

ER STTA 法 : hER α -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化
試験法の評価報告書

平成 28 年 10 月 21 日

内分泌かく乱試験法資料編纂委員会

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（横浜市立大学、元 基礎生物学研究所）

小野 敦（岡山大学、元 国立医薬品食品衛生研究所）

用語集

Accuracy : 正確性

Concordance : 一致度

17 β -estradiol (E2) : 17 β -エストラジオール

ER : Estrogen receptor

ER α/β : エストロゲン受容体 α/β

ER STTA : hER α -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法

Estrogen responsive element (ERE) : 核内のエストロゲン応答配列

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

GLP: Good Laboratory Practice

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研究

Intra-laboratory validation study : 施設内バリデーション研究

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

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

Uterotrophic assay : 子宮肥大試験

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

Validation study : バリデーション研究

Validation study management team : バリデーション研究運営委員会

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

ER STTA 法（詳しくは「hER α -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体(ER)恒常発現系転写活性化試験法」；The Stably Transfected Transcription Activation (STTA) assay using the human ER α -HeLa-9903 cell line) は、化学物質のエストロゲン（および抗エストロゲン）活性を化学発光により検出する *in vitro* 試験法の一つで、内分泌かく乱物質対策のために開発されたものである。本試験法は、我が国（日本）の住友化学株式会社で構築された hER α -HeLa-9903 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）においてプロトコルが開発された。hER α -HeLa-9903 細胞は、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞にヒト ER α を発現する遺伝子配列と、アフリカツメガエルのピテロジェニン遺伝子由来のエストロゲン応答配列（ERE）の下流に mouse metallothionein (MT) 遺伝子の TATA ボックス配列およびレポーター遺伝子となるホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した遺伝子配列を安定的に導入した細胞であり、ER STTA 法は導入された ER α 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る。hER α -HeLa-9903 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：JCRB1318）。ER STTA 法については、厚生労働省・経済産業省共同で OECD に提案され、その後実施された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（TG）の提案に至った。

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（内分泌かく乱物質と呼ばれる）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の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、バリデーション試験を行った上で国際的な TG（OECD TG440）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結合反応の測定法があり、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 17 β -estradiol (E2)と比較して定量的に決定するものである。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。

ER STTA 法は、エストロゲン活性物質による ER 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は、すでに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 ERE の下流に安定的に導入した BG1Luc4E2 細胞が開発されており、この細胞を用いた試験法「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 (BG1Luc ER TA 法)」が OECD TG に収載されている (OECD TG 457, 2012)。

ER STTA 法と BG1Luc ER TA 法の相違は、(1) 本法が hER α を HeLa 細胞に組み込んだものであるのに対し、BG1Luc ER TA 法は BG1 細胞に内在する ER を利用する、(2) 本法では組み込まれた受容体はヒト ER α のみであるが、BG1 細胞は 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 (ER α 、ER 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) BG1Luc ER TA 法のアンタゴニスト試験では、バリデーション試験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、本法では、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 1mM まで評価可能である。

ER STTA 法のバリデーションについては、アゴニスト試験とアンタゴニスト試験について別々に独立した施設間バリデーション試験が実施された。

アゴニスト試験に関しては、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施設の参加によるバリデーション試験が実施された。アゴニストバリデーション試験の予試験では、事前検討として陽性2物質(E2, Bisphenol A)の2回繰り返し測定を行い、参加試験施設の測定技術および実験手法の技術移転の評価が行われた。本試験では、陽性対照を含むコード化された10物質の3回繰り返し測定により施設内、施設間再現性についての検討が行われた。また、リードラボで実施された86物質(多施設バリデーションでの測定実施10物質を含む)の測定結果から結合試験との比較、子宮肥大試験との比較、ICCVAM報告との比較が行われた。バリデーション試験の結果、4試験施設のデータは高い一致率を示し、ICCVAM報告の分類(陽性・陰性)との一致率も高いものであった。この結果から、ER STTA法は、化学物質の*in vitro* ERアゴニスト活性を正確に検出する試験法であると評価された。このアゴニスト試験バリデーション報告書は、2006年にアゴニスト試験法のみ試験法ガイドライン案とともにOECDに提出され、2009年に成立した最初のTG455をサポートするデータとなった。その後、TG455は、2012年にBG1Luc ER TA法のアゴニスト試験法を包含する性能準拠試験法ガイドライン(PBTG)に更新され、あわせてアゴニスト試験の性能基準(PS)が公開された(1)。

アンタゴニスト試験に関しては、上記のアゴニスト試験バリデーション報告書の第三者評価における要求を受けて、2008年にOECDにプロジェクト提案され、JaCVAMが中心となって、当初、国内3施設(CERI、大塚製薬、カネカ)、海外2施設(韓国KFDA、ベルギーVITO)の参加による国際バリデーション試験として開始されたものの、海外2施設および国内1施設(カネカ)は各施設の事情によりバリデーション試験の途中で撤退したため、バリデーションに必要な試験データの取得のため、2010年よりBG1Luc ER TA法バリデーション試験に参加経験のある(株)日吉(以下、日吉と記す)が追加で参加した。アンタゴニストバリデーション試験は3段階にわけて行われ、第1段階では、TG455で示されたアゴニスト試験の参照物質3物質の3回繰り返し測定により、参加試験施設の測定技術および実験手法の技術移転の評価が行われ、全ての参加施設が、アゴニストの基準を満たす結果を得た。第2段階では、新たに構築されたアンタゴニストのプロトコルに従い、アンタゴニスト測定の参照物質候補4物質の測定、第3段階では、コード化された20物質の測定が行われた。海外2施設は第2段階の途中で、国内1施設(カネカ)は第3段階の途中でバリデーション試験より撤退したため、最終的な評価は、CERI、大塚製薬および日吉の測定結果とカネカの測定済み結果より行われた。バリデーション試験の結果、被験物質の定性的評価結果は、施設間で一致するものの、施設によっては参照基準を満たす事が出来なかった。この原因として、細胞培養技術に由来する反応性の変化が示唆されたものの完全には

解消出来なかったことから、陽性物質の定量的評価結果について信頼性を保証出来ない可能性が示された。そのため、本試験系は当初、定量的評価系として開発されたものの定性的評価を主眼としたプロトコルの変更が行われた。既に試験法ガイドラインが成立している BGILuc ER TA 法も定性的評価系として試験法ガイドライン化されていることから、OECD TG 455 改定案についても定性的評価系として提案された。アンタゴニスト試験バリデーション報告書については、2014 年にアンタゴニスト試験を包含する TG455 改訂案(2) およびアンタゴニスト試験の PS(3)とともに OECD に提出された。アンタゴニスト試験バリデーション報告書は、先に提出されたアゴニスト試験バリデーション報告書の追加文書として提出され、最終的にアゴニスト試験 (part A) とアンタゴニスト試験 (part B) を含む単一のバリデーション報告書として公開される予定である(4)。なお、TG 455 へのアンタゴニスト試験法の追加により BGILuc ER TA 法は、ER STTA 法と共に試験法の一つとして TG 455 に記載され、BGILuc ER TA 法のみ TG である TG 457 は、廃止される予定である。

