

新規試験法提案書

AR STTA法（AR-EcoScreenTM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）

平成31年 2 月

国立医薬品食品衛生研究所

新規試験法提案書

平成 31 年 2 月 19 日

No. 2018-03

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）に関する提案

平成 31 年 2 月 19 日に国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容： 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）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。

この提案書は、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test Guideline (TG) 458; Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicalsなどをもとに、内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として AR STTA 法を提案するものである。

大野泰雄 

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長

平林容子 

平林容子

JaCVAM 運営委員会 委員長

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)
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)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
野口真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
森田 健 (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 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日

* : 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日

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

JaCVAM 運営委員会

- 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) : 委員長
石井孝司 (国立感染症研究所)
大原拓 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課)
小川久美子 (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 病理部)
奥田晴宏 (国立医薬品食品衛生研究所)
諫田泰成 (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 薬理部)
北嶋聡 (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 毒性部)
小池紘一郎 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
高木篤也 (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 毒性部 動物管理室)
東野正明 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
蛭田浩一 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
広瀬明彦 (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 安全性予測評価部)
笛木修 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
淵岡学 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
本間正充 (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 変異遺伝部)
小島肇 (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 安全性予測評価部
第二室) : 事務局

JaCVAM statement on the Stably Transfected human Androgen Receptor Transcriptional Activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals using the AR-EcoScreen™ cell line

At a meeting held on 19 February 2019 at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Kanagawa, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

Proposal: We consider the Stably Transfected human Androgen Receptor Transcriptional Activation assay (AR STTA) for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals using the AR-EcoScreen™ cell line to be a useful means of *in vitro* screening, which when used in combination with other test methods for the assessment of anticipated hazardous effects is capable of making a significant contribution to the management of chemical substances.

This statement was prepared following a review of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guideline (TG) 458 “Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals” and others to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have confirmed the usefulness of this assay.

Based on the above, we propose the AR STTA test method as a useful means for safety assessment by regulatory agencies.

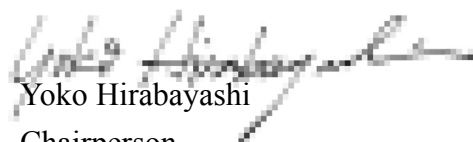
Yasuo Ohno
Chairperson

JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Yoko Hirabayashi
Chairperson

JaCVAM Steering Committee



February 19, 2019

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Yasuo Ohno (Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences): Chairperson

Mr. Yoshiaki Ikarashi (National Institute of Health Sciences: NIHS)

Mr. Noriyasu Imai (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)

Mr. Tomoaki Inoue (Japanese Society of Immunotoxicology)

Mr. Yuji Ishii (Biological Safety Research Center: BSRC, NIHS)

Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)

Mr. Takeshi Morita (Japanese Environmental Mutagen Society)

Mr. Shunji Nakai (Japan Chemical Industry Association)

Ms. Ruriko Nakamura (National Institute of Technology and Evaluation)

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS)

Mr. Satoshi Numazawa (Japanese Society of Toxicology)

Ms. Maki Noguchi (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) *

Mr. Kazutoshi Shinoda (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Ms. Mariko Sugiyama (Japan Cosmetic Industry Association)

Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Cutaneous Immunology and Allergy)

Term: From 1st April 2016 to 31st March 2018

*: From 1st April 2017 to 31st March 2018

Mr. Yasuo Ohno (Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences): Chairperson

Ms. Yoko Hirabayashi (BSRC, NIHS)

Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

Mr. Noriyasu Imai (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)

Mr. Kunifumi Inawaka (Japan Chemical Industry Association)

Mr. Tomoaki Inoue (Japanese Society of Immunotoxicology)

Mr. Yuji Ishii (BSRC, NIHS)

Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)

Mr. Fumihiko Kubo (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Mr. Kenichi Masumura (Japanese Environmental Mutagen Society)

Ms. Ruriko Nakamura (National Institute of Technology and Evaluation)

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS/ Saiseikai Utsunomiya Hospital)

Mr. Jihei Nishimura (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Mr. Satoshi Numazawa (Japanese Society of Toxicology)

Ms. Mariko Sugiyama (Japan Cosmetic Industry Association)

Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Cutaneous Immunology and Allergy)

Term: From 1st April 2018 to 31st March 2020

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM steering Committee after receiving the report from JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Ms. Yoko Hirabayashi (BSRC, NIHS): Chairperson
Mr. Manabu Fuchioka (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Osamu Fueki (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS)
Mr. Koichi Hiruta (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Masamitsu Honma (Division of Genetics and Mutagenesis, BSRC, NIHS)
Mr. Koji Ishii (National Institute of Infectious Diseases)
Mr. Yasunari Kanda (Division of Pharmacology, BSRC, NIHS)
Mr. Satoshi Kitajima (Division of Toxicology, BSRC, NIHS)
Mr. Kouichirou Koike (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, BSRC, NIHS)
Mr. Haruhiro Okuda (NIHS)
Mr. Taku Oohara (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Atsuya Takagi (Animal Management Section of the Division of Toxicology, BSRC, NIHS)
Mr. Masaaki Tsukano (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Hajime Kojima (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS): Secretary

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)

目 次

評価会議報告書 ----- 1

評価報告書 ----- 7

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 458, Stably Transfected
Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of
Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals -----39

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.

評価報告書

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

内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会

平成 30 年（2018 年）10 月 1 日

内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会

小野 宏（一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所）

井口泰泉（横浜市立大学）

小野 敦（岡山大学）

丸野内棣（藤田保健衛生大学）

用語集

Accuracy : 正確性

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

Androgen Receptor (AR) : アンドロゲン受容体

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

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

Concordance : 一致度

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

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

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

Dimethylsulfoxide (DMSO) : ジメチルスルホキシド

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

False negative rate : 偽陰性率

False positive rate : 偽陽性率

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

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

Hershberger assay : ハーシュバーガー試験

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

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

米国代替法評価省庁間連絡委員会

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

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

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

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

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

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

Performance Standards (PS) : 性能標準

Reliability : 信頼性

Test Guideline (TG) : 試験法ガイドライン

Transcription Activation (TA) : 転写活性化

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

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

OECD Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment (OECD EDTA) : OECD 内分泌かく乱物質の試験と評価に関するタスクフォース

OECD Validation Management Group for Non-Animal Tests (OECD-VMG NA) : OECD 試験法バリデーション運営委員会非動物試験部会

Methyltrienolone (R1881) : メチルトリエノロン

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

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

Study Management Team (SMT) : 研究運営委員会

Validation study : バリデーション試験

要旨

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

本試験法の検査性能および試験法としての科学的妥当性と規制試験法としての妥当性については、各 4 施設の参加による 2 回のバリデーション試験におけるアゴニスト試験・アンタゴニスト試験各 10 物質についての評価結果により検証された。さらに、本試験法は定量的評価法として開発され、バリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験のいずれにおいても定量的評価値の再現性も良好であることが示された。OECD のピアレビューでは、それらのバリデーションの結果をもとに、この試験法の正確性・信頼性が評価され、OECD-EDTA で提案された OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters のレベル 2 に該当する内分泌かく乱物質のスクリーニング評価に有用な試験法として OECD TG458 が成立した。

本試験法に関連した今後の課題として、本試験法における陽性反応が実際の生体影響をどの程度反映するものであるかという点があげられる。本試験法はあくまでもスクリーニング法であり、想定される有害影響を確定評価する試験法と組み合わせて評価を行うことで今後の化学物質管理に大きく貢献すると考えられる。

1. 本試験法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

AR STTA 法（詳しくは「AR-EcoScreen™細胞を用いたアンドロゲン受容体(AR)恒常発現系転写活性化試験法」; The Stably Transfected Transcription Activation (STTA) assay using the human AR-EcoScreen™ cell line) は、化学物質のアンドロゲン（および抗アンドロゲン）活性を化学発光により検出する *in vitro* 試験法の一つで、化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング評価のために開発された。本試験法は、我が国（日本）の大塚製薬株式会社で構築された AR-EcoScreen™細胞株を用いて、（一財）化学物質評価研究機構（以下、CERI と記す）が中心となって試験プロトコルが開発された。AR-EcoScreen™細胞は、CHO-K1 細胞に導入したヒト AR プラスミドとホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にラット前立腺 C3 遺伝子のアンドロゲン応答配列 (ARE) を持つレポータープラスミド、および、細胞毒性評価の指標となるウミシイタケ・ルシフェラーゼを安定発現する細胞株である。AR STTA 法は導入された AR の活性化によって起るレポーター遺伝子の転写活性の変化を化学発光により定量的に測定する試験系であり、細胞毒性評価を同一のプレート上で実施出来る上、通常の細胞毒性検出法では評価が難しい被験物質によるルシフェラーゼ発光への影響を評価することが可能であるという利点を有する。AR-EcoScreen™細胞は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (<http://cellbank.nibiohn.go.jp/>) より入手可能である（細胞登録番号: JCRB1328）。AR STTA 法については、厚生労働省・経済産業省共同で OECD に SPSF が提案され、その後、実施された 2 回のバリデーション試験の結果をもとに、試験法ガイドライン (TG458) の成立に至った。

