

BG1LucER TA (LUMI-CELLER) 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書

平成 24 年 11 月 29 日

内分泌かく乱試験法評価委員会

委員名：

小野 宏（委員長：（一財）食品薬品安全センター秦野研究所）

丸野内棣（藤田保健衛生大学）

井口泰泉（基礎生物学研究所）

中澤憲一（国立医薬品食品衛生研究所）

用語集

Accuracy : 正確度

Concordance : 一致率

Estrogen receptor (ER) α/β : エストロゲン受容体 α/β

Estrogen responsive element (ERE) : 核内のエストロゲン反応部位

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) : 欧州代替法検証センター

False negative rate : 偽陰性率

False positive rate : 偽陽性率

Federal Register : (米国) 連邦官報

Independent International Scientific Peer Review Panel : 国際第三者専門技術評価委員会

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 : 施設間検証

Intra-laboratory validation study : 施設内検証

Japanese Center for Validation of Alternative Methods (JaCVAM) : 日本代替法評価センター

National Institute of Health (NIH) : 米国国立衛生研究所

National Toxicology Program Interagency Center for the Validation of Alternative Methods (NICEATM) : 毒性学国家事業代替試験法検証省庁間連絡センター

Reliability : 信頼性

Transcription activation (TA) : 転写活性化

US Environmental Protection Agency (US EPA) : 米国環境保護庁

Uterotrop(h)ic assay : 子宮肥大試験

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

Xenobiotic Detection Systems, Inc. (XDS) : XDS 社

Validation study : 検証試験

Validation study management team : 検証試験運営委員会

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

LUMI-Cell ER 試験法すなわち BG1LucER TA 法（詳しくは「BG1Luc4E2 細胞を用いるエストロゲン受容体（ER）転写活性化（TA）試験」）は、物質のエストロゲン活性を測定する *in vitro* 試験法の一つで、内分泌攪乱物質対策のために開発が求められてきたものである。本試験法は、米国 North Carolina 州 Durham にある Xenobiotic Detection Systems, Inc. (XDS) 社で開発されたもので、ヒト卵巣癌由来株細胞 BG1 にレポーター遺伝子として Luciferase responsive element を含む plasmid を核内のエストロゲン反応部位（ERE）の下流に安定的に導入した細胞を用い、この細胞に内在する ER の活性化によって起る遺伝子変化を発光で検出しそれを定量的に測定する試験法である。Interagency Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) はこの試験法の検証試験 (Validation study) に基づく評価を行い、その有用性を認め、US Environmental Protection Agency (US EPA) および Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) に試験法ガイドラインとして採択するよう提案した。

内分泌機能に影響する生物活性を有する物質は、ホルモン等の天然の生体物質のほか合成化学物質にも多数知られるようになったが、その活性の有無と程度について未調査の物質が多い。こうした物質のうち、大量の曝露によって生体の内分泌機能およびこれと関係した生殖発生等に影響を及ぼすもの（内分泌攪乱物質と呼ばれる）であることが懸念されるものがあり、現在、影響の有無を確認する試験法が開発が求められている。また、この確認の対象となる物質の数が膨大なものであるため、効率的なスクリーニングを行う試験法の開発と実用化が求められてきた。スクリーニングの指標として有望な性質には物質の内分泌活性があり、物質のホルモン受容体との結合性または内分泌機能の活性化を測定する方法が注目されている。エスト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「嚙歯類を用いる子宮肥大試験」が確立され、検証試験を行った上で国際的な試験法ガイドライン (OECD TG) 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* 試験法が開発が進められている。

物質の ER 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 ER に対する化学物質の競合結合反応の測定があり、たとえばラット子宮から抽出した ER を用いる「ラット子宮エストロゲン受容体結合性試験」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 ER 結合性を標準物質、たとえばエストラジオールと比較して定量的に決定できるものである。しかし、ER に対しては受容体刺激物質ばかりでなく拮抗物質も結合性があるので、両者の区別が出来ない。その区別のためには、物質と ER との結合が起こす生物学的効果を確認する必要があり、有意義な指標として生体に誘発されるエストロゲン効果を測定する *in vivo* 試験（たとえばラット子宮肥大試験）が利用されている。*In vitro* でも、ER が活性物質と結合したのちに細胞内で起こる応答が観察できれば、エストロゲン効果を確認できる。活性物質と結合した細胞内 ER は、核内の ERE との結合を通じて関連物質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保持する細胞において検査することは意義がある。

BG1LucER TA 法は、エストロゲン活性物質による ER 結合の次の過程として関連遺伝子の転写が誘導されることを観察する方法である。細胞には転写活性化を調べるために、当該遺伝子と連結した位置（下流）に発光誘発遺伝子を組み込んでおき、転写が起れば細胞が発光するような操作を加えてある。このような細胞としては、すでに HeLa 細胞にヒトエストロゲン受容体 α (hER α) と発光酵素 (Luciferase) 遺伝子を組み込んだ細胞が開発されており、この細胞を用いた試験法「hER α -HeLa-9903 細胞を用いる安定導入転写活性化試験 Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay (hER α -HeLa STTA)」が、US EPA の試験法として採択され (OPPTS 890.1300, 2009)、また OECD 試験法ガイドラインに記載されている (OECD TG 455, 2009)。

