もある) な広範な被験物質に適用できる点で非常に価値が高い。なお、AR に関しては、結合性試験や他にこれまでにバリデーション試験が終了した AR 転写活性化試験法が無いため *in vivo* (ハーシュバーガー試験) 以外では、現時点で OECD で TG 化された唯一のスクリーニング試験法である。

理論的視点から：

アゴニスト活性およびアンタゴニスト作用のある化学物質による AR に対する単なる結合能ではなく転写活性を測定できる。培養細胞を用いる試験であるため反応系や培養細胞の維持管理が結果に影響を及ぼす可能性は否定できない。このことは試験結果の変動につながる可能性が高いので十分に注意が必要である。

測定系構築上の視点から：

- a. 培養細胞：AR STTA 法では CHO-K1 細胞にヒト AR を恒常的に強制発現させた AR-EcoScreen™ 細胞を用いてアッセイ系を構築している。一般にヒトの培養細胞では染色体の形態および数の異常を高頻度に有することが知られている。その影響は強制発現させた AR の発現にもある程度及ぶことが予想される。現在のところこうした染色体異常を防ぐ手段は知られていない。従って、試験対象物質の測定時には、TG で指定された参照 (標準) 物質の測定によって AR 反応性を常に評価する必要がある。
- b. レポーター遺伝子：このアッセイ系ではレポーター遺伝子を導入し、AR 活性化によるレポーター遺伝子発現により測定を行う。一部の化学物質は、レポーターとして用いているルシフェラーゼ活性の受容体非特異的な亢進や阻害等により疑陽性 (も

しくは偽陰性) 反応を惹起する可能性がある。また、ARE は用いる配列により GR が交差反応性を示すことが知られており、AR-EcoScreen™ 細胞で用いられているラット前立腺 C3 遺伝子プロモーターの ARE についても、非常に弱いものの GR アゴニストによる反応が示されている。アゴニスト検出試験において AR 非特異的な陽性反応が疑われる場合には、TG458 の ANNEX 2 に示された方法により、AR 特異性を確認する必要がある。

試験法操作上の視点から：

- a. 準備段階を含めた培養容器内の細胞密度の調整。特に細胞を均一に播種できているかどうかのチェックが必要である。
- b. 生細胞を倒立顕微鏡でチェックする際に容器全体をチェックする必要がある。

2-3 AR STTA 法の注意点

レポーターアッセイに共通の注意点として、以下が挙げられる。

使用する細胞について：細胞の反応性を維持するため、プロトコルでは、測定に使用する細胞の継代数は 40 代までと規定されている。AR-EcoScreen™ 細胞は、比較的、安定であることが示されているが、同様の試験系である ER STTA 法で用いる HeLa-9930 細胞では、規定の継代数以内であっても継代時の取扱等による反応性の低下が報告されている。参照物質の測定結果がプロトコルに示されたクライテリアを連続して逸脱する場合やプレート採用基準を連続して満たさなかった場合は、規定の継代数以内であっても新たなロット（サブロット）の細胞の使用を検討すべきである。

3. バリデーション試験に用いた物質の分類と妥当性

第 1 回目のバリデーション試験では、陽性対照物質の DHT を含む 5 物質についてアゴニスト検出試験とアンタゴニスト検出試験が実施された。追加の第 2 回バリデーション試験では、第 1 回目とは異なるアゴニスト・アンタゴニストがそれぞれ 5 物質が選択され、実施された。結果として、計 2 回のバリデーション試験により、アゴニスト・アンタゴニスト各 10 物質の測定が実施され、いずれも 5 物質が陽性、5 物質が陰性物質であり、陽性物質には強い活性を有する物質とともに活性の弱い物質も含まれている。AR に関しては、アゴニストおよびアンタゴニストの両方の活性を有することが知られている化学物質は限られており、バリデー

ションが実施された物質数はあまり多くないものの、代表的な活性物質が含まれていることから選択された物質は妥当と判断される。

4. 試験法のデータと結果の有用性

第1回のバリデーション試験において、参加4施設全てで測定が行われた物質は、陽性物質として測定されたDHTおよびコード化物質として測定が実施された4物質の計5物質（アゴニスト陽性2物質、アンタゴニスト陽性2物質、1物質は陰性）であり、これら5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。

第2回のバリデーション試験において、参加4施設全てで測定が行われた物質は、アゴニスト試験では陽性物質として測定されたDHT及びMestanolone、陰性対照物質として測定されたDi(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)およびコード化物質として測定が実施された5物質（陽性3物質、陰性2物質）であり、アンタゴニスト試験では陽性物質として測定されたHydroxyflutamideおよびBisphenol A、陰性対照物質として測定されたDEHPおよびコード化物質として測定が実施された5物質（陽性3物質、陰性2物質）であり、コード化物質として測定された各5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。

また、第1回バリデーション実施に先立って大塚製薬においてプレバリデーション試験として測定が実施された40物質（Table 1）の測定結果をもとに、ICCVAMリストでの文献情報をもとにしたAR TA作用分類（ICCVAM, 2003）やAR結合試験結果（NITE CHRIP）との比較が行われた。

同種の試験系であるER STTA法のバリデーション試験に比べて測定物質数が少ないが、AR活性（アゴニスト・アンタゴニストいずれも）を示すことが知られている化学物質が限られていること、バリデーション試験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構造・種類の物質が選択されており妥当であると評価される。計2回のバリデーション試験で評価が行われた化学物質の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、TG458に習熟物質リスト（Table 2-1, 2-2）として示されており、これらの情報は新たな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

第1回バリデーション試験においては、陽性物質として測定されたDHTを含む5物質（アゴニスト陽性2物質、アンタゴニスト陽性2物質、陰性1物質）の参加4施設における3回