環境中や市場に流通する多くの化学物質が内分泌系に影響する生物活性を有することが示されており、そうした化学物質による内分泌系のかく乱によるヒト健康への影響や環境に対する影響が指摘されている。しかし、市場に流通する多くの化学物質については、内分泌系への作用の有無や程度について評価されていない。OECD（経済協力開発機構）では、1998 年に重点活動項目の 1 つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のためのテストガイドラインの整備のため、OECD 内分泌かく乱物質の試験と評価に関するタスクフォース (OECD EDTA) を設置し、化学物質の内分泌かく乱作用評価のための試験法を OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters として整理し、既存ガイドラインの改訂と、新規試験法ガイドラインの作成を開始した。OECD conceptual framework は、それぞれ生物学的複雑性の異なる 5 つのレベルから構成されており、本試験法ガイドラインは、レベル 2 の「機構に関する情報をもたらす *in vitro* 試験」に該当する転写活性化 (TA) 試験法である。

化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングに有用な指標として、化学物質のホルモン受容体との結合性または受容体を介した内分泌機能の活性化および阻害を測定する方法が注目された。アンドロゲン活性に関する試験法としては、すでに *in vivo* 試験法として「ハーシュバガー試験」が確立され、バリデーション試験を行った上で国際的な TG (OECD TG441) となっているが、より簡便で迅速な非動物試験として培養細胞を用いる *in vitro* 試験法の開発が進められてきた。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. 試験法の妥当性

2-1 試験法の概略

1) 目的と原理

本試験法は内分泌かく乱物質のうち AR に作用する化学物質を検索し、その人体および自然界に対する有害影響を避けることを目的として開発された。本法、AR STTA 法はその一つで生体の AR に結合し、アゴニスト作用、あるいはアンタゴニスト作用を示す化学物質をスクリーニングするために CHO-K1 細胞にヒト AR を恒常的に発現するプラスミドと ARE 下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドを導入・安定発現させ、被験物質を細胞に曝露させた後、AR 活性によるホタルルシフェラーゼ発現量の変化をルシフェリンを基質として発光を測定するものである。

2) 標準測定条件

次の点に留意する必要がある。

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

を前もって特別に訓練を受けておく必要がある。

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

2-2 妥当性の検討

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

理論的視点から：

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

測定系構築上の視点から：

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

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

試験法操作上の視点から：

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

2-3 AR STTA 法の注意点

レポーターアッセイに共通の注意点として、以下が挙げられる。

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

3. バリデーション試験に用いた物質の分類と妥当性

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

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

4. 試験法のデータと結果の有用性

第1回のバリデーション試験において、参加4施設全てで測定が行われた物質は、陽性物質として測定されたDHTおよびコード化物質として測定が実施された4物質の計5物質（アゴニスト陽性2物質、アンタゴニスト陽性2物質、1物質は陰性）であり、これら5物質の測定結果をもとに施設内および施設間再現性の評価が行われた。

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

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

同種の試験系であるER STTA法のバリデーション試験に比べて測定物質数が少ないが、AR活性（アゴニスト・アンタゴニストいずれも）を示すことが知られている化学物質が限られていること、バリデーション試験に用いられた化学物質は、既知見情報や入手の容易さ等をもとに可能な限り広範な構造・種類の物質が選択されており妥当であると評価される。計2回のバリデーション試験で評価が行われた化学物質の活性および構造による分類（ステロイド類、ベンゼン環を一つ有する化合物類等）については、TG458に習熟物質リスト（Table 2-1, 2-2）として示されており、これらの情報は新たな試験系開発の参照物質として有用である。

5. 試験方法の再現性

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

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

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

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

6. 試験法の正確性・信頼性

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

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

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

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

7. データの質

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

8. 試験法の有用性、限界および提言

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

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

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

9. その他の試験方法の科学的な報告

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

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

10. 結論

AR STTA 法は、*in vitro* で化学物質の AR に対するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を検出するスクリーニング試験法であり、その検査性能については各 4 施設の参加による 2 回のバリデーション試験結果をもとに再現性・信頼性が確認されている。本試験法は、化学物質の AR に対する結合性を見る試験法とは異なり、その結合の結果による RNA 転写活性化を検出することによりアゴニストとアンタゴニストの活性を分けて検査することが出来る。その試験法としての科学的妥当性と規制試験法としての妥当性については、2 回のバリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験各 10 物質について評価が行われ、施設内・施設間再現性ともほぼ 100%の結果を得ている。また、本試験法は定量的評価法として開発され、バリデーション試験においてアゴニスト試験・アンタゴニスト試験のいずれにおいても定量的評価値の再現性も良好であることが示されている。OECD のピアレビューでは、それらバリデーションの結果をもとに本試験法の正確性・信頼性が評価され、OECD-EDTA で提案された OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters のレベル 2 に該当する内分泌かく乱物質のスクリーニング評価に有用な試験法として OECD TG458 が成立した。

本試験法に関連した今後の課題として、化学物質のアンドロゲン（抗アンドロゲン）活性に起因する内分泌かく乱作用において、本試験法における陽性反応が実際の生体影響をどの程度反映するものであるかという点があげられる。本試験法はあくまでもスクリーニング法であり、想定される有害影響を確定評価する試験法と組み合わせて評価を行うことで今後の化学物質管理に大きく貢献すると考えられる。

参考文献

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

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

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

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

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

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

※ 参考文献(1)の Table 8

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

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

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

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

² Substances were assigned to one or more chemical classes using the U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), an internationally recognized standardized classification scheme (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

³ Substances were assigned to one or more product classes using the U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

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

※ 参考文献(3)の Table 2-1

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

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

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

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

² Substances were assigned to one or more chemical classes using the U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), an internationally recognized standardized classification scheme (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

³ Substances were assigned to one or more product classes using the U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

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

※ 参考文献(3)の Table 2-2

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

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

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

※ 参考文献(1)の Table 18

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

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

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

※ 参考文献(1)の Table 17

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

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

n.e. : not evaluated for cytotoxicity

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

※ 参考文献(1)の Table 21

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

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

n.e. : not evaluated for cytotoxicity

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

※ 参考文献(1)の Table 20

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

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

ND: Not determined

Table 7 (continued)

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

※ 参考文献(2)の Table 17

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

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

ND: Not determined

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

Table 8 (continued)

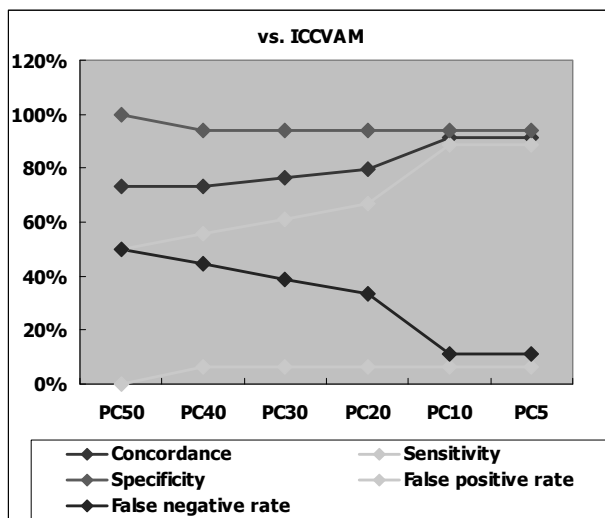
	Lab	ID	Log IC30 (M)	Mean SD CV%	Log IC50 (M)	Mean SD CV%	Decision	
Prochloraz CAS:67747-09-5	CERI	1	ND		ND		Negative	
		2	ND		ND			
		3	ND		ND			
			Add	-5.77	-5.77	-5.44	-5.44	Positive
	sumitomo	1		-5.58	-5.60	-5.22	-5.25	Positive
		2		-5.65	0.05	-5.33	0.06	
		3		-5.56	0.89%	-5.21	1.23%	
	hokkaido	1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

ND: Not determined

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

※ 参考文献(2)の Table 18

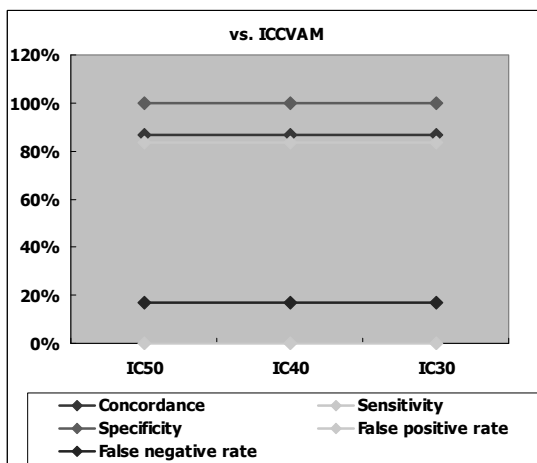
Table 9 AR STTA プレバリデーション測定結果（アゴニスト測定）と ICCVAM Report (2003) で示された参照物質の比較