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かく乱物質のうち ER に作用する化学物質を検索し、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、ER STTA 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するために HeLa 細胞にヒト ER α を恒常的に発現するプラスミドと ERE 下流に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。OECD TG 455 に添付されたプロトコル (ANNEX 2) 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 E2 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：ER STTA 法の基となる HeLa 細胞は天然の ER を発現しておらず、ER STTA 法で用いる HeLa-9903 では強制発現されたヒト ER α 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。同様の ER 転写活性化試験法である BG1Luc 細胞は、ER α 型/ β 型双方を発現しており、両者を介した作用が検出可能であるとされるものの、いずれの受容体への作用であるかを区別することは出来ない。これに対して、ER STTA 法（HeLa-9903 細胞）では、純粋にヒト ER α のみを介した作用を検出可能である。

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 ER に対する単なる結合能ではなく転写活性を測定できる。*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：ER STTA 法では HeLa 細胞にヒト ER α を恒常的に強制発現させた HeLa9903 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 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、試験対象物質の測定時には、ER 反応性のチェックを TG で指定された参照（標準）物質の測定によって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、ER 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、ER STTA 法では、一部の植物エストロゲンで高濃度において受容体を介しないルシフェラーゼの高活性化

現象が示されることが明らかにされている。これまでに工業用化学物質では、同様の作用が検出された例はないが注意が必要である。

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 ER STTA 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。

使用培養細胞について：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。しかし、アンタゴニスト試験のバリデーションにおいては、一部の参加施設で継代数が 40 代以下であっても細胞継代に伴うと思われる反応性の低下や用量反応性の変化が認められており注意が必要である。バリデーション試験では、継代時のトリプシン消化時間の延長が細胞にダメージを与える可能性が示唆されている。また、細胞形態に異常が無くても、反応性が変化することが示唆されており、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した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、細胞を新たなロット（サブロット）に切替えるべきである。

3. バリデーション試験に用いた物質の分類と妥当性

アゴニスト試験法のバリデーションでは 86 物質（Table 1）が、アンタゴニスト試験法のバリデーションでは 21 物質（Table 2）が用いられた(4)。それらにはステロイド、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含まれている。試験法の感度を評価するため、陰性物質がアゴニスト試験では約 30% (27/86)、アンタゴニスト試験では 60% (12/20) を占めており、選ば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

アゴニスト試験のバリデーションに用いられた 86 物質のうち、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 E2 及びコード化物質として測定が実施された 9 物質の計 10 物質（陽性 7 物質、陰性 3 物質）であり、これら 10 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、他の 76 物質については、リードラボである CERi における測定結果をもとに、ICCVAM 参照分類や ER 結合試験、子宮肥大試験結果との比較が行われた (Table 3~6)。

アンタゴニスト試験のバリデーションでは、参照物質を含む 21 物質のうち、バリデーション試験第 3 段階でコード化物質として測定が実施された 20 物質 (陽性 8 物質、陰性 10 物質、不明 2 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、および文献情報などから予想されたアンタゴニスト活性との比較による評価精度のバリデーションが行われた (Table 7)。アンタゴニスト試験のバリデーションにおいては測定物質数が少ないが、アンタゴニスト活性を示すことが明らかにされている化学物質の多くは、医薬品もしくはその類似物質であり、一般工業化学物質で明確なアンタゴニスト活性が知られている物質は、非常に限られていることによる。バリデーション試験で評価が行われた陽性 8 物質は、今後の新たな試験系評価における重要な参照物質となるであろう。

いずれのバリデーション試験においても用いられた化学物質は、ICCVAM 参照分類リスト等を参考に、広範な種類の物質が選択されているが、バリデーション報告書においては、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。

5. 試験方法の再現性

アンタゴニスト試験では、陽性物質として測定された E2 を含む 10 物質 (陽性 7 物質、陰性 3 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バリデーションが行われ、いずれも一致率は 100%であった。

アンタゴニスト試験では、バリデーション試験第 3 段階目で撤退したカネカを含む 4 施設における 20 物質 (大塚製薬は 19 物質、カネカは 12 物質) の 3 回以上の測定結果をもとに施設内再現性の解析が行われた。施設内再現性についてカネカでは、各物質 5~6 回の測定結果が全て一致したのは 67% (8/12 物質)であったが、他の 4 物質については、測定結果が一致しなかったのは、各 1 測定のみであった。他の施設では 90%以上の再現性を示した (Table 8)。一方、施設間再現性についても同様に 20 物質についての 2~4 施設からの測定結果から解析が行われ、2 物質 (Atrazine、Dibenzo[a,h]anthracene) については、それぞれ 1/3 施設で他施設と一致しない結果が示された。その他の被験物質については、施設間で 100%一致する結果を得た。結果として文献情報などから予想されたアンタゴニスト活性 (不明 2 物質を除く 18 物質 (陽性 8 物質、陰性 10 物質)) との比較では、2 施設で一致率 94%、他の 2 施設では 100%であった (Table 9)。

6. 試験法の正確性・信頼性

ER STTA 法の正確性を評価するため、アゴニスト試験では、35 物質（陽性 25 物質、陰性 10 物質）の測定結果について ICCVAM 参照分類との比較が行われ一致率は、100%であった（Table 10）。ER 結合試験データと ER STTA 法の比較が 48 物質（結合試験陽性 24 物質、陰性 24 物質）について行われ一致率は 79%（38/48）であった（Table 11）。同様に、*in vivo* 子宮肥大試験との比較が 48 物質（子宮肥大試験陽性 32 物質、陰性 16 物質）について行われ一致率は 85%（41/48）であった（Table 12）。

アンタゴニスト試験については、バリデーションに用いられた 20 物質について、文献情報などから予想されたアンタゴニスト活性（不明 2 物質を除く 18 物質（陽性 8 物質、陰性 10 物質））と 2~4 施設での測定結果を総合的に判断した判定結果との比較が行われ、一致率は、100%であった（Table 9）。

7. データの質

アゴニストバリデーション試験における多施設測定は、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（先行バリデーション試験は、非 GLP で実施された）。アンタゴニストバリデーション試験については、バリデーション報告書に記載は無いが、各施設において GLP に準じて試験が実施された。

8. 試験法の有用性、限界および提言

- 1) アンタゴニストによる結果：ER STTA 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を抑制する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、ER 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 濃度で検出できるのでより感度が高く、偽陽性・偽陰性の生じる可能性は少ないと思われる。
- 3) ER STTA 法による化学物質のアゴニスト活性・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、BG1 細胞）などと比較しても、陽性や陰性物質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) 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、ER 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ため注意が必要である。
- 5) 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。細胞の継代によって ER の反応性が変化しないことを確認しておくことが必要である。TG で示された ER アゴニスト試験、アンタゴニスト試験それぞれの参照物質（陽性・陰性）を用いて用量-応答性を調べておくことが必要である。
- 6) 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 HeLa-9903 細胞に影響しないことを確認しておく必要がある。
- 7) 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。
- 8) 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、ER 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。
- 9) ER STTA 法は、化学物質の内分泌かく乱性をスクリーニングする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。
- 10) 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、安定的導入とは言えるものの、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。HeLa-9903 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。使用する試験系の参照（標準）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。
- 11) 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 ER に関しての試験法としては、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 への作用は、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、導入の一過性型/安定型を問わず、前述の BG1Luc 細胞を始め、酵母、ゼブラフィッシュ肝細胞株、HepG2、CV-1 など種々の細胞で検討されている。

上述の試験のうち、BG1Luc 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、BG1Luc ER TA 法として OECD TG にも収載されているが、これに対する ER STTA 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”に記されている。他の試験法については、バリデーション試験は行われていない。

