



試験ガイドライン No.455

安定に形質移入した転写活性化に関する
性能に基づく試験法ガイドライン
エストロゲン受容体アゴニストお
よびアンタゴニストの検出のた
めの *in vitro* 試験法

2021 年 6 月 14 日

OECD の化学物質の試験に
関するガイドライン



OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを検出するための、安定に形質移入した転写活性化 *In Vitro* 試験法に関する性能に基づく試験法ガイドライン

はじめに

性能に基づく試験法ガイドライン

1. この性能に基づく試験法ガイドライン (PBTG) では、エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを検出するための、安定に形質移入した転写活性化 *In Vitro* 試験法 (ER TA 試験法) について説明する。本試験は、エストロゲン受容体 (すなわち、ER α および/または ER β) アゴニストおよびアンタゴニストの確認試験に関する機械的および機能的に類似するいくつかの試験方法からなり、危険有害物評価の新規または更新済み検査方法の国際的承認 についての OECD ガイダンス文書 (GD) (1) に規定されるバリデーションの原則に従った新たな類似試験または改良試験の開発を促進するものである。本 PBTG の基礎となる十分に検証された参照試験法 (補遺 2 および補遺 3) は次の通りである：

- (h) ER α -HeLa-9903 細胞株を用いた安定に形質移入した TA (STTA) 試験法 (2)、および
- hER α を主に発現し、hER β がある程度寄与する(4) (5)、VM7Luc4E2 細胞株¹を用いた VM7Luc ER TA 試験法 (3)

同一の危険有害物エンドポイントについての類似試験法の開発およびバリデーションには、性能基準 (PS) (6) (7)が利用可能であり、これを使用すべきである。これらにより、本 PBTG を適時に改訂して、更新された PBTG に新たな類似する試験法を追加できるようになる。ただし、類似試験法は、性能基準が満たされていることを確認し、合意した後にのみ追加される。本試験ガイドラインに含まれる試験法は、エストロゲン受容体の転写活性化に関する試験結果に対する各国の要求事項への対応に一律に使用することができ、さらにデータの相互受け入れによる利益が得られる。

¹ 2016 年 6 月以前は、この細胞株は BG1Luc 細胞株と称されていた。BG-1 細胞は当初 Geisinger ら (1998 年) (35) によって報告され、後に国立環境衛生科学研究所 (NIEHS) の研究者らによって特徴付けられた(36)。比較的最近になって、研究者らが使用している BG-1 細胞には、BG-1 Fr と BG-1 NIEHS の 2 つの異なる変異体が存在することが発見された。Li ら (2014 年) (37) が実施したこれら 2 つの BG-1 変異細胞株の DNA 検査を含む詳細な分析により、BG-1 Fr は独特のものであり、分析法の開発に使用した元の細胞株である BG-1 NIEHS は BG1 ヒト卵巣癌細胞株ではなく、MCF7 ヒト乳癌細胞株の変異体であることが示された。本試験法に使用した細胞株は、当初は BG1Luc4E2(38)と呼ばれていたが、現在は VM7Luc4E2 (「V」= 変異体) と称される。「M7」= MCF7 細胞)。同様に、本試験法は現在、VM7Luc ER TA と称されている。これにより、本試験法のベースとなる細胞株の由来は変わるが、既報のバリデーション試験にも、エストロゲン/抗エストロゲン様化学物質のスクリーニングにおける本試験法の有用性や適用にも影響しない。

本 PBTG に含まれる試験法の背景と原理

2. OECD では、1998 年に優先的活動項目の一つとして、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試験ガイドラインに関し、既存のものを改訂し、新規に作成し直す作業を開始した。内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質の試験および評価に関する OECD の概念枠組み（Conceptual Framework: CF）は 2012 年に改訂された。当初の CF および改訂された CF は、内分泌かく乱性評価のための標準化された試験ガイドラインに関するガイダンス文書に補遺として含まれている(8)。CF は 5 つのレベルで構成され、それぞれ異なったレベルの生物学的複雑性に対応している。本 PBTG で説明する ER 転写活性化（TA）試験は、「*選択された内分泌機構／経路に関するデータをもたらす *in vitro* 試験*」が含まれるレベル 2 に当たる。本 PBTG は、エストロゲン受容体（ER）アゴニストおよびアンタゴニストを確認できるよう設計された *in vitro* 転写活性化（TA）試験法に関するものである。

3. エストロゲンと ER との相互作用はエストロゲン制御遺伝子の転写に影響を与え、細胞増殖、正常な胎児発生、および生殖機能に必要なものを含む細胞プロセスの誘導または阻害につながる可能性がある(9)(10)(11)。正常なエストロゲンシステムの混乱は正常な発生（個体発生）、生殖に関する健康および生殖系の完全性に対する有害な作用を引き起こす可能性がある。

4. *In vitro* での TA 試験は、レポーター遺伝子産物の転写を制御する特異的受容体と物質との直接的または間接的な相互作用を基にしている。このような試験は、ER のような特定の核内受容体により制御される遺伝子発現を評価するために広く用いられてきた(12)(13)(14)(15)(16)。これらは、ER により制御されるエストロゲンの転写活性化の検出に対して提案されている(17)(18)(19)。核内 ER には、それぞれ α と β と呼ばれる少なくとも 2 つの主要なサブタイプがあり、これらは異なる遺伝子によってコードされる。それぞれの蛋白質は、生物学的機能や組織分布、リガンド結合親和性が異なる(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)。核内 ER α は古典的なエストロゲン応答(27)(28)(29)(30)を媒介するため、ER の活性化または阻害を測定するために現在開発中のほとんどのモデルは ER α に特異的である。これらの試験は、リガンド結合後に ER を活性化（または阻害）する化学物質を同定するために使用し、その後受容体-リガンド複合体が特定の DNA 応答エレメントに結合し、レポーター遺伝子を転写活性化することで、マーカー蛋白質の細胞内発現量を増加させる。これらの試験法では、異なるレポーター応答を使用することができる。ルシフェラーゼに基づいたシステムでは、ルシフェラーゼ酵素がルシフェリン基質を照度計での定量的測定が可能な生物発光生成物に変換する。その他の一般的なレポーターの例として、蛍光蛋白質や、無色の基質である X-gal（5-ブロモ-4-クロロ-インドリル-ガラクトピラノシド）を分光光度計で定量可能な青色の生成物に変換可能な酵素である β -ガラクトシダーゼをコードする *LacZ* 遺伝子が挙げられる。これらのレポーターは、市販の試験キットを用いて迅速かつ安価に評価することができる。

5. STTA および VM7Luc TA 試験法のバリデーション試験では、意図する目的に対するそれらの妥当性および信頼性が実証された(3)(4)(5)(30)。乳房細胞株を用いた発光ベース ER TA 試験法の性能基準は、LUMI-CELL® ER（VM7Luc ER TA）試験法に関する（米）代替試験法の検証に関する省庁間調整委員会（ICCVAM）試験法評価報告書：化学物質のヒトエストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニスト活性を確認するための *in vitro* 試験法に記載され

ている (3)。これらの性能基準は、STTA および VM7Luc TA の両試験法に適用できるように改訂されている (2)。

6. 本試験ガイドラインで使用する定義および略語は、補遺 1に記載している。

適用範囲およびTA 試験法に関連する制限

7. これらの試験法は、スクリーニングおよび優先順位付けの目的で提案されているが、証拠の重み付けアプローチで利用できる機構的情報を提供することもできる。これらは、*in vitro* 系において化学物質がエストロゲン受容体 (ER) に結合することで誘発される TA に対応するものである。したがって、*in vivo* での完全な状態の内分泌系の複雑なシグナル伝達と調節に結果をそのまま外挿するべきではない。

8. ER を介した TA は内分泌かく乱 (ED) の主要な機序の 1 つであると考えられているが、ED が生じる可能性のある機序には他に、(i) 内分泌系内の他の受容体や酵素系との相互作用、(ii) ホルモン合成、(iii) 代謝活性化および／またはホルモン不活性化、(iv) 標的組織へのホルモンの分布、(v) 身体からのホルモンのクリアランスなどがある。本 PBTG に基づくいずれの試験法も、これらの作用機序に対応するものではない。

9. 本 PBTG は、化学物質が活性化（すなわちアゴニストとして作用）し、また ER 依存性転写を抑制（すなわちアンタゴニストとして作用）する能力を扱っている。化学物質の中には、細胞型依存的にアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性の両方を示し、選択的エストロゲン受容体調節因子 (SERM) として知られているものがある。これらの試験法で陰性であった化学物質は、その化学物質が受容体に結合しないと結論する前に、ER 結合試験で評価することができる。また、本試験法は、*in vitro* 細胞系の限られた代謝能を考慮して親分子の活性に関する情報を提供するにすぎない。バリデーション時には単一物質しか使用されていないことを考慮し、混合物の試験への適用性は検討されていない。しかし、本試験法は、多成分物質および混合物の試験に理論的に適用可能である。ある混合物について規制目的を意図してデータを生成する場合、この試験ガイドラインを用いる前に、ガイドラインからその目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合の理由について検討する。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検討は不要である。

10. 参照のため、本 PBTG に記載した十分に検証された両試験法で試験を行った 34 物質のアゴニスト試験の結果を表 1 に示す。ER 結合および TA に関する *in vitro* 試験法、および／または子宮刺激性試験法などの公表成績(2)(3)(18)(31)(32)(33)(34)に基づく、これらの物質のうち 26 が確定的 ER アゴニストおよび 8 つの陰性物質に分類される。本 PBTG に記載した十分に検証された両試験法で試験を行った 15 物質のアゴニスト試験の結果を表 2 に示す。ER 結合および TA に関する *in vitro* 試験法などの公表成績(2)(3)(18)(31)に基づく、これらの物質のうち 4 つが確定的／推定的 ER アンタゴニストおよび 10 の陰性物質に分類される。表 1 および表 2 に要約したデータに関して、アンタゴニストアッセイ用の 1 つの物質（ミフェプリストン）を除くいずれの物質の分類に関しても、2 つの参照試験法間で 100% の一致があり、各物質は ER アゴニスト／アンタゴニストまたは陰性に正しく分類されている。本化学物質群およびバリデーション試験において STTA および VM7Luc ER TA 試験法でされたその他の化学物質に関する補足情報は、ERTA 試験に関する性能基準(6)(7)、補遺 2（表 1、表 2、表 3）に示す。

表 1: 両アゴニストアッセイで試験し、ER アゴニスト (POS) または陰性 (NEG) に分類した物質についての STTA および VM7Luc ER TA 試験法の結果の概要