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

※ 参考文献(1)の Table9

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



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

※ 参考文献(1)の Table 11

Table 11 AR 結合試験結果と AR STTA の比較

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

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

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

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

※ 参考文献(1)の Table 13

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

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

¹: AR_RBA% : AR Relative Binding Activity

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

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

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

※ 参考文献(1)の Table 14

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals

INTRODUCTION

1. The OECD initiated a high-priority activity in 1998 to revise existing, and to develop new, Test Guidelines for the screening and testing of potential endocrine disrupting chemicals. The OECD Conceptual Framework for testing and assessment of potential endocrine disrupting chemicals comprises five levels, each level corresponding to a different level of biological complexity (1). The Stably Transfected (ST) human Androgen Receptor (AR) Transcriptional Activation (TA) assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals (AR STTA) using the AR-EcoScreen™ cell line (2) is included in level 2 for "*in vitro* assays providing data about selected endocrine mechanism(s)/pathway(s) (Mammalian and non mammalian methods)" (1).
2. *In vitro* TA assays are based upon the production of a reporter gene product induced by a chemical, following binding of the chemical to a specific receptor and subsequent downstream transcriptional activation. TA assays, using activation of reporter genes, are screening assays that have long been used to evaluate the specific gene expression regulated by specific nuclear receptors, such as the estrogen receptors (ERs) and androgen receptors (AR) (3) (4) (5) (6). They have been proposed for the detection of nuclear receptor-mediated transactivation (3) (4) (7).
3. The AR STTA test method has been validated by collaboration of the Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) and the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Japan with support of the study management team from the OECD validation management group for non-animal testing (2). The AR STTA test method provides concentration-response data for substances with *in vitro* AR agonist or antagonist activity (2), which may be used for screening and prioritisation purposes and can also be used as mechanistic information in a weight of evidence approach.
4. Definitions and abbreviations used in this Test Guideline are described in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

5. Androgen agonists and antagonists act as ligands for AR through AR binding, and may activate or inhibit the transcription of androgen responsive genes. This interaction may have the potential to trigger adverse health effects by disrupting androgen-regulated systems. This Test Guideline

1

© OECD, (2016)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.

This Guideline was adopted by the OECD Council by written procedure on 29 July 2016 [C(2016)103].

describes an assay that evaluates transcriptional activation and inhibition of AR-mediated responses. This process is considered to be one of the key mechanisms of possible endocrine disruption related health hazards, although there are also other important endocrine disruption mechanisms. These include (i) actions mediated via other nuclear receptors linked to the endocrine system and interactions with steroidogenic enzymes, (ii) metabolic activation or deactivation of hormones, (iii) distribution of hormones to target tissues, and (iv) clearance of hormones from the body. This Test Guideline exclusively addresses transcriptional activation and inhibition of an androgen-regulated reporter gene by binding to the human AR, and therefore it should not be directly extrapolated to the complex *in vivo* situation of androgen regulation of cellular processes. In addition, the assay is only likely to inform on the activity of the parent molecule bearing in mind the limited metabolising capacities of the *in vitro* cell systems.

6. This test method is specifically designed to detect human AR-mediated transcriptional activation and inhibition by measuring luciferase activity as the endpoint. However, substance-dependent interference with luminescence signals are known to occur due to over-activation or inhibition of the luciferase reporter gene assay system (8) (9) (10). It is therefore possible that such interference with the luciferase reporter gene may also occur in the AR STTA luciferase assay systems. This should be considered when evaluating the data.
7. This cell line has been developed to have minimal glucocorticoid receptor (GR)-mediated response, however, a limitation with respect to AR selectivity is the potential for GR cross talk (11) (12). In certain cases this may result in substances that activate GR being classified positive in this assay. When further investigation is deemed necessary, both non receptor-mediated luciferase signals and GR activation can be tested by incubating the test chemical with an AR antagonist (such as Hydroxyflutamide (HF)) to confirm whether the response by the test chemical is blocked or not (see Annex 2).
8. Considering that only single substances were used during the validation, the applicability to test mixtures has not been addressed. The test method is nevertheless theoretically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. Before use of the Test Guideline on a mixture for generating data for an intended regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture.

PRINCIPLE OF THE TEST

9. The TA assay using a reporter gene technique is an *in vitro* tool that provides mechanistic data. The assay is used to establish signal activation or blocking of the androgen receptor caused by a ligand. Some chemicals may, in a cell type-dependent manner, display both agonist and antagonist activity and are known as selective androgen receptor modulators (SARMs). Following the ligand binding, the receptor-ligand complex translocates to the nucleus where it binds specific DNA response elements and transactivates a firefly luciferase reporter gene, resulting in an increased cellular expression of the luciferase enzyme. Luciferin is a substrate that is transformed by the luciferase enzyme to a bioluminescence product that can be quantitatively measured with a luminometer. Luciferase activity can be evaluated quickly and inexpensively with a number of commercially available test kits.
10. The test system provided in this Test Guideline utilises the AR-EcoScreen™ cell line, which is derived from a Chinese hamster ovary cell line (CHO-K1), with three stably inserted constructs: (i) the human AR expression construct (encoding the full-length human receptor gene identical with Genbank ID of M20132 which has 21 times CAG trinucleotide short tandem repeat), and (ii) a

firefly luciferase reporter construct bearing four tandem repeats of a prostate C3 gene-responsive element driven by a minimal heat shock protein promoter. The C3 gene derived androgen responsive element is selected to minimise GR-mediated responses. In addition, (iii) a renilla luciferase reporter construct under the SV40 promoter, stably and non-inducibly expressed is transfected as to distinguish pure antagonism from a cytotoxicity-related decrease of luciferase activity (13) (14).

11. Data interpretation for an **AR agonistic effect** is based upon the maximum response level induced by a test chemical. If this response equals or exceeds 10% of the response induced by 10 nM 5 α -dihydrotestosterone (DHT), the positive AR agonist control (PC_{AGO}) (i.e. the log PC₁₀), the test chemical is considered positive. Data interpretation for an **AR antagonistic effect** of a test chemical is based on a cut-off of a 30% inhibitory response against 500 pM DHT (i.e. the log IC₃₀). If the response exceeds this 30% AR blocking, then the chemical is considered a positive AR antagonist. Data analysis and interpretation are discussed in greater detail in paragraphs 42-56. Typical representations of the agonist and antagonist reference standard curves are shown in Figure 1.

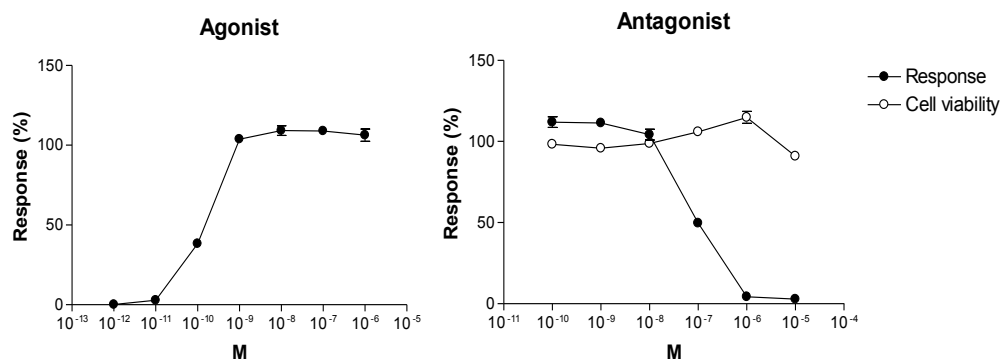


Figure 1: Typical positive control responses

PROCEDURE

Cell Lines

12. The stably transfected AR-EcoScreenTM cell line should be used for the assay. The cell line can be freely obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank as reference No. JCRB1328, upon signing a Material Transfer Agreement (MTA).
13. Only cells characterised as mycoplasma-free (i.e. free of bacterial contamination) should be used in testing. RT PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) is the method of choice for a sensitive detection of mycoplasma infection (15) (16) (17).

Stability of the cell line

14. To monitor the stability of the cell line for the **agonist assay**, DHT, Mestanolone and Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) should be used as reference standards. A complete concentration response curve for all three reference standards, at the test concentration range provided in Table 1-2 and the plate concentration assignment shown in Table 3-1, should be obtained at least once each time the assay is performed, and the results should be in agreement with the results provided in Tables 1-1 and 1-2.

15. To monitor the stability of the cell line for measuring **AR antagonism**, HF, Bisphenol A (BPA) and DEHP should be used as reference standards. A complete concentration response curve for all three reference standards, at the test concentration range provided in Table 1-4 and the plate concentration assignment shown in Table 3-2, should be obtained at least once each time the assay is performed, and the results should be in agreement with the results provided in Tables 1-3 and 1-4.

