

評価会議報告書

**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**

JaCVAM 評価会議

平成 30(2018)年 12 月 25 日

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
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)
稲若邦文 (日本化学工業協会)
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)
久保文宏 (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)
中村るりこ (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/済生会宇都宮病院)
西村次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
平林容子 (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)
増村健一 (日本環境変異原学会)
横関博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期:平成 30 年 4 月 1 日～平成 32 年 3 月 31 日

AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体 (Androgen receptor: AR) 恒常発現系転写活性化試験法: Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities: AR-EcoScreen™ (AR STTA 法、以下、本試験法)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のスクリーニング評価のために開発されたものである。本試験法は CHO-K1 細胞に導入した 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る。

本試験法については、AR アゴニストと AR アンタゴニストについてそれぞれ多施設間バリデーション研究が実施され^{1,2)}、OECD 専門家会議によりその正確性および信頼性が評価され、2016 年に OECD テストガイドライン TG458³⁾として承認された。

JaCVAM 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「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の評価報告書」(平成 30 年 10 月 1 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: 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)

代替する対象毒性試験: ラットにおけるハーシュバーガー試験: (抗)アンドロゲン様作用の短期スクリーニング試験 (OECD TG441, 2009)⁴⁾。

試験法の概略: 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、本試験法は、CHO-K1 細胞にヒト AR を恒常的に発現するプラスミドとアンドロゲン応答配列 (Androgen Responsive Element: ARE) の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・安定発現させた細胞 (AR-EcoScreen™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

本試験法については 2 回のバリデーション研究が実施されている。第 1 回バリデーション研究¹⁾は、2004 年に(一財)化学物質評価研究機構 (CERI) が中心となって、国内 4 施設の参加により実施された。本研究では、陽性対照 1 物質を含む計 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が実施された。一方、第 1 回バリデーション報告書の OECD による評価において、測定された物質数が 5 物質と限られており、将来、性能標準を設定する際の参照物質として選択できる物質数が少ないことが指摘され、追加のバリデーション研究が実施された。第 2 回バリデーション研究²⁾は、OECD VMG-NA (OECD Validation Management Group for Non-Animal Tests)

で組織された研究管理グループから提案されたアゴニスト・アンタゴニストそれぞれ 5 物質ずつを用いて、国内 3 施設、海外 1 施設の計 4 施設の参加による国際バリデーション研究として 2013 年より開始された。OECD では、これらのバリデーション研究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 (OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment) で提案された OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters のレベル 2 (選択された内分泌機構／経路に関する情報をもたらす *in vitro* アッセイ(哺乳類および非哺乳類の方法)) 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妥当性が認められ、OECD TG458³⁾ が承認された。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、CHO-K1 細胞にヒト AR とラット前立腺 C3 遺伝子の ARE を上流に持つレポーター遺伝子を導入し、安定発現させた AR-EcoScreen™ 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する *in vitro* 試験法である。類似の AR 転写活性化試験法⁵⁾ では MMTV (mouse mammary tumor virus) プロモーターの ARE を導入した MDA-kb2 細胞を用いており、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 作用物質と GR 作用物質の区別ができない。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 作用物質への反応をほとんど示さないため AR 作用物質に対する特異性が高い。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⁶⁾ されている。以上のことから、本試験法は AR 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

本試験法は単に化学物質と AR との結合にとどまらず、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。試験に供した物質数が少ないという問題はあるが、各 4 施設において実施された 2 回のバリデーション研究^{1),2)} におけるアゴニスト検出試験・アンタゴニスト検出試験 (アゴニスト陽性計 5 物質、アンタゴニスト陽性計 5 物質、陰性計 5 物質) の結果、陽性・陰性判定の一致率はいずれも 100% であった。また、本試験法は定量的評価法として開発され、バリデーション研究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。

本試験法は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指標として、同一細胞で細胞毒性の評価を可能とすることで試験にかかる時間が短くなり、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、AR 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る発光により評価が可能である。

溶媒として水、エタノール(>95%)あるいはジメチルスルホキシド(DMSO)が用いられているが、これら以外の溶媒を使用する場合は、AR-EcoScreen™細胞に影響しないことを確認する必要がある。また、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、当該物質への適用はできない。さらに、体内で代謝されて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、本試験法では評価はできない。

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AR-EcoScreen™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。この試験に必要な技術は、細胞培養を用いる試験法一般の技術、および細胞の抽出液のルシフェラーゼ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、化学発光の測定に用いる光度計であり、高価なものではない。細胞も公的な細胞バンクから入手可能である。以上のことから、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スクリーニング法として、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 (2010) 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. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/46755800.pdf>
- 2) OECD (2015) 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. Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Doc-id-381096-ARTA-Draft-Validation-report-clean.pdf>
- 3) OECD TG458 (2016) Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals. Accessible at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788

- 4) OECD TG441 (2009) Hershberger bioassay in rats: A short-term screening assay for (anti) androgenic properties. Accessible at https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
- 5) Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE Jr. (2002) 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.
- 6) Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai F (2005) Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen System). *J Health Sci* 51:557–568.