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、陽性・陰性判定の一致率はいずれも 100%であった。また、アゴニスト検出試験での陽性判定基準である $\text{Log}_{10}[\text{PC10 (M)}]$ 、 $\text{Log}_{10}[\text{PC50 (M)}]$ の CV 値 (Table 3, 4) は最大で、それぞれ施設内で 8.0、7.1%、4 施設全体では 4.4、4.5%、アンタゴニスト検出試験の陽性判定基準である $\text{Log}_{10}[\text{linerIC30 (M)}]$ 、 $\text{Log}_{10}[\text{linerIC50 (M)}]$ の CV 値 (Table 5, 6) は最大で、それぞれ施設内で 5.9、3.6%、4 施設全体では、9.0、8.6%と定量的評価においても良好な再現性が示された。

第 2 回バリデーション試験においては、アゴニスト検出試験が実施された 5 物質の参加 4 施設における 3 回の測定結果における陽性・陰性判定は、施設内および施設間ともに一致率 100%であった。アゴニスト検出試験での陽性判定基準である $\text{Log}_{10}[\text{PC10 (M)}]$ 、 $\text{Log}_{10}[\text{PC50 (M)}]$ の CV 値 (Table 7) は最大で、それぞれ施設内で 3.8、2.9%、4 施設全体では、4.5、1.5%と定量的評価においても良好な再現性が示された。

アンタゴニスト検出試験においては、1 施設 (CERI) で陽性判定されるべき 1 物質について陰性の結果であったことから施設内再現性 80~100%、施設間再現性 95%となった。結果が一致しなかった原因は、バリデーション試験を行う最高濃度を各施設それぞれで溶解性試験を実施して決定したため、結果が一致しなかった 1 物質については当該試験施設での測定最高濃度が他の施設より低かったためであった。同施設でより高濃度での追加測定 (1 回) を実施した結果、他施設同様に陽性の結果を得たため、再試験結果を考慮した再現性は、施設内・施設間ともに一致率 100%であった。この結果を受けて、最終プロトコールでは最高濃度設定における注意点として、多少の析出が認められても出来るだけ高い濃度を設定することが望ましいとの記載が追加された。アンタゴニスト検出試験の陽性判定基準である $\text{Log}_{10}[\text{linerIC30 (M)}]$ 、 $\text{Log}_{10}[\text{linerIC50 (M)}]$ の CV 値 (Table 8) は最大で、それぞれ施設内で 2.5、2.2%、CERI の追加測定結果を含めた 4 施設全体の CV 値は最大で、3.1、2.6%と定量的再現性においても良好な結果が示された。

6. 試験法の正確性・信頼性

AR STTA 法による評価結果の信頼性の検証のため、プレバリデーション試験として大塚製薬で実施された 40 物質の測定結果を用いて ICCVAM リスト (ICCVAM, 2003) との比較、AR 結合試験 (NITE CHRIP) の結果 (比較には、31 物質が用いられた) との比較が行われた。

ICCVAM リスト (ICCVAM, 2003) に記載された文献情報をもとにした被験物質の *in vitro* AR TA アッセイにおけるアゴニスト及びアンタゴニストとしての作用との比較においては、アゴニスト検出試験の結果では、PC10 を陽性判定基準とした場合、40 物質のうち陽性・陰性が

明確に報告されている 34 物質についての一貫率は 91%、おそらく陰性であるとされている物質を含む 40 物質での一貫率は 85%であった (Table 1 および 9 参照)。一方、アンタゴニスト検出試験では、IC30 を陽性判定基準とした場合、40 物質のうち ICCVAM 報告で陽性・陰性が明確に報告されている 23 物質についての一貫率は 87%、ICCVAM 報告でおそらく陰性であるとされている物質を含む 40 物質での一貫率は 75%であった (Table 1 および 10 参照)。

なお、AR 結合試験の結果 (NITE CHRIP) との比較では、結合試験データが入手可能であった 31 物質 (結合試験結果は、陽性 24 物質、陰性 7 物質であった) について AR STTA 法でアゴニスト・アンタゴニストいずれかが陽性の物質 (27 物質) およびいずれも陰性の物質 (4 物質) との比較が行われ、一貫率は 77.4%、感度は 91.7%と高い値が示されたが、評価に用いられた陰性物質が少なかったため特異度については 28.6%であった (Table 11,12 参照)。

7. データの質

バリデーション試験における多施設間評価は、リードラボである CERi の信頼性保証システムのもと、GLP (OECD Principle of Good Laboratory Practice, November 26, 1997) に準拠して実施された。

8. 試験法の有用性、限界および提言

- 1) AR STTA 法は原理の項でも述べた様に単に化学物質と AR との結合に止まらずアゴニスト・アンタゴニスト活性を検出できる点が優れている。ICCVAM リスト (ICCVAM, 2003) との一貫度、AR STTA 法の感受性、特異性は良好であり、偽陽性や偽陰性は少ないという結果が示されている。
- 2) 化学物質のアンドロゲン活性をルシフェリン発光により定量化する試験系であり、同時に安定発現させたウミシイタケ・ルシフェラーゼによる発光を細胞毒性の指標とすることにより、同一細胞で細胞毒性評価が可能であるため試験に係る時間が短く、多数の化学物質のスクリーニングに向いている。
- 3) レポーターとして用いているルシフェラーゼ活性に影響を与える化学物質では、AR 非特異的な亢進や阻害等により疑陽性 (もしくは偽陰性) 反応を惹起する可能性があるが、そうした影響は、細胞毒性指標として安定発現させたウミシイタケ・ルシフェラーゼにより評価が可能である。
- 4) AR を介した化学物質のアンドロゲン活性の一次スクリーニングに有用な試験系である。
- 5) 溶媒として水や Ethanol (>95%)あるいは DMSO が用いられているが、DMSO に溶けにく