Cell Culture and Plating Conditions

16. The following mediums should be prepared:
 - Medium for dilution: Phenol Red Free D-MEM/F-12.
 - Medium for cell propagation: Phenol Red Free D-MEM/F-12 supplemented with 5% v/v fetal bovine serum (FBS), Zeocin (200 µg/mL), Hygromycin (100 µg/mL), Penicillin (100 units/mL), and Streptomycin (100 µg/mL).
 - Medium for the assay plate: Phenol Red Free D-MEM/F-12 supplemented with 5%v/v Dextran-coated charcoal treated (DCC)-FBS, Penicillin (100 units/mL), and Streptomycin (100 µg/mL).
17. Cells should be maintained in a CO₂ incubator (5% CO₂) at 37±1°C with medium for cell propagation. Upon reaching 75-90% confluency (i.e. every 3-4 days), cells are subcultured to 10 mL at a density of 0.4-0.8 x 10⁵ cell/mL in 10cm³ cell culture dishes. To prepare the assay plate (96-well plate), cells should be suspended in the medium for the assay plate and then plated into wells of a microplate containing 90 µL/well at a density of 1 x 10⁵ cells/mL. Next, the cells should be pre-incubated in a 5% CO₂ incubator at 37±1°C for 24 hours before chemical exposure.
18. To maintain the integrity of the response, the cells should be grown for more than one passage from the frozen stock in the conditioned media for cell propagation and should not be cultured for more than 40 passages. For the AR-EcoScreenTM cell line, this will be stable up to three month under suitable culture condition.
19. The DCC-FBS can be obtained from commercial sources. The selection of DCC-FBS is critical for the assay performance; therefore, the appropriate DCC-FBS should be selected based on the proliferative capacity and confirmation of effect on assay performance with the reference standards.

Acceptability criteria

Positive and negative reference standards

20. Prior to, and during the study, the responsiveness of the test system should be verified using the appropriate concentrations of known reference standards provided in Table 1-2 and 1-4, with DHT and Mestanolone as the positives for agonist assay, HF and BPA as the positives for antagonist assay, and DEHP as the negative for the agonist and antagonist assay. Acceptable range values derived from the validation study are also given in Table 1-2 and Table 1-4 (2). These three concurrent reference standards for each AR agonist/antagonist assay should be included in every AR agonist/antagonist experiment (conducted under the same conditions including the materials, passage level of cells and by the same technicians), and the results should fall within the given acceptable limits and the shape of concentration-response curve of positive reference standards should be sigmoidal. If this is not the case, the cause for the failure to meet the acceptability criteria should be determined (e.g. cell handling, and serum and antibiotics for quality and concentration) and the assay repeated. Once the acceptability criteria have been achieved, it is

essential in order to ensure minimum variability of $\log PC_{50}$, $\log PC_{10}$, $\log IC_{30}$, $\log IC_{50}$ values, that use of materials for cell culturing is consistent.

21. The acceptability criteria of three concurrent reference standards can ensure the accuracy of quantitative sensitivity of the assay, but for the purposes of qualitative assessment, deviations from acceptable ranges of the reference standards (as specified in tables 1-2 and 1-4) could be allowed if the quality criteria (see tables 1-1 or 1-3) are met, however the reference standards should be included with each experiment and the results should be judged according to the parameters indicated in tables 1-2 and 1-4 and the concentration-response curve of the positive reference standards should be sigmoidal.

Table 1-1: Quality criteria for AR agonist assay

Fold-induction of PC _{AGO} (10 nM DHT)	≥ 6.4
FI PC ₁₀	Greater than 1 +2SD (fold-induction of VC)

FI PC₁₀: fold-induction corresponding to the PC₁₀ (10%) of Positive control (PC_{AGO}:10 nM of DHT)
SD: Standard Deviation, VC: Vehicle Control

Fold-induction of PC_{AGO} is calculated by the following equation:

$$\text{Fold-induction of PC}_{\text{AGO}} = \frac{\text{Mean RLU of PC}_{\text{AGO}} (10 \text{ nM DHT})}{\text{Mean RLU of VC}}$$

RLU: Relative Light Units

Table 1-2: Acceptable range of the reference standards for AR agonist assay

Substance Name [CAS RN]	Judgment	logPC ₁₀	logPC ₅₀	Test range
5α-Dihydrotestosterone (DHT)[521-18-6]	Positive: PC ₁₀ should be calculated	-12.08 ~ -9.87	-11.03 ~ -9.00	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
Mestanolone[521-11-9]	Positive: PC ₁₀ should be calculated	-10.92 ~ -10.41	-10.15 ~ -9.26	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [117-81-7]	Negative: PC ₁₀ should not be calculated	-	-	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

Table 1-3: Quality criteria for AR antagonist assay

Fold induction of AG ref ¹	≥ 5.0
RTA of PC _{ATG} (%) ²	≤ 46

AG ref = Agonist reference (500 pM DHT) in the antagonist assay

RTA : Relative Transcriptional Activity

PC_{ATG} = Antagonist control (500pM DHT, 0.1 μM HF)

¹: Fold induction of AG ref is calculated by the following equation:

$$\text{Fold-induction of AG ref} = \frac{\text{Mean RLU of AG ref} (500 \text{ pM DHT})}{\text{Mean RLU of VC}}$$

VC: Vehicle Control, RLU: Relative Light Units

²: RTA of PC_{ATG} (%) is calculated by the following equation;

$$\text{RTA of PC}_{\text{ATG}} (\%) = \text{Mean} \left(\frac{\text{RLU of PC}_{\text{ATG}} - \text{Mean RLU of VC}}{\text{Mean RLU of AG ref} - \text{Mean RLU of VC}} \right) \times 100$$

Table 1-4: Acceptable range of the reference standards for AR antagonist assay

Substance Name [CAS RN]	Judgment	log IC ₃₀	log IC ₅₀	Test range
Hydroxyflutamide (HF) [52806-53-8]	Positive: IC30 should be calculated	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Bisphenol A (BPA) [80-05-7]	Positive: IC30 should be calculated	-7.52 ~ -4.48	-7.05 ~ -4.29	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [117-81-7]	Negative: IC30 should not be calculated	-	-	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Positive and vehicle controls

22. **For the agonist assay**, positive control (PC_{AGO}) wells (n=4) treated with an endogenous ligand (10 nM of DHT), vehicle control (VC) wells (n=4) treated with vehicle alone and positive control for cytotoxicity (PC_{CT}, 10 µg/mL of cycloheximide) wells (n=4) should be prepared on each assay plate in accordance with the plate design indicated in Table 3-1 and Table 4-1. **For the antagonist assay**, vehicle control (n=3), positive control for agonistic activity (PC_{AGO}, 10 nM of DHT, n=3), positive control for antagonistic activity (PC_{ATG}, 500 pM DHT and 0.1 µM of HF, n=3), positive control for cytotoxicity (PC_{CT}, 10 µg/mL of cycloheximide, n=3) and agonist reference (AG ref, 500 pM of DHT, n=12) should be set-up at each assay plate in accordance with the plate design indicated in Table 3-2 and Table 4-2.

Quality criteria for AR agonist assay

23. The mean luciferase activity of the PC_{AGO} (10 nM DHT) should be at least 6.4-fold higher than that of the mean VC on each plate for the agonist assay. These criteria were established based on the reliability of the endpoint values from the validation study.
24. With respect to the quality control of the assay, the fold-induction corresponding to the logPC₁₀ (10%) of positive control (PC_{AGO}: 10 nM of DHT) (FI PC₁₀) should be greater than 1+2SD of the induction value (=1) of the concurrent VC. For prioritisation purposes, the log PC₁₀ value can be useful to simplify the data analysis required compared to a statistical analysis. Although a statistical analysis provides information on significance, such an analysis is not a quantitative parameter with respect to a concentration-based potential, and so is less useful for prioritisation purposes.

Quality criteria for AR antagonist assay

25. The mean luciferase activity of the AG ref (500 pM DHT) should be at least 5.0-fold for antagonism assay. These criteria were established based on the reliability of the endpoint values from the validation study.
26. RTA of PC_{ATG} (500 pM DHT and 0.1 µM HF) should be less than 46%.

In summary:

27. Acceptability Criteria are the following:

For AR agonist assay:

- The mean luciferase activity of the PC_{AGO} (10 nM DHT) should be at least 6.4-fold higher than the mean VC on each plate
- The fold induction corresponding to the log PC₁₀ value of the concurrent PC_{AGO} (10 nM DHT) should be greater than 1+2SD of the fold induction value of the VC.
- The shape of concentration-response curve of positive reference standards should be sigmoidal.
- The results of the three reference standards should be within the acceptable range (Table 1-2).

For AR antagonist assay:

- Fold induction of AG ref ([500 pM DHT]/[Vehicle Control]) should be at least 5.0.
- RTA of PC_{ATG} (%) should be less than 46.
- The shape of concentration-response curve of positive reference standards should be sigmoidal.
- The results of the three reference standards should be within the acceptable range (Table 1-4).

