

評価会議報告書

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)

JaCVAM 評価会議

平成 28 年 (2016 年) 12 月 6 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄 (運営委員会推薦)：座長
飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
金子 和弘 (日本化学工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
谷川 浩子 (日本動物実験代替法学会)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
森田 健 (日本環境変異原学会)
山田 隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
横関 博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
吉田 武美 (日本毒性学会)
吉村 功 (座長推薦)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

大野 泰雄 (運営委員会推薦)：座長
飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会)
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井 俊司 (日本化学工業協会)
中村 りこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関 博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

hER α -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 (Estrogen receptor : ER) 恒常発現系転写活性化試験法 : The Stably Transfected TA assay using the human ER α -HeLa-9903 cell line (ER STTA 法、以下、本試験法) 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 HeLa 細胞に導入された ER α の活性化によって起こ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。

本試験法のバリデーション研究については、ER α アゴニストと ER α アンタゴニストについて、それぞれ独立した施設間バリデーション研究が実施された。アゴニスト試験バリデーション報告書¹⁾ は、OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) に 2006 年に提出され、アンタゴニスト試験バリデーション報告書²⁾ は、2014 年に提出された。前者は 2009 年に試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) 455 として承認され³⁾、後者は 2015 年に TG455 の改訂版として TG となった⁴⁾。JaCVAM (Japanese Center for Validation of Alternative Methods) 評価会議は、内分泌かく乱試験法資料編纂委員会により作成された「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) を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称 : 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)

代替する対象毒性試験 : *in vivo* 試験法の「げっ歯類を用いる子宮肥大試験」(OECD TG440, 2007)⁵⁾ を代替する試験法である。類似の試験法として、*in vitro* 試験法の「ラット子宮エストロゲン受容体結合性試験」(OECD TG 493, 2015)⁶⁾ と「BG1Luc4E2 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験 : BG1Luc estrogen receptor transactivation assay (BG1Luc ER TA)」(OECD TG 457, 2012)⁷⁾ がある。

試験法の概略 : 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、本試験法は、HeLa 細胞にヒト ER α を恒常的に発現するプラスミドとエストロゲン応答配列 (Estrogen responsive element : ERE) の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・安定発現させた細胞 (hER α -HeLa-9903 細胞) を用いる。この細胞に被験物質を曝露した後のルシフェラーゼ活性の変化を測定する。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

アゴニストを評価する試験法に関しては、(一財) 化学物質評価研究機構が中心となって、4 試験施設が参加したバリデーション研究が実施された。その報告書が 2006 年に OECD に

提出され、2009年にTG455として承認された。この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（Performance-Based Test Guideline:PBTG）⁸⁾に更新され、あわせてアゴニスト試験の性能基準（Performance Standards:PS）が公開された⁹⁾。アンタゴニストを評価する試験法に関しては、JaCVAMが中心となって、最終的に4試験施設でバリデーション研究が実施された。アンタゴニストバリデーション報告書は、先に提出されたアゴニストについての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評価法（part A）とアンタゴニスト評価法（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た²⁾。これらのバリデーション報告書に基づき、2014年にアンタゴニスト試験を包含するTG455改訂案がOECDに提出され、承認された。これらの資料を用いて、JaCVAM内分泌かく乱試験法資料編纂委員会が評価し、報告書としてまとめたものを評価資料とした。

本試験法はHeLa細胞にヒトER α を導入し、強制発現させたhER α -HeLa-9903細胞を用い、アゴニストおよびアンタゴニストの両者を検出できるような*in vitro*試験法にしたものである。水やDimethyl sulfoxide（DMSO）等に溶解する広範な被験物質に適用できる点で価値が高い。類似のER転写活性化試験法であるBG1Luc ER TAで用いられるBG1Luc細胞は、ER α 型/ER 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ている。これに対して、本試験法では、純粋にヒトER α のみを介した作用を検出可能であるが、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試験法の結果は同等と考えられ、ERを介して作用する化学物質をスクリーニングする方法として科学的な妥当性があると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は単にアンタゴニストとERとの結合にとど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。ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）参照分類、ER結合試験、子宮肥大試験等の結果との一致度、本試験法の感度、特異度は良好であり、偽陽性や偽陰性は少ないという結果を示している。

BG1Luc ER TA試験法に比し感度が高く、アゴニスト、アンタゴニストを1/100の濃度で検出できる。

本試験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の結果をICCVAM参照分類との比較した結果、一致率は100%であった。エストロゲン活性の検出に用いられる既存の細胞系（内在性のヒトERを利用するBG1細胞）などと比較しても、陽性物質や陰性物質の識別性は良好である。本試験法で用いているhER α -HeLa-9903細胞は増殖が早いいため、試験準備のための時間を短くすることができ、多数の化学物質のスクリーニングに向いている。

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偽陽性（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。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が、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必要がある。OECD TG で示された ER α アゴニストおよび ER α アンタゴニスト試験それぞれの熟達度確認物質 14 物質と 10 物質を用いて用量-応答性を調べておくことが必要である。また、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 hER α -HeLa-9903 細胞に影響しないことを検証する必要がある。

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。今後の検討が期待される。また、代謝されてから ER α アゴニストおよび ER α アンタゴニスト作用を示す物質の評価も行えない。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は遺伝子組み換えにより作製された hER α -HeLa-9903 細胞を用いる試験法であり、生きた動物を用いないという点で、3Rs の精神に合致している。この試験で必要な技術は、培養細胞を用いる試験法一般の技術および細胞の発光を測定する技術であり、適切な訓練によって容易に習得できるものである。また、本試験のために必要な機器は、通常の細胞培養に要する装置のほか、細胞発光の測定に用いる光度計であり、高価なものでない。細胞も公的な細胞バンクから入手可能である。以上より、本試験法の社会的受け入れ性は高いと考える。

行政上の利用性：

本試験法は培養細胞を用いる *in vitro* 試験法であり、化学物質のエストロゲン受容体への作用の有無を評価でき、誤評価が少ないことから、類似試験法である BG1Luc ER TA 法と同じ程度に¹⁰⁾、行政上利用が可能であると考えられる。

引用文献

- 1) Takeyoshi, M. (2006), Draft Report of Pre-validation and Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p1-188.
- 2) OECD (2015), Report of the inter-laboratory validation for stably transfected transactivation assay to detect estrogenic and anti-estrogenic activity, Series on Testing & Assessment No. 225.
- 3) OECD (2009), Test No. 455: The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha

Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals

- 4) OECD (2015), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists
- 5) OECD (2007), Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents
- 6) OECD (2015), Test No. 493: Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity
- 7) OECD (2012) Test No. 457: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists
- 8) OECD (2012), Test No. 455, Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists
- 9) OECD (2012) Performance standards for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen agonists for TG 455, Series on Testing & Assessment No. 173.
- 10) JaCVAM 評価会議報告書（平成 25 年 6 月 11 日）ヒトエストロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出する BG1Luc ER TA 法