い物質については、他の有用な溶媒を検討し、それが AR-EcoScreen™ 細胞に影響しないことを確認して使用する必要がある。

- 6) 現時点では揮発性物質の取り扱いについて明確な指針は無く、今後の検討が期待される。
- 7) 体内で代謝されてアンドロゲンのアゴニストまたはアンタゴニスト活性を示す物質について、AR STTA 法を用いてどのように評価するかの検討が必要である。
- 8) AR STTA 法は、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 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) 一般に遺伝子を導入した細胞は、安定的に導入した場合であっても、継代ごとに遺伝子発現に多少の変化が起る可能性がある。AR-EcoScreen™ 細胞についても、継代早期の反応性の明らかな細胞を多量に分割凍結保存して、逐次利用するような措置が望ましい。また、使用する試験系の参照（標準）物質に対する反応を試験ごとに確認することが必要である。
- 10) 基礎的な試験操作の正確性を保証することが必要で、試験施設がこの細胞系の使用に習熟することが、当然ながら求められる。試験準備の際に、培養液中の細胞の濃度を確認し、ウェルごとの細胞数が均等であることを保証するような記録、たとえば顕微鏡写真での確認を励行するような配慮が望ましい。

9. その他の試験方法の科学的な報告

内分泌かく乱作用につながると考えられる AR に関わる試験法としては、問題とする物質の受容体への結合実験がまず想起される。結合実験では化学物質との相互作用が容易となるよう、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非細胞系 (cell-free) が有利であり、実際、この系での結合実験は以前より行われている。一方、受容体と相互作用を示す物質にはアゴニストとアンタゴニストがあり、単純な結合実験では両者の区別が困難である。さらに、非細胞系での結果は細胞系と一致しないという報告も多く、細胞内に特有の結合を制御する因子の存在が示唆されている。よって、結合を含めた受容体との相互作用については細胞系を利用して調べるのが望ましい。

AR STTA 法、AR の転写活性を指標とすることにより、アゴニスト・アンタゴニスト作用の有無を判定できる。同様のレポーターアッセイは、前述の MDA-kb2 細胞を始め種々の細胞で検討されているが、現時点でバリデーションが終了している試験系は無い。

10. 結論

AR STTA 法は、*in vitro* で化学物質の AR に対するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を検出するスクリーニング試験法であり、その検査性能については各 4 施設の参加による 2 回のバリデーション試験結果をもとに再現性・信頼性が確認されている。本試験法は、化学物質の AR に対する結合性を見る試験法とは異なり、その結合の結果による RNA 転写活性化を検出することによりアゴニストとアンタゴニストの活性を分けて検査することが出来る。その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、2 回のバリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験各 10 物質について評価が行われ、施設内・施設間再現性ともほぼ 100%の結果を得ている。また、本試験法は定量的評価法として開発され、バリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験のいずれにおいても定量的評価値の再現性も良好であることが示されている。OECD のピアレビューでは、それらバリデーション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 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 OECD TG458 が成立した。

本試験法に関連した今後の課題として、化学物質のアンドロゲン（抗アンドロゲン）活性に起因する内分泌かく乱作用において、本試験法における陽性反応が実際の生体影響をどの程度反映するものであるか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、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。

参考文献

- (1) Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation (AR-STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, 2010.
- (2) Addendum: 2nd Validation Study Report For Androgen Receptor (AR)-Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation (AR-STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities of Chemicals: AR EcoScreen™, Study management team of the 2nd validation study of AR STTA, 2015.
- (3) OECD TG458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, Adopted: 29 July 2016, OECD.
- (4) Wilson et al., A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists, *Toxicol. Sci.*, 66, 69–81, 2002
- (5) Satoh et al., Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen)., *J. Health Sci.*, 51(5), 557–568, 2005
- (6) ICCVAM, 2003, ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (7) NITE CHRIP, NITE Chemical Risk Information Platform, (NITE 化学物質総合情報提供システム) , https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop

Table 1 AR STTA プレバリデーション試験で測定が行われた 40 物質の測定結果と ICCVAM 報告との比較

No.	Chemical name	ICCVAM		AR-EcoScreen	
		Agonist	Antagonist	PC10 ^a	lin.IC30 ^b
1	Diethylstilbestrol	N	P	N	P
2	Methyltrienolone (R1881)	P	N	P	N
3	Cyproterone acetate	P	P	P	P
4	Fluoxymestron	P	N	P	N
5	Dexamethasone	P	N'	P	N
6	17 β -Estradiol	P	P	P	P
7	Flutamide	N	P	N	P
8	Medroxyprogesterone acetate	P	N	P	N
9	Testosterone	P	N	P	N
10	4-Androstenedione	P	N'	P	N
11	Di- <i>n</i> -butyl phthalate	N	N'	N	N
12	Diethylhexyl phthalate	N	N'	N	N
13	5 α -Dihydrotestosterone	P	N'	P	N
14	Estrone	P	N'	P	P
15	Linuron	P	P	P	P
16	<i>p,p'</i> -Methoxychlor	N	P	N	N
17	Spirolactone	P	P	P	P
18	Sodium azide	N'	N'	N	N
19	4- <i>tert</i> -Octylphenol	N	P	N	P
20	Procymidone	N	P	N	P
21	<i>p-n</i> -Nonylphenol	N	N'	N	P
22	Bisphenol A	N	P	N	P
23	Progesterone	P	P	P	P
24	<i>p,p'</i> -DDE	P	P	N	P
25	Finasteride	N'	N'	N	P
26	Hydroxyflutamide	P	P	N	P
27	4-Hydroxytamoxifen	N	N'	N	P
28	Actinomycin D	N'	N'	P	N
29	Vinclozolin	N	P	N	P
30	Atrazine	N	N	N	N
31	Mifepristone	P	P	P	P
32	Fluoranthene	P	P	P	P
33	Kepone	N	P	N	N
34	<i>o,p'</i> -DDT	N	P	N	N
35	Corticosterone	N	N'	P	N
36	17 α - Ethinyl estradiol	N	N'	N	P
37	Ketoconazole	N'	N'	N	P
38	Methyl testosterone	P	N'	P	N
39	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate	N'	N'	N	N
40	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	N'	N'	N	P