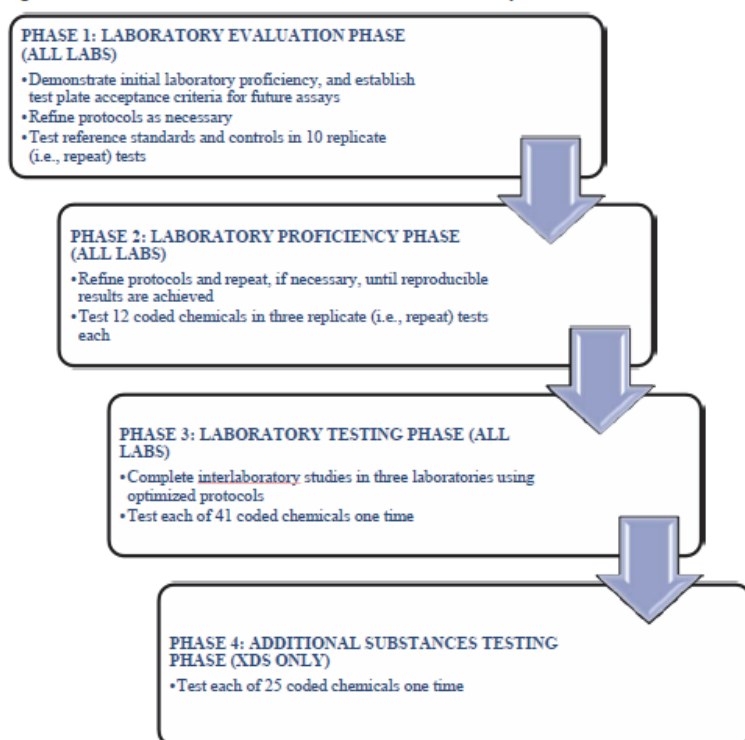
hER α -HeLa STTA 法と本 BG1LucER TA 法の相違は、(1) 前者が hER α を HeLa 細胞に組み込んだものであるのに対し、本法は BG1 細胞に内在する ER を利用する、(2) 前者では組み込まれた受容体は ER α であるが、本法の BG1 細胞は ER α と ER β の双方を具えている、(3) 前者は専ら ER 刺激物質 (アゴニスト) の試験を行うが、本法では、ER 拮抗物質 (アンタゴニスト) の活性を測定するプロトコルも用意されている、ことである。

2004 年 ICCVAM は、XDS 社から提案された BG1LucER TA 法を評価し、施設間検証試験に付してその有用性を広く確認するに値するものであると認めた。これを受けて National Toxicology Program Interagency Center for the Validation of Alternative Methods (NICEATM) が国際的施設間検証試験を企画、実行した。Japanese Center for Validation of Alternative Methods (JaCVAM) および European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) はこれに協力して検証試験運営委員会を組織した。試験施設として、米国の XDS 社、日本の株式会社日吉、および欧州の ECVAM がこの検証試験に参加し、BG1LucER TA 法によって物質の ER アゴニスト活性および ER アンタゴニスト活性の試験を実施し、そのデータに基づいて本試験法の試験性能の正確性と信頼性を評価するための検証を行った。

(Fig.1-1)

検証試験の第 1 段階では、ER アゴニスト、ER アンタゴニスト各 10 物質の試験を行い、参加試験施設の技量の評価を行った。第 2~4 段階では、プロトコルに評価と改良を加えつつ、*in vitro* ER アゴニスト、アンタゴニスト試験の検証に用いるべき参照物質として ICCVAM が選定していた 78 物質の試験を行った。

Figure 1-1 NICEATM/ECVAM/JaCVAM Validation Study Phases



検証試験の結果、3 試験機関のデータは高い一致率を示した。ICCVAM 参照物質の分類（陽性・陰性）と 3 試験機関のデータの一致率も高いものであった。従って、BG1LucER TA 法は、物質の *in vitro* ER アゴニスト活性を正確に検出する試験であり、既存の ER TA 法（hER α -HeLa STTA）と同等の性能を有し、また物質の *in vitro* ER アンタゴニスト活性を正確に検出できる試験法である、と結論された。試験法の信頼性については、試験法施設内再現性、施設間再現性ともに良好な結果であり、技術移転性、試験法の頑健性に問題はなく、通常の細胞培養実験の施設と発光分析機器が備えられていれば、技術的に特に困難な部分もないので、行政規制試験とする妥当性は認められる。BG1Luc 細胞は California 大学 Davis 校の Research Technology Transfer Services から、あるいは XDS 社から入手することが出来る。

この検証試験の終了後、NICEATM と ICCVAM は、2011 年 1 月、Independent International Scientific Peer Review Panel（以下 Panel）を組織して Peer Review を委嘱した。Panel は複数回の電話会議を行った後、2011 年 3 月 29～31 日 Maryland 州 Bethesda の National Institute of Health（NIH）で集合会議を開催し、5 月に報告書を提出した。これは、2011 年 5 月 18 日の Federal Register に発表された。

この試験法は、同年 OECD に提案され、TG455 に組み入れるべく加盟各国に意見聴取回覧中である。前述のように、すでに TG455 として hER α -HeLa STTA が収載されているが、原理的および機能的に同様な性能に基づいた試験法として、同じ TG455 に ANNEX 3 として加えることとされている。（ER α -HeLa cell 法は ANNEX 2 となる）。

本試験法の今後の問題点として、細胞に内在する 2 種類のエストロゲン受容体 ER α と ER β の測定

結果に対する寄与の比率を明らかにすることが課題として残っている。これは、内分泌攪乱性がエストロゲン活性に起因するという考えにおいて、ER α と ER β の関与の程度を推量するという重要な課題である。この分別測定法の開発ができれば、物質のエストロゲン活性の詳細な把握が可能になり、この分野の研究と化学物質管理に大いに貢献すると考えられる。

2. 試験法の妥当性

2-1 試験法の概略

1) 目的と原理

ここで取り上げる試験法は内分泌攪乱物質のうちエストロゲンに関連する化学物質を測定し、その人体、自然界に対する弊害を避けることを目的として開発された。本法、BG1LucER TA 法はその一つで生体の ER 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、測定するために ER を発現する培養細胞に ER 応答性のルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として導入・安定発現させ、被検化学物質を投与して細胞に反応させた後、ルシフェラーゼ活性の変化を（ルシフェリンの）発光により測定できる様にしたものである。

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。ICCVAM 報告書に添付されたプロトコル (Appendix B) にある培養処方を忠実に守ること。細胞濃度の調製方法なども含めて、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. 標準条件の設定: 測定値は全て相対値で比較するので 17 β -エストラジオール (E2) の適切な濃度を常に同一の 96 ウェル・プレート上で標準として測定し、それに対する相対値として表す。
- c. 被験化合物: 反応陽性の化学物質と同時に陰性の化学物質も試験すること、さらに ER アンタゴニスト作用のある化学物質の効果も同時に試験することが重要である。

2-2 妥当性の検討

1) 総合的検討: BG1LucER TA 法の基となる細胞、BG1 は天然の ER を発現しており、ER アゴニストおよび ER アンタゴニストの両者が測定可能な *in vitro* 系である。溶媒に溶解可能 (DMSO を用いる場合もある) な広範な被験化学物質に適用できる点で非常に価値が高い。ただし ER α 型/ β 型の化学物質との結合やそれぞれの生理的作用効果およびその識別が十分に解明されていないのでその点は早期に識別可能な系との比較検討が望まれる。