Substances to demonstrate laboratory proficiency

28. Prior to testing unknown chemicals in the AR STTA assay, the responsiveness of the test system should be confirmed by each laboratory, at least once for each newly prepared batch of cell stocks taken from the frozen stock. This is done by independently testing 10 proficiency substances listed in Tables 2-1 and 2-2 for AR agonism and antagonism, respectively. This should be done at least in duplicate, on different days, and the results should be comparable to Tables 2-1 and 2-2, and any deviations should be justified. Dependent on cell type, some of these proficiency substances may behave as SARMS and display activity as both agonists and antagonists. However, the proficiency substances are classified in Tables 2-1 and 2-2 by their known predominant activity which should be used for proficiency evaluation.

Table 2-1: List of Proficiency substances for agonist assay

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

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

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

² Substances were assigned to one or more chemical classes using the U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), an internationally recognised standardised classification scheme (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

³ Substances were assigned to one or more product classes using the U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Table 2-2: List of Proficiency substances for antagonist assay

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

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

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

² Substances were assigned to one or more chemical classes using the U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), an internationally recognised standardised classification scheme (available at <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

³ Substances were assigned to one or more product classes using the U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Vehicle

29. An appropriate solvent should be used as the concurrent VC at the same concentration for the different positive and negative controls and the test chemicals. Test chemicals should be dissolved in a solvent that solubilises the test chemical and is miscible with the cell medium. Water, ethanol (95% to 100% purity) and dimethyl sulfoxide (DMSO) may be suitable vehicles accepted by the cells. Generally DMSO is used. In this case, the final level in the well should not exceed 0.1% (v/v). For any other vehicle (e.g. ethanol), it should be demonstrated that the maximum concentration used is not cytotoxic and does not interfere with the assay performance (as confirmed by response of renilla luciferase).

Preparation of test chemicals

30. The test chemicals should be dissolved in an appropriate solvent (see paragraph 29) and serially diluted with the same solvent at a common ratio of 1:10. In order to define the highest soluble concentration of the test chemical, a solubility test should be carried out following the flow diagram shown in Figure 2.

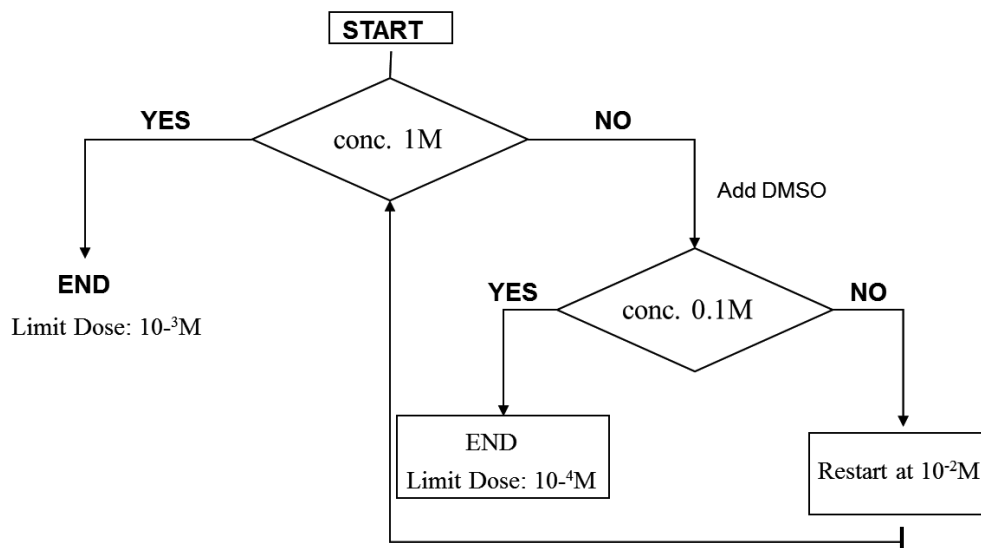


Figure 2: Diagram for solubility test

Limit dose: the highest concentration to be tested as the assay concentration.

YES: No precipitation, NO: Precipitation

31. A solubility test is a very important step to determine the maximum concentration for the assay and it may affect the sensitivity of the assay. Maximum concentration should be selected based on the avoidance of precipitation at highest concentration ranges in culture media. Precipitation observed at any concentration should be noted, but these data should not be included in the dose-response analysis.
32. For AR antagonists, the presence of increasing levels of cytotoxicity can significantly alter or eliminate the typical sigmoidal response and should be considered when interpreting the data. Cytotoxicity can be evaluated with renilla luciferase activity in the AR-EcoScreen™ cell line, which was originally established to express renilla luciferase constitutively. Accordingly, AR-mediated transcriptional activity and cytotoxicity should be evaluated simultaneously in the same assay plate. For AR agonists, cytotoxicity can also affect the shape of a concentration response curve. In such case, evaluation of cytotoxicity should be performed or evaluated from the results of antagonist assay conducted for same test chemical.
33. Should the results of the cytotoxicity test show that the concentration of the test chemical has reduced renilla luciferase activity by 20% or more, this concentration is regarded as cytotoxic, and the concentrations at or above the cytotoxic concentration should be excluded from the evaluation. The maximum concentration should be considered to be reduced when intrinsic cytotoxic effect is observed at the result of initial run of the test chemical. Cytotoxicity (%) of each well is calculated by the following equations and the mean of triplicate wells of same concentration is calculated for the cytotoxicity (%) of each concentration of test chemicals.

For the agonist assay;

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{RLU of each well} - \text{Mean RLU of PC}_{\text{CT}}}{\text{Mean RLU of VC} - \text{Mean RLU of PC}_{\text{CT}}} \right) \times 100$$

For the antagonist assay;

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{RLU of each well} - \text{Mean RLU of PC}_{\text{CT}}}{\text{Mean RLU of AG ref} - \text{Mean RLU of PC}_{\text{CT}}} \right) \times 100$$

Chemical Exposure and Assay Plate Organisation

34. For the AR agonist assay, each test chemical should be serially diluted in DMSO, or appropriate solvent, and added to the wells of a microtiter plate to achieve final serial concentrations in the assay, as determined by the preliminary range finding test (typically a series of, for example 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM and 1 nM [10^{-3} - 10^{-9} M]) for triplicate testing.

For each test concentration of the test chemical, the procedure for chemical dilutions (Steps 1 and 2) and for exposing the cells (Step 3) can be conducted as follows:

Step 1: Chemical dilution: First dilute 10 µL of the test chemical in solvent into 90 µL of media.

Step 2: Then 10 µL of the diluted chemical prepared in Step 1 should be diluted into 90 µL of the media.

Step 3: Chemical exposure of the cells: Add 10 µL of diluted chemical solution (prepared in Step 2) to an assay well containing 9×10^3 cells/90 µL/well.

The recommended final volume of media required for each well is 100 µL.

Reference standards and test samples can be assigned as shown in Table 3-1 and Table 4-1.

Table 3-1: Example of plate concentration assignment of the reference standards in the assay plate for agonist assay

Row	DHT			Mestanolone			DEHP			Test Chemical [#]		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 µM	→	→	1 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	100 nM	→	→	100 nM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	10 nM	→	→	10 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	1 nM	→	→	1 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	100 pM	→	→	100 pM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	1 pM	→	→	1 pM	→	→	10 pM	→	→	1 nM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: Vehicle control (DMSO);

PC_{AGO}: Positive control (10 nM of DHT);

PC_{CT}: Cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide);

#: concentration of test chemical is an example

35. For the AR antagonist assay, each test chemical should be serially diluted in DMSO, or appropriate solvent, and added to the wells of a microtiter plate to achieve final serial concentrations in the assay, as determined by the preliminary range finding test (typically a series of, for example 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, and 10 nM [10^{-3} - 10^{-8} M]) for triplicate testing.

For each test concentration of the test chemical the procedure for chemical dilutions (Steps 1 and 2) and for exposing cells (Step 3) can be conducted as follows:

Step 1: Chemical dilution: First dilute 10 µL of the test chemical in the solvent to a volume of 90 µL media containing 56 nM DHT/DMSO*.

Step 2: Then 10 µL of the diluted chemical prepared in Step 1 should be diluted into 90 µL of the media.

Step 3: Chemical exposure of the cells: Add 10 µL of diluted chemical solution (prepared in Step 2) to an assay well containing 9×10^3 cells/90 µL/well.

The recommended final volume of media required for each well is 100 µL.

*56 nM DHT/DMSO is added to achieve 500 pM DHT, 0.1% DMSO after dilution.

Reference standards and test samples can be assigned as shown in Table 3-2 and Table 4-2.