P: positives, *N*: negatives, *N'*: anticipated negatives

a: Agonist activity based on PC10 (10% activity of the positive control response),

b: Antagonist activity based on lin.IC30 (30% inhibition of the spiked-in (500 pM of DHT) response)

※ 参考文献(1)の Table 8

Table 2-1 OECD TG458 に示された AR STTA アゴニスト試験習熟物質リスト

Substance Name	CAS RN	Class ¹	log PC ₁₀ ^{1*} (M)	log PC ₅₀ ^{1*} (M)	Chemical Class ²	Product Class ³
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	P	-12.08 ~ -9.87	-11.03 ~ -9.00	Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
Mestanolone	521-11-9	P	-10.92 ~ -10.41	-10.15 ~ -9.26	Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
Testosterone	58-22-0	P	-10.42 ~ -9.73	-9.46 ~ -8.96	Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
17 β -Estradiol	50-28-2	P	-7.74 ~ -6.75	-5.34 ~ -4.88	Steroid, phenolic	Pharmaceutical
Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9	P	-9.64 ~ -8.89	-8.77 ~ -8.37	Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
17 α -Ethinyl estradiol	57-63-6	N	-	-	Steroid, phenolic	Pharmaceutical
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	N	-	-	Phthalate	Plasticizer
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	N	-	-	Phthalate	Chemical intermediate; Plasticizer
Hydroxyflutamide	52806-53-8	N	-	-	Anilide	Pharmaceutical metabolite
Bisphenol A	80-05-7	N	-	-	Bisphenol	Chemical intermediate

Abbreviations: CAS RN: Chemical Abstracts Service Registry Number, M: molar, P: Positive, N: Negative

¹ Validation report of Androgen Receptor (AR)-Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities (2)

² 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>).

³ 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>).

* logPC_{10/50}: The log₁₀(concentration of chemical) induce 10% or 50%, respectively, of activity of the positive control response.

※ 参考文献(3)の Table 2-1

Table 2-2 OECD TG458 に示された AR STTA アンタゴニスト試験習熟物質リスト

Substance Name	CAS RN	Class ¹	log IC ₃₀ ^{1*} (M)	log IC ₅₀ ^{1*} (M)	Chemical Class ²	Product Class ³
Hydroxyflutamide	52806-53-8	P	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	Anilide	Pharmaceutical metabolite
Bisphenol A	80-05-7	P	-7.52 ~ -4.48	-7.05 ~ -4.29	Bisphenol	Chemical intermediate
Flutamide	13311-84-7	P	-6.20 ~ -5.69	-5.66 ~ -5.43	Anilide	Pharmaceutical
Prochloraz	67747-09-5	P	-5.77 ~ -5.47	-5.44 ~ -5.12	Imidazole	Pesticide
Vinclozolin	50471-44-8	P	-6.83 ~ -6.32	-6.47 ~ -5.85	Organochlorine	Pesticide
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	N	-		Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
Mestanolone	521-11-9	N	-		Steroid, nonphenolic	Pharmaceutical
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	N	-		Phthalate	Chemical intermediate; Plasticizer
Atrazine	1912-24-9	N	-		Triazine; Aromatic amine	Pesticide
6-Propyl-2-thiouracil	51-52-5	N	-		Pyrimidines	Pharmaceutical

Abbreviations; CAS RN: Chemical Abstracts Service Registry Number, M: molar, P: Positive, N: Negative

¹ Validation report of Androgen Receptor (AR)-Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities (2)

² 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>).

³ 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>).

* logIC_{30/50}: The log₁₀ concentration of chemical cause 30% or 50% inhibition, respectively, of the spiked-in (500 pM of DHT) response.

※ 参考文献(3)の Table 2-2

Table 3 第1回バリデーション試験におけるAR STTA アゴニストアッセイ Log₁₀[PC10 (M)*]の再現性

Test Substance	Test vial No.	Laboratory	Trial	Log ₁₀ [PC10 (M)]																			
				Data	intra-Lab				inter-Lab														
					Mean	SE	SD	CV	Mean	SE	SD	CV											
Hydroxyflutamide	1	CERI	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	2	sumitomo	1	-5.06																			
			2	-	-5.06	-	-	-															
			3	-																			
	3	otsuka	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	4	kaneka	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
Methyltrienolone (R1881)	5	CERI	1	-10.82																			
			2	-10.81	-10.79	0.02	0.03	-0.3															
			3	-10.76																			
	6	sumitomo	1	<-11.00																			
			2	<-11.00	<-11.00	-	-	-															
			3	<-11.00																			
	7	otsuka	1	-10.82																			
			2	-10.81	-10.81	0.00	0.01	-0.1															
			3	-10.81																			
	8	kaneka	1	-10.69																			
			2	-10.63	-10.67	0.02	0.03	-0.3															
			3	-10.68																			
Diethylhexyl phthalate	9	CERI	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	10	sumitomo	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	11	otsuka	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	12	kaneka	1	-5.33																			
			2	-	-5.33	-	-	-															
			3	-																			
Bisphenol A	13	CERI	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	14	sumitomo	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	15	otsuka	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
	16	kaneka	1	-																			
			2	-																			
			3	-																			
5α-Dihydrotestosterone	DHT	CERI	1	-10.91																			
			2	-10.81	-10.77	0.06	0.11	-1.0															
			3	-10.70																			
			4	-10.66																			
	DHT	sumitomo	1	-9.92																			
			2	-11.37	-10.93	0.51	0.88	-8.0															
			3	-11.50																			
			4	-11.73																			
	DHT	otsuka	1	-11.73																			
			2	-11.72	-11.75	0.03	0.05	-0.4															
			3	-11.72																			
			4	-11.82																			
DHT	kaneka	1	-10.67																				
		2	-10.71	-10.69	0.06	0.11	-1.1																
		3	-10.70																				
		4	-10.70																				
MAX						0.51	0.88	-0.1		0.24	0.48	-0.7											
MIN						0.00	0.01	-8.0		0.04	0.08	-4.4											
Ave.						0.10	0.18	-1.6		0.14	0.28	-2.6											

* PC10 (M):The concentration(M) of chemical induce 10% of activity of the positive control(10 nM of DHT) response.