理論的視点から:

ER アゴニスト活性および ER アンタゴニスト作用のある化学物質による ER α 型/ β 型に対する単

なる結合能ではなく活性を測定できる。*in vitro* 系ではあるが、バイオアッセイであるため反応系、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。このことは表面上には現れ難い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：BG1LucER TA 法ではヒト卵巣癌由来株細胞、BG1 細胞が ER を発現していることを基に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 ER 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、ER の発現のチェックを標準参照物質の使用によって常に実行する必要がある。
- 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、ER によりレポーターを発現させる。ヒトの ER には α 型と β 型が存在し、その両者へのアゴニスト/アンタゴニスト結合やその活性化による生理的作用の違いは十分には解明されていない。しかしヒト ER α と ER β の cDNA は既に単離されているのでその機能解明は近い将来明らかとなることが期待される。これらの cDNA を同一または別々の細胞に導入したレポーター・アッセイ系 (HeLa-9903) も既に報告されている。本法でもその様な細胞を用いた系の測定結果との比較検討をすべきである。
- c. 内分泌攪乱物質の影響はヒトに対するエストロゲン様物質に限ったことではなく、種々のホルモン様物質がヒトのみならず地球上の生態系にも広範な影響を及ぼしていることはよく知られている。その観点からヒト ER アッセイ系の外にヒトアンドロゲン受容体 (AR) を用いたアンドロゲン様物質や関連するホルモン様物質のスクリーニングおよび他の生物種に対する同様の測定法の開発やそれらと比較検討を視野に入れる必要がある。

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 BG1LucER TA 法の問題点

1) アッセイシステム

以下のような問題がある。

- a. 使用培養細胞について：BG1 細胞はヒト ER α と ER β を発現している。しかしその発現強度がどの程度であるか、また強度比を一定に維持する管理方法の記載が無い。ヒト ER α と ER β の cDNA は既に入手可及な段階にある。他の試験結果によるとアゴニスト、アンタゴニストの種類によって、ER α と ER β とで反応性の異なる化学物質が複数知られている。近い将来 ER α と ER β の生理機能や発現細胞の違いなどが明らかになる可能性が大きい。従って早

期に両受容体を介する細胞応答を別々に測定できる系を確立すべきである。

- b. 本法ではアッセイ培養に入る前に細胞はフェノールレッド不含培地で培養され、しかもルシフェリン反応に対する影響を除外するため、培地の種類もアッセイ前に交換される。こうした煩雑さを緩和するため、今日では同じ薬品会社からフェノールレッドやその他の薬品による影響の出ないフッ化ルシフェリンが発売されているので、ルシフェラーゼ・アッセイ系をルシフェリンからこれに変えるのがよいと思われる。培地は DMEM に統一すべきである。
- c. 被験化合物のうち揮発性あるいは DMSO 不溶性の物質については適切な溶解補助剤（可溶剤）を使用するか、別の試験法を今後検討すべきである。
- d. 96 ウェル・プレートのウェル中の細胞の顕微鏡写真をデータに添付する方が良い。測定の信頼度のチェックに利用できる。

3. 検証試験に用いた物質の分類と妥当性

Figure 1-1 に示すように、検証試験の 2~4 段階で、それぞれ 12、41、25 物質、合計 78 物質が試験に供された。それらの一覧を Table 1 に示す。これらは ER アゴニスト、アンタゴニストの両者の評価に用いられた。ステロイド、有機酸、炭化水素など広範な種類かつ様々な反応強度の物質が利用されている。試験法の感度を評価するため、陰性物質は約 25%を占めており、選ばれた物質は妥当であると判断されている。

4. 試験法のデータと結果の有用性

ICCVAM により選ばれた 78 物質の結果から、陽性、陰性と確実に分類される物質のみが正確性の評価に使われた。ER アゴニストの評価では、下記 Table 2 に示す 42 物質（陽性 33 物質、陰性 9 物質）、ER アンタゴニストの評価では Table 3 に示す 25 物質（陽性 3 物質、陰性 22 物質）である。さらに、ER アゴニストに関しては 42 物質のうち下に示す 7 物質がアッセイの正確性を求める評価から除外された。この理由は、データが正確な判断には不十分であったため、陽性か陰性かの判断には不適切とされたことによる。ただし、評価に用いられた物質を含め、*in vivo* 試験（子宮肥大試験）の結果が得られている物質は少ない。

- Clomiphene citrate
- *p,p'*-DDE
- 5 α -Dihydrotestosterone
- Flutamide
- Procymidone
- Resveratrol
- Tamoxifen

Table 2 では、陽性 33/42、陰性 9/42 であるが、結果を詳しく見ると、3 機関の結果がそろって陽性なのは 22/33 で、11/33 は 1~2 の機関で陽性ではないと報告されている。さらに陰性のうち 2/9 は 3 機関の結果がそろっていない。このデータはスクリーニング用の参考として相応しいとは言えない。

次に Table 3 について見ると、ER アンタゴニスト作用のあるもの（陽性；POS）3/25 のうち 1 つは 3 機関の結果がそろっていない。陰性（NEG）19/25 のうちの 1 つでは陽性（POS）の結果が得られている。これらは ER アンタゴニスト作用を明らかにする試験法として十分ではないことを示している。

化学物質の構造による分類（ステロイド類、ベンゼン単環等）も示した方が良いと考えられる。また、バリデーションとして実施すべき化学物質として、ER アンタゴニストを増やすべきである。指標とする化学物質のヒト ER α と ER β の反応性も示した方が良いであろう。

5. 試験法の正確性

BG1LucER TA 法の正確性を評価するため、ICCVAM 参照分類と比較した。ER アゴニストの評価は 35 物質を用いて実施された。Table 4 に示すように、3 施設の正確性の一致率は 97% (34/35) であり、そのうち感度は 96% (27/28)、特異度は 100% (7/7) であった。偽陽性はなく、偽陰性率は 4% (1/28) であった。この結果は、各施設の結果から個別に計算した場合でも同様であった。