10. 結論

ER STTA 法は、化学物質の *in vitro* での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、その検査性能の有用性を確認するバリデーション試験はアゴニストについては 4 試験施設の測定結果をもとに、また、アンタゴニストについては参加 6 試験施設のうち 4 施設の測定結果をもとにその再現性・信頼性が確認されている。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 RNA 転写活性化まで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、ICCVAM の選定した参照物質、CERI における背景データや文献情報をもとに選定された化学物質 (アゴニスト試験では 86 物質、アンタゴニスト試験では 20 物質) を用いてバリデーション試験が行われた。バリデーションの結果をもとに、OECD の第三者評価ではこの試験法の正確性と信頼性が高いと評価されており、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプチュアルフレームワークのレベル 2 に該当する試験法として内分泌かく乱物質のスクリーニング評価に有用であると認めている。本試験法は定量的評価法として開発され、アゴニスト試験法については、バリデーション試験において定量的評価値の信頼性が評価されたが、アンタゴニスト試験法ではバリデーション試験に

において試験施設間で定量値のばらつきが認められたことから定性的評価法として OECD ガイドライン化された。

本試験法の今後の問題点として、内分泌かく乱性がエストロゲン（抗エストロゲン）活性に起因するという考えにおいて、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課題があげられる。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) OECD (2012), Performance standards for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen agonists for TG 455, ENV/JM/MONO(2012)18 (01-Aug-2012), Series on Testing and Assessment No. 173.
- (2) OECD (2015), Draft updated TG 455 for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists, ENV/JM/TG(2015)27 (02-Mar-2015) for 27th Meeting of the Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)
- (3) OECD (2015), Draft updated performance standards for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor antagonists, ENV/JM/TG(2015)28 (03-Mar-2015) for 27th Meeting of the Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)
- (4) OECD (2015), Draft report of the inter-laboratory validation for stably transfected transactivation assay to detect estrogenic and anti-estrogenic activity, ENV/JM/TG(2015)29 (03-Mar-2015) for 27th Meeting of the Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT).

Table 1 ER-STTA アゴニストバリデーション試験で測定が行われた 86 物質の測定結果

No	Chemical	CASRN	ER STTA agonist assay			
			PC ₁₀ (M)	PC ₅₀ (M)	PC ₁₀ based class	PC ₅₀ based class
1	Atrazine	1912-24-9	-	-	N	N
2	Corticosterone	50-22-6	-	-	N	N
3	Haloperidol	52-86-8	-	-	N	N
4	Ketoconazole	65277-42-1	-	-	N	N
5	Linuron	330-55-2	-	-	N	N
6	Phenobarbital(Na)	57-30-7	-	-	N	N
7	Reserpine	50-55-5	-	-	N	N
8	Spironolactone	52-01-7	-	-	N	N
9	Flutamide	13311-84-7	-	-	N	N
10	Procymidone	32809-16-8	-	-	N	N
11	Ethyl paraben	120-47-8	5.00E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
12	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	1.23E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
13	Tamoxifen	10540-29-1	1.49E-07	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
14	Clomiphene citrate	50-41-9	3.68E-08	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
15	Zearalenone	17924-92-4	2.44E-11	6.44E-10	P	P
16	17β-Estradiol	50-28-2	<1.00E-1 1	<1.00E-11	P	P
17	Trenbolone	10161-33-8	1.78E-08	2.73E-07	P	P
18	17α-Estradiol	57-91-0	7.24E-11	6.44E-10	P	P
19	17α-Ethinyl estradiol	57-63-6	<1.00E-1 1	<1.00E-11	P	P
20	4-Cumylphenol	599-64-4	1.49E-07	1.60E-06	P	P
21	4-tert-Octylphenol	140-66-9	1.85E-09	7.37E-08	P	P
22	Apigenin	520-36-5	1.31E-07	5.71E-07	P	P
23	Bisphenol A	80-05-7	2.02E-08	2.94E-07	P	P
24	Bisphenol B	77-40-7	2.36E-08	2.11E-07	P	P
25	Butylbenzyl phthalate	85-68-7	1.14E-06	4.11E-06	P	P
26	Coumestrol	479-13-0	1.23E-09	2.00E-08	P	P
27	Daidzein	486-66-8	1.76E-08	1.51E-07	P	P
28	Diethylstilbestrol	56-53-1	<1.00E-1 1	2.04E-11	P	P
29	Estrone	53-16-7	3.02E-11	5.88E-10	P	P
30	Genistein	446-72-0	2.24E-09	2.45E-08	P	P
31	Kaempferol	520-18-3	1.36E-07	1.21E-06	P	P
32	Chlordecone (Kepone)	143-50-0	7.11E-07	7.68E-06	P	P
33	Methyl testosterone	58-18-4	1.73E-07	4.11E-06	P	P
34	Morin	480-16-0	5.43E-07	4.16E-06	P	P

35	Norethynodrel	68-23-5	1.11E-10	1.50E-09	P	P
36	Phenolphthalin	81-90-3	-	-	N	N
37	Progesterone	57-83-0	-	-	N	N
38	Cyproterone acetate	427-51-0	-	-	N	N
39	Mifepristone	84371-65-3	-	-	N	N
40	Diethylhexyl phthalate	117-81-7	-	-	N	N
41	L-Thyroxine	51-48-9	1.32E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
42	4-Androstenedione	63-05-8	2.56E-07	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
43	Testosterone	58-22-0	2.82E-08	9.78E-06	P	P
44	Vinclozolin	50471-44-8	1.33E-07	7.65E-06	P	P
45	Dibutyl phthalate	84-74-2	-	-	N	N
46	Nonylphenol	25154-52-3	1.37E-08	1.58E-07	P	P
47	Phenobarbital	50-06-6	-	-	N	N
48	Medroxyprogesterone	520-85-4	-	-	N	N
49	Dihydrotestosterone (DHT)	521-18-6	1.04E-07	5.28E-07	P	P
50	Testosterone propionate	57-85-2	2.03E-09	2.91E-07	P	P
51	Fenarimol	60168-88-9	-	-	N	N
52	p,p'-DDE	72-55-9	-	-	N	N
53	Hexestrol	84-16-2	<1.00E-1 1	2.75E-11	P	P
54	(2,4,5-Trichlorophenoxy)acetic acid	93-76-5	-	-	N	N
55	para-sec-butylphenol	99-71-8	1.38E-06	PC10(noPC ₅₀)	P	N
56	Norgestrel	797-63-7	1.05E-07	PC10(noPC ₅₀)	P	N
57	Norethindrone	68-22-4	1.01E-09	4.95E-08	P	P
58	Equilin	474-86-2	<1.00E-1 1	7.54E-11	P	P
59	Dicyclohexylphthalate	84-61-7	2.53E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
60	Diethyl phthalate	84-66-2	4.46E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
61	di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1	-	-	N	N
62	p-dodecyl-phenol	104-43-8	2.36E-08	4.10E-07	P	P
63	4-n-octylphenol	1806-26-4	1.26E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
64	4-n-amyphenol	14938-35-3	1.78E-07	4.62E-06	P	P
65	Testosterone enanthate	315-37-7	1.71E-08	2.71E-07	P	P
66	p-(tert-pentyl)phenol	80-46-6	4.02E-07	3.46E-06	P	P
67	4-cyclohexylphenol	1131-60-8	6.43E-08	1.51E-06	P	P
68	4-(1-adamantyl)phenol	29799-07-3	1.25E-09	1.86E-08	P	P
69	4-(phenylmethyl)phenol	101-53-1	1.20E-06	4.07E-06	P	P
70	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	6807-17-6	1.89E-09	1.99E-08	P	P
71	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	6.91E-09	8.02E-08	P	P
72	4,4'-(octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene)	1943-97-1	3.72E-08	PC ₁₀	P	N