Table 3-2: Example of plate concentration assignment of the reference standards in the assay plate for antagonist assay

Row	HF			Bisphenol A			DEHP			Test chemical [#]		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	AG ref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO}	→	→	PC _{ATG}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: Vehicle control (DMSO);

PC_{AGO}: Positive AR agonist control (10 nM of DHT);

AG ref: AR agonist reference (500 pM DHT, 0.1% DMSO)

PC_{ATG}: Positive AR antagonist control (500 pM DHT, 0.1 µM of HF);

PC_{CT}: Cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide);

** Gray colored wells are spiked with 500pM DHT

#: concentration of test chemical is an example

36. The reference standards (DHT, Mestanolone and DEHP for the agonist assay; HF, BPA and DEHP for the antagonist assay) should be tested in every experiment (as indicated in Table 3-1 and 3-2). Wells treated with 10 nM of DHT that can produce a maximum induction of DHT (PC_{AGO}), and wells treated with DMSO (or appropriate solvent) alone (VC) should be included in each test assay plate for the agonist assay as well as a cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide called PC_{CT}) (Table 4-1). In the case of the antagonist assay, a positive AR agonist control (10 nM of DHT called PC_{AGO}), an AR agonist reference (500 pM DHT, 0.1% DMSO called AG ref), a positive AR antagonist control (500 pM DHT, 0.1 µM of HF called PC_{ATG}) and cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide called PC_{CT}) should be prepared additionally (Table 4-2). If cells from different sources (e.g. different passage number, different lot numbers, etc.) are used in the same experiment, the reference standards should be tested for each cell source.

Table 4-1: Example of plate concentration assignment of test chemicals and plate control substances in the assay plate for agonist assay

Row	Test Chemical 1			Test Chemical 2			Test Chemical 3			Test Chemical 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: Vehicle control (DMSO);

PC_{AGO}: Positive AR agonist control (10 nM of DHT);

PC_{CT}: Cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide);

The concentration of test chemicals is provided as an example.

Table 4-2: Example of plate concentration assignment of test chemicals and plate control substances in the assay plate for antagonist assay

Row	Test Chemical 1			Test Chemical 2			Test Chemical 3			Test Chemical 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→
G	AG ref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{ATG}	→	→	→

VC: Vehicle control (DMSO);

PC_{AGO}: Positive AR agonist control (10 nM of DHT);

AG ref: AR agonist reference (500 pM DHT, 0.1% DMSO)

PC_{ATG}: Positive AR antagonist control (500 pM DHT, 0.1 µM of HF) ;

PC_{CT}: Cytotoxicity control (10 µg/mL of cycloheximide);

** Gray colored wells are spiked with 500pM DHT

The concentration of test chemicals is provided as an example.

37. The lack of edge effects should be confirmed, as appropriate, and if edge effects are suspected, the plate layout should be altered to avoid such effects. For example, a plate layout excluding the edge wells can be employed.
38. After adding the chemicals, the assay plates should be incubated in a 5% CO₂ incubator at 37±1°C for 20-24 hours to induce the reporter gene products.
39. Special considerations will need to be applied to those substances that are highly volatile. In such cases, nearby control wells may generate false positives, and this should be considered in light of expected and historical control values. In the few cases where volatility may be of concern, the use of “plate sealers” may help to effectively isolate individual wells during testing, and is therefore recommended in such cases.
40. Repetition of definitive tests for the same chemical should be conducted on different days using freshly prepared assay reagents and dilutions of the test chemicals, to ensure independence. In cases where multiple chemicals are concurrently tested within a single run, maintaining the same plate design, while changing the order in which chemicals are added to the test wells, would be preferable.

Luciferase activity measurements

41. A commercial dual-reporter assay system (e.g. Promega, E2920 or its equivalents) is preferable to detect both of the AR response (firefly luciferase activity) and cytotoxicity (renilla luciferase activity) simultaneously, as long as the acceptability criteria are met. The assay reagents should be selected based on the sensitivity of the luminometer to be used. Procedure is according to the manufacturer's instructions basically. For instance, when using Dual-Glo Luciferase Assay system (Promega, E2920), cell Culture Lysis Reagent (Promega, E1531, or equivalents) should be used before adding the substrate. 40 µL of the first substrate should be directly added into the assay wells; then measure the firefly luciferase signal; then remove 60 µL of supernatant to detect firefly luciferase activity; and finally add 40 µL of the second substrate into the assay wells of the original plate to detect renilla luciferase activity. A luciferase assay reagent [e.g. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, or equivalents)] or a standard luciferase assay system (Promega, E1500, or equivalents) can be used to detect only for the AR response (firefly luciferase activity). When using Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega, E2510), after adding the Cell Culture Lysis Reagent (Promega, E1531, or equivalents), 40 µL of prepared reagent should be directly added into the assay wells.

ANALYSIS OF DATA

42. **For the Agonist assay**, to obtain the relative transcriptional activity to the positive control (10 nM DHT), the luminescence signals from the same plate can be analysed according to the following steps (other equivalent mathematical processes are also acceptable):
 - Step 1. Calculate the mean value for the vehicle control (VC).
 - Step 2. Subtract the mean value of the VC from each well value in order to subtract any vehicle-driven effect or noise.
 - Step 3. Calculate the mean for the corrected PC_{AGO} (=the normalised PC_{AGO}).

Step 4. Divide the corrected value of each well in the plate by the mean value of the normalised PC_{AGO} (PC_{AGO} is set to 100%).

The final value of each well is the relative transcriptional activity for that well compared to the PC_{AGO} response.

Step 5. Calculate the mean value of the relative transcriptional activity for each concentration of the test chemical. There are two dimensions to the response: the averaged transcriptional activity (response) and the concentration at which the response occurs (see following section).

43. **For the Antagonist assay**, to obtain the relative transcriptional activity, the luminescence signals from the same plate can be analysed according to the following steps (other equivalent mathematical processes are also acceptable):

Step 1. Calculate the mean value for the VC.

Step 2. Subtract the mean value of the VC from each well value in order to subtract any vehicle-driven effect or noise.

Step 3. Calculate the mean for the corrected AG ref (=the normalised AG ref).

Step 4. Divide the corrected value of each well in the plate by the mean value of the normalised the AG ref (AG ref is set to 100%).

The final value of each well is the relative transcriptional activity for that well compared to the maximum response of the AG ref.

Step 5. Calculate the mean value of the relative transcriptional activity for each concentration group of the test chemical. There are two dimensions to the response: the averaged transcriptional activity (response) and the concentration at which the response occurs (see following section).

log PC₅₀, log PC₁₀, log IC₅₀ and log IC₃₀ induction considerations

44. To evaluate cytotoxicity, cell viability should be expressed as the percentage of renilla luciferase activity of the chemically-treated wells to the mean renilla luciferase activity of the wells of the vehicle control for the agonist assay or the mean renilla luciferase activity of the wells of AG ref (500 pM DHT) for the antagonist assay, in accordance with equations indicated in paragraph 33.
45. In the case of the agonist assay, the following information should be provided for each test chemical:
- The maximum level of response induced by a test chemical, expressed as a percentage against the response induced by PC_{AGO} (10 nM DHT) on the same plate (RPC_{max}).
 - For positive chemicals, the concentrations that induce an effect corresponding to that of a 10% effect for the positive control (log PC₁₀) and, if appropriate, to 50% effect for the positive control (log PC₅₀).
46. Descriptions of log PC_x values, “x” is a selected response like 10% or 50% induction compared to PC_{AGO}, are provided in Figure 3. log PC₁₀ and log PC₅₀ values can be defined as the test chemical concentrations estimated to elicit either a 10% or a 50% induction of transcriptional activity induced by PC_{AGO} (Positive control; 10 nM of DHT). Each log PC_x value can be calculated by a simple linear regression using two variable data points for the transcriptional activity. Where the data points lying immediately above and below the log PC_x value have the coordinates (a,b) and (c,d) respectively, then the log PC_x value is calculated using the following equation and Figure 4:

$$\log[\text{PC}_x] = c + [(x-d)/(b-d)](a-c)$$

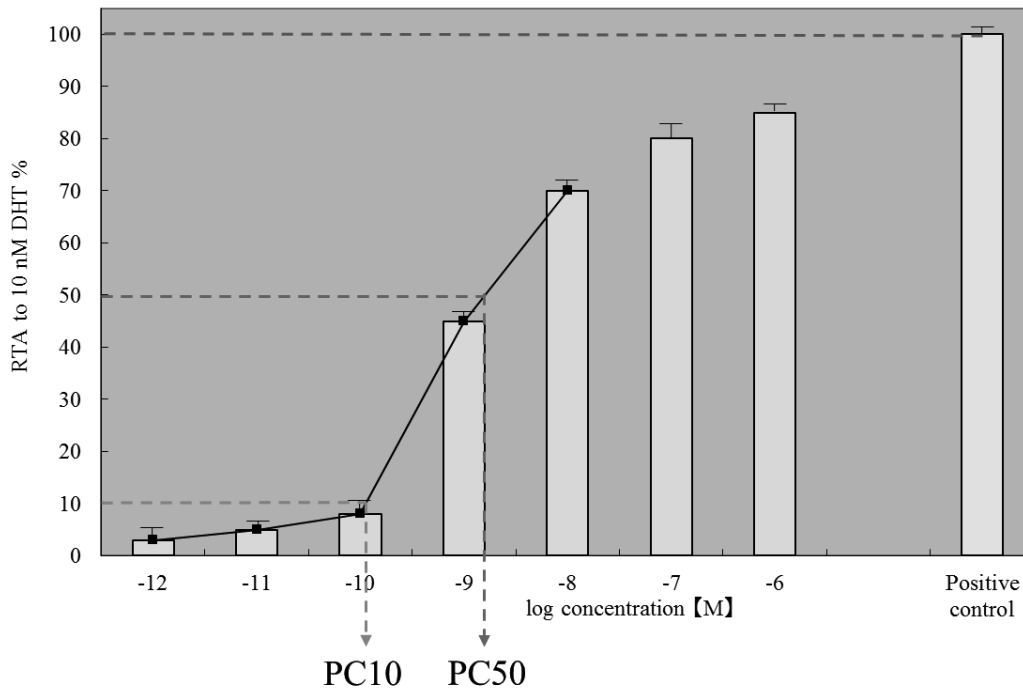


Figure 3: Schematic descriptions of log PC_x values

The PC_{AGO} (Positive control; 10 nM of DHT) is included on each assay plate in agonist assay. RTA: relative transcriptional activity