	物質	CASRN	STTA 試験法 ¹			VM7Luc ER TA 試験法 ²		分類のためのデータソース ⁴		
			ER TA 活性	PC ₁₀ 値 (M)	PC ₅₀ 値 ^b (M)	ER TA 活性	EC50 値 ^{b,3} (M)	その他の ER TAs ^c	ER 結合性	子宮刺激性
1	17β-エストラジオール ^a	50-28-2	陽性	<1.00 × 10 ⁻¹¹	<1.00 × 10 ⁻¹¹	陽性	5.63 × 10 ⁻¹²	陽性(227/227)	陽性	陽性
2	17α-エストラジオール ^a	57-91-0	陽性	7.24 × 10 ⁻¹¹	6.44 × 10 ⁻¹⁰	陽性	1.40 × 10 ⁻⁹	陽性 (11/11)	陽性	陽性
3	17α-エチニルエストラジオール ^a	57-63-6	陽性	<1.00 × 10 ⁻¹¹	<1.00 × 10 ⁻¹¹	陽性	7.31 × 10 ⁻¹²	陽性 (22/22)	陽性	陽性
4	17β-トレンボロン	10161-33-8	陽性	1.78 × 10 ⁻⁸	2.73 × 10 ⁻⁷	陽性	4.20 × 10 ⁻⁸	陽性 (2/2)	未試験	未試験
5	19-ノルテストステロン ^a	434-22-0	陽性	9.64 × 10 ⁻⁹	2.71 × 10 ⁻⁷	陽性	1.80 × 10 ⁻⁶	陽性 (4/4)	陽性	陽性
6	4-クミルフェノール ^a	599-64-4	陽性	1.49 × 10 ⁻⁷	1.60 × 10 ⁻⁶	陽性	3.20 × 10 ⁻⁷	陽性 (5/5)	陽性	未試験
7	4-tert-オクチルフェノール ^a	140-66-9	陽性	1.85 × 10 ⁻⁹	7.37 × 10 ⁻⁸	陽性	3.19 × 10 ⁻⁸	陽性 (21/24)	陽性	陽性
8	アピゲニン ^a	520-36-5	陽性	1.31 × 10 ⁻⁷	5.71 × 10 ⁻⁷	陽性	1.60 × 10 ⁻⁶	陽性 (26/26)	陽性	未試験
9	アトラジン ^a	1912-24-9	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (30/30)	陰性	未試験
10	ビスフェノール A ^a	80-05-7	陽性	2.02 × 10 ⁻⁸	2.94 × 10 ⁻⁷	陽性	5.33 × 10 ⁻⁷	陽性 (65/65)	陽性	陽性
11	ビスフェノール B ^a	77-40-7	陽性	2.36 × 10 ⁻⁸	2.11 × 10 ⁻⁷	陽性	1.95 × 10 ⁻⁷	陽性 (6/6)	陽性	陽性
12	フタル酸ブチルベンジル ^a	85-68-7	陽性	1.14 × 10 ⁻⁶	4.11 × 10 ⁻⁶	陽性	1.98 × 10 ⁻⁶	陽性 (12/14)	陽性	陰性
13	コルチコステロン ^a	50-22-6	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (6/6)	陰性	未試験
14	クメストロール ^a	479-13-0	陽性	1.23 × 10 ⁻⁹	2.00 × 10 ⁻⁸	陽性	1.32 × 10 ⁻⁷	陽性 (30/30)	陽性	未試験
15	ダイゼイン ^a	486-66-8	陽性	1.76 × 10 ⁻⁸	1.51 × 10 ⁻⁷	陽性	7.95 × 10 ⁻⁷	陽性 (39/39)	陽性	陽性
16	ジエチルスチルベストロール ^a	56-53-1	陽性	<1.00 × 10 ⁻¹¹	2.04 × 10 ⁻¹¹	陽性	3.34 × 10 ⁻¹¹	陽性 (42/42)	陽性	未試験
17	フタル酸ジ-n-ブチル	84-74-2	陽性	4.09 × 10 ⁻⁶		陽性	4.09 × 10 ⁻⁶	陽性 (6/11)	陽性	陰性
18	エチルパラベン	120-47-8	陽性	5.00 × 10 ⁻⁶	(no PC ₅₀)	陽性	2.48 × 10 ⁻⁵	陽性		未試験
19	エストロン ^a	53-16-7	陽性	3.02 × 10 ⁻¹¹	5.88 × 10 ⁻¹⁰	陽性	2.34 × 10 ⁻¹⁰	陽性 (26/28)	陽性	陽性
20	ゲニステイン ^a	446-72-0	陽性	2.24 × 10 ⁻⁹	2.45 × 10 ⁻⁸	陽性	2.71 × 10 ⁻⁷	陽性 (100/102)	陽性	陽性
21	ハロペリドール	52-86-8	陰性	-	-	陰性	-	陰性(2/2)	陰性	未試験

22	ケンフェロール ^a	520-18-3	陽性	1.36×10^{-7}	1.21×10^{-6}	陽性	3.99×10^{-6}	陽性 (23/23)	陽性	未試験
23	キーボン ^a	143-50-0	陽性	7.11×10^{-7}	7.68×10^{-6}	陽性	4.91×10^{-7}	陽性 (14/18)	陽性	未試験
24	ケトコナゾール	65277-42-1	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (2/2)	陰性	未試験
25	リニユロン ^a	330-55-2	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (8/8)	陰性	未試験
26	meso-ヘキセストール ^a	84-16-2	陽性	$<1.00 \times 10^{-11}$	2.75×10^{-11}	陽性	1.65×10^{-11}	陽性 (4/4)	陽性	未試験
27	メチルテストステロン ^a	58-18-4	陽性	1.73×10^{-7}	4.11×10^{-6}	陽性	2.68×10^{-6}	陽性 (5/6)	陽性	未試験
28	モリン	480-16-0	陽性	5.43×10^{-7}	4.16×10^{-6}	陽性	2.37×10^{-6}	陽性 (2/2)	陽性	未試験
29	ノルエチノドレル ^a	68-23-5	陽性	1.11×10^{-11}	1.50×10^{-9}	陽性	9.39×10^{-10}	陽性 (5/5)	陽性	未試験
30	p,p'-メトキシクロル ^a	72-43-5	陽性	1.23×10^{-6}	(no PC50) ^b	陽性	1.92×10^{-6}	陽性 (24/27)	陽性	陽性
31	フェノバルビタール ^a	57-30-7	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (2/2)	陰性	未試験
32	レセルピン	50-55-5	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (4/4)	陰性	未試験
33	スピロノラクトン ^a	52-01-7	陰性	-	-	陰性	-	陰性 (4/4)	陰性	未試験
34	テストステロン	58-22-0	陽性	2.82×10^{-8}	9.78×10^{-6}	陽性	1.75×10^{-5}	陽性 (5/10)	陽性	未試験

略語：CASRN = CAS 登録番号、M = モル、EC₅₀ = 被験物質の 50% 有効濃度、PC₁₀（および PC₅₀）= 各プレートにおける陽性対照（E2、1nM）により誘発された応答の 10%（または PC₅₀ では 50%）の応答を示す被験物質の濃度。

^aER アゴニストまたは陰性物質に指定され、VM7Luc ER TA バリデーション試験（ICCVAM VM7Luc ER TA 評価報告書、表 4-1(3)）で正確性の評価に使用され、STTA および VM7Luc ER TA 試験法で試験した共通物質。

^b細胞毒性または不溶性のために制限がない状態で試験した最高濃度は、 1×10^{-5} M（STTA 試験法）および 1×10^{-3} M（VM7Luc ER TA 試験法）であった。

^c括弧内の数字は、参照された試験の総数に対して陽性（POS）または陰性（NEG）に分類された試験結果を示す。

¹エストロゲン活性を検出するための安定に形質移入した転写活性化（TA）試験法 - hER-HeLa-9903 細胞株を用いたヒトエストロゲン受容体 α を介したレポーター遺伝子試験法の先行バリデーションおよび施設間バリデーションの報告書案で報告された値(2)

²LUMI-CELL® ER（VM7Luc ER TA）試験法に関する ICCVAM 試験法評価報告書：ER アゴニストおよびアンタゴニストを同定するための *in vitro* 試験法(3)

³平均 EC₅₀ 値は、VM7Luc ER TA バリデーション試験（XDS、ECVAM および Hiyoshi）(3)の試験施設から報告された値を用いて算出した。

⁴ER アゴニストまたは陰性としての分類は、ER 結合および TA 試験法に関する ICCVAM Background Review Document（BRD）(31)の情報、ならびに ICCVAM BRD の完了後に公表・検討された文献(2)(3)(18)(31)(33)(34)から得られた情報に基づいた。

注記：本 PBTG 内の各試験法には同じ測定値はない。一部の状況では、完全な用量応答曲線が作成されないため、EC₅₀ が算出できない。STTA 試験法では、PC₁₀ 値は重要な測定値であるが、PC_x から有用な情報を得られるさらなる例もある。

表 2： 両アンタゴニストアッセイで試験し、ER アンタゴニスト（POS）または陰性（NEG）に分類した物質についての STTA および VM7Luc ER TA 試験法の結果の比較

	物質名 ^a	CASRN	ER STTA 試験法 ¹		VM7Luc ER TA 試験法 ²		ER STTA 候補の影響 ⁴	ICCVAM ⁵ の コンセンサス 分類	MeSH ⁶ 化学物質クラス	製品クラス ⁷
			ER TA 活性	IC ₅₀ 値 ^b (M)	ER TA 活性	IC ₅₀ 値 ^{b,3} (M)				
1	4-ヒドロキシタモキシフェン	68047-06-3	陽性	3.97×10^{-9}	陽性	2.08×10^{-7}	中程度陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
2	ジベンゾ [a,h] アントラセン	53-70-3	陽性	No IC ₅₀	陽性	No IC ₅₀	陽性	陽性と推定	多環式化合物	実験用薬品、天然物
3	ミフェプリストン	84371-65-3	陽性	5.61×10^{-6}	陰性	-	軽度 陽性	陰性	ステロイド	医薬品
4	ラロキシフェン塩酸塩	82640-04-8	陽性	7.86×10^{-10}	陽性	1.19×10^{-9}	中程度陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
5	タモキシフェン	10540-29-1	陽性	4.91×10^{-7}	陽性	8.17×10^{-7}	陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
6	17β-エストラジオール	50-28-2	陰性	-	陰性	-	陰性と推定	陰性と推定	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
7	アビゲニン	520-36-5	陰性	-	陰性	-	陰性	陰性	複素環化合物	色素、天然物、医薬品中間体
8	アトラジン	1912-24-9	陰性	-	陰性	-	陰性	陰性と推定	複素環化合物	除草剤
9	フタル酸ジ-n-ブチル	84-74-2	陰性	-	陰性	-	陰性	陰性	エステル、フタル酸	化粧品成分、化成品、可塑剤
10	フェナリモル	60168-88-9	陰性	-	陰性	-	未試験	陰性と推定	複素環化合物、ピリミジン	殺菌剤
11	フラボン	525-82-6	陰性	-	陰性	-	陰性と推定	陰性と推定	フラボノイド、複素環化合物	天然物、医薬品
12	フルタミド	13311-84-7	陰性	-	陰性	-	陰性	陰性と推定	アミド	医薬品、動物用医薬品
13	ゲニステイン	446-72-0	陰性	-	陰性	-	陰性と推定	陰性	フラボノイド、複素環化合物	天然物、医薬品
14	p-n-ニルフェノール	104-40-5	陰性	-	陰性	-	未試験	陰性	フェノール	化学中間体
15	レスベラトロール	501-36-0	陰性	-	陰性	-	陰性と推定	陰性	炭化水素（環状）	天然物

略語：CASRN = CAS 登録番号、M = モル、IC₅₀ = 被験物質の 50%阻害濃度。

^a ER アンタゴニストまたは陰性物質に指定され、VM7Luc ER TA バリデーション試験(2)(3)で正確性の評価に使用した、STTA および VM7Luc ER TA 試験法で試験した共通物質。

^b 細胞毒性または不溶性のために制限がない状態で試験した最高濃度は、 1×10^{-3} M（STTA 試験法）および 1×10^{-5} M（VM7Luc ER TA 試験法）であった。

¹ ER を介した活性を検出するための安定に形質移入した転写活性化試験法のバリデーション報告書、パート B(2)

² LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) 試験法に関する ICCVAM 試験法評価報告書：ER アゴニストおよびアンタゴニストを同定するための *in vitro* 試験法(3)

³ 平均 IC₅₀ 値は、VM7Luc ER TA バリデーション試験 (XDS、ECVAM および Hiyoshi) (3)の試験施設から報告された値を用いて算出した。