bisphenol			(noPC ₅₀)			
73	4,4'-dimethoxytriphenylmethane	7500-76-7	-	-	N	N
74	Benzophenone	119-61-9	-	-	N	N
75	4-hydroxybenzophenone	1137-42-4	1.10E-06	2.60E-06	P	P
76	4,4'-dihydroxybenzophenone	611-99-4	1.24E-07	1.65E-06	P	P
77	2,4,4'-trihydroxybenzophenone	1470-79-7	4.38E-08	3.75E-07	P	P
78	4,4'-dimethoxybenzophenone	90-96-0	2.50E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
79	2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	1.06E-07	3.28E-07	P	P
80	4-hydroxyazobenzene	1689-82-3	1.64E-07	1.08E-06	P	P
81	3,3,3',3'-tetramethyl-1,1'-spirobisindane-5,5',6,6'-tetrol	77-08-7	1.43E-07	3.16E-06	P	P
82	4,4'-thiobis-phenol	2664-63-3	2.01E-08	2.14E-07	P	P
83	Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7	2.30E-06	PC ₁₀ (noPC ₅₀)	P	N
84	Octachlorostyrene	29082-74-4	-	-	N	N
85	Hematoxylin	517-28-2	-	-	N	N
86	Tributyltin chloride	1461-22-9	-	-	N	N

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number, PC₁₀ (PC₅₀) = the concentration of a test chemical at which the response is 10% (or 50% for PC₅₀) of the response induced by the positive control (E2, 1nM) in each plate, P = Positive, N = Negative

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 2 をもとに作成

Table 2 ER-STTA アンタゴニストバリデーション試験で測定が行われた 21 物質の測定結果

No.	Chemical	CASRN	ER STTA ¹ antagonist Classification	ER STTA ¹ Mean IC ₅₀ (M)
1	17β-estradiol	50-28-2	NEG	-
2	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	NEG	-
3	4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[phenol]	110726-28-8	POS	2.51 × 10 ⁻⁶
4	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	843-55-0	NEG	-
5	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	3.97 × 10 ⁻⁹
6	Apigenin	520-36-5	NEG	-
7	Atrazine	1912-24-9	NEG	-
8	Clomiphene citrate (cis and trans mixture)	50-41-9	POS	4.26 × 10 ⁻⁷
9	Dibenzo[a,h]anthracene	53-70-3	POS	No IC ₅₀
10	Dibutyl phthalate	84-74-2	NEG	-
11	Fenarimol	60168-88-9	NEG	-
12	Flavone	525-82-6	NEG	-
13	Flutamide	13311-84-7	NEG	-
14	Genistein	446-72-0	NEG	-
15	ICI 182,780	129453-61-8	POS	2.67 × 10 ⁻¹⁰
16	Methylpiperidinylpyrazole dihydrochloride	289726-02-9	POS	3.11 × 10 ⁻⁸
17	Mifepristone (Mifeprex)=RU-486	84371-65-3	POS	5.61 × 10 ⁻⁶
18	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	-
19	Raloxifene HCl	82640-04-8	POS	7.86 × 10 ⁻¹⁰
20	Resveratrol	501-36-0	NEG	-
21	Tamoxifen	10540-29-1	POS	4.91 × 10 ⁻⁷

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; M = molar; IC₅₀ = half maximal inhibitory concentration of test chemical; NEG = negative; POS = positive.

¹ The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (9)

※ 参考文献(3)の ANNEX2, Table 2 を引用

Table 3 アゴニストバリデーション試験において施設間比較に用いられた 10 物質

Chemical	CAS No.	Manufacturer	Lot. No.	Purity
17 β -Estradiol	50-28-2	Wako	ACK5754	99%
17 α -Estradiol	57-91-0	Wako	ELJ1532	97% ,HPLC ,for Biochem.
Genistein	446-72-0	Wako	VIR1711	98%
4-tert-Octylphenol	140-66-9	Wako	YWE9213	97% ,cGC ,for Environment Anal.
Bisphenol A	80-05-7	TCI	GF01	>99%
p-tert-Pentylphenol	80-46-6	Wako	KSQ2664	97% ,GC
17 α -Methyltestosterone	58-18-4	Wako	TPE6748	97% ,HPLC ,for Biochem.
Hematoxylin	517-28-2	Wako	LDK7723	N.S.
Diethylhexyl phthalate	117-81-7	Wako	ELE1799	97% ,GC
Benzophenone	119-61-9	Wako	RLH9114	99% ,cGC ,for Environment Anal.

TCI : Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

Wako : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

N.S. : not specified

※ 参考文献(4), Table 9 を引用

Table 4 アゴニストバリデーション試験において ICCVAM 参照分類との比較に用いられた 46 物質

Chemical	CAS No.	Manufacturer	Lot. No.	Purity
17 α -Ethinyl estradiol	57-63-6	Wako	KSN3933	98%
Diethylstilbestrol	56-53-1	Wako	7488C	N.S.
17 α -Estradiol	57-91-0	Wako	ELJ1532	97%
17 β -Estradiol	50-28-2	Wako	ACL1188	>97%
Zearalenone	17924-92-4	Sigma	50K4014	N.S.
Estrone	53-16-7	Wako	TPN4558	98%
Methyl testosterone	58-18-4	Wako	TPE6748	97%
Coumestrol	479-13-0	Fluka	400248	<95%
Genistein	446-72-0	Wako	NNP1712	98%
<i>p</i> -n-Nonylphenol	104-40-5	Wako		N.S.
Bisphenol B	77-40-7	TCI	FIC01	N.S.
Daidzein	486-66-8	Wako	HC-1408	97%
4-Cumylphenol	599-64-4	Wako	PAK1144	98%
Bisphenol A	80-05-7	TCI	GF01	>99%
<i>p,p'</i> -Methoxychlor	72-43-5	Wako	YWL9207	>97%
Apigenin	520-36-5	Aldrich	00902BU	N.S.
Tamoxifen	10540-29-1	ICN	4636C	N.S.
Kepone (Chlordecone)	143-50-0	Wako		99%
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	Wako	KSJ8408	99%
Kaempferol	520-18-3	Wako	ELK6128	95%
4- <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9	Wako	YWE9213	97%
Atrazine	1912-24-9	Wako	MSF9593	>98%
Progesterone	57-83-0	Sigma	98H0893	99%
Testosterone	58-22-0	Wako	ACG5233	>97%
Corticosterone	50-22-6	Sigma	128H0744	95%
Phenobarbital	57-30-7	Wako	ACE1373	98%
Vinclozolin	50471-44-8	Wako	HCQ9724	99%
Cyproterone acetate	427-51-0	Sigma	65H0687	N.S.
Flutamide	13311-84-7	Sigma	87H1511	98%
Linuron	330-55-2	Dr.Ehrensofter	70226	100%
Mifepristone	84371-65-3	Sigma	19H0828	98%
Procymidone	32809-16-8	Wako	HCH9638	99%
Clomiphene citrate	50-41-9	Sigma	28 0308	N.S.
Ethyl paraben	120-47-8	Wako	ELH6061	99%
Norethynodrel	68-23-5	Sigma	88F0192	N.S.
4-Androstenedione	63-05-8	Sigma	116H0463	98%
2- <i>sec</i> -Butylphenol	89-72-5	Wako	KSR1873	98%
Diethylhexyl phthalate	117-81-7	Wako	ELE1799	97%
Morin	480-16-0	Fluka	404144	N.S.
Phenolphthalin	81-90-3	Wako	ELP7131	N.S.
Haloperidol	52-86-8	ICN	85689	90%
Ketoconazole	65277-42-1	Wako	78353	N.S.