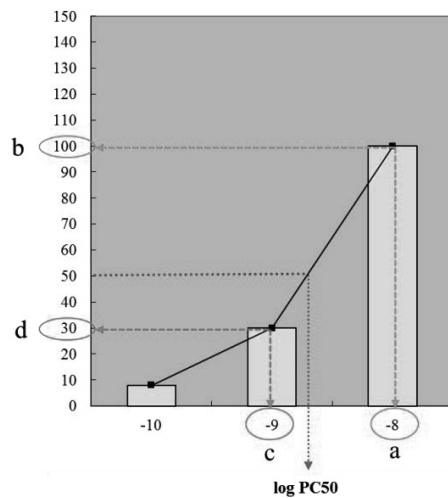


Figure 4: Example for calculation of log PC₅₀.

47. In the case of the antagonist assay, the following information should be provided for each positive test chemical: the concentrations of 30% inhibition of transcriptional activity induced by 500 pM DHT (log IC₃₀) and, if appropriate, to 50% inhibition of activity of 500 pM DHT (log IC₅₀).
48. Descriptions of log IC_x values, “x” is a selected response like 30% or 50% inhibition compared to DHT controls, are provided in Figure 5. log IC₅₀ and log IC₃₀ values can be defined as the test chemical concentrations estimated to elicit either a 50% or a 30% inhibition of transcriptional activity induced by 500 pM DHT. These values can be calculated in the same way as the log PC

values. Each $\log IC_x$ value can be calculated by a simple linear regression using two variable data points for the transcriptional activity. Where the data points lying immediately above and below the $\log IC_x$ value have the coordinates (c,d) and (a,b) respectively, then the $\log IC_x$ value is calculated using the following equation and Figure 6:

$$\log [IC_x] = a - [(b - (100 - x)) / (b - d)] (a - c)$$

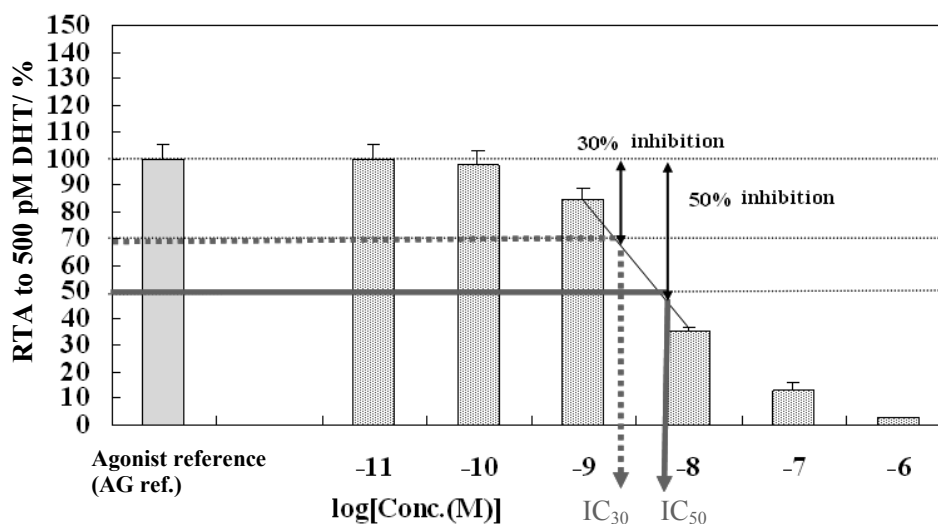


Figure 5: Schematic descriptions of log IC values.

The AG ref (DMSO at 0.1% spiked with 500 pM DHT) is included on each assay plate in antagonist assay. RTA: relative transcriptional activity

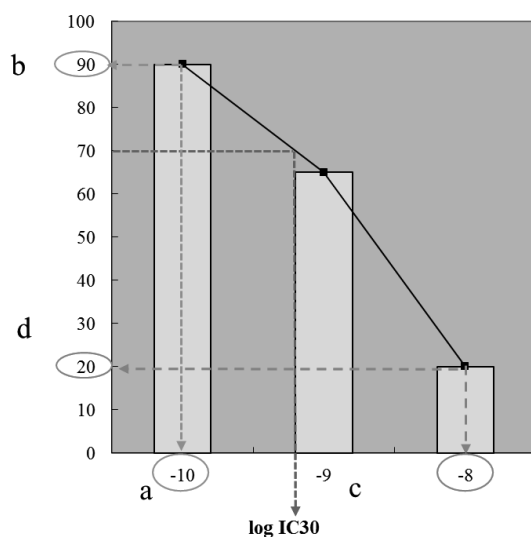


Figure 6: Examples for calculation of log IC₃₀.

49. To distinguish pure antagonism from a cytotoxicity-related decrease of luciferase activity, AR-EcoScreen™ is designed to express two kinds of luciferase: firefly luciferase inducibly expressed by the AR response element and renilla luciferase stably and non-inducibly expressed.

50. By using dual reporter assay system, both cell viability and the antagonism can be evaluated in the same cells in a single plate run. The response for the positive cytotoxic control (10µg/mL of cycloheximide called PC_{CT}) is used to adjust renilla activity by subtracting the PC_{CT} values – the so-called “renilla activities” - from those of all sample wells. To evaluate the true cytotoxicity of chemicals with the AR Ecoscreen™ assay, such revised cell viability should be used. If the cell viability is lower than 80% at the specific concentration of a test chemical, this/these data point(s) is/are left out of the calculations.
51. The results, i.e. positive or negative judgment of test chemical, should be based on a minimum of two or three independent runs. If two runs give comparable and reproducible results, it may not be necessary to conduct a third run. To be acceptable, the results should:
- Meet the acceptability criteria (see paragraphs 20-27)
 - Be reproducible in triplicate wells (CV<20%).

Data Interpretation Criteria

52. **For the agonist assay**, data interpretation criteria are shown in Table 5-1. Positive results will be characterised by both the magnitude of the effect and the concentration at which the effect occurs. Expressing results as a concentration at which a 50% (log PC₅₀) or 10% (log PC₁₀) are reached accomplishes the goal. However, a test chemical is determined to be positive if the maximum response induction by the test chemical (RPC_{max}) is equal to or exceeds 10% of the positive control responses in at least two of two or two of three runs, whereas a test chemical is considered negative if the RPC_{max} fails to achieve at least 10% of the positive control in two of two or two of three runs.

Table 5-1: Positive and negative decision criteria for agonist assay

Positive	If a RPC _{max} is obtained that is equal to or exceeds 10% of the response of the positive control in at least two of two or two of three runs.
Negative	If a RPC _{max} fails to achieve at least 10% of the response of the positive control in two of two or two of three runs.

53. **For the antagonist assay**, data interpretation criteria are shown in Table 5-2. Positive results will be characterised by both the magnitude of the effect and the concentration at which the effect occurs. Expressing results as a concentration at which a 50% (log IC₅₀) or 30% (log IC₃₀) are reached, accomplishes this goal. However, a test chemical is determined to be positive if the log IC₃₀ could be calculated in at least two of two or two of three runs, whereas a test chemical is considered as negative if the log IC₃₀ could not be calculated in two of two or two of three runs.

Table 5-2: Positive and negative decision criteria for antagonist assay

Positive	If the log IC ₃₀ is calculated in at least two of two or two of three runs.
Negative	If the log IC ₃₀ fails to calculate in two of two or two of three runs.

54. The calculations of log PC₁₀, log PC₅₀ and RPC_{max} for agonist assay, and log IC₅₀ and log IC₃₀ for antagonist assay can be calculated by using a spreadsheet available with the Test Guideline on the OECD public website.
55. It should be sufficient to obtain log PC_x or log IC_x values at least twice. However, should the resulting base-line for data in the same concentration range show variability with high coefficient

of variation (%CV), it should be considered that the reliability of the data is low and the source of the high variability should be identified. The %CV of the raw data triplicate wells (i.e. luminescence intensity data) of the data points on the same assay plate that are used for the calculation of log PC_x or log IC_x should be less than 20%. When an equivocal or inconclusive result is suspected, an additional run or check can be considered.