※ 参考文献(1)の Table 18

Table 4 第1回バリデーション試験におけるAR STTA アゴニストアッセイ Log₁₀[PC50 (M)*]の再現性

Test Substance	Test vial No.	Laboratory	Trial	Log ₁₀ [PC50 (M)]																		
				Data	intra-Lab				inter-Lab													
					Mean	SE	SD	CV	Mean	SE	SD	CV										
Hydroxyflutamide	1	CERI	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	2	sumitomo	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	3	otsuka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	4	kaneka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
Methyltrienolone (R1881)	5	CERI	1	-9.87																		
			2	-9.92	-9.83	0.06	0.11	-1.1														
			3	-9.71																		
	6	sumitomo	1	<-11.00																		
			2	-10.41	-10.39	0.02	0.02	-0.2														
			3	-10.38					-9.93	0.18	0.36	-3.7										
	7	otsuka	1	-9.98																		
			2	-9.99	-9.98	0.01	0.02	-0.2														
			3	-9.95																		
	8	kaneka	1	-9.53																		
			2	-9.47	-9.52	0.02	0.04	-0.4														
			3	-9.55																		
Diethylhexyl phthalate	9	CERI	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	10	sumitomo	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	11	otsuka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	12	kaneka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
Bisphenol A	13	CERI	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	14	sumitomo	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	15	otsuka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
	16	kaneka	1	-																		
			2	-																		
			3	-																		
5α-Dihydrotestosterone	DHT	CERI	1	-9.97																		
			2	-10.11	-9.85	0.11	0.23	-2.3														
			3	-9.68																		
			4	-9.65																		
	DHT	sumitomo	1	-9.27																		
			2	-10.47	-10.09	0.41	0.72	-7.1														
			3	-10.54					-10.07	0.23	0.45	-4.5										
			4	-10.47																		
	DHT	otsuka	1	-10.48																		
			2	-10.48	-10.69	0.14	0.27	-2.6														
			3	-10.77																		
			4	-11.05																		
DHT	kaneka	1	-9.62																			
		2	-9.67	-9.65	0.06	0.11	-1.2															
		3	-9.65																			
		3	-9.65																			
MAX						0.41	0.72	-0.2				0.23	0.45	-3.7								
MIN						0.01	0.02	-7.1				0.18	0.36	-4.5								
Ave.						0.11	0.19	-1.9				0.20	0.41	-4.1								

* PC50 (M): The concentration(M) of chemical induce 50% of activity of the positive control(10 nM of DHT) response.

※ 参考文献(1)の Table 17

Table 5 第 1 回バリデーション試験における AR STTA アンタゴニストアッセイ
Log₁₀[linearIC30(M)*]の再現性

Test Substance	Test vial No.	Laboratory	Trial	Log ₁₀ [lin.IC30 (M)]																		
				Data	intra-Lab				inter-Lab													
					Mean	SE	SD	CV	Mean	SE	SD	CV										
Hydroxyflutamide	1	CERI	1	-7.71																		
			2	-7.54	-7.57	0.07	0.13	-1.7														
			3	-7.46																		
	2	sumitomo	1	-7.55																		
			2	-6.78	-7.07	0.24	0.42	-5.9														
			3	-6.89																		
	3	otsuka	1	-7.64																		
			2	-7.51	-7.53	0.05	0.09	-1.2														
			3	-7.46																		
	4	kaneka	1	-8.43																		
			2	-8.52	-8.38	0.09	0.16	-1.9														
			3	-8.20																		
Methyltrienolone (R1881)	5	CERI	1	n.e.																		
			2	n.e.	-	-	-	-														
			3	n.e.																		
	6	sumitomo	1	n.e.																		
			2	n.e.	-	-	-	-														
			3	n.e.																		
	7	otsuka	1	n.e.																		
			2	n.e.	-5.46	-	-	-														
			3	-5.46																		
	8	kaneka	1	n.e.																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
Diethylhexyl phthalate	9	CERI	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	10	sumitomo	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	11	otsuka	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	12	kaneka	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
Bisphenol A	13	CERI	1	n.e.																		
			2	-5.81	-5.74	0.06	0.09	-1.6														
			3	-5.68																		
	14	sumitomo	1	-5.61																		
			2	-5.63	-5.63	0.01	0.02	-0.4														
			3	-5.66																		
	15	otsuka	1	-5.72																		
			2	-5.80	-5.77	0.02	0.04	-0.7														
			3	-5.79																		
	16	kaneka	1	-6.80																		
			2	-6.72	-6.78	0.03	0.06	-0.9														
			3	-6.84																		
5α-Dihydrotestosterone	DHT	CERI	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	DHT	sumitomo	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	DHT	otsuka	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
	DHT	kaneka	1	-																		
			2	-	-	-	-	-														
			3	-																		
MAX																						
MIN																						
Ave.																						

n.e. : not evaluated for cytotoxicity

* linearIC30(M): The concentration(M) of chemical cause 30% inhibition of the spiked-in (500 pM of DHT) response.