⁴ ER STTA 活性は、ER 結合試験、子宮刺激性試験の CERI の過去データおよび公開文献から照合された情報から推定した(2)

⁵ ER アンタゴニストまたは陰性としての分類は、ER 結合および TA 試験法に関する ICCVAM Background Review Document (BRD) (31)の情報、ならびに ICCVAM BRD の完了後に公表・検討された文献(2)(3)(18)(31)から得られた情報に基づいた。

⁶ 国際的に認められ標準化された分類法である米国国立医学図書館の医学件名標目表 (MeSH) を用いて、各化学物質を一つ以上の化学物質分類に分類した (<http://www.nlm.nih.gov/mesh> より入手可能)。

⁷ 米国国立医学図書館の有害物質データベースを用いて、各化学物質を一つ以上の製品分類に分類した (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> より入手可能)。

ER TA 試験法の構成要素

試験法の必須構成要素

11. 本 PBTG は、1 つ以上のエストロゲン応答エレメントの制御下で、安定に形質移入した、または内因性 ER α 受容体および安定に形質移入したレポーター遺伝子構築物を用いる手法に適用される。ただし、ER β などの他の受容体が存在する可能性がある。これらは試験法の必須構成要素である。

対照物質

12. 各アゴニストおよびアンタゴニストアッセイについて、提案された同時参照標準の根拠を説明すること。必要に応じて、同時対照（陰性対照、溶剤および陽性対照）は、試験法が試験条件下で作動していることの指標となり、実験間比較の基礎となる。これらは通常、任意の実験の許容基準の一部である(1)。

標準的品質管理手順

13. 細胞株が複数回の継代を通して安定を維持し、マイコプラズマを含まない（すなわち、細菌汚染がない）状態を維持し、期待される ER 介在性の応答を経時的に示す能力を維持するようにするために、各試験について記載したとおりに標準的な品質管理手順を実施する。その正確な同一性および他の汚染物質（真菌、酵母、ウイルスなど）について細胞株をさらに確認する。

試験施設の習熟度証明

14. 本 PBTG に基づくいずれかの試験法で未知の化学物質を試験する前に、各試験施設は当該試験法の使用における習熟度を証明する必要がある。各試験施設は、習熟度を証明するために、表 3 に挙げた 14 の習熟度確認物質でアゴニストアッセイを実施し、表 4 の 10 の習熟度確認物質でアンタゴニストアッセイを実施する。試験系の応答性は、習熟度確認物質の試験によっても確認される。習熟度確認物質の一覧は、ER TA 試験の性能基準(6)に示す参照物質のサブセットである。これらの物質は市販されており、ER アゴニストまたはアンタゴニスト活性と広く関連する化学物質類を代表するもので、ER アゴニストおよびアンタゴニストに予想される適切な範囲の力価（すなわち、強い～弱い）を示し、陰性を含む。習熟度確認物質の試験は、日を変えて 2 回以上繰り返し実施する。各習熟度確認物質を正しく分類（陽性／陰性）することにより、習熟度が証明される。習熟度確認試験は、各技術者が試験法を学習する際に繰り返し行う必要がある。細胞の種類によっては、これらの習熟度確認物質の一部が SERM として機能し、アゴニストおよびアンタゴニストの両方として活性を示す可能性がある。しかし、習熟度評価に使用すべき既知の主要な活性によって、習熟度確認物質を表 3 および表 4 に分類している。

15. 性能を証明するために、また品質管理の目的で、各試験施設は、参照標準（17 β -エストラジオールおよびタモキシフェンなど）、陽性対照および陰性対照の化学物質および溶剤対照（DMSO など）のデータとともにアゴニストおよびアンタゴニストの履歴データベースを編集する必要がある。まず、アゴニスト（17 β -エストラジオールなど）とアンタゴニスト（タモキシフェンなど）についてそれぞれ 10 回以上の独立したランを行ってデータベースを作成する。これらの参照標準および溶剤対照の今後の分析結果を追加してデータベースを拡大し、試験施設によるバイオアッセイの一貫性および性能を長期にわたり確保する。

表 3 : (14)アゴニストアッセイ用習熟度確認物質の一覧⁸

N° ⁷	物質	CASRN	予想される 応答 ¹	STTA 試験			VM7Luc ER TA 試験		MeSH 化学物質クラス ⁵	製品クラス ⁶
				PC ₁₀ 値 (M) ²	PC ₅₀ 値 (M) ²	試験濃度範囲 (M)	VM7Luc EC ₅₀ 値 (M) ³	範囲設定試験の 最高濃度 (M) ⁴		
14	ジエチルスチルベスト ロール	56-53-1	陽性	$<1.00 \times 10^{-11}$	2.04×10^{-11}	$10^{-14} - 10^{-8}$	3.34×10^{-11}	3.73×10^{-4}	炭化水素（環状）	動物用医薬品
12	17 α -エストラジオール	57-91-0	陽性	4.27×10^{-11}	6.44×10^{-10}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.40×10^{-9}	3.67×10^{-3}	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
15	meso-ヘキサストロール	84-16-2	陽性	$<1.00 \times 10^{-11}$	2.75×10^{-11}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.65×10^{-11}	3.70×10^{-3}	炭化水素（環状）、フェノ ール	医薬品、動物用医薬品
11	4-tert-オクチルフェノ ール	140-66-9	陽性	1.85×10^{-9}	7.37×10^{-8}	$10^{-11} - 10^{-5}$	3.19×10^{-8}	4.85×10^{-3}	フェノール	化学中間体
9	ゲニステイン	446-72-0	陽性	2.24×10^{-9}	2.45×10^{-8}	$10^{-11} - 10^{-5}$	2.71×10^{-7}	3.70×10^{-4}	フラボノイド、複素環化合 物	天然物、医薬品
6	ビスフェノール A	80-05-7	陽性	2.02×10^{-8}	2.94×10^{-7}	$10^{-11} - 10^{-5}$	5.33×10^{-7}	4.38×10^{-3}	フェノール	化学中間体
2	ケンフェロール	520-18-3	陽性	1.36×10^{-7}	1.21×10^{-6}	$10^{-11} - 10^{-5}$	3.99×10^{-6}	3.49×10^{-3}	フラボノイド、複素環化合 物	天然物
3	フタル酸ブチルベンジ ル	85-68-7	陽性	1.14×10^{-6}	4.11×10^{-6}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.98×10^{-6}	3.20×10^{-4}	カルボン酸、エステル、フ タル酸	可塑剤、化成品
4	p,p'-メトキシクロル	72-43-5	陽性	1.23×10^{-6}	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.92×10^{-6}	2.89×10^{-3}	炭化水素（ハロゲン化）	農薬、動物用医薬品
1	エチルパラベン	120-47-8	陽性	5.00×10^{-6}	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	2.48×10^{-5}	6.02×10^{-3}	カルボン酸、フェノール	医薬品、保存剤
17	アトラジン	1912-24-9	陰性	-	-	$10^{-10} - 10^{-4}$	-	4.64×10^{-4}	複素環化合物	除草剤
20	スピロラクトン	52-01-7	陰性	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	2.40×10^{-3}	ラクトン、ステロイド	医薬品
21	ケトコナゾール	65277-42-1	陰性	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	9.41×10^{-5}	複素環化合物	医薬品
22	レセルピン	50-55-5	陰性	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	1.64×10^{-3}	環状化合物、インドール	医薬品、動物用医薬品

略語：CASRN = CAS 登録番号、EC₅₀ = 被験物質の 50%有効濃度、PC₁₀（および PC₅₀） = 各プレートにおける陽性対照（E2、1nM）により誘発された応答の 10%（または PC₅₀ では 50%）の応答を示す被験物質の濃度。

¹ ER アゴニスト活性に関する陽性または陰性の分類は、ER 結合および TA 試験法に関する ICCVAM Background Review Document (BRD) (31)、ならびに ICCVAM BRD の完了後に公表・検討された参照試験(2)(3)(18)(31)(32)(33)(34)から得られた経験的データおよびその他の情報に基づいた。

- ² エストロゲン活性を検出するための安定に形質移入した転写活性化（TA）試験法 - hER-HeLa-9903 細胞株を用いたヒトエストロゲン受容体 α を介したレポーター遺伝子試験法の先行バリデーションおよび施設間バリデーションの報告書案で報告された値(30)。
- ³ 平均 EC₅₀ 値は、VM7Luc ER TA バリデーション試験（XDS、ECVAM および Hiyoshi）(3)の試験施設から報告された値を用いて算出した。
- ⁴ 報告された濃度は、VM7Luc ER TA 試験法のバリデーションの際に試験した最高濃度（範囲設定試験）であった。濃度が試験施設間で異なる場合、最高濃度を報告する。LUMI-CELL® ER（VM7Luc ER TA）試験法に関する ICCVAM 試験法評価報告書：化学物質のヒトエストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニスト活性を確認するための *in vitro* 試験法(3)の表 4～10 を参照。
- ⁵ 国際的に認められ標準化された分類法である米国国立医学図書館の医学件名標目表（MeSH）を用いて、各化学物質を一つ以上の化学物質分類に分類した（<http://www.nlm.nih.gov/mesh> より入手可能）。
- ⁶ 米国国立医学図書館の有害物質データバンクを用いて、各化学物質を一つ以上の製品分類に分類した（<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> より入手可能）。
- ⁷ 性能基準(6)の表 1（ER アゴニスト正確性評価用参照化学物質の一覧(22)）より
- ⁸ 習熟度確認物質がもはや市販されていない場合、同一の分類で、力価、作用機序および化学的分類が同等の物質を使用することができる。

表 4 : アンタゴニストアッセイ用習熟度確認物質の一覧(10)

	物質名 ^a	CASRN	ER STTA 試験法 ¹			VM7Luc ER TA 試験法 ²			ER STTA ¹ 候補の影響	ICCVAM ⁵ のコ ンセンサス分類	MeSH ⁶ 化学物質 クラス	製品クラス ⁷
			ER TA 活性	IC ₅₀ (M)	試験濃度範囲 (M)	ER TA 活性	IC ₅₀ ³ (M)	範囲設定試験の 最高濃度 (M) ⁴				
1	4-ヒドロキシタモキシフェン	68047-06-3	陽性	3.97×10^{-9}	$10^{-12} - 10^{-7}$	陽性	2.08×10^{-7}	2.58×10^{-4}	中程度陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
2	ラロキシフェン塩酸塩	82640-04-8	陽性	7.86×10^{-10}	$10^{-12} - 10^{-7}$	陽性	1.19×10^{-9}	1.96×10^{-4}	中程度陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
3	タモキシフェン	10540-29-1	陽性	4.91×10^{-7}	$10^{-10} - 10^{-5}$	陽性	8.17×10^{-7}	2.69×10^{-4}	陽性	陽性	炭化水素（環状）	医薬品
4	17β-エストラジオール	50-28-2	陰性	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	陰性	-	3.67×10^{-3}	陰性であること*	陰性と推定	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
5	アピゲニン	520-36-5	陰性	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	陰性	-	3.70×10^{-4}	陰性	陰性	複素環化合物	色素、天然物、医薬品中間体
6	フタル酸ジ-n-ブチル	84-74-2	陰性	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	陰性	-	3.59×10^{-3}	陰性	陰性	エステル、フタル酸	化粧品成分、化成物、可塑剤
7	フラボン	525-82-6	陰性	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	陰性	-	4.50×10^{-4}	陰性であること*	陰性と推定	フラボノイド、複素環化合物	天然物、医薬品
8	ゲニステイン	446-72-0	陰性	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	陰性	-	3.70×10^{-4}	陰性であること*	陰性	フラボノイド、複素環化合物	天然物、医薬品
9	p-n-ノニルフェノール	104-40-5	陰性	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	陰性	-	4.54×10^{-4}	未試験	陰性	フェノール	化学中間体
10	レスベラトロール	501-36-0	陰性	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	陰性	-	4.38×10^{-4}	陰性であること*	陰性	炭化水素（環状）	天然物