ER アンタゴニストの評価については、25 物質を用いて実施された。Table 5 に示すように、3 施設の正確性の一致率は 100% (25/25) であり、そのうち感度は 100% (3/3)、特異度は 100% (22/22) であった。偽陽性も偽陰性もなかった。この結果は、各施設ごとの結果でも同様であった。

ER 結合試験データと BG1LucER TA 法の比較では、一致率は 97% (33/34) であり、medroxyprogesterone acetate が BG1LucER TA では陽性となり、一致しなかった。同様に、*in vivo* 子宮肥大試験との比較では、一致率は 92% (12/13) であり、butylbenzyl phthalate が BG1LucER TA 法では陽性となり、一致しなかった。

6. 試験方法の信頼性

施設内再現性は、検証試験での各施設のすべてのプレートの標準物質および対照実験の結果、ならびに、12 物質の 3 施設における 3 回の実験で求められた第 2 段階の結果から求めた。Table 6 に示すように ER アゴニスト試験では、標準物質である 17 β -estradiol (E2) の EC50 値は 8~11 $\times 10^{-12}$ M であった。各施設の 3 回の結果は 100%一致したが、12 物質のうちいくつかの種類は施設間で一致しなかった。

Table 7 に示すように ER アンタゴニスト試験では、標準物質である raloxifene の IC50 値は 1.1~1.3 $\times 10^{-9}$ M であった。各施設の 3 回の結果は 100%一致したが、12 物質のうちいくつかの種類は施設間で一致しなかった。

施設間再現性については、施設内再現性と同様に 12 物質の 3 施設における 3 回の実験で求められた第 2 段階の結果から求めた。Table 8 に示すように、ER アゴニストが陽性と示されたのは 67% (8/12) であり、ER アンタゴニストでは 100% (12/12) であった。Table 9 に示すように、41 物質を用いた第 3 段階の結果では、このうちの 5 物質の ER アゴニストは不適切なデータで評価できなかった。少なくとも 2 施設において、残り 36 物質の結果は 100%一致した。ER アンタゴニスト活性については、93% (38/41) が一致した。

7. データの質

評価報告書では記載がないが、背景評価報告書によると、XDS社とECVAMはGLPガイドラインに準拠して実験を実施した。株式会社日吉には検証試験に先立ち、OECDのGLP基準に則ったガイドランス文書を渡した。株式会社日吉のQC (quality control) と保証方法はISO9000及びISO2000にも準じた。QA (quality assurance) はすべての施設で適切に実施された。

8. 試験法の有用性、限界および提言

- 1) ER アンタゴニストによる結果：BG1LucER TA法は原理の項でも述べた様に単にアンタゴニストとERとの結合に止まらずアゴニストの活性抑制効果を検出できる点が優れている。他の同様の試験法の結果との一致度、BG1LucER TA法の感受性、特異性、偽陽性・偽陰性の識別は良好な結果を示した。
- 2) 試験方法から見た結果：他の試験法に比しアゴニスト、アンタゴニストの濃度が1/100で検出できるのでより正確であり、偽陽性・偽陰性の生じる可能性は少ない。
- 3) BG1LucER TA法による化学物質のERアゴニスト活性・ERアンタゴニスト活性のスクリーニング結果は、エストロゲン活性の試験に用いられる既存の細胞系（内在性のヒトERを利用するMCF-7細胞、ヒトER α を安定的に組み込んだHeLa細胞）などと比較しても、偽陽性や偽陰性の識別は良好である。また、化学物質のエストロゲン活性をルシフェリン発光により定量化するが、MCF-7細胞に比べて増殖が早いため、試験時間が短縮され、多数の化学物質のスクリーニングに向いている。
- 4) ER α とER β の両方を内在的に発現しているため化学物質のエストロゲン作用を総体として検出可能である。ERを介した化学物質のエストロゲン活性を一次スクリーニングするには便利な試験系である。一方、選択した物質がER α あるいはER β に特異的に結合して作用するのかを調べるためには、どちらかのERサブタイプを発現させた細胞系を用いた二次的なスクリーニングが必要となる。
- 5) BG1細胞の内在的なER α とER β の存在比が細胞の継代によって変化しないことを保証しておくことが必要である。それぞれのERに対するアゴニスト、アンタゴニストは市販されているので、これらの物質を用いた応答性を調べておくことも必要であろう。
- 6) 溶解補助剤(可溶化剤)としてDMSOが用いられているが、DMSOに溶けにくい物質については、他の有用な補助剤(可溶化剤)を検討し、それがBG1細胞に影響しないことを検証する必要がある。
- 7) 化学物質の複合影響の可能性が指摘されてきているが、BG1LucER TA法を用いて複数の物質を同時に曝露した場合の複合作用の検討は行われていない。今後、複合曝露の検討が必要である。
- 8) 現時点では揮発性物質の取り扱いについて明確な指針が無いと思われる。今後の検討が期待される。
- 9) 代謝されてからエストロゲン作用を示す物質の評価についても、BG1LucER TA法を用いてどのよ

うにスクリーニングするか検討が必要である。

- 10) BG1LucER TA 法を国内の化学物質評価にどのように利用するかについての検討も今後の課題である。
- 11) 本法ではアッセイ培養に入る前に細胞はフェノールレッド不含培地で培養され、しかも培地の種類もアッセイ前に交換される。今日では同じ薬品会社からフェノールレッドやその他の薬品による影響の出ない試薬（フッ化ルシフェリン）が発売されているためこれを利用すればフェノールレッド含有の有無は問題にならない。しかし、培地は DMEM に統一すべきである。
- 12) 本試験法の実用上の懸念として、試験系の安定性の問題が指摘されよう。一般に遺伝子を導入した細胞は、安定的導入とは言うものの、継代ごとに遺伝子発現には多少の変化が起るため、長期にわたって同じ反応性を保つことは期待できない。BG1 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く、細胞を含む試験材料の供給に関する配慮が必要である。少なくとも、使用する試験系の標準対照物質に対する反応を試験の度ごとに確認することが必要である。
- 13) 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

内分泌攪乱作用につながると考えられる ER に関する試験法としては、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。受容体と相互作用を示す物質としては、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の利用が望ましい。

細胞系での物質の ER への結合は、内在的な転写活性の増加を目安とすることにより、アゴニスト作用の有無を判定できる。このようなレポーター・アッセイは、導入の一過型/安定型を問わず、酵母、ゼブラフィッシュ肝細胞株、HepG2、HeLa、CV-1 など種々の細胞で行われている。