※ 参考文献(1)の Table 21

Table 6 第1回バリデーション試験における AR STTA アンタゴニストアッセイ
Log₁₀[linearIC50(M)*]の再現性

Test Substance	Test vial No.	Laboratory	Trial	Log ₁₀ [lin.IC50 (M)]																	
				Data	intra-Lab				inter-Lab												
					Mean	SE	SD	CV	Mean	SE	SD	CV									
Hydroxyflutamide	1	CERI	1	-7.27																	
			2	-7.12	-7.13	0.08	0.14	-1.9													
			3	-7.00																	
	2	sumitomo	1	-6.96																	
			2	-6.51	-6.69	0.14	0.24	-3.6													
			3	-6.59																	
	3	otsuka	1	-7.26																	
			2	-7.16	-7.15	0.07	0.12	-1.7													
			3	-7.01																	
	4	kaneka	1	-7.87																	
			2	-7.82	-7.81	0.04	0.07	-0.9													
			3	-7.73																	
Methyltrienolone (R1881)	5	CERI	1	n.e.																	
			2	n.e.	-	-	-	-													
			3	n.e.																	
	6	sumitomo	1	n.e.																	
			2	n.e.	-	-	-	-													
			3	n.e.																	
	7	otsuka	1	n.e.																	
			2	n.e.	-5.22	-	-	-													
			3	-5.22																	
	8	kaneka	1	n.e.																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
Diethylhexyl phthalate	9	CERI	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	10	sumitomo	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	11	otsuka	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	12	kaneka	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
Bisphenol A	13	CERI	1	n.e.																	
			2	-5.54	-5.44	0.11	0.15	-2.8													
			3	-5.33																	
	14	sumitomo	1	-5.38																	
			2	-5.25	-5.31	0.04	0.06	-1.2													
			3	-5.30																	
	15	otsuka	1	-5.45																	
			2	-5.51	-5.48	0.02	0.03	-0.6													
			3	-5.48																	
	16	kaneka	1	-6.38																	
			2	-6.34	-6.37	0.02	0.03	-0.5													
			3	-6.40																	
5α-Dihydrotestosterone	DHT	CERI	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	DHT	sumitomo	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	DHT	otsuka	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
	DHT	kaneka	1	-																	
			2	-	-	-	-	-													
			3	-																	
MAX						0.14	0.24	-0.5				0.24	0.49	-6.4							
MIN						0.02	0.03	-3.6				0.23	0.46	-8.6							
Ave.						0.06	0.11	-1.7				0.24	0.47	-7.5							

n.e. : not evaluated for cytotoxicity

* linearIC50(M):The concentration(M) of chemical cause 50% inhibition of the spiked-in (500 pM of DHT) response.

※ 参考文献(1)の Table 20

Table 7 第2回バリデーション試験における AR STTA アゴニストアッセイの再現性

	Lab	Run No.	Log PC10 (M)	Mean SD %CV	Log PC50 (M)	Mean SD %CV	Decision	
17 α -Ethinyl estradiol CAS:57-63-6	CERI	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
	sumitomo	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
	hokkaido	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
	NIFDS	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
		For 4 labs	Mean SD CV%	ND		ND		Negative
	17 β -Estradiol CAS:50-28-2	CERI	1	-7.63	-7.63	ND		Positive
			2	-7.67	0.03	ND		
3			-7.60	0.43%	ND			
sumitomo		1	-7.24	-7.23	ND		Positive	
		2	-7.19	0.04	ND			
		3	-7.27	0.58%	ND			
hokkaido		1	-7.74	-7.72	-5.33	-5.27	Positive	
		2	-7.73	0.02	-5.34	0.12		
		3	-7.70	0.30%	-5.13	2.29%		
NIFDS		1	-7.05	-6.96	-4.93	-4.99	Positive	
		2	-7.08	0.19	-4.88	0.15		
		3	-6.75	2.67%	-5.15	2.94%		
		For 4 labs	Mean SD CV%	-7.39 0.33 4.50%		-5.13 0.19 3.80%		Positive
Butylbenzyl phthalate CAS:85-68-7		CERI	1	ND		ND		Negative
			2	ND		ND		
	3		ND		ND			
	sumitomo	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
	hokkaido	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
	NIFDS	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
		For 4 labs	Mean SD CV%	ND		ND		Negative

ND: Not determined

Table 7 (continued)

	Lab	ID	Log IC30 (M)	Mean SD CV%	Log IC50 (M)	Mean SD CV%	Decision
Medroxyprogesterone 17-acetate CAS:71-58-9	CERI	1	-8.94	-8.93	-8.45	-8.46	Positive
		2	-8.93	0.02	-8.50	0.03	
		3	-8.90	0.23%	-8.44	0.38%	
	sumitomo	1	-8.92	-8.91	-8.44	-8.42	Positive
		2	-8.91	0.02	-8.45	0.04	
		3	-8.89	0.18%	-8.37	0.51%	
	hokkaido	1	-9.64	-9.38	-8.77	-8.71	Positive
		2	-8.98	0.35	-8.62	0.08	
		3	-9.52	3.76%	-8.72	0.89%	
	NIFDS	1	-8.95	-9.11	-8.51	-8.57	Positive
		2	-9.00	0.24	-8.58	0.06	
		3	-9.39	2.63%	-8.63	0.69%	
	For 4 labs	Mean	-9.08		-8.54		Positive
		SD	0.27		0.13		
		CV%	2.96%		1.47%		
Testosterone CAS:58-22-0	CERI	1	-9.83	-9.89	-9.28	-9.30	Positive
		2	-9.98	0.08	-9.35	0.04	
		3	-9.85	0.82%	-9.28	0.41%	
	sumitomo	1	-9.85	-9.84	-9.24	-9.23	Positive
		2	-9.84	0.00	-9.20	0.02	
		3	-9.84	0.03%	-9.24	0.24%	
	hokkaido	1	-10.42	-10.32	-9.46	-9.41	Positive
		2	-10.17	0.13	-9.37	0.05	
		3	-10.36	1.24%	-9.39	0.54%	
	NIFDS	1	-9.77	-9.75	-9.13	-9.07	Positive
		2	-9.75	0.02	-9.10	0.09	
		3	-9.73	0.24%	-8.96	0.99%	
	For 4 labs	Mean	-9.95		-9.25		Positive
		SD	0.24		0.14		
		CV%	2.37%		1.50%		