略語：CASRN = CAS 登録番号、M = モル、IC₅₀ = 被験物質の 50%阻害濃度。

* 文献レビュー(2)に従って陰性に分類。

^a ER アンタゴニストまたは陰性物質に指定され、VM7Luc ER TA バリデーション試験(2)(3)で正確性の評価に使用した、STTA および VM7Luc ER TA 試験法で試験した共通物質。

¹ ER を介した活性を検出するための安定に形質移入した転写活性化試験法のバリデーション報告書、パート B(2)

² LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) 試験法に関する ICCVAM 試験法評価報告書：ER アゴニストおよびアンタゴニストを同定するための *in vitro* 試験法(3)

³ 平均 IC₅₀ 値は、VM7Luc ER TA バリデーション試験 (XDS、ECVAM および Hiyoshi) (3)の試験施設から報告された値を用いて算出した。

⁴ 報告された濃度は、VM7Luc ER TA 試験法のバリデーションの際に試験した最高濃度（範囲設定試験）であった。濃度が試験施設間で異なる場合、最高濃度を報告する。LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) 試験法に関する ICCVAM 試験法評価報告書：化学物質のヒトエストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニスト活性を確認するための *in vitro* 試験法(3)の表 4~11 を参照。

⁵ ER アンタゴニストまたは陰性としての分類は、ER 結合および TA 試験法に関する ICCVAM Background Review Document (BRD) (31)の情報、ならびに ICCVAM BRD の完了後に公表・検討された文献(2)(3)(18)(31)から得られた情報に基づいた。

⁶ 国際的に認められ標準化された分類法である米国国立医学図書館の医学件名標目表 (MeSH) を用いて、各化学物質を一つ以上の化学物質分類に分類した (<http://www.nlm.nih.gov/mesh> より入手可能)。

⁷ 米国国立医学図書館の有害物質データベースを用いて、各化学物質を一つ以上の製品分類に分類した (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> より入手可能)。

テストランの許容基準

16. テストランの許容または破棄は、各実験で用いた参照標準および対照について得られた結果の評価に基づいて行う。参照標準の PC_{50} (EC_{50}) または IC_{50} の値は、選択した試験法について規定されている許容基準 (STTA については補遺 2、VM7Luc ER TA については補遺 3 を参照) を満たしていなければならない。また、許容された各実験についてすべての陽性／陰性対照を正確に分類する。参照標準および対照の履歴データベースを作成し、維持することにより、当該試験法を一貫して実施できることを証明する (段落 15 参照)。複数の実験で得られた参照標準のカーブフィットパラメータの平均値の標準偏差 (SD) または変動係数 (CV) は、試験施設内再現性の尺度として使用することができる。さらに、許容基準に関する以下の原則を満たさなければならない。

- データが ER 活性化 (アゴニストアッセイの場合) または抑制 (アンタゴニストアッセイの場合) を定量的に評価するのに十分であること (すなわち、有効性および力価)。
- 基準エストロゲンの参照濃度の平均レポーター活性が、溶媒 (溶剤) 対照と比較して試験法で規定された最低値以上であり、十分な感度を確保できること。STTA および VM7Luc ER TA 試験法では、これは各プレートの平均溶媒対照の 4 倍である。
- 試験濃度が被験物質の溶解度の範囲内に保たれ、細胞毒性を示さないこと。

データの解析

17. 陽性応答と陰性応答の分類には、各試験法について規定されたデータ解析手順を用いる。

18. 許容基準 (段落 16) への適合は、当該試験法が適切に作動していることを示すが、特定のテストランで正確なデータが得られることを保証するものではない。初回ランの結果が再現されることが、正確なデータが得られたことを示す最良の指標である。2 回のランで再現性のある結果が得られた場合 (いずれのテストランの結果でも被験物質が陽性であることが示されている場合など)、3 回目のランを行う必要はない。

19. 2 回のランで再現性のある結果が得られない場合 (被験物質が 1 回は陽性、もう 1 回は陰性である場合など)、またはこの試験法の結果に関してより高い確実性が必要な場合は、少なくとも 3 回のランを個別に実施する。この場合、分類は 3 回の結果のうち 2 回の一致した結果に基づいて行う。

一般的なデータ解釈の基準

20. 現時点では、ER TA データの解釈に関して普遍的に合意された方法はない。しかし、ER を介した活性の定性的 (陽性／陰性など) および／または定量的評価 (EC_{50} 、 PC_{50} 、 IC_{50} など) は、経験的データおよび科学的に妥当な判断に基づくものでなければならない。可能であれば、陽性結果は、溶媒 (溶剤) 対照または基準エストロゲンと比較したときの影響の大きさおよび影響が生じる濃度 (EC_{50} 、 PC_{50} 、 RPC_{Max} 、 IC_{50} など) の両方によって特徴付ける。

試験報告書

21. 試験報告書には、以下の情報を含める。

試験法：

- 使用した試験法

対照／参照標準／被験物質

- 入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 既知の場合、被験物質自体の安定性
- 既知の場合、被験物質の溶剤への溶解性および溶剤中の安定性
- 必要に応じて、被験物質を添加した培地の pH、浸透圧および沈殿の測定結果

単一成分物質：

- 外観、水溶性およびその他の関連する物理化学的性質
- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的同定など

多成分物質、UVCB 物質 (組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生物物質)、混合物：

- 構成成分の化学的同定（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの特徴付け

溶剤／溶媒：

- 特性（性質、供給源、ロット番号）
- 溶剤／溶媒選択の根拠
- 既知の場合、被験物質の溶剤／溶媒への溶解度および溶解液中の安定性

細胞：

- 細胞の種類および供給元
 - ER の内因性発現の有無内因性発現がみられない場合、形質移入された受容体
 - 使用したレポーター構築物（供給元の種を含む）
 - 形質移入方法
 - 安定形質移入の維持のための選択方法（該当する場合）
 - 安定な株に対する形質移入方法の妥当性
- 細胞継代数（解凍から）
- 融解時の細胞継代数
- 細胞培養の維持方法

試験条件：

- 溶解度の限界
- 適用した生存可能性の評価方法の説明
- 培地組成、CO₂ 濃度

- 被験物質の濃度
- 溶媒および被験物質の添加量
- 培養温度および湿度
- 処理期間
- 処理開始時および処理期間中の細胞密度
- 陽性および陰性参照標準
- レポーター試薬（製品名、供給源、ロット番号）
- テストランを陽性、陰性、または不確かとみなすための基準

許容性確認：

- 各アッセイプレート of 誘導倍率、および過去の対照に基づいた試験法で要求される最小値を満たすかどうか
- 同時陽性対照／参照標準の許容基準（ $\log_{10}EC_{50}$ 、 $\log_{10}PC_{50}$ 、 $\log IC_{50}$ 、ヒル勾配値など）の実測値

結果：

- 生データおよび正規化データ
- 最大誘導倍率
- 細胞毒性データ
- 存在する場合、最小有効濃度（LEC）
- 必要に応じて、 RPC_{Max} 、 PC_{Max} 、 PC_{50} 、 IC_{50} および／または EC_{50} 値
- 可能であれば濃度応答関係
- 統計解析を実施する場合は、誤差および信頼度の尺度（SEM、SD、CV、または 95% CI など）、およびこれらの値がどのように得られたかの説明

結果の考察

結論

参考文献 (1)

- 1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- 4) Pujol P., et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): p. 5367-73.
- 5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): p. 67-82.
- 6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 8) 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.
- 9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 20- 6.
- 10) Welboren W.J., et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): p. 1073-89.
- 11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63- 6.
- 12) Jefferson W.N., et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): p. 179-189.
- 13) Sonneveld E., et al. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): p. 173-187.

- 14) Takeyoshi M., et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti-Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): p. 91- 98.
- 15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): p. 81-118.
- 16) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol*, 71(10): p. 1459-69.
- 17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett*, 102-103, 677-680.
- 18) EDSTAC. (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. Available at: [<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.html>].
- 19) 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://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinrpt.pdf].
- 20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): p. 379-383.
- 21) Ogawa S., et al. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): p. 122-126.
- 22) Enmark E., et al. (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): p. 4258-4265.
- 23) Ball L.J., et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): p. 204-211.
- 24) Barkhem T., et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): p. 105-12.
- 25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): p. 1703-1714.
- 26) Harris D.M., et al. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): p. 558-568.
- 27) Anderson J.N., Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): p. 1460-1468.
- 28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): p. 515-522.
- 29) Gorski J., et al. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: p. 45-80.

- 30) Jensen E.V., et al. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.
- 31) ICCVAM. (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No. 03-4505.). Available at:[http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/final1002/erta_brd/ERTA034505.pdf].
- 32) Kanno J., et al. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.
- 33) Kanno J., et al. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.
- 34) Kanno J., et al. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.
- 35) Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.
- 36) Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.
- 37) Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.
- 38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, In Vitro & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

補遺 1

定義および略語

許容基準：実験対照および参照標準の性能に関する最低基準。1回の実験が有効とみなされるためには、すべての許容基準を満たさなければならない。

正確性（一致度）：試験法で得られた結果と許容された参照値の近接する程度。正確性は試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面にあたる。この用語は、試験法で正しい結果が得られた割合を意味する場合には、互換的に「一致度」が用いられることが多い(1)。

アゴニスト（作用薬）：特異的な受容体に結合したときに、転写などの応答を引き起こす物質。

アンタゴニスト（拮抗薬）：受容体に結合することで、生物学的応答自体を引き起こすことなく、アゴニストが介する応答を阻害または抑制する受容体リガンドまたは化学物質の一種。

抗エストロゲン活性：17 β エストラジオールがエストロゲン受容体を介して発揮する作用に対する抑制能。

細胞形態：組織培養プレートの1つのウェル中の単層で増殖した細胞の形状および外観。死滅しつつある細胞は、異常な細胞形態を示すことが多い。

CF：内分泌かく乱物質の試験法と評価に関する OECD の概念枠組み。

チャコール／デキストラン処理：細胞培養に使用する血清の処理。チャコール／デキストラン（「ストリッピング」と呼ばれることが多い）による処理では、内因性ホルモンとホルモン結合蛋白質が除去される。

細胞毒性：細胞の構造または機能に対する有害な作用で、最終的に細胞死を引き起こす可能性がある。曝露期間の終了時には、ウェルに存在する細胞数が減少したり、同時溶媒対照と比較した細胞機能の測定能力の低下により反映される。

CV：変動係数

DCC-FBS：チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清

DMEM：ダルベッコ変法イーグル培地

DMSO：ジメチルスルホキシド

E2：17 β -エストラジオール

EC₅₀：被験物質の 50%有効濃度。

ED : 内分泌かく乱

hER α : ヒトエストロゲン受容体 α

hER β : ヒトエストロゲン受容体 β

EFM : エストロゲンを含まない培地。4.5%チャコール／デキストラン処理 FBS、1.9% L-グルタミン、0.9%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）。

ER : エストロゲン受容体

ERE : エストロゲン応答エレメント

エストロゲン活性 : 化学物質がエストロゲン受容体に結合して活性化する能力に関し、17 β -エストラジオールと類似した能力。本 PBTG では hER α を介したエストロゲン活性を検出することが可能である。

ERTA : エストロゲン受容体転写活性化

FBS : ウシ胎児血清

HeLa : 不死化ヒト子宮頸部細胞株

HeLa9903 : hER α とルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に形質移入した HeLa 細胞のサブクローン