Reserpine	50-55-5	RBI	SNV-494A	97.5%
Spirolactone	52-01-7	Sigma	41K1534	97%
L-Thyroxine	51-48-9	TCI	GF01	98%
17 β -Trenbolone	10161-33-8	Sigma aldrich	024K0877	>98%

Aldrich : Aldrich Chemical Co., Inc. (Sigma-Aldrich corp.)

Fluka : Fluka Chemie AG (Sigma-Aldrich corp.) ICN : ICN Biomedicals, Inc.

Kanto : Kanto Chemical Co., Inc.

Sigma : Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich corp.) RBI : SIGMA-RBI

TCI : Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

Wako : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

N.S. : not specified

※ 参考文献(4), Table 6 を引用

Table 5 アゴニストバリデーション試験において ER 結合試験結果との比較に用いられた 48 物質

Chemical	CAS No.	Manufacturer	Lot. No.	Purity
Ethynyl estradiol	57-63-6	Wako	KSN3933	98%
17 β -Estradiol	50-28-2	Wako	ACL1188	>97%
Hexestrol	84-16-2	Wako	LDQ2218	N.S.
Estrone	53-16-7	Wako	TPN4558	98%
17 α -Estradiol	57-91-0	Wako	ELJ1532	97%
Norethynodrel	68-23-5	Sigma	88F0192	N.S.
Coumestrol	479-13-0	Fluka	400248	<95%
Genistein	446-72-0	Wako	NNP1712	98%
4- <i>tert</i> - Octylphenol	140-66-9	Wako	YWE9213	97%
Daidzein	486-66-8	Wako	HC-1408	97%
Nonylphenol (mixture)	25154-52-3	Aldrich	00504CU	N.S.
Bisphenol B	77-40-7	TCI	FIC01	N.S.
Testosterone propionate	57-85-2	Sigma	98H0566	N.S.
Bisphenol A	80-05-7	TCI	GF01	>99%
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	Wako	TPJ4827	95%
Kaempferol	520-18-3	Wako	ELK6128	95%
4- α -Cumylphenol	599-64-4	Wako	PAK1144	98%
17 α -Methyltestosterone	58-18-4	Wako	TPE6748	97%
Morin	480-16-0	Fluka	404144	N.S.
Vinclozolin	50471-44-8	Wako	HCQ9724	99%
Testosterone	58-22-0	Wako	ACG5233	>97%
Tamoxifen	10540-29-1	ICN	4636C	N.S.
Clomiphene citrate	50-41-9	Sigma	28 0308	N.S.
di(2-Ethylhexyl)phthalate	117-81-7	Wako	ELE1799	97%
RU-486	84371-65-3	Sigma	19H0828	98%
Methoxychlor	72-43-5	Wako	YWL9207	>97%
Fenarimol	60168-88-9	Kanto	707S7109	97%
<i>para-sec</i> -butylphenol	99-71-8	TCI	FHF01	>98%
Dibutyl phthalate	84-74-2	Wako		for Anal. of Phthalic Acid Esters
Phenolphthalin	81-90-3	Wako	ELP7131	N.S.
Cyproterone acetate	427-51-0	Sigma	65H0687	N.S.
Ethyl <i>p</i> -Hydroxybenzoate	120-47-8	Wako	ELH6061	99%
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	93-76-5	Wako	HCL9884	98.7%
<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	Wako	YWG9700	99%
Ketoconazol	65277-42-1	Wako	78353	N.S.
Androstenedione	63-05-8	Sigma	116H0463	98%
Progesterone	57-83-0	Sigma	98H0893	99%
Haloperidol	52-86-8	ICN	85689	90%
Medroxyprogesterone	520-85-4	Sigma	59H0579	N.S.
Spirolactone	52-01-7	Sigma	41K1534	97%
L-thyroxine	51-48-9	TCI	GF01	98%

Reserpine	50-55-5	RBI	SNV-494A	97.5%
Corticosterone	50-22-6	Sigma	128H0744	95%
Phenobarbital	50-06-6	Maruishi	8603	N.S.
Linuron = Lorox	330-55-2	Dr.Ehrensofter	70226	100%
Procymidon	32809-16-8	Wako	HCH9638	99%
Atrazine	1912-24-9	Wako	MSF9593	>98%
Flutamide	13311-84-7	Sigma	87H1511	98%

Aldrich : Aldrich Chemical Co., Inc. (Sigma-Aldrich corp.)

Fluka : Fluka Chemie AG (Sigma-Aldrich corp.) ICN : ICN Biomedicals, Inc.

Kanto : Kanto Chemical Co., Inc.

N.S. : not specified

Maruishi : Maruishi Pharmaceutical. Co., Ltd.

Sigma : Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich corp.) RBI : SIGMA-RBI

TCI : Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

Wako : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

※ 参考文献(4), Table 7 を引用

Table 6 アゴニストバリデーション試験において子宮肥大試験結果との比較に用いられた 48 物質

Chemical	Cas No.	Manufacture	Lot No.	Purity
Ethynyl Estradiol	57-63-6	Wako	KSN3933	>97%
Equilin	474-86-2	Sigma	97H1529	100%
Estrone	53-16-7	Wako	TPN4558	98%
17 α -Estradiol	57-91-0	Wako	ACL1188	>97%
Zearalenone	17924-92-4	Sigma	50K4014	N.S.
4-(1-Adamantyl)phenol	29799-07-3	Aldrich	11608MR	97%
2,2-bis(4-Hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	6807-17-6	Wako	PTM1337	100%
Genistein	446-72-0	Wako	NNP1712	98%
Norethrinrone	68-22-4	Wako	DWM4647	100%
4- <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9	Wako	09802JQ	99%
4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	Aldrich	05328PI	97%
Daidzein	486-66-8	Wako	HC-1408	97%
Nonylphenol (mixture)	25154-52-3	Kanto	109281	97%
Bisphenol B	77-40-7	TCI	FIC01	100%
4,4'-Thiobisphenol	2664-63-3	TCI	JC01	100%
Testosterone enanthate	315-37-7	Wako	KSL4869	100%
Bisphenol A	80-05-7	TCI	GF01	>99%
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	Wako	ELN6605	98%
2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	1470-79-7	Aldrich	04417JN	95%
<i>p</i> -Dodecyl-phenol	104-43-8	Kanto	209D2209	N.S.
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	Wako	TPJ4827	95%
4-Hydroxyazobenzene	1689-82-3	Wako	LDM7343	96%
4-Cyclohexylphenol	1131-60-8	TCI	FIJ01	100%
4- α -Cumylphenol	599-64-4	Wako	PAK1144	98%
4,4'-Dihydroxybenzophenone	611-99-4	Wako	LDR1808	99%
4-Hydroxybenzophenone	1137-42-4	Aldrich	04419CO	98%
3,3,3',3'-Tetramethyl-1,1'-spirobisindane-5,5',6,6'-tetrol	77-08-7	TCI	GG01	99%
<i>p</i> -(<i>tert</i> - Pentyl)phenol	80-46-6	Wako	ELF1567	100%
4-(Phenylmethyl)phenol	101-53-1	TCI	FHG01	100%
17 α -Methyltestosterone	58-18-4	Wako	ELG7538	100%
4- <i>n</i> -Amylphenol	14938-35-3	TCI	FIF01	99%
4,4'-(Octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene) bisphenol	1943-97-1	ACROS	A008394601	100%
Levonorgestrel	797-63-7	Sigma	30K0711	99%
Methoxychlor	72-43-5	Wako	YWL9207	>97%
4- <i>n</i> -Octylphenol	1806-26-4	Wako	JSL9944	99%
Diphenyl- <i>p</i> -Phenylenediamine	74-31-7	Wako	ELH7269	97%
4,4'-Dimethoxybenzophenone	90-96-0	TCI	FIH01	100%
Dicyclohexyl phthalate	84-61-7	Wako	RIG9061	100%
Diethyl phthalate	84-66-2	Wako	ELH6895	99%
di- <i>n</i> -Butyl phthalate	84-74-2	Wako	ACE7193	N.S.
di(2-Ethylhexyl)adipate	103-23-1	Wako	LDR4958	100%