56. Meeting the acceptability criteria indicates the assay system is operating properly, but it does not ensure that any particular run will produce accurate data. Duplicating the results of the first run is the best assurance that accurate data were produced.

TEST REPORT

57. The test report should include the following information:

Control/Reference standards/Test chemical

- Source, lot number, expiry date, if available
- Stability of the test chemical itself, if known;
- Solubility and stability of the test chemical in solvent, if known.
- Measurement of pH, osmolality and precipitate in the culture medium to which the test chemical was added, as appropriate.

Mono-constituent substance:

- Physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties;
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name, CAS number, SMILES or InChI code, structural formula, purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc.

Multi-constituent substance, UVCBs and mixtures:

- Characterised as far as possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents.

Solvent/Vehicle:

- Characterisation (nature, supplier and lot number);
- Justification for choice of solvent/vehicle;
- Solubility and stability of the test chemical in solvent/vehicle, if known.

Cells:

- Type and source of cells;
- Number of cell passages;
- Methods for maintenance of cell cultures.

Test conditions:

Solubility limitations should be reported, as well as:

- Composition of media, CO₂ concentration;
- Concentration of test chemical;
- Volume of vehicle and test chemical added;
- Incubation temperature and humidity;
- Duration of treatment;

- Cell density during treatment;
- Positive and negative reference standards;
- Duration of treatment period;
- Luciferase assay reagents (Product name, supplier and lot);
- Acceptability and data interpretation criteria.

Acceptability check:

- Fold inductions for each assay plate.
- Actual log PC₅₀ and log PC₁₀ (or log IC₅₀ and log IC₃₀) values for concurrent reference standards.

Results:

- Raw and normalised data of luminescent signals;
- The maximum fold induction level;
- Cytotoxicity data;
- Concentration-response relationship, where possible;
- Log PC₁₀, log PC₅₀ and PC_{max} for agonist assay, and log IC₅₀ and log IC₃₀ values for antagonist assay, as appropriate;
- EC₅₀ values, if appropriate;
- Statistical analyses, if any, together with a measure of error (e.g. SD, %CV or 95% confidence interval) and a description of how these values were obtained.

Discussion of the results***Conclusion***

LITERATURE

1. OECD (2012), Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
2. OECD (2016), Validation report of Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transactivation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.241), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. EDSTAC (1998) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Available at: [<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>]
4. ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine.htm#fineval>]
5. Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Clark, G. and Newbold R. (2002), Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J. Chromat. B.*, 777, 179-189.
6. Sonneveld, E., Riteco, J.A., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. and van der Burg, B. (2006), Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89, 173-187.
7. Gray, L.E. Jr. (1998), Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
8. Escande, A., et al. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
9. Kuiper, G.G., et al. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
10. Tarnow, P., Tralau, T., Hunecke, D., Luch, A.(2013), Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells. *Toxicol In Vitro.* 27, 1467-1475.
11. 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). *J. Health Sci.*, 51(5), 557-568.
12. Wilson V. S., Bobseine K., Lambright C. R. and Gray Jr. L. E., (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 (1): 69-81.
13. Araki N, Ohno K, Nakai M, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by *in vitro* reporter gene assays using AR-EcoScreen cells. *Toxicol In Vitro.* 19(6):831-42.
14. Araki N, Ohno K, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Evaluation of a rapid *in vitro* androgen receptor transcriptional activation assay using AR-EcoScreen cells. *Toxicol In Vitro.* 19(3):335-52.
15. Spaepen, M., Angulo, A.F., Marynen, P. and Cassiman, J.J. (1992), Detection of bacterial and

- mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 78(1), 89-94.
16. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii H (1995), Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.* 57(4), 769-71.
 17. Dussurget, O. and Roulland-Dussoix D. (1994), Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(3), 953-9.
 18. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

ANNEX 1

Definitions and abbreviations

Agonist: A substance that binds to a specific receptor and triggers a response in the cell. It mimics the action of an endogenous ligand that binds to the same receptor.

AG ref: Agonist reference (500 pM of DHT) in the antagonist assay.

Androgenic activity: the capability of a chemical to mimic 5 α -Dihydrotestosterone in its ability to bind to and activate androgen receptors. AR-mediated specific androgenic activity can be detected in this Test Guideline.

Antagonist: A type of receptor ligand or chemical that does not provoke a biological response itself upon binding to a receptor, but blocks or dampens agonist-mediated responses.

Anti-androgenic activity: the capability of a chemical to suppress the action of 5 α -Dihydrotestosterone-mediated through androgen receptors. AR-mediated specific anti-androgenic activity can be detected in this Test Guideline.

AR: Androgen receptor

ARTA: Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay.

BPA: Bisphenol A

%CV: Coefficient of variation

Cytotoxicity: the harmful effects to cell structure or function ultimately causing cell death. It can be reflected by a reduction in the number of cells present in the well at the end of the exposure period or a reduction of the capacity for a measure of cellular function when compared to the concurrent vehicle control.

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum.

DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalate

DHT: 5 α -Dihydrotestosterone

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EC₅₀ value: the concentration of agonist that provokes a response halfway between the baseline (Bottom) and maximum response (Top).

ER: Estrogen receptor

FBS: Fetal bovine serum

GR: Glucocorticoid receptor

HF: Hydroxyflutamide

IC₅₀: the concentration of a test chemical at which the measured activity in an antagonist assay inhibits at level of 50% of the maximum activity induced by 500 pM DHT in each plate.

IC₃₀: the concentration of a test chemical at which the measured activity in an antagonist assay inhibits at level of 30% of the maximum activity induced by 500 pM DHT in each plate.

PC_{AGO}: Positive AR agonist control (DHT at 10 nM)

PC_{ATG} : Positive AR antagonist control (500 pM DHT and 0.1 μ M of HF)

PC_{CT}: the response of the positive cytotoxic control (10µg/mL of cycloheximide)

PC₁₀: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 10% of the response induced by positive control (DHT at 10 nM) in each plate.

PC₅₀: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 50% of the response induced by positive control (DHT at 10 nM) in each plate.

PC_{max}: the concentration of a test chemical inducing the RPC_{max}.

RPC_{max}: maximum level of response induced by a test chemical, expressed as a percentage to the response induced by PC_{AGO} (10 nM DHT) on the same plate.

RLU: Relative Light Units

RTA: Relative Transcriptional Activity

RT PCR: Real Time polymerase chain reaction

SARMs : Selective androgen receptor modulators

SD: Standard deviation

STTA: Stably Transfected Transcriptional Activation Assay.

TA: Transcriptional activation

UVCBs: Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials

Validation: The process by which the reliability and relevance of a particular approach, method, process or assessment is established for a defined purpose (18).

VC (Vehicle control): The vehicle that is used to dissolve test and control chemicals is tested solely as vehicle without dissolved chemical.

ANNEX 2

False positives: Assessment of non-AR-mediated luminescence signals

1. False positives might be generated by non-AR-mediated activation of the luciferase gene, or direct activation of the gene product or unrelated luminescence. Such effects are indicated by an incomplete or unusual dose-response curve. If such effects are suspected, the effect of an AR antagonist (e.g. Hydroxyflutamide (HF) at non-toxic concentration) on the response should be examined.
2. To ensure validity of this approach, the agonistic activity of the following needs to be tested in the same plate:
 - Agonistic activity of the unknown chemical with / without 1 μ M of HF (in triplicate)
 - VC (in triplicate)
 - 1 μ M HF (in triplicate)
 - 500 pM of DHT (in triplicate) as PC_{AGO}

3. Data interpretation criteria

Note: All wells should be treated with the same concentration of the vehicle.

- If the agonistic activity of the unknown chemical is NOT affected by the treatment with HF, it is classified as “Negative”.
- If the agonistic activity of the unknown chemical is inhibited, apply the decision criteria (Table 5-1).
- If the agonistic activity at any concentrations tested is inhibited by the treatment with 1 μ M of HF (AR antagonist), the difference in the responses between the wells non-treated with the AR antagonist and wells treated with the AR antagonist is calculated. This difference should be considered as the true response and should be used for the calculation of the appropriate parameters to enable a classification decision to be made.

$$\text{True response} = (\text{Response without HF}) - (\text{Response with HF})$$

4. Data analysis

Check the performance standard.

Check the CV between wells treated under the same conditions.

1. Calculate the mean of the VC
2. Subtract the mean of VC from each well value **not** treated with HF
3. Calculate the mean of HF
4. Subtract the mean of the VC from each well value treated with HF
5. Calculate the mean of the PC_{AGO}
6. Calculate the relative transcriptional activity of all other wells relative to the PC_{AGO}