IC₅₀ : 阻害作用のある被験物質の 50%有効濃度。

ICCVAM : 代替試験法の検証に関する省庁間調整委員会。

施設間再現性 : 技能を認められた異なる試験施設が、同一の手順を用いて同一の物質を試験した場合に、質的および量的に同様の結果がもたらされる程度の尺度。施設間再現性は、先行バリデーションおよびバリデーションの過程において確認され、試験施設間で試験法を技術移転できる程度を示す。"Inter-laboratory reproducibility"の他、"between-laboratory reproducibility"とも言われる(1)。

施設内再現性 : 同一試験施設内の技能を認められた者が、特定の手順を用いて異なる時期に同じ結果を再現できる程度の判定。"Intra-laboratory reproducibility"の他、"within-laboratory reproducibility"とも言われる(1)。

LEC : 最小有効濃度とは、応答を生じさせる被験物質の最低濃度（同時溶媒対照に対して誘導倍率が統計的に有意に異なる被験物質の最低濃度）のこと。

模倣的試験 : 検証が行われ許容された参照試験法と構造的・機能的に類似した試験法に関する口語表現。類似試験法と互換的に用いられる。

MT : メタロチオネイン

MMTV : マウス乳腺腫瘍ウイルス

OHT : 4-ヒドロキシタモキシフェン

PBTG : 性能に基づく試験法ガイドライン

PC (陽性対照) : 試験法が適切に機能することを保証するためにすべての試験に含まれる活性の強い物質で、17β-エストラジオールが望ましい。

PC₁₀ : アゴニストアッセイで測定された活性が、各プレートで PC (STTA 試験では 1nM の E2) により誘発された最大活性の 10%となる被験物質の濃度。

PC₅₀ : アゴニストアッセイで測定された活性が、各プレートで PC (当該試験法で規定された参照濃度で E2) により誘発された最大活性の 50%となる被験物質の濃度。

PC_{Max} : RPC_{Max}を誘導するときの被験物質の濃度

性能基準 : バリデーション済み試験法に基づき、機構上および機能上類似している提唱される試験法が、バリデーション済み試験法に匹敵することの評価根拠となる基準。(1) 試験法の不可欠な要素、(2) バリデーション済み試験法の性能が許容可能であることを証明するために使用された化学物質から選択された最小限の参照化学物質の一覧、および(3) 最小限の参照化学物質の一覧を用いて評価した場合に、提案された試験法が証明しなければならないバリデーション済み試験法で得られたものと同等レベルの正確性および信頼性(1)が含まれる。

習熟度確認物質 : 性能基準に含まれる参照物質のサブセットで、標準化された試験法に関する技術的能力を証明するために試験施設が使用できるもの。これらの物質の選択基準としては通常、応答の範囲を代表するものであること、市販されていることおよび高品質な参照データがあることなどが挙げられる。

習熟度 : 未知の物質を試験する前に実証される、試験法を適切に実施する能力。

基準エストロゲン (陽性対照、PC) : 17β-エストラジオール (E2、CAS 50-28-2)。

参照標準 : 試験法の妥当性を証明するために用いる参照標準。17β-エストラジオールは、STTA および VM7Luc ER TA 試験の参照標準である。

参照試験法 : 本 PBTG の根拠となる試験法。

妥当性 : 試験と対象になる作用との関係、およびその試験が特定の目的に対し意味を持ち、有用であるか否かの関係を示す用語。試験が対象の生物学的作用を、正しく測定または予測する度合いのことである。妥当性には、試験法の正確性 (一致度) の検討が含まれる(1)。

信頼性 : 同一のプロトコルを用いて試験法を実施した場合、施設内および施設間で経時的に再現可能な度合いを示す尺度。信頼性は、施設内および施設間再現性の算出により評価される。

RLU : 相対発光量

RNA : リボ核酸

RPC_{Max} : 被験物質によって誘導される最大の応答レベルであり、同一プレート上で 1 nM の E2 によって誘導される応答に対する割合 (%) で表される

RPMI : 0.9%ペニシリン-ストレプトマイシンおよび8.0%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した RPMI 1640 培地

ラン : 試験法の生物学的結果における化学的作用を評価する個別の実験。各ランは、共通の細胞のプールから同時に蒔かれた細胞の複製ウェルで実施する 1 つの完結した実験である。

独立したラン : 個別の独立した実験で、別のプールの細胞、新たに希釈した化学物質を用いて、別の日または別のスタッフが同じ日に実施し、試験法の生物学的結果に対する化学作用を評価する。

SD : 標準偏差

感度 : 試験により正しく分類されたすべての陽性／活性物質の割合。区分化の結果が得られる試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討項目である(1)。

特異度 : 試験により正しく分類されたすべての陰性／不活性物質の割合。区分化の結果が得られる試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討項目である(1)。

安定的形質移入 : 安定的に細胞ゲノムに組み込むような方法で DNA を培養細胞に形質移入した場合、形質移入された遺伝子の安定した発現をもたらす。安定的に形質移入した細胞のクローンは、安定したマーカー (G418 耐性など) によって選択する。

STTA 試験法 : 安定に形質移入した転写活性化試験法、HeLa 9903 細胞株を用いた ER α 転写活性化試験法。

試験 : 特定の試験法を用いて単一の特定の物質を評価するために実施されるあらゆる実験作業。試験は、試験培地中の被験物質の希釈のテスト、予備的範囲設定ラン、すべての必要な包括的ラン、データ解析、品質保証、細胞毒性評価などの全段階からなる。試験が完了すると、毒性標的に対する試験化学活性の分類 (活性、不活性または不確定) が可能となる。この分類は、使用した試験法および陽性参照化学物質に対する力価の推定値により評価する。

物質 : UN GHS(1)の文脈において化学元素およびその化合物が自然状態で使用されること、または製品の安定性を維持するために必要な添加物および使用された工程から生じる不純物を含む製造工程によって得られること。ただし、物質の安定性に影響を与えたり組成を変化させたりすることなく分離できる溶剤は除く。

TA (転写活性化) : エストロゲンのエストロゲン受容体への結合などの特定の化学的シグナルに応じた mRNA 合成の開始

試験法 : PBTG の文脈において、試験法とは試験法ガイドラインに概説された性能基準を満たす上で有効と認められた方法のうちの 1 つである。試験法の構成要素には、例えば、関連する増殖条件を伴う特定の細胞株、試験を実施する特定の培地、プレートの設定条件、被験物質の調製および希釈、ならびにその他の品質管理に必要な措置および関連するデータ評価ステップが含まれる。

転写 : mRNA 合成

UVCB : 組成が未知または変化しやすい化学物質、複雑な応答生成物および生物材料

バリデーション済み試験法：特定の目的に対する関連性（正確性を含む）および信頼性を確認するためのバリデーション試験が完了した試験法。検証済み試験は、提案された目的に対しては、正確性および信頼性の点で許容可能とするのに十分な性能を有していない可能性があることに留意されたい(1)。

バリデーション：定められた目的に対して、特定の方策、方法、手順または評価法の信頼性と関連性を確立する手順(1)。

VC（溶媒対照）：被験物質および参照標準の溶解に用いる溶媒は、溶解した化学物質を含まない溶媒としてのみ試験する。

VM7：エストロゲン受容体を内因的に発現する不死化腺癌細胞。

VM7Luc4E2：VM7Luc4E2 細胞株は、エストロゲン受容体の両方の型（ER α および ER β ）を内因的に発現し、プラスミド pGudLuc7.ERE で安定に形質移入した VM7 不死化ヒト由来腺癌細胞に由来する。このプラスミドには、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターの上流にあるエストロゲン応答エレメントとホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む合成オリゴヌクレオチドのコピーが 4 つ含まれる。

弱陽性対照：試験法が適切に機能することを保証するためにすべての試験に含まれる参照化学物質リストから選択された活性の弱い物質。

補遺 2

hER α -HeLa-9903 細胞株を用いた化学物質のエストロゲンアゴニストおよびアンタゴニストの活性検出のための、安定に形質移入したヒトエストロゲン受容体- α 転写活性試験法

初期検討事項および制限事項（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

1. この転写活性化（TA）試験では、hER α -HeLa-9903 細胞株を用いて、ヒトエストロゲン受容体 α （hER α ）を介したエストロゲンアゴニスト活性を検出する。hER α -HeLa-9903 細胞株を用いて、ヒトエストロゲン受容体 α （hER α ）を介したエストロゲンアゴニストおよびアンタゴニストの活性を検出する、日本の化学物質評価研究機構（CERI）による安定に形質移入した転写活性化（STTA）試験法のバリデーション試験で、この試験法の意図する目的の妥当性および信頼性が立証された(1)。
2. 本試験法は、化学発光をエンドポイントとして測定することにより、hER α を介した TA を検出するように特別に設計されている。しかし、1 μ M を超える植物性エストロゲン濃度では、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化による非受容体媒介性発光シグナルが報告されている(2)(3)。用量応答曲線は、ER 系の真の活性化が低濃度で起こることを示しているが、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の植物性エストロゲン様過剰活性化を引き起こすと疑われる高濃度の植物性エストロゲンまたは類似化合物で得られるルシフェラーゼ発現は、安定に形質移入した ER TA 試験法系において慎重に検討する必要がある（付録 1）。
3. 規制目的で本試験法を使用する前に、「一般的な緒言」 および 「ER TA 試験法の構成要素」（1～14 ページ）を読むこと。本試験法ガイドラインで使用する定義および略語は、補遺 1 に記載している。

本試験法の原理（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

4. 本試験法は、エストロゲン受容体とリガンドのシグナル結合に用いる。リガンドと結合すると、受容体-リガンド複合体は細胞核へ移行し、そこで特異的な DNA 応答エレメントと結合し、ホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子を転写活性化することで、ルシフェラーゼ酵素の細胞内発現量を増加させる。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ酵素により照度計での定量的測定が可能な生物発光生成物に変換される基質である。ルシフェラーゼ活性は、市販されている数多くの試験キットを用いることで速やかに、かつ低廉な費用で測定することができる。

5. 本試験系では、ヒト子宮頸部腫瘍由来に由来する安定的に挿入された以下の 2 つの構築物を持つ hER α -HeLa-9903 細胞株を用いている：(i) hER α 発現構築物（完全長のヒト受容体をコードする）および(ii) マウスメタロチオネイン（MT）プロモーターTATAエレメントによって駆動される、ビテルロゲニンのエストロゲン応答エレメント（ERE）の 5 本のタンデムリピートを有するホタルルシフェラーゼレポーター構築物。マウス MT TATA 遺伝子構築物は、最良の性能を有することが示されており、一般的に使用されている。そのため、この hER α -HeLa-9903 細胞株は、被験物質が hER α を介したルシフェラーゼ遺伝子発現の転写活性化を誘導する能力を測定することができる。

6. ER アゴニストアッセイの場合、データ解釈は、被験物質によって誘発された最大応答レベルが、陽性対照（PC）である 17 β -エストラジオール（E2）の最大誘導（1 nM）濃度により誘発されたアゴニスト応答の 10%以上であるか否か（すなわち PC₁₀）に基づいて行う。ER アンタゴニストアッセイの場合、データの解釈は、細胞毒性のないスパイクインコントロール（E2 の 25 pM）により誘発された応答から、応答が 30%以上の活性低下を示すか否かに基づいて行う。データの解析および解釈については、段落 34～48 で詳細に考察する。

手順

細胞株

7. 試験には、安定に形質移入した hER α -HeLa-9903 細胞株を使用する。この細胞株は、JCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）細胞バンク²から、物質移動合意書（MTA、Material Transfer Agreement）に署名した上で入手することができる。