<i>p-n</i> -Nonylphenol	104-40-5	TCI	10425	99%
di(2-Ethylhexyl)phthalate	117-81-7	Wako	ELH6895	99%
Benzophenone	119-61-9	Wako	HCM9879	100%
Tributyltin chloride	1461-22-9	Wako	LDN5508	98%
Octachlorostyrene	29082-74-4	Kanto	106121	100%
Hematoxylin	517-28-2	Sigma	99H3645	N.S.
4,4'-Dimethoxytriphenylmethane	7500-76-7	ERC	1040701	100%

Aldrich : Aldrich Chemical Co., Inc. (Sigma-Aldrich corp.)

Fluka : Fluka Chemie AG (Sigma-Aldrich corp.) ICN : ICN Biomedicals, Inc.

Kanto : Kanto Chemical Co., Inc.

N.S. : not specified

Sigma : Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich corp.)

RBI : SIGMA-RBI

TCI : Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

Wako : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

※ 参考文献(4), Table 8 を引用

Table 7 アンタゴニストバリデーション試験 Task3 において施設内再現性、施設間再現性の評価の用いられた 20 物質

Code	Chemical name	CASRN	Manufacturer	Catalog ID.	Lot No.
ATG001	ICI 182,780	129453-61-8	Sigma	I4409	068K4711
ATG002	Mifepristone (Mifeprex, RU-486)	84371-65-3	Sigma	M8046	125K1071
ATG003	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene) diphenol	1478-61-1	TCI	B0945	MMSFBTQ
ATG004	Methylpiperdinylnpyrazole dihydrochloride	289726-02-9	Sigma-Aldrich	M7068	076K47051
ATG005	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	Sigma	H7904	018K4132
ATG006	Raloxifene HCl	82640-04-8	Wako (LKT Labs, Inc)	513-22901(R0243)	23923004
ATG007	Clomiphene citrate(cis and trans mixture)	50-41-9	Sigma	C6272	126K1525
ATG008	Dibutyl phthalate	84-74-2	Wako	047-16521	ALQ8564
ATG009	Atrazine	1912-24-9	Wako	010-15631	TSG9681
ATG010	Flutamide	13311-84-7	Wako Wako	069-04851 069-04851	WKR0694 PEF2340
ATG011	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	843-55-0	Wako	028-11071	DPR2259
ATG012	4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[phenol]	110726-28-8	Wako	322-28032	EWH0280
ATG013	Apigenin	520-36-5	Wako	012-18913	PEK4270
ATG014	Genistein	446-72-0	Sigma Sigma	G6649 G6649	018K1203 098K0735
ATG015	Dibenzo[a,h]anthracene	53-70-3	Wako Wako	041-26791 041-26791	HSQ8748 EPQ4053
ATG016	p-n-nonylphenol	104-40-5	Wako	146-06791	DPF8978
ATG017	Flavone	525-82-6	Wako	061-02231	PEM1887
ATG018	Resveratrol	501-36-0	Sigma	R5010	038K5202
ATG019	Fenarimol	60168-88-9	Supelco Supelco	PS1073 PS1073	393-118B 404-67B
ATG020	17 β -estradiol	50-28-2	Wako Wako	056-04044 056-04044	ALL2384 ALH5038
	Tamoxifen*	10540-29-1	Sigma Sigma	T5648 T5648	117K1079 089K1381

* Tamoxifen は、参照化合物としてのみ測定された

※ 参考文献(4), Part B, Table 2-1,2-2 をもとに作成

Table 8 アンタゴニストバリデーション試験における施設内再現性

Activity per Test	CERI	OTSUKA	KANEKA	HIYOSHI
Agreement Within Laboratory	19/20 (95%)	19/19 (100%)	8/12 (67%)	18/20 (90%)
Positive candidate	8/9	9/9	3/5	8/9
Negative candidate	9/9	8/9	6/7	8/9
Unknown	2/2	1/1	0/1	2/2
Discordance Within Laboratory	1/20 (5%)	0/19 (0%)	4/12 (33%)	2/20 (10%)
Positive candidate (Results*)	1/9 (NNP)*	0/9	2/5 (PPPPNP) (PPPNP)	1/9 (NPP)
Negative candidate (Results)	0/9	1/9 (PNN)	1/6 (NNNPN)	1/9 (NPP)
Unknown (Results)	0/2	0/1	1/1 (PNNNNN)	0/2

*: Details of discordant results, (NNP) means two negatives and one positive.

※ 参考文献(3), ANNEX2, Table 5 を引用

Table 9 アンタゴニストバリデーション試験における施設間再現性および文献情報等から予想された作用との比較

Code	Chemical name	Candidate effect	CERI	OTSUKA	KANEKA	HIYOSHI	Total
ATG001	ICI 182,780	strong	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG002	Mifepristone(Mifeprex) = RU-486	mild	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG003	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	Negative in ER STTA assay	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG004	Methylpiperidinylpyrazole dihydrochloride	mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG005	4-Hydroxytamoxifen	moderate	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG006	Raloxifene HCl	moderate	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG007	Clomiphene citrate(cis and trans mixture)	moderate	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG008	Dibutyl phthalate	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG009	Atrazine	Negative	Negative	Negative		Positive	Negative (2/3)
ATG010	Flutamide	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG011	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	Negative in ER STTA assay	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG012	4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[phenol]	mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG013	Apigenin	Negative	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG014	Genistein	Negative*	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG015	Dibenzo[a,h]anthracene	Positive*	Negative	Positive		Positive	Positive (2/3)
ATG016	p-n-nonylphenol	not tested	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG017	Flavone	Negative*	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG018	Resveratrol	Negative*	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG019	Fenarimol	not tested	Negative			Negative	Negative (2/2)
ATG020	17β-estradiol	Negative*	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)

2x2 table analysis compared with candidate effects

Accuracy: 94% 100% 100% 94% 100% (97%)**

Sensitivity: 88% 100% 100% 100% 100% (97%)**

Specificity: 100% 100% 100% 88% 100% (97%)**

* classified positive/negative according to literature review

**Performance compared with candidate effect excluding chemicals noted as "not tested"(n=18), parentheses indicate the value based on the total number of tests.