※ 参考文献(2)の Table 17

Table 8 第2回バリデーション試験における AR STTA アンタゴニストアッセイの再現性

	Lab	ID	Log IC30 (M)	Mean SD CV%	Log IC50 (M)	Mean SD CV%	Decision
6-Propyl-2-thiouracil CAS:51-52-5	CERI	1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
		Add	ND		ND		
	sumitomo	1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
	hokkaido	1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
	NIFDS	1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
	For 4 labs	Mean SD CV%	ND		ND		Negative
	Atrazine CAS:1912-24-9	CERI	1	ND		ND	
2			ND		ND		
3			ND		ND		
Add			ND		ND		
sumitomo		1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
hokkaido		1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
NIFDS		1	ND		ND		Negative
		2	ND		ND		
		3	ND		ND		
For 4 labs		Mean SD CV%	ND		ND		Negative
Flutamide CAS:13311-84-7		CERI	1	-5.96	-6.14	ND	
	2		-6.13	0.15	ND		
	3		-6.15	2.45%	ND		
	Add		-6.33		-5.82		
	sumitomo	1	-5.96	-5.97	-5.57	-5.60	Positive
		2	-5.88	0.09	-5.57	0.05	
		3	-6.07	1.57%	-5.66	0.87%	
	hokkaido	1	-5.71	-5.74	-5.43	-5.47	Positive
		2	-5.81	0.06	-5.53	0.05	
		3	-5.69	1.10%	-5.44	0.96%	
	NIFDS	1	-6.20	-6.04	-5.66	-5.61	Positive
		2	-5.96	0.14	-5.58	0.05	
		3	-5.95	2.31%	-5.58	0.82%	
	For 4 labs	Mean SD CV%	-5.96 0.16 2.74%	(-5.98)* (0.19)* (3.14%)*	-5.56 0.08 1.44%	(-5.58) (0.11) (1.99%)	Positive

ND: Not determined

*Values in parenthesis are overall Mean, SD and CV% containing additional trial by CERI.

Table 8 (continued)

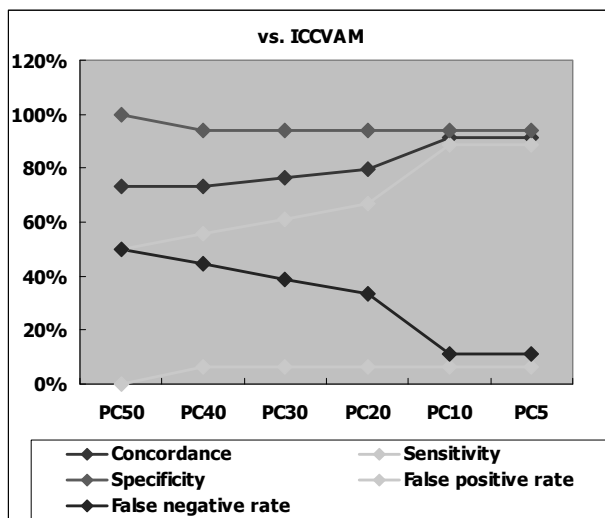
	Lab	ID	Log IC30 (M)	Mean SD CV%	Log IC50 (M)	Mean SD CV%	Decision	
Prochloraz CAS:67747-09-5	CERI	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
			Add	-5.77	-5.77	-5.44	-5.44	Positive
	sumitomo	1		-5.58	-5.60	-5.22	-5.25	Positive
		2		-5.65	0.05	-5.33	0.06	
		3		-5.56	0.89%	-5.21	1.23%	
	hokkaido	1		-5.54	-5.53	-5.27	-5.26	Positive
		2		-5.59	0.06	-5.30	0.05	
		3		-5.47	1.14%	-5.20	1.04%	
	NIFDS	1		-5.53	-5.53	-5.15	-5.14	Positive
		2		-5.52	0.01	-5.12	0.02	
		3		-5.54	0.16%	-5.16	0.36%	
		For 4 labs	Mean	-5.55	(-5.57)*	-5.22	(-5.24)	Positive
		SD	0.05	(0.08)*	0.07	(0.10)		
		CV%	0.92%	(1.48%)*	1.36%	(1.87%)		
Vinclozolin CAS:50471-44-8	CERI	1	-6.44	-6.46	-6.07	-6.10	Positive	
		2	-6.45	0.03	-6.04	0.05		
		3	-6.46	0.48%	-6.14	0.82%		
			Add	-6.51		-6.14		Positive
	sumitomo	1		-6.42	-6.38	-5.96	-5.92	Positive
		2		-6.39	0.04	-5.95	0.06	
		3		-6.34	0.62%	-5.85	0.96%	
	hokkaido	1		-6.46	-6.40	-6.10	-6.07	Positive
		2		-6.42	0.07	-6.12	0.07	
		3		-6.32	1.09%	-6.00	1.09%	
	NIFDS	1		-6.83	-6.70	-6.47	-6.31	Positive
		2		-6.65	0.11	-6.25	0.14	
		3		-6.62	1.67%	-6.21	2.17%	
		For 4 labs	Mean	-6.48	(-6.49)	-6.10	(-6.10)	Positive
		SD	0.17	(0.14)	0.19	(0.16)		
		CV%	2.63%	(2.18%)	3.08%	(2.55%)		

ND: Not determined

*Values in parenthesis are overall Mean, SD and CV% containing additional trial by CERI.