以上のことは主として先に発見された α 型の受容体 (ER α) についての記述であるが、ER にはこれとは別に β 型 (ER β) が存在する。ER α 、ER β の両者は塩基配列に相同性があるが、コードする遺伝子は異なっており、生体内での発現の様相にも差異がある。また、内分泌攪乱化学物質が ER を介して影響を及ぼすとしてもその全てが ERE 下流遺伝子の転写の修飾に直接起因すると断じるには問題があり、ジェネティック (genetic ; 遺伝子的) な転写の修飾ではなく、影響のエピジェネティック (epigenetic ; 後成的) な側面についても考察が加えられている。いずれにしても、ER α 、ER β の両受

容体が発現しており、エピジェネティックな影響も観察しうる細胞系が利用に適している。

ER α 、ER β はともに結晶化され X 線により構造が解析されている。この結果より、ER α 、ER β のエストロゲンおよび関連物質の結合についての検討や考察がなされている。これに加え、化学物質の ER に対する定量的構造-活性相関 (QSAR) も試みられているが、現在のところ結果の集積とその解析の段階に止まっており、動物実験の代替に達してはいない。

上述の試験のうち、HeLa 細胞でルシフェラーゼをレポーターとした ER 活性化アッセイは、hER α -HeLa STTA 法として OECD の試験法ガイドラインにも収載されているが、これに対する BG1LucER TA 法の優位性については、1 の“本試験法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性”に記載されている。他の試験法については、代替法としての定義、あるいは、普遍性等の要件を充たすとは言えず、当然検証試験は行われていない。よって、ER α 、ER β の両受容体を介する生体への影響という点で、BG1LucER TA 試験法の今後の研究の発展が望まれる。

10. 結論

BG1LucER TA 法は、化学物質の *in vitro* での ER アゴニスト活性および ER 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、その検査性能の有用性を確認する検証試験は国際的に 3 試験施設共同試験によって完了している。本試験法は、化学物質の ER 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 DNA の転写活性化まで知ることが出来、さらに、ER 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、ICCVAM の選定した 78 種の参照物質を用いて検証試験が行われた。検証の結果、ICCVAM の評価報告書ではこの試験法の正確性と信頼性を高く評価しており、行政規制の試験法としても、既存の ER TA 法 (hER α -HeLa STTA : OECD TG455) と同等であると認めている。

ただし、本試験法では検証試験において、試験施設間にある程度の結果の相違が見られている。そのような場合、再試験を行うなどして、試験施設における試験操作上の問題の有無について明らかにすべきであった。また、参照物質として全 78 物質が規定されていたが、その全てについて全参加試験施設のデータが比較検討されたわけではなかった。一部の物質は、反応が不明確であるとして評価から除外されている。その理由について検討すべきであった。

本試験法は、ヒト卵巣癌由来細胞株 BG1 細胞を起源としており、ER は細胞に内在するものを利用して、ヒト ER の反応が細胞内にあるがままで観察できることが利点とされている。しかし、この細胞には ER α と ER β の双方が存在し、それらが試験による TA 反応のどの程度ずつを担っているかが不明である。これは、ICCVAM 報告書にも述べてあるとおり、今後の、しかし至急の研究課題である。

Table 1. Reference Substances Tested for ER TA Activity

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|---|------------|----------------------------------|---|-------------|--|
| 12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetate | 16561-29-8 | Hydrocarbon (Cyclic) | Laboratory Chemical | >99.5 | LC Laboratories |
| 17 α -Estradiol | 57-91-0 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.5 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 17 α -Ethinyl estradiol | 57-63-6 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | \geq 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 17 β -Estradiol | 50-28-2 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 17 β -Trenbolone | 10161-33-8 | Steroid | Pharmaceutical | 96.6 | Spectrum Chemicals & Laboratory Products |
| 19-Nortestosterone | 434-22-0 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 98.0 | Toronto Research Chemicals, Inc. (TRC) |
| 2- <i>sec</i> -Butylphenol | 89-72-5 | Phenol | Chemical Intermediate, Pesticide Intermediate | 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|-----------------------------------|------------|--|--|-------------|---|
| 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid | 93-76-5 | Carboxylic Acid | Herbicide | 99.3 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 4-Androstenedione | 63-05-8 | Steroid | Pharmaceutical | 98.6 | Sigma-Aldrich Corporation/ Hiyoshi-International Laboratory USA |
| 4-Cumylphenol | 599-64-4 | Phenol | Chemical Intermediate | 99.9 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 4-Hydroxytamoxifen | 68047-06-3 | Hydrocarbon (Cyclic) | Pharmaceutical | 99.5 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 4-Hydroxyandrostenedione | 566-48-3 | Steroid | Pharmaceutical | 99.6 | Sigma-Aldrich Corporation |
| 4- <i>tert</i> -Octylphenol | 140-66-9 | Phenol | Chemical Intermediate, Pharmaceutical Intermediate | 99.3 | Chem Service, Inc. |
| 5 α -Dihydrotestosterone | 521-18-6 | Steroid | Pharmaceutical | \geq 97.5 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Actinomycin D | 50-76-0 | Heterocyclic Compound, Polycyclic Compound | Laboratory Chemical, Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.7 | USB Corporation |
| Ammonium perchlorate | 7790-98-9 | Amine, Onium Compound | Industrial Chemical, Laboratory Chemical, Pharmaceutical | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Apigenin | 520-36-5 | Heterocyclic Compound | Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Apomorphine | 58-00-4 | Heterocyclic Compound | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.8 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Atrazine | 1912-24-9 | Heterocyclic Compound | Herbicide | 98.0 | Chem Service, Inc. |
| Bicalutamide | 90357-06-5 | Amide | Pharmaceutical | >99.5 | LKT Laboratories, Inc. |
| Bisphenol A | 80-05-7 | Phenol | Chemical Intermediate, Flame Retardant, Fungicide | 97.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Bisphenol B | 77-40-7 | Phenol | Chemical Intermediate, Flame Retardant, Fungicide | 97.4 | City Chemical LLC |