※ 参考文献(4), Part B, Table19 を引用

Table 10 アゴニストバリデーション試験結果と ICCVAM 参照分類との比較結果

A: 個別試験データ

No	Chemical	CASRN	ER STTA agonist assay				Updated Classifications of Chemical
			PC10 (M)	PC50 (M)	PC10 based class	PC50 based class	ICCVAM class
1	Atrazine	1912-24-9	-	-	N	N	N
2	Corticosterone	50-22-6	-	-	N	N	N
3	Haloperidol	52-86-8	-	-	N	N	N
4	Ketoconazole	65277-42-1	-	-	N	N	N
5	Linuron	330-55-2	-	-	N	N	N
6	Phenobarbital(Na)	57-30-7	-	-	N	N	N
7	Reserpine	50-55-5	-	-	N	N	N
8	Spironolactone	52-01-7	-	-	N	N	N
9	Flutamide	13311-84-7	-	-	N	N	N
10	Procymidone	32809-16-8	-	-	N	N	N
11	Ethyl paraben	120-47-8	5.00E-06	PC10(noPC50)	P	N	P
12	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	1.23E-06	PC10(noPC50)	P	N	P
13	Tamoxifen	10540-29-1	1.49E-07	PC10(noPC50)	P	N	P
14	Clomiphene citrate	50-41-9	3.68E-08	PC10(noPC50)	P	N	P
15	Zearalenone b	17924-92-4	2.44E-11	6.44E-10	P	P	P
16	17β-Estradiol	50-28-2	<1.00E-11	<1.00E-11	P	P	P
17	17β-Trenbolone	10161-33-8	1.78E-08	2.73E-07	P	P	P
18	17α-Estradiol	57-91-0	7.24E-11	6.44E-10	P	P	P
19	17α-Ethinyl estradiol	57-63-6	<1.00E-11	<1.00E-11	P	P	P
20	4-Cumylphenol	599-64-4	1.49E-07	1.60E-06	P	P	P
21	4-tert-Octylphenol	140-66-9	1.85E-09	7.37E-08	P	P	P
22	Apigenin	520-36-5	1.31E-07	5.71E-07	P	P	P
23	BisphenolA	80-05-7	2.02E-08	2.94E-07	P	P	P
24	BisphenolB	77-40-7	2.36E-08	2.11E-07	P	P	P
25	Butylbenzyl phthalate	85-68-7	1.14E-06	4.11E-06	P	P	P
26	Coumestrol	479-13-0	1.23E-09	2.00E-08	P	P	P
27	Daidzein	486-66-8	1.76E-08	1.51E-07	P	P	P
28	Diethylstilbestrol	56-53-1	<1.00E-11	2.04E-11	P	P	P
29	Estrone	53-16-7	3.02E-11	5.88E-10	P	P	P
30	Genistein	446-72-0	2.24E-09	2.45E-08	P	P	P
31	Kaempferol	520-18-3	1.36E-07	1.21E-06	P	P	P
32	Kepone(Chlordecone)	143-50-0	7.11E-07	7.68E-06	P	P	P
33	Methyl testosterone	58-18-4	1.73E-07	4.11E-06	P	P	P
34	Morin	480-16-0	5.43E-07	4.16E-06	P	P	P
35	Norethynodrel	68-23-5	1.11E-10	1.50E-09	P	P	P

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number, PC10 (PC50) = the concentration of a test chemical at which the response is 10% (or 50% for PC50) of the response induced by the positive control (E2, 1nM) in each plate, P = Positive, N = Negative

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 2 をもとに作成

B: 集計表

		STTA (PC10 based)		
		Positive	Negative	Total
Updated classification of ICCVAM Chemicals	Positive	25	0	25
	Negative	0	10	10
	Total	25	10	35

Overall Accuracy	100%	35/35
Sensitivity	100%	25/25
Specificity	100%	10/10
False positive	0%	0/10
False negative	0%	0/25
Positive predictivity	100%	25/25
Negative predictivity	100%	10/10

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 8 を引用

Table 11 アゴニストバリデーション試験結果と ER 結合試験データとの比較

A: 個別試験データ

No	Chemical	CASRN	ER STTA agonist assay				ER Binding Assay	
			PC10 (M)	PC50 (M)	PC10 based class	PC50 based class	ER-RBA E2=100%	ER-RBA class
1	Atrazine	1912-24-9	-	-	N	N	N.B.	N
2	Corticosterone	50-22-6	-	-	N	N	N.B.	N
3	Haloperidol	52-86-8	-	-	N	N	N.B.	N
4	Ketoconazole	65277-42-1	-	-	N	N	N.B.	N
5	Linuron	330-55-2	-	-	N	N	N.B.	N
7	Reserpine	50-55-5	-	-	N	N	N.B.	N
8	Spironolactone	52-01-7	-	-	N	N	N.B.	N
9	Flutamide	13311-84-7	-	-	N	N	N.B.	N
10	Procymidone	32809-16-8	-	-	N	N	N.B.	N
11	Ethyl p paraben	120-47-8	5.00E-06	PC10(noPC50)	P	N	N.B.	N
12	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	1.23E-06	PC10(noPC50)	P	N	0.00238	P
13	Tamoxifen	10540-29-1	1.49E-07	PC10(noPC50)	P	N	47	P
14	Clomiphene citrate	50-41-9	3.68E-08	PC10(noPC50)	P	N	37	P
16	17β-Estradiol	50-28-2	<1.00E-11	<1.00E-11	P	P	126	P
18	17α-Estradiol	57-91-0	7.24E-11	6.44E-10	P	P	80.1	P
19	17α-Ethinyl estradiol	57-63-6	<1.00E-11	<1.00E-11	P	P	142	P
20	4-Cumylphenol	599-64-4	1.49E-07	1.60E-06	P	P	0.107	P
21	4-tert-Octylphenol	140-66-9	1.85E-09	7.37E-08	P	P	0.124	P
23	BisphenolA	80-05-7	2.02E-08	2.94E-07	P	P	0.195	P
24	BisphenolB	77-40-7	2.36E-08	2.11E-07	P	P	0.593	P
26	Coumestrol	479-13-0	1.23E-09	2.00E-08	P	P	0.264	P
27	Daidzein	486-66-8	1.76E-08	1.51E-07	P	P	0.18	P
29	Estrone	53-16-7	3.02E-11	5.88E-10	P	P	44.2	P
30	Genistein	446-72-0	2.24E-09	2.45E-08	P	P	0.12	P
31	Kaempferol	520-18-3	1.36E-07	1.21E-06	P	P	0.029	P
33	Methyl testosterone	58-18-4	1.73E-07	4.11E-06	P	P	N.D.	N
34	Morin	480-16-0	5.43E-07	4.16E-06	P	P	0.0011	P
35	Norethynodrel	68-23-5	1.11E-10	1.50E-09	P	P	0.282	P
36	Phenolphthalin	81-90-3	-	-	N	N	N.D.	N
37	Progesterone	57-83-0	-	-	N	N	N.B.	N
38	Cyproterone acetate	427-51-0	-	-	N	N	N.D.	N
39	Mifepristone	84371-65-3	-	-	N	N	0.0594	P
40	Diethylhexyl phthalate	117-81-7	-	-	N	N	0.071	P
41	L-Thyroxine	51-48-9	1.32E-06	PC10(noPC50)	P	N	N.B.	N
42	4-Androstenedione	63-05-8	2.56E-07	PC10(noPC50)	P	N	N.B.	N
43	Testosterone	58-22-0	2.82E-08	9.78E-06	P	P	N.D.	N
44	Vinclozolin	50471-44-8	1.33E-07	7.65E-06	P	P	N.B.	N
45	Dibutyl phthalate	84-74-2	-	-	N	N	N.D.	N
46	Nonylphenol	25154-52-3	1.37E-08	1.58E-07	P	P	0.143	P
47	Phenobarbital	50-06-6	-	-	N	N	N.B.	N
48	Medroxyprogesterone	520-85-4	-	-	N	N	N.B.	N
49	DHT	521-18-6	1.04E-07	5.28E-07	P	P	0.0218	P
50	Testosterone propionate	57-85-2	2.03E-09	2.91E-07	P	P	N.B.	N
51	Fenarimol	60168-88-9	-	-	N	N	0.00179	P
52	p,p'-DDE	72-55-9	-	-	N	N	N.B.	N
53	Hexestrol	84-16-2	<1.00E-11	2.75E-11	P	P	37.6	P
54	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	93-76-5	-	-	N	N	N.B.	N
55	para-sec-butylphenol	99-71-8	1.38E-06	PC10(noPC50)	P	N	0.00177	P