※ 参考文献(2)の Table 18

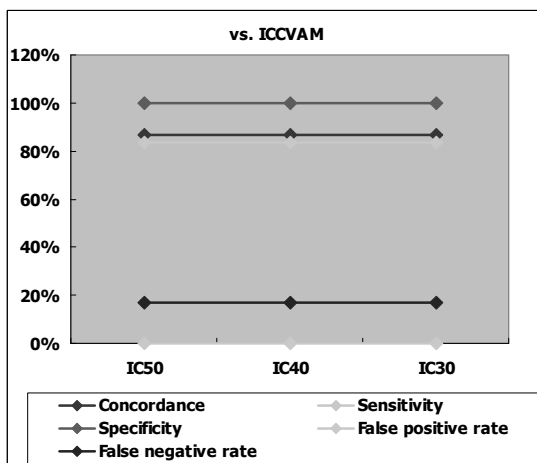
Table 9 AR STTA プレバリデーション測定結果（アゴニスト測定）と ICCVAM Report (2003) で示された参照物質の比較



	PC50	PC40	PC30	PC20	PC10	PC5
Concordance	73.5%	73.5%	76.5%	79.4%	91.2%	91.2%
Sensitivity	50.0%	55.6%	61.1%	66.7%	88.9%	88.9%
Specificity	100.0%	93.8%	93.8%	93.8%	93.8%	93.8%
False positive rate	0.0%	6.3%	6.3%	6.3%	6.3%	6.3%
False negative rate	50.0%	44.4%	38.9%	33.3%	11.1%	11.1%

※ 参考文献(1)の Table9

Table 10 AR STTA プレバリデーション測定結果（アンタゴニスト測定）と ICCVAM Report (2003) で示された参照物質の比較



	Lin. IC50	Lin. IC40	Lin. IC30
Concordance	87.0%	87.0%	87.0%
Sensitivity	83.3%	83.3%	83.3%
Specificity	100.0%	100.0%	100.0%
False positive rate	0.0%	0.0%	0.0%
False negative rate	16.7%	16.7%	16.7%

※ 参考文献(1)の Table 11

Table 11 AR 結合試験結果と AR STTA の比較

		AR STTA				Sum
		P/P ¹	P/N ¹	N/P ¹	N/N ¹	
AR Binding Assay	P ²	8 Cyproterone acetate, Dexamethasone, 17β-Estradiol, Estrone, Linuron (= Lorox), Spironolactone, Progesterone, RU-486	7 Fluoxymesterone, Hydroxymethylprogesterone acetate, Testosterone, Androstenedione, 5α-Dihydrotestosterone, Corticosterone, 17α-Methyltestosterone	7 Diethylstilbestrol, Flutamide, Methoxychlor, 4-tert-Octylphenol, Bisphenol A, p,p'-DDE, Ethynyl estradiol	2 4-Hydroxytamoxifen, Kepone	24
	N ²	0	0	5 Dibutyl phthalate, Procymidon, p-n-Nonylphenol, Vinclozolin, 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2 DEHP, Atrazine	7
		8	7	12	4	31

Concordance:	$[(8+7+7) + 2] / 31 = 77.4\%$
Sensitivity:	$(8+7+7) / 24 = 91.7\%$
Specificity:	$2 / 7 = 28.6\%$

¹ : P(Positive) or N(Negative) of Agonist assay/Antagonist assay of AR STTA.

² : P(Positive) or N(Negative) of AR binding assay

※ 参考文献(1)の Table 13

Table 12 AR 結合試験と AR STTA 法の化学物質ごとの結果比較

Chemical Name	CAS No	AR_RBA% ¹	AR_RBA P/N ²	AR STTA		ICCVAM		Max conc. (mM)
				Ago	Atg	Ago	Atg	
Diethylstilbestrol	56-53-1	0.0136	P	N	P	N	P	0.1
Cyproterone acetate	427-51-0	12.1	P	P	P	P	P	0.1
Fluoxymesterone	76-43-7	6.04	P	P	N	P	N	0.1
Dexamethasone	50-02-2	0.0393	P	P	P	P	N'	1
17β-Estradiol	50-28-2	6.6	P	P	P	P	P	1
Flutamide	13311-84-7	0.0812	P	N	P	N	P	1
Hydroxymethylprogesterone acetate	71-58-9	51	P	P	N	P	N	0.01
Testosterone	58-22-0	68.5	P	P	N	P	N	1
4-Androstenedione	63-05-8	0.644	P	P	N	P	N'	0.1
Dibutyl phthalate	84-74-2	N.D.	N	N	P	N	N'	1
Di-sec-octyl phthalate	117-81-7	N.B.	N	N	N	N	N'	1
5α-Dihydrotestosterone	521-18-6	105	P	P	N	P	N'	0.1
Estrone	53-16-7	0.113	P	P	P	P	N'	0.1
Linuron	330-55-2	0.0259	P	P	P	P	P	1
<i>p,p'</i> -Methoxychlor	72-43-5	0.0159	P	N	P	N	P	1
Spirolactone	52-01-7	3.08	P	P	P	P	P	1
4- <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9	0.0125	P	N	P	N	P	1
Procymidon	32809-16-8	N.B.	N	N	P	N	P	0.1
<i>p-n</i> -Nonylphenol	104-40-5	N.B.	N	N	P	N	N'	1
Bisphenol A	80-05-7	0.0301	P	N	P	N	P	1
Progesterone	57-83-0	3.59	P	P	P	P	P	0.1
<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	0.0497	P	N	P	P	P	0.1
4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	0.0543	P	N	N	N	N'	0.1
Vinclozolin	50471-44-8	N.D.	N	N	P	N	P	1
Atrazine	1912-24-9	N.B.	N	N	N	N	N	1
RU-486	84371-65-3	9.08	P	P	P	P	P	1
Kepone	143-50-0	0.0186	P	N	N	N	P	0.1
Corticosterone	50-22-6	0.299	P	P	N	N	N'	1
17α-Ethynyl estradiol	57-63-6	0.482	P	N	P	N	N'	1b
17α-Methyltestosterone	58-18-4	78.8	P	P	N	P	N'	0.1
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	93-76-5	N.B.	N	N	P	N'	N'	1

¹: AR_RBA% : AR Relative Binding Activity

N.D. Hot ligand was replaced only 20-50% and IC50 was not calculated.

N.B.: Hot ligand was not replaced greater than 20%.

²: AR_RBA P/N : P(Positive) or N(Negative) judgement by AR binding assay based on AR_RBA%

※ 参考文献(1)の Table 14