8. 試験には、マイコプラズマを含まないことが確認された細胞のみを使用すること。RT-PCR（リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応）は、マイコプラズマ感染を高感度で検出するために選択すべき方法である(4)(5)(6)。

細胞株の安定性

9. 細胞株の安定性をモニターするため、アゴニストアッセイの参照標準として E2、17 α -エストラジオール、17 α -メチルテストステロンおよびコルチコステロンを使用し、試験実施ごとに少なくとも 1 回、表 1 に示す試験濃度範囲における完全な濃度応答曲線を測定し、結果は表 1 に示す結果と一致しなければならない。

10. アンタゴニストアッセイの場合、タモキシフェンとフルタミドの 2 つの参照標準の完全な濃度応答曲線を各ランで同時に測定する。この 2 つの化学物質について陽性か陰性かの定性的分類をモニターする必要がある。

細胞培養および播種条件

11. 細胞は、60 mg/L の抗生物質カナマイシンおよび 10%のチャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清（DCC-FBS）を添加した、フェノールレッドを含まないイーグル最小必須培地（EMEM）で、37 $\pm$ 1°C の CO₂ インキュベーター（5% CO₂）内で維持する。細胞密集度が 75～90%に達したら、100 mm の細胞培養ディッシュに、1mL あたり 0.4 x 10⁵～1 x 10⁵ 細胞、10mL で

² JCRB 細胞バンク：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8、独立行政法人医薬基盤研究所、FAX 番号：072-641-9812

継代する。細胞を 10% FBS-EMEM (DCC-FBS を添加した EMEM と同じ) で懸濁してから、 1×10^4 細胞/ (100 μ L/ウェル) の密度でマイクロプレートのウェルに播種する。次に、細胞を 5% CO₂ インキュベーターに入れて 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C で 3 時間前培養してから、化学物質への曝露を行う。プラスチック器具にエストロゲン作用があってはならない。

12. 応答の完全性を維持するため、細胞は凍結保存状態から取り出した後、調整済みの細胞増殖用培地にて 2 代以上継代させ、継代回数は 40 代を超えないようにする。hER α -HeLa-9903 細胞株の場合、これは 3 ヶ月未満である。ただし、不適切な培養条件で培養した場合、細胞の性能が低下することがある。

13. DCC-FBS は付録 2 の記載通りに調製するか、市販品を入手することができる。

許容基準

ER アゴニストアッセイの陽性および陰性の参照標準

14. 試験前および試験中に、濃度の強力なエストロゲン：E2、弱エストロゲン (17 α -エストラジオール)、非常に弱いアゴニスト (17 α -メチルテストステロン) および陰性物質 (コルチコステロン) を適切な濃度で用いて試験系の応答性を検証する必要がある。バリデーション試験(1)で得られた許容値の範囲を表 1 に示す。これら 4 種類の参照化学物質について同時に行う検証は、実験のたびに行い、結果が規定の許容範囲内に収まらなければならない。もし収まらなかった場合には、許容基準を満たせなかった原因を特定し (細胞の取扱い上の問題、血清や抗生物質の品質および濃度の問題など)、試験をやり直す。許容基準を満たせた場合には、EC₅₀、PC₅₀、PC₁₀ の値のばらつきを最小限に抑えるため、常に同じ材料を使用して細胞培養を行うことが重要である。3 種類の陽性参照標準による PC₁₀ 値が許容基準内に収まるとともに、算出される PC₅₀ 値および EC₅₀ 値もまた許容基準内に収まらなければならないことから、4 種類の参照化学物質を用いた同時並行検証を実験ごとに (材料、細胞の継代数、技術者などの同一条件下で実施) に行うことで、試験の感度が確保される (表 1 参照)。

表 1：ER アゴニストアッセイの参照標準の許容値の範囲

化学物質名	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	ヒル勾配	披験範囲
17 β -エストラジオール (E2) CAS 番号：50-28-2	-11.4 ~ -10.1	<-11	-11.3 ~ -10.1	0.7 ~ 1.5	10 ⁻¹⁴ ~ 10 ⁻⁸ M
17 α -エストラジオール CAS 番号：57-91-0	-9.6 ~ -8.1	-10.7 ~ -9.3	-9.6 ~ -8.4	0.9 ~ 2.0	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
コルチコステロン CAS 番号：50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁴ M
17 α -メチルテストステロン CAS 番号：58-18-4	-6.0 ~ -5.1	-8.0 ~ -6.2	—	—	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

ER アンタゴニストアッセイの陽性および陰性の参照標準

15. 試験前および試験中に、適切な濃度の陽性物質（タモキシフェン）および陰性物質（フルタミド）を用いて試験系の応答性を検証する必要がある。バリデーション試験(1)で得られた許容値の範囲を表 2 に示す。これらの 2 つの同時参照標準を各実験に含めなければならない。その結果は基準に示された通りに正確に判定されなければならない。もし収まらなかった場合には、基準を満たせなかった原因を特定し（細胞の取扱い上の問題、血清や抗生物質の品質および濃度の問題など）、試験をやり直す。さらに、陽性物質（タモキシフェン）の IC_{50} 値を算出し、その結果は所定の許容限度内でなければならない。許容基準を満たせた場合には、 IC_{50} 値のばらつきを最小限に抑えるため、常に同じ材料を使用して細胞培養を行うことが重要である。各実験（材料、細胞の継代数、技術者などの同一条件下で実施）に含めるべき 2 つの同時参照標準により、試験の感度が確保される（表 2 参照）。

表 2: ER アンタゴニストアッセイの 2 つの参照標準の基準および許容値の範囲

化学物質名	基準	Log IC_{50}	披験範囲
タモキシフェン CAS 番号: 10540-29-1	陽性: IC_{50} の算出が必要	-5.942 ~ -7.596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
フルタミド CAS 番号: 13311-84-7	陰性: IC_{30} の算出は不要	-	10^{-10} ~ 10^{-5} M

陽性対照および溶媒対照

16. ER アゴニストアッセイ（1 nM の E2）および ER アンタゴニストアッセイ（10 μ M の TAM）の陽性対照（PC）は、各プレートで 3 回以上試験する。被験物質の溶解に使用する溶媒は、溶媒対照（VC）として各プレートで 3 回以上試験する。この VC に加え、PC に被験物質とは異なる溶媒を使用する場合、PC と同じプレート上で別の VC を 3 回以上試験する。

ER アゴニストアッセイの品質基準

17. 陽性対照（1 nM の E2）のルシフェラーゼ活性の平均値は、各プレートの平均 VC の 4 倍以上でなければならない。この基準は、バリデーション試験の評価項目の値の信頼性（従来は 4 ~ 30 倍）に基づいて設定されている。

18. 試験法の品質管理に関して、同時 PC（1 nM の E2）の PC_{10} 値に相当する誘導倍率は、同時 VC の誘導倍率の値（= 1）の $1 + 2SD$ を超えていなければならない。優先順位付けのために、 PC_{10} 値は統計解析と比較して必要なデータ解析を単純化するのに役立つ可能性がある。統計解析では有意性に関する情報が得られるが、統計解析は濃度に基づく潜在的可能性に関しては定量的なパラメータではないため、優先順位付けにはあまり有用ではない。

ER アнтаゴニストアッセイの品質基準

19. スパイクインコントロール (25 pM E2) の平均ルシフェラーゼ活性は、各プレートの平均 VC の 4 倍以上でなければならない。この基準は、バリデーション試験の評価項目の値の信頼性に基づいて設定されている。
20. 試験法の品質管理に関して、1 nM の E2 の相対的転写活性化 (RTA) が 100%を超え、範囲 0.1 μ M ~ 1 μ M の 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) 濃度の RTA が 40.6%未満であり、100 μ M のジギトニン (Dig) の RTA が 0%未満でなければならない。試験施設は、試験法を設定する際に、OHT 予備試験に基づいて OHT 濃度を選択できる。タモキシフェンの IC₅₀を含め、他のすべての習熟度および許容性基準を満たす必要がある。

試験施設の習熟度証明 (本試験ガイドライン (8~15 ページ) の段落 14 ならびに「ER TA 試験法の構成要素」の表 3 および表 4 を参照)。

溶媒

21. 様々な陽性対照、陰性対照および被験物質に使用しているものと同濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) または適切な溶剤を同時 VC として用いる。被験物質を溶解することができ、細胞培地と混和可能な溶剤に被験物質を溶解する。適切な溶媒は、水、エタノール (純度 95%~100%) および DMSO である。DMSO を用いる場合は、濃度が 0.1% (v/v) を超えてはならない。いずれの溶媒についても、最大使用量で細胞毒性を示さず、試験の性能に影響しないことを実証しなければならない。

被験物質の調製

22. 一般に、培地で希釈するための溶液を調製するためには、被験物質を DMSO または適切な溶剤に溶解し、同じ溶剤を用いて、公比 1:10 で段階希釈する。

溶解度および細胞毒性：範囲設定のための検討

23. 予備的試験を実施し、被験化学物質について適切な濃度範囲を決定するとともに、これらの化学物質に溶解性および細胞毒性上の問題があるかどうかを確認する。まず、1 μ L/mL、1 mg/mL または 1 mM のうち、最も低い濃度にあたるものを最高濃度とし化学物質の試験を行う。予備試験で認められた細胞毒性の程度または溶解性の欠如に基づき、初回の確定用ランを実施し、最大許容濃度 (1 mM、100 μ M、10 μ M など) からの対数段階希釈法により化学物質を試験し、混濁や沈殿、または細胞毒性の兆候の有無を確認する。2 回目、必要があれば 3 回目の確定用ランにおいては化学物質の濃度を適切に調整して濃度応答曲線をさらに良好に推定し、不溶性となる、または過剰な細胞毒性を引き起こすことが示された濃度を除外する。
24. ER アゴニストおよびアンタゴニストについては、高いレベルの細胞毒性があると、典型的なシグモイド応答を有意に変化させたり、認められなくする場合があるため、データを解釈する際には考慮に入れる必要がある。細胞毒性の試験法は 80%の細胞生存率に関する情報が得られるものを選択し、実験室での経験に基づいた適切なアッセイを利用して実施する。
25. 細胞毒性試験の結果、被験物質のある濃度において細胞数が 20%以上減少した場合、この濃度は細胞毒性を示すとみなし、細胞毒性濃度およびこれを超える濃度は評価から除外する。

化学物質への曝露およびアッセイプレート構成

26. 化学物質の希釈（ステップ 1 および 2）および細胞への曝露（ステップ 3）の手順は、以下の記載に従って行う。

ステップ 1： 各被験化学物質は DMSO または適切な溶媒で段階的に希釈し、予備的な範囲設定試験（濃度段階の典型的な例、1 mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)）で決定した最終的な段階濃度（各濃度につき 3 組）が得られるよう、マイクロタイタープレートのウェルに添加する。

ステップ 2： 化学物質の希釈：最初に、被験物質 1.5 μ L を溶媒で希釈し、500 μ L の培地濃度にする。

ステップ 3： 化学物質への細胞の曝露：培地（ステップ 2 で調製）での希釈物を 50 μ L 採り、 10^4 個/100 μ L/ウェルを含むアッセイウェルに添加する。

各ウェルに加えるべき培地の最終的容量は 150 μ L となることが望ましい。試験試料および参照標準は、表 3 および表 4 に示すように割り付けることができる。

表 3： ER アゴニストアッセイにおけるアッセイプレート中の参照標準のプレート濃度割り付けの例

列	17 α -メチルテストステロン			コルチコステロン			17 α -エストラジオール			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	濃度 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	濃度 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	濃度 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	濃度 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	濃度 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	濃度 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	濃度 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC：溶媒対照（0.1% DMSO）、PC：陽性対照（1 nM E2）