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|---------------------------------|----------|---|---|------------|----------------------------|
| Butylbenzyl phthalate | 85-68-7 | Carboxylic Acid, Ester, Phthalic Acid | Plasticizer, Industrial Chemical | 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Chrysin | 480-40-0 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Natural Product | 99.8 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Clomiphene citrate | 50-41-9 | Amine, Carboxylic Acid, Heterocyclic Compound | Pharmaceutical | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Corticosterone | 50-22-6 | Steroid | Pharmaceutical | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Coumestrol | 479-13-0 | Heterocyclic Compound | Natural Product | 98.0 | BIOMOL International, Inc. |
| Cycloheximide | 66-81-9 | Heterocyclic Compound | Fungicide, Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Cyproterone acetate | 427-51-0 | Steroid | Pharmaceutical | 99.6 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Daidzein | 486-66-8 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Natural Product | ≥97.5 | Alfa Aesar GmbH |
| Dexamethasone | 50-02-2 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Di- <i>n</i> -butyl phthalate | 84-74-2 | Ester, Phthalic Acid | Cosmetic Ingredient, Industrial Chemical, Plasticizer | ≥98.0 | City Chemical LLC |
| Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracene | 53-70-3 | Polycyclic Compound | Laboratory Chemical, Natural Product | 99.9 | Supelco Analytical |
| Dicofol | 115-32-2 | Hydrocarbon (Cyclic), Hydrocarbon (Halogenated) | Pesticide | 98.0 | Chem Service, Inc. |
| Diethylhexyl phthalate | 117-81-7 | Phthalic Acid | Pesticide Intermediate, Plasticizer | 98.0 | Alfa Aesar GmbH |
| Diethylstilbestrol | 56-53-1 | Hydrocarbon (Cyclic) | Pharmaceutical, Veterinary Agent | ≥99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Estrone | 53-16-7 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Ethyl paraben | 120-47-8 | Carboxylic Acid, Phenol | Pharmaceutical, Preservative | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------|---|------------|---------------------------------|
| Fenarimol | 60168-88-9 | Heterocyclic Compound, Pyrimidine | Fungicide | 99.5 | Chem Service, Inc. |
| Finasteride | 98319-26-7 | Steroid | Pharmaceutical | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Flavone | 525-82-6 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Natural Product, Pharmaceutical | 99.7 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Fluoranthene | 206-44-0 | Polycyclic Compound | Industrial Chemical, Laboratory Chemical, Pharmaceutical Intermediate | 99.6 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Fluoxymestron | 76-43-7 | Steroid | Pharmaceutical | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Flutamide | 13311-84-7 | Amide | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Genistein | 446-72-0 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Natural Product, Pharmaceutical | 98.8 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Haloperidol | 52-86-8 | Ketone | Pharmaceutical, Veterinary Agent | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Hydroxyflutamide | 52806-53-8 | Amide | Pharmaceutical | 99.4 | LKT Laboratories, Inc. |
| Kaempferol | 520-18-3 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Natural Product | 99.0 | INDOFINE Chemical Company, Inc. |
| Kepone | 143-50-0 | Hydrocarbon (Halogenated) | Pesticide | >99.9 | Supelco Analytical |
| Ketoconazole | 65277-42-1 | Heterocyclic Compound | Pharmaceutical | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| L-Thyroxine | 51-48-9 | Amino Acid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Linuron | 330-55-2 | Urea | Herbicide | 99.5 | Chem Service, Inc. |
| Medroxyprogesterone acetate | 71-58-9 | Steroid | Pharmaceutical | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| <i>meso</i> -Hexestrol | 84-16-2 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.3 | City Chemical LLC |
| Methyl testosterone | 58-18-4 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Mifepristone | 84371-65-3 | Steroid | Pharmaceutical | 99.1 | Sigma-Aldrich Corporation |

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|---------------------------|------------|-----------------------------------|---|------------|---------------------------------------|
| Morin | 480-16-0 | Flavonoid, Heterocyclic Compound | Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate | 95.3 | TCI America |
| Nilutamide | 63612-50-0 | Heterocyclic Compound, Imidazole | Pharmaceutical | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Norethynodrel | 68-23-5 | Steroid | Pharmaceutical | ≥95.0 | Research Plus Inc. |
| <i>o,p'</i> -DDT | 789-02-6 | Hydrocarbon (Halogenated) | Pesticide | 98.9 | Chem Service, Inc. |
| Oxazepam | 604-75-1 | Heterocyclic Compound | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 99.5 | Sigma-Aldrich Corporation |
| <i>p-n</i> -Nonylphenol | 104-40-5 | Phenol | Chemical Intermediate | 99.6 | Alfa Aesar GmbH |
| <i>p,p'</i> -Methoxychlor | 72-43-5 | Hydrocarbon (Halogenated) | Pesticide, Veterinary Agent | 99.1 | Chem Service, Inc. |
| <i>p,p'</i> -DDE | 72-55-9 | Hydrocarbon (Halogenated) | Pesticide Intermediate | 99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Phenobarbital | 50-06-6 | Heterocyclic Compound, Pyrimidine | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 100.0 | Spectrum Chemical Manufacturing Corp. |
| Phenolphthalin | 81-90-3 | Carboxylic Acid, Phenol | Dye, Laboratory Chemical | 95.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Pimozide | 2062-78-4 | Heterocyclic Compound | Pharmaceutical | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Procymidone | 32809-16-8 | Polycyclic Compound | Fungicide | 99.0 | Chem Service, Inc. |
| Progesterone | 57-83-0 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | ≥99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Propylthiouracil | 51-52-5 | Heterocyclic Compound, Pyrimidine | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Raloxifene HCl | 82640-04-8 | Hydrocarbon (Cyclic) | Pharmaceutical | 100.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Reserpine | 50-55-5 | Heterocyclic Compound, Indole | Pharmaceutical, Veterinary Agent | 98.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Resveratrol | 501-36-0 | Hydrocarbon (Cyclic) | Natural Product | ≥99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Sodium azide | 26628-22-8 | Azide, Salt (Inorganic) | Chemical Intermediate, Fungicide, Herbicide | 99.7 | Sigma-Aldrich Corporation |

| Substance | CASRN | MeSH Chemical Class ^a | Product Class ^b | Purity (%) | Manufacturer |
|----------------|------------|----------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------------|
| Spironolactone | 52-01-7 | Lactone, Steroid | Pharmaceutical | 99.7 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Tamoxifen | 10540-29-1 | Hydrocarbon (Cyclic) | Pharmaceutical | ≥99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Testosterone | 58-22-0 | Steroid | Pharmaceutical, Veterinary Agent | >99.0 | Sigma-Aldrich Corporation |
| Vinclozolin | 50471-44-8 | Heterocyclic Compound | Fungicide | 99.5 | Chem Service, Inc. |

Abbreviations: CASRN = CAS Registry Number (American Chemical Society); MeSH = Medical Subject Headings (U.S. National Library of Medicine).