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number, PC10 (PC50) = the concentration of a test chemical at which the response is 10% (or 50% for PC50) of the response induced by the positive control (E2, 1nM) in each plate, P = Positive, N = Negative

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 2 をもとに作成

B: 集計表

		STTA (PC10 based)		
		Positive	Negative	Total
ER binding assay	Positive	21	3	24
	Negative	7	17	24
	Total	28	20	48

Overall accuracy	79%	38/48
Sensitivity	88%	21/24
Specificity	71%	17/24
False positive	29%	7/24
False negative	13%	3/24
Positive predictivity	75%	21/28
Negative predictivity	85%	17/20

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 9 を引用

Table 12 アゴニストバリデーション試験結果と子宮肥大試験との比較

A: 個別試験データ

No	Chemical	CASRN	ER STTA agonist assay				Uterotrophic Assay
			PC10 (M)	PC50 (M)	PC10 based class	PC50 based class	Utero. Class
12	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	1.23E-06	PC10(noPC50)	P	N	N
15	Zearalenone_b	17924-92-4	2.44E-11	6.44E-10	P	P	P
18	17 α -Estradiol	57-91-0	7.24E-11	6.44E-10	P	P	P
19	17 α -Ethinyl_estradiol	57-63-6	<1.00E-11	<1.00E-11	P	P	P
20	4-Cumylphenol	599-64-4	1.49E-07	1.60E-06	P	P	P
21	4-tert-Octylphenol	140-66-9	1.85E-09	7.37E-08	P	P	P
23	BisphenolA	80-05-7	2.02E-08	2.94E-07	P	P	P
24	BisphenolB	77-40-7	2.36E-08	2.11E-07	P	P	P
27	Daidzein	486-66-8	1.76E-08	1.51E-07	P	P	N
29	Estrone	53-16-7	3.02E-11	5.88E-10	P	P	P
30	Genistein	446-72-0	2.24E-09	2.45E-08	P	P	P
33	Methyl_testosterone	58-18-4	1.73E-07	4.11E-06	P	P	P
40	Diethylhexyl_phtalate	117-81-7	-	-	N	N	N
45	Dibutyl phthalate	84-74-2	-	-	N	N	N
46	Nonylphenol	25154-52-3	1.37E-08	1.58E-07	P	P	P
49	DHT	521-18-6	1.04E-07	5.28E-07	P	P	P
56	Norgestrel	797-63-7	1.05E-07	PC10(noPC50)	P	N	P
57	Norethindrone	68-22-4	1.01E-09	4.95E-08	P	P	P
58	Equilin	474-86-2	<1.00E-11	7.54E-11	P	P	P
59	Dicyclohexyl phtalate	84-61-7	2.53E-06	PC10(noPC50)	P	N	N
60	Diethyl phtalate	84-66-2	4.46E-06	PC10(noPC50)	P	N	N
61	di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1	-	-	N	N	N
62	p-dodecyl-phenol	104-43-8	2.36E-08	4.10E-07	P	P	P
63	4-n-octylphenol	1806-26-4	1.26E-06	PC10(noPC50)	P	N	N
64	4-n-amyphenol	14938-35-3	1.78E-07	4.62E-06	P	P	P
65	Testosterone_ enanthate	315-37-7	1.71E-08	2.71E-07	P	P	P
66	p-(tert-pentyl)phenol	80-46-6	4.02E-07	3.46E-06	P	P	P
67	4-cyclohexylphenol	1131-60-8	6.43E-08	1.51E-06	P	P	P
68	4-(1-adamantyl)phenol	29799-07-3	1.25E-09	1.86E-08	P	P	P
69	4-(phenylmethyl)-phenol	101-53-1	1.20E-06	4.07E-06	P	P	P
70	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	6807-17-6	1.89E-09	1.99E-08	P	P	P
71	4,4'-exafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	6.91E-09	8.02E-08	P	P	P
72	4,4'-(octahydro-4,7-methano-5H-inden-5-ylidene)bisphenol	1943-97-1	3.72E-08	PC10(noPC50)	P	N	P
73	4,4'-dimethoxytriphenylmethane	7500-76-7	-	-	N	N	N
74	Benzophenone	119-61-9	-	-	N	N	N
75	4-hydroxybenzophenone	1137-42-4	1.10E-06	2.60E-06	P	P	P
76	4,4'-dihydroxybenzophenone	611-99-4	1.24E-07	1.65E-06	P	P	P
77	2,4,4'-trihydroxybenzophenone	1470-79-7	4.38E-08	3.75E-07	P	P	P
78	4,4'-dimethoxybenzophenone	90-96-0	2.50E-06	PC10(noPC50)	P	N	N
79	2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	1.06E-07	3.28E-07	P	P	P
80	4-hydroxyazobenzene	1689-82-3	1.64E-07	1.08E-06	P	P	P
81	3,3,3',3'-tetramethyl-1,1'-spirobisindane-5,5',6,6'-tetrol	77-08-7	1.43E-07	3.16E-06	P	P	N
82	4,4'-thiobis-phenol	2664-63-3	2.01E-08	2.14E-07	P	P	P
83	Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7	2.30E-06	PC10(noPC50)	P	N	P
84	Octachlorostyrene	29082-74-4	-	-	N	N	N
85	Hematoxylin	517-28-2	-	-	N	N	N
86	Tributyltin-chloride	1461-22-9	-	-	N	N	N

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number, PC10 (PC50) = the concentration of a test chemical at which the response is 10% (or 50% for PC50) of the response induced by the positive control (E2, 1nM) in each plate, P = Positive, N = Negative

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 2 をもとに作成

B: 集計表

		STTA (PC10 based)		
		Positive	Negative	Total
Uterotrophic assay	Positive	32	0	32
	Negative	7	9	16
	Total	39	9	48

Overall accuracy	85%	41/48
Sensitivity	100%	32/32
Specificity	56%	9/16
False positive	44%	7/16
False negative	0%	0/32
Positive predictivity	82%	32/39
Negative predictivity	100%	9/9

※ 参考文献(1)の ANNEX2, Table 10 を引用