27. 参照標準（E2、17 α -エストラジオール、17 α -メチルテストステロンおよびコルチコステロン）を各ランで試験する（表 3）。E2 を最大に誘導できる 1 nM の E2 で処理した PC ウェルと DMSO（または適切な溶剤）のみで処理した VC ウェルを、各アッセイプレートに含める（表 4）。由来の異なる細胞（異なる継代数、異なるロットなど）を同一の実験に用いる場合、各由来の細胞について参照標準の試験を行う必要がある。

表 4: ER アゴニストアッセイにおけるアッセイプレート中の被験物質およびプレート対照化学物質のプレート濃度割り付けの例

列	被験物質 1			被験物質 2			被験物質 3			被験物質 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	濃度 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	濃度 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	濃度 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	濃度 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	濃度 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	濃度 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	濃度 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC : 溶媒対照 (0.1% DMSO) 、 PC : 陽性対照 (1 nM E2)

表 5: ER アンタゴニストアッセイにおけるアッセイプレート中の参照標準のプレート濃度割り付けの例

列	タモキシフェン			フルタミド			被験物質 1			被験物質 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	濃度 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	濃度 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	濃度 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	濃度 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	濃度 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	濃度 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0.1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC : 溶媒対照 (0.1% DMSO) 、 PC : 陽性対照 (1 nM E2) 、 OHT : 4-ヒドロキシタモキシフェン、 Dig : ジギトニン。

25pM E2 添加

28. 化学物質のアンタゴニスト活性を評価するため、A 列から G 列までのアッセイウェルに 25pM E2 を添加する。参照標準 (タモキシフェンおよびフルタミド) を各ランで試験する。hER α -HeLa-9903 細胞株の品質を管理できる 1 nM の E2 で処理した PC ウェル、DMSO (または適切な溶剤) で処理した VC ウェル、「スパイクインコントロール」に対応する添加した E2 に DMSO を添加して処理した 0.1% DMSO ウェル、最終濃度 1 μ M の OHT で処理したウェル、および 100 μ M の Dig で処理したウェルを、各アッセイプレートに含める (表 5)。それに続くアッセイプレートは、参照標準ウェルを使用せず、同じプレート配置に従う (表 6)。由来の異なる細胞 (異なる継代数、異なるロットなど) を同一の実験に用いる場合、各由来の細胞について参照標準の試験を行う必要がある。

表 6: ER アンタゴニストアッセイにおけるアッセイプレート中の被験物質およびプレート対照
化学物質のプレート濃度割り付けの例

列	被験物質 1			被験物質 2			被験物質 3			被験物質 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	濃度 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	濃度 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	濃度 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	濃度 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	濃度 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	濃度 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0.1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μ M OHT	→	→	100 μ M Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: 溶媒対照 (0.1% DMSO)、PC: 陽性対照 (1 nM E2)、OHT: 4-ヒドロキシタモキシフェン、Dig: ジギトニン。

:25pM E2 添加

29. 必要に応じて、エッジ効果が認められないことを確認する。もしエッジ効果が疑われる場合には、プレートの配置を換えて、この効果をなくすようにする。例えば、周辺部のウェルを除外したプレート配置とするなどの方法が考えられる。

30. 化学物質を添加した後、アッセイプレートを 5% CO₂ インキュベーターに入れ、37°C±1°C で 20～24 時間培養を行い、レポーター遺伝子産物を誘導発現させる。

31. 揮発性の高い化学物質に対しては特別な考慮を払う必要である。このような場合、近傍の対照物質のウェルが偽陽性を示す場合があるため、対照物質について経験的に得られている予測値を踏まえた上でこの現象に注意を払う必要がある。揮発性が懸念要因となる少数のケースでは、「プレートシーラー」の使用が試験実施中に各ウェルを確実に分離する上で有用であり、このような例には推奨される。

32. 同一化学物質に対する確定試験は日を改め再度実施し、独立性を確保する。

ルシフェラーゼアッセイ

33. 許容基準を満たす限り、試験には、市販のルシフェラーゼ測定試薬 (Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega、E2510 または同等品) など) または標準的なルシフェラーゼアッセイシステム (Promega、E1500 または同等品) を使用することができる。アッセイ試薬は、使用する照度計の感度に基づいて選択する。標準的なルシフェラーゼアッセイシステムを用いる場合、基質を添加する前に Cell Culture Lysis Reagent (Promega、E1531 または同等物) を使用する。ルシフェラーゼ試薬は、製造業者の指示に従って適用すること。

データの分析

ER アゴニストアッセイ

34. ER アゴニストアッセイの場合、PC (1 nM の E2) に対する相対的な転写活性を求めるため、同一プレートから出る発光シグナルの分析を次のステップに従って行うことができる (他の

同等な数学的手法も使用可能)。

ステップ 1. VC について平均値を計算する。

ステップ 2. VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。

ステップ 3. 正規化した PC について平均値を計算する。

ステップ 4. プレート中の各ウェルについて正規化した数値を、正規化した PC の平均値 (PC = 100%) で割る。

各ウェルについての最終的な値は、PC の応答性と比較した当該ウェルの相対的な転写活性となる。

ステップ 5. 被験物質の各濃度群について相対転写活性の平均値を計算する。応答は2つの次元で構成される。1 つは平均した転写活性 (応答) であり、もう 1 つはその応答が起こる濃度である (次項参照)。

EC₅₀、PC₅₀ および PC₁₀ 誘導の検計

35. EC₅₀ を計算するには完全な濃度応答曲線が必要となるが、被験物質の濃度範囲には制限があるため (例えば、細胞毒性や溶解性の問題等の原因で)、この計算が常に実施可能で実際的であるとはいえない。しかし、EC₅₀ および最大誘導レベル (ヒルの式中、Top の値に相当) は有用なパラメータであるため、可能であればこれらのパラメータも報告する必要がある。EC₅₀ および最大誘導レベルの計算には、適切な統計ソフトウェアを使用する (Graphpad Prism 統計ソフトウェアなど)。

36. ヒルのロジスティック式を濃度応答データに適用できる場合は、次の式に従って EC₅₀ を算出する(7)。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\exp((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{ヒル勾配})})$$

式中、

X は濃度の対数、
および、

Y は応答を示す。Y は Bottom から始まり、シグモイド曲線をたどって Top へ向かう。
ヒルのロジスティック式では、Bottom はゼロに固定される。

37. 各被験化学物質について、次の値を求める。

(i) RPC_{Max}。これは、被験化学物質によって誘導される最大の応答レベルであり、同一プレート上で 1 nM の E2 によって誘導される応答に対する割合 (%) で表す。また、PC_{Max} (RPC_{Max} に関連する濃度) も求める。

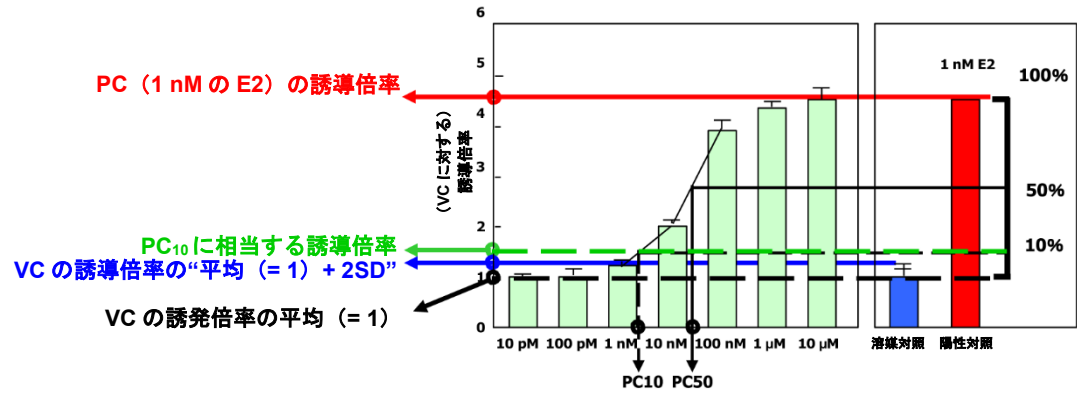
(ii) 陽性の化学物質については、PC₁₀ および適切な場合には PC₅₀ を誘導する濃度。

38. PC_x の値は、XY 座標系上において PC_x 値のすぐ上とすぐ下の 2 点間を補間することにより計算できる。PC_x 値のすぐ上とすぐ下に置かれたデータ点の座標を、それぞれ (a, b) および (c, d) とした場合、PC_x 値は次の式を用いて計算できる。

$$\log [PC_x] = \log [c] + (x - d)/(d - b)$$

39. PC 値の説明を、下の図 1 に示す。

図 1 : PC 値の導き方の例。PC (1 nM の E2) を各アッセイプレートに含める。



ER アンタゴニストアッセイ

40. ER アンタゴニストアッセイの場合、スパイクインコントロール（E2 の 25 pM）に対する相対的な転写活性（RTA）を求めるため、同一プレートから出る発光シグナルの分析を次のステップに従って行うことができる（他の同等な数学的手法も使用可能）。

ステップ 1. VC について平均値を計算する。

ステップ 2. VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。

ステップ 3. 正規化したスパイクインコントロールについて平均値を計算する。

ステップ 4. プレート中の各ウェルについて正規化した数値を、正規化したスパイクインコントロールの平均値（スパイクインコントロール = 100%）で割る。

各ウェルについての最終的な値は、スパイクインコントロールの応答性と比較した当該ウェルの相対的な転写活性となる。

ステップ 5. 各処理群について相対転写活性の平均値を計算する。

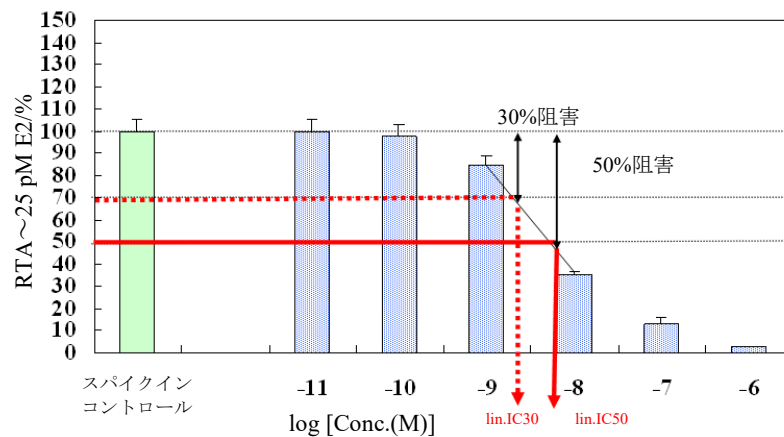
IC₃₀ および IC₅₀ 誘導の検討

41. 陽性の化学物質については、IC₃₀ および適切な場合には IC₅₀ を誘導する濃度。

42. IC_x の値は、XY 座標系上において IC_x 値のすぐ上とすぐ下の 2 点間を補間することにより計算できる。IC_x 値のすぐ上とすぐ下に置かれたデータ点の座標を、それぞれ (a, b) および (c, d) とした場合、IC_x 値は次の式を用いて計算できる。

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

図 2 : IC 値の導き方の例。スパイクインコントロール（25 pM の E2）を各アッセイプレートに含める。



RTA : 相対的転写活性

43. 結果は、2 回（または 3 回）の独立したランに基づいて算出する必要がある。2 回のランの結果が近似しており再現性が認められる場合には、3 回目のランを行う必要はない。許容できる結果とは、次の条件を満たすものをいう。