^a 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>).

^b 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>).

Table 2. 42 ICCVAM-Recommended Substances Used to Evaluate ER Agonist Accuracy

| Substance | CASRN | Classification ^a | | | | |
|---------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | ICCVAM Consensus | BG1Luc ER TA Consensus ^b | XDS | ECVAM | Hiyoshi |
| 17 α -Estradiol | 57-91-0 | POS | POS | POS (1/1) | POS (3/3) | POS (2/2) |
| 17 α -Ethinyl estradiol | 57-63-6 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| 17 β -Estradiol | 50-28-2 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| 19-Nortestosterone | 434-22-0 | POS | POS | POS (1/1) | NT | NT |
| 4-Cumylphenol | 599-64-4 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| 4- <i>tert</i> -Octylphenol | 140-66-9 | POS | POS | I (1/1) | POS (1/1) | POS (2/2) |
| 5 α -Dihydrotestosterone | 521-18-6 | POS | I | I (1/1) | I (1/1) | POS (1/1) |
| Apigenin | 520-36-5 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Atrazine | 1912-24-9 | NEG | NEG | NEG (3/3) | POS (3/3) | NEG (3/3) |
| Bicalutamide | 90357-06-5 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| Bisphenol A | 80-05-7 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| Bisphenol B | 77-40-7 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| Butylbenzyl phthalate | 85-68-7 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| Chrysin | 480-40-0 | POS | POS | POS (2/2) | NT | NT |
| Clomiphene citrate | 50-41-9 | POS | I | I (1/1) | NEG (1/1) | POS (1/1) |
| Corticosterone | 50-22-6 | NEG | NEG | NEG (3/3) | POS (3/3) | NEG (4/4) |
| Coumestrol | 479-13-0 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Daidzein | 486-66-8 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Dicofol | 115-32-2 | POS | POS | POS (1/1) | NEG (1/1) | POS (1/1) |
| Diethylstilbestrol | 56-53-1 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| Estrone | 53-16-7 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Ethyl paraben | 120-47-8 | POS | POS | I (1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Fenarimol | 60168-88-9 | POS | POS | POS (1/1) | NT | NT |
| Flutamide | 13311-84-7 | NEG | I | I (1) | NT | NT |
| Genistein | 446-72-0 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (4/4) |
| Hydroxyflutamide | 52806-53-8 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Kaempferol | 520-18-3 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Kepone | 143-50-0 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| L-Thyroxine | 51-48-9 | POS | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| Linuron | 330-55-2 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| <i>meso</i> -Hexestrol | 84-16-2 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Methyl testosterone | 58-18-4 | POS | POS | POS (3/3) | POS (1/1) | POS (2/2) |

| Substance | CASRN | Classification ^a | | | | |
|---------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | ICCVAM Consensus | BG1Luc ER TA Consensus ^b | XDS | ECVAM | Hiyoshi |
| Norethynodrel | 68-23-5 | POS | POS | POS (2/2) | POS (1/1) | POS (2/2) |
| <i>o,p'</i> -DDT | 789-02-6 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| <i>p-n</i> -Nonylphenol | 104-40-5 | POS | POS | POS (3/3) | POS (3/3) | POS (3/3) |
| <i>p,p'</i> -DDE | 72-55-9 | POS | I | I (1/1) | I (1/1) | NEG (1/1) |
| <i>p,p'</i> -Methoxychlor | 72-43-5 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (2/2) |
| Phenobarbital | 50-06-6 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NT |
| Procymidone | 32809-16-8 | NEG | I | I (1/1) | NT | NT |
| Resveratrol | 501-36-0 | POS | I | POS (1/1) | I (1/1) | NEG (2/3) |
| Spirolactone | 52-01-7 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| Tamoxifen | 10540-29-1 | POS | I | I (1/1) | I (1/1) | POS (1/1) |

Abbreviations: BG1Luc ER TA = LUMI-CELL BG1Luc4E2 ER TA test method; CASRN = CAS Registry Number (American Chemical Society); ECVAM = European Centre for the Validation of Alternative Methods; I = inadequate (positive or negative classification could not be determined because of poor-quality data); NEG = negative; NT = not tested; POS = positive; XDS = Xenobiotic Detection Systems, Inc.

^a Number in parentheses represents test results (POS, NEG, or I) over the total number of trials that met test plate acceptance criteria.

^b BG1Luc ER TA consensus classification represents the majority classification among the three validation laboratories.

Table 3. 25 ICCVAM-Recommended Substances Used to Evaluate ER Antagonist Accuracy

| Substance | CASRN | Classification ^a | | | | |
|---------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | ICCVAM Consensus | BG1Luc ER TA Consensus ^b | XDS | ECVAM | Hiyoshi |
| 17 α -Ethinyl estradiol | 57-63-6 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| 4-Hydroxytamoxifen | 68047-06-3 | POS | POS | POS (1/1) | I (2/2) | POS (1/1) |
| 5 α -Dihydrotestosterone | 521-18-6 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Apigenin | 520-36-5 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (4/4) |
| Bisphenol A | 80-05-7 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Butylbenzyl phthalate | 85-68-7 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (4/4) |
| Chrysin | 480-40-0 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| Coumestrol | 479-13-0 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Daidzein | 486-66-8 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Di- <i>n</i> -butyl phthalate | 84-74-2 | NEG | NEG | NEG (2/2) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Dicofol | 115-32-2 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Diethylhexyl phthalate | 117-81-7 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (2/2) | NEG (1/1) |
| Diethylstilbestrol | 56-53-1 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | POS (1/1) |
| Genistein | 446-72-0 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (3/3) |
| Kaempferol | 520-18-3 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Kepone | 143-50-0 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Mifepristone | 84371-65-3 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NT | NT |
| Norethynodrel | 68-23-5 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| <i>o,p'</i> -DDT | 789-02-6 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (4/4) |
| <i>p-n</i> -Nonylphenol | 104-40-5 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (3/3) |
| <i>p,p'</i> -DDE | 72-55-9 | NEG | NEG | NEG (1/1) | NEG (1/1) | NEG (1/1) |
| Progesterone | 57-83-0 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (3/3) |
| Raloxifene HCl | 82640-04-8 | POS | POS | POS (1/1) | POS (1/1) | POS (1/1) |
| Resveratrol | 501-36-0 | NEG | NEG | NEG (3/3) | NEG (3/3) | NEG (3/3) |
| Tamoxifen | 10540-29-1 | POS | POS | POS (4/4) | POS (3/3) | POS (3/3) |

Abbreviations: BG1Luc ER TA = LUMI-CELL BG1Luc4E2 ER TA test method; CASRN = CAS Registry Number (American Chemical Society); ECVAM = European Centre for the Validation of Alternative Methods;

I = inadequate (positive or negative classification could not be determined because of poor-quality data);

NEG = negative; NT = not tested; POS = positive; XDS = Xenobiotic Detection Systems, Inc.

^a Number in parentheses represents test results (POS, NEG, or I) over the total number of trials that met test plate acceptance criteria.

^b BG1Luc ER TA consensus classification represents the majority classification among the three validation laboratories.

Table 4. Accuracy of the BG1LucER TA agonist Data

| Laboratory | N | Accuracy | Sensitivity | Specificity | False Positive Rate | False Negative Rate |
|------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|---------------------|---------------------|
| Combined | 35 ^a | 97% (34/35) | 96% (27/28) | 100% (7/7) | 0% (0/7) | 4% (1/28) |
| XDS | 34 | 97% (33/34) | 96% (27/28) | 100% (6/6) | 0% (0/6) | 4% (1/28) |
| ECVAM | 29 | 86% (25/29) | 92% (23/25) | 50% (2/4) | 50% (2/4) | 8% (2/25) |
| Hiyoshi | 32 | 94% (30/32) | 93% (27/29) | 100% (3/3) | 0% (0/3) | 7% (2/29) |

Abbreviations: ECVAM = European Centre for the Validation of Alternative Methods; N = number; XDS = Xenobiotic Detection Systems, Inc.

^a A total of 42 substances were evaluated in the BG1LucER TA agonist test method. Seven substances did not produce a consensus classification and were omitted, leaving 35 substances for analysis.

Table 5. Accuracy of the BG1LucER TA antagonist Data

| Laboratory | N | Accuracy | Sensitivity | Specificity | False Positive Rate | False Negative Rate |
|------------|----|-----------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Combined | 25 | 100% (25/25) | 100% (3/3) | 100% (22/22) | 0% (0/22) | 0% (0/3) |
| XDS | 25 | 100% (25/25) | 100% (3/3) | 100% (22/22) | 0% (0/22) | 0% (0/3) |
| ECVAM | 23 | 100% (23/23) | 100% (3/3) | 100% (20/20) | 0% (0/20) | 0% (0/3) |
| Hiyoshi | 23 | 96% (22/23) | 100% (3/3) | 95% (19/20) | 5% (1/20) | 0% (0/3) |

Abbreviations: ECVAM = European Centre for the Validation of Alternative Methods; N = number; XDS = Xenobiotic Detection Systems, Inc.

Table 6. Agonist E2 EC50 Control Values

| Laboratory | Mean | SD | N |
|--|-----------------------|-----------------------|----|
| E2 Reference Standard EC₅₀ (M) | | | |
| XDS | 1.1×10^{-11} | 6.7×10^{-12} | 93 |
| ECVAM | 1.1×10^{-11} | 1.9×10^{-11} | 60 |
| Hiyoshi | 8.0×10^{-12} | 2.8×10^{-12} | 65 |

Table 7. Antagonist Raloxifene EC50 Control Values

| Laboratory | Mean | SD | N |
|--|----------------------|-----------------------|----|
| Raloxifene Reference Standard IC₅₀ (M) | | | |
| XDS | 1.1×10^{-9} | 5.6×10^{-10} | 79 |
| ECVAM | 1.3×10^{-9} | 5.6×10^{-10} | 62 |
| Hiyoshi | 1.2×10^{-9} | 2.9×10^{-10} | 53 |

Table 8. Interlaboratory Agreement for phase 2 Test Substances

| Results Among Laboratories | Agonist Testing | Antagonist Testing |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|
| Agreement Among Laboratories | 8/12 (67%) | 12/12 (100%) |
| +++ | 8/12 | 2/12 |
| --- | 0/12 | 10/12 |
| Discordance Among Laboratories | 4/12 (33%) | 0/12 (0%) |
| ++- | 1/12 | 0/12 |
| +-- | 3/12 | 0/12 |

+ denotes a positive test result.

- denotes a negative test result.

+++ indicates that the substance was classified as positive at all three laboratories.

--- indicates that the substance was classified as negative at all three laboratories.

+- indicates that a test substance was classified as positive in two of three laboratories. The substance was classified as negative in the third laboratory.

+-- indicates that the test substance was classified as positive in one of three laboratories.

Table 9. Interlaboratory Agreement for phase 3 substances Tested Once at Each Laboratory

| Results Among Laboratories | Agonist Testing | Antagonist Testing |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Agreement Among Laboratories | 30/36 (83%) | 38/41 (93%) |
| +++ | 18/36 | 2/41 |
| --- ^a | 4/36 | 33/41 |
| ++I | 2/36 | 1/41 |
| --I | 6/36 | 2/41 |
| Discordance Among Laboratories | 6/36 (17%) | 3/41 (7%) |
| ++- | 3/36 | 0/41 |
| +-- | 0/36 | 1/41 |
| +--I | 3/36 | 2/41 |

Abbreviations: I = inadequate data.

Only those substances that produced a definitive result in at least two of the three laboratories were used in this evaluation.

Five substances that produced an inadequate result in two laboratories during agonist testing were not included in this table.

+ denotes a positive test result.

- denotes a negative test result.

+++ indicates that the substance was classified as positive at all three laboratories.

--- indicates that the substance was classified as negative at all three laboratories.