- 許容基準を満たす（14～20 の許容基準を参照）。
- 再現性を有する。

データ解釈の基準

表 7 : ER アゴニストアッセイにおける陽性および陰性の判定基準

陽性	陽性対照の応答の 10%と同等またはこれを超える RPC_{Max} が、2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で得られた場合。
陰性	2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で RPC_{Max} が陽性対照の応答の 10%に満たなかった場合。

表 8 : ER アンタゴニストアッセイにおける陽性および陰性の判定基準

陽性	IC_{30} が 2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で算出される場合。
陰性	IC_{30} が 2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で算出されない場合。

44. データ解釈基準を表 7 および表 8 に示す。陽性の結果は、作用の程度およびその作用をもたらした濃度の両方によって説明づけられる。アゴニストアッセイでは PC 値の 50% (PC_{50}) または 10% (PC_{10}) が得られたときの濃度、アンタゴニストアッセイではスパイクインコントロール値の 50% (IC_{50}) もしくは 30% (IC_{30}) を抑制する濃度として結果を表すことにより、この 2

点の目標が達成されることになる。ただし、被験物質によって誘導された最大応答 (RPC_{Max}) が、2回のランのうち2回とも、もしくは3回のランのうち2回でPCの応答の10%と同等またはこれを超えた場合は当該化学物質を陽性と判定し、 RPC_{Max} が、2回のランのうち2回とも、もしくは3回のランのうち2回で陽性対照の応答の10%に満たなかった場合には、陰性とみなす。

45. ER アゴニストアッセイにおける PC_{10} 、 PC_{50} および PC_{Max} 、ならびに ER アンタゴニストアッセイにおける IC_{30} および IC_{50} の算出は、OECD の公開ウェブサイト上の試験ガイドラインで利用可能なスプレッドシートを用いて行うことができる³。

46. PC_{10} または PC_{50} および IC_{30} または IC_{50} の値が少なくとも2回得られれば十分である。ただし、同じ濃度範囲におけるデータとして得られたベースライン値に容認できないほど高い変動係数 (CV ; %) を有するばらつきが認められた場合は、データに信頼性が欠けると判断し、大きなばらつきをもたらした原因を特定しなければならない。 PC_{10} の計算に用いるデータポイントについて得られる3連による生データ (すなわち、発光強度データ) の CV は、20%未満となる必要がある。

47. 許容基準に適合することはアッセイ系が正しく動作していることを示しているが、ある特定のランで正確なデータが得られることを保証するものではない。初回のランでの結果が再現されることが、正確なデータが得られていることの最良の保証となる。

48. ER アゴニストアッセイでは、陽性の被験化合物、とりわけ PC_{10} ~ PC_{49} に当たる化学物質およびルシフェラーゼを過剰刺激することが疑われる化学物質に関して、本試験法ガイドラインで目的とするスクリーニングおよび優先順位付けに加えてさらに情報が必要な場合には、観察されたルシフェラーゼ活性が $ER\alpha$ 特異的な応答のみによることを、 $ER\alpha$ アンタゴニストを用いて確認することができる (補遺1参照)。

試験報告書

49. 「ER TA 試験法の構成要素」 (本試験法ガイドライン 8~15 ページ) の段落 20 を参照。

³ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

参考文献 (2)

1. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
2. 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.
3. Kuiper G.G., et al. (1998). “Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta”, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
4. Spaepen M., et al. (1992). “Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
5. Kobayashi H., et al. (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.
6. 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.
7. De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

補遺 1 - 偽陽性：受容体非介在性の発光シグナルの評価

1. ERアゴニストアッセイにおける偽陽性は、ルシフェラーゼ遺伝子のER非介在性の活性化、またはこの遺伝子産物の直接的な活性化、すなわち被験物質とは無関係の蛍光発光によりもたらされる。このような作用が起こったことは、不完全または異常な用量応答曲線によって示される。このような作用が疑われる場合は、ERアンタゴニスト（無毒性濃度の4-ヒドロキシタモキシフェン [OHT] など）が応答に及ぼす影響を検査する必要がある。純粋な拮抗薬である ICI 182780 は、182780 濃度が十分に高いと VC の値を低下させる可能性があり、データ解析に影響を与えるため、本目的には適さないことがある。
2. 本手法の妥当性を確保するためには、次の項目を同一のプレート上で試験する必要がある。
 - 10 μ M の OHT の存在下、非存在下における未知の化学物質のアゴニスト活性
 - VC (3 連)
 - OHT (3 連)
 - アゴニスト PC として 1 nM の E2 (3 連)
 - 1 nM の E2 + OHT (3 連)

データ解釈の基準

注：すべてのウェルを、同一濃度の溶媒で処理する必要がある。

- 未知の化学物質のアゴニスト活性が、ER アンタゴニストによる処理によっても影響されない場合は、本物質を「陰性」に分類する。
- 未知の化学物質のアゴニスト活性が完全に阻害された場合は、判定基準を適用する。
- 未知の化学物質の最小濃度でのアゴニスト活性が、PC₁₀ の応答と同等以上の場合、当該物質は、PC₁₀ の応答と同等またはそれ以上の阻害を受ける。ERアンタゴニストで処理したウェルと処理しなかったウェルとの間の応答の差を計算し、この差を真の応答とみなして、適切なパラメータの算出に用い、分類の判定ができるようにする。

データ解析

性能標準を確認する。

同一条件下で処理した複数のウェル間の CV を確認する。

1. VC の平均値を計算する。
2. OHT で処理していない各ウェルの値から VC の平均値を引く。
3. OHT の平均値を計算する。
4. OHT で処理した各ウェルの値から VC の平均値を引く。
5. PC の平均値を計算する。
6. その他のすべてのウェルの、PC に対する相対的転写活性を計算する。

補遺 2 - チャコール・デキストラン（DCC）処理血清の調製

1. チャコール・デキストラン（DCC）による血清の処理は、血清中の残留エストロゲンにより応答に偏りが生じるのを防ぐため、細胞用培地に添加される血清からエストロゲン化合物を除去するのに用いる一般的な方法である。本手法により、500 mL のウシ胎児血清（FBS）を処理することができる。

構成品

2. 以下の材料および装置が必要となる。

材料

活性炭
デキストラン

塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
ショ糖

1 M の HEPES 緩衝液 (pH 7.4)
濾過装置で製造した超純水

装置

加圧滅菌処理したガラス容器（サイズは必要に応じて調整する）一般的な理化学用遠心分離機（温度を 4°C に設定できるもの）

手順

3. 50 mL の遠心分離管を使用するために以下の手順を調整する。

[1 日目] 1.5 mM の MgCl_2 、0.25 M のスクロース、2.5 g のチャコール (活性炭)、0.25 g のデキストランおよび 5 mM の HEPES を含むチャコール・デキストラン懸濁液を、超純水 1 L を用いて調製し、4°C で一晩攪拌する。

[2 日目] 作成した懸濁液を 50 mL の遠心分離管に分注し、4°C、10000 rpm で 10 分間遠心する。上清を除去し、活性炭沈殿物の半分は、3 日目の使用に備えて 4°C で保存する。活性炭の残りの半分は、あらかじめ沈殿を起こさないようゆっくりと解凍しておいた FBS に懸濁し、56°C で 30 分間、加熱不活性化を行い、加圧滅菌処理したガラス容器（エルレンマイヤーフラスコ等）に移す。この懸濁液を 4°C で一晩静かに攪拌する。

[3 日目] FBS 懸濁液を遠心分離管に分注し、4°C、10000 rpm で 10 分間遠心する。FBS を採取し、2 日目に調製し保存しておいた別の活性炭沈殿物に加える。活性炭沈殿物を懸濁させ、できた懸濁液を加圧滅菌したガラス容器に入れ、4°C で一晩静かに攪拌する。

[4 日目] 懸濁液を分注し、4°C、10000 rpm で 10 分間遠心し、上清を 0.2 µm の滅菌フィルターで濾過滅菌する。この DCC 処理 FBS は、-20°C で保管することにより 1 年間使用することができる。

補遺 3

エストロゲン受容体アゴニストとアンタゴニストを同定するための VM7Luc エストロゲン受容体転写活性化試験法

初期検討事項および制限事項（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

1. 本試験法では、VM7Luc4E2 細胞株⁴を使用する。本試験法は、（米）代替毒性の試験法の評価に関する毒性プログラム省庁間センター（NICEATM）および（米）代替試験法の検証に関する省庁間調整委員会（ICCVAM）によって妥当性の確認がなされてきた(1)。VM7Luc 細胞株は、主に内因性 ER α および少量の内因性 ER β を発現する(2)(3)(4)。
2. 本試験法は、ジメチルスルホキシド（DMSO、CASRN 67-68-5）に溶解させることができ、DMSO または細胞培養培地と応答せず、また、被験濃度において細胞毒性がない限りにおいて、幅広い物質に適用することができる。DMSO が使用できない場合には、エタノールまたは水といった他の溶媒を用いてもよい（段落 12 参照）。VM7Luc ER TA アゴニスト（アンタゴニスト）の試験法の実証された性能は、本試験法で作成されたデータが ER 介在の作用メカニズムに関して情報をもたらす場合があり、さらなる試験のための物質の優先順位付けのために考慮し得ることを示唆している。
3. 本試験法は、化学発光をエンドポイントとして測定することにより、hER α および hER β を介した TA を検出するように特別に設計されている。発光が高い信号/バックグラウンド比を持つことからバイオアッセイにおける化学発光の利用が広がっている(10)。ただし、細胞ベースの試験におけるホタルルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼ酵素を阻害する物質により見かけ上の阻害や蛋白質安定化に起因する発光増加の両方を引き起こし、混乱することがある（10）。さらに、いくつかのルシフェラーゼベースの ER レポーター遺伝子アッセイでは、植物エストロゲンの濃度が 1 μ M を超えた場合、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化による非受容体媒介性発光シグナルが報告されている(9)(11)。用量応答曲線は、ER 系の真の活性化が低濃度で起こるこ

⁴ 2016 年 6 月以前は、この細胞株は BG1Luc 細胞株と称されていた。BG-1 細胞は当初 Geisinger ら（1998 年）(12)によって報告され、後に国立環境衛生科学研究所（NIEHS）の研究者らによって特徴付けられた(13)。比較的最近になって、研究者らが使用している BG-1 細胞には、BG-1 Fr と BG-1 NIEHS の 2 つの異なる変異体が存在することが発見された。Li ら（2014 年）(14)が実施したこれら 2 つの BG-1 変異細胞株の DNA 検査を含む詳細な分析により、BG-1 Fr は独特のものであり、分析法の開発に使用した元の細胞株である BG-1 NIEHS は BG1 ヒト卵巣癌細胞株ではなく、MCF7 ヒト乳癌細胞株の変異体であることが示された。本試験法に使用した細胞株は、当初は BG1Luc4E2(15)と呼ばれていたが、現在は VM7Luc4E2（「V」= 変異体）と称される。「M7」= MCF7 細胞）。同様に、本試験法は現在、VM7Luc ER TA と称されている。これにより、本試験法のベースとなる細胞株の由来は変わるが、既報のバリデーション試験にも、エストロゲン／抗エストロゲン様化学物質のスクリーニングにおける本試験法の有用性や適用にも影響しない。

とを示しているが、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の植物性エストロゲン様の過剰活性化を引き起こすと疑われる高濃度の植物性エストロゲンまたは類似化合物で得られるルシフェラーゼ発現は、安定に形質移入した ER TA 試験法系において慎重に検討する必要がある（補遺2）。

4. 規制目的で本試験法を使用する前に、「一般的な緒言」および「ER TA 試験法の構成要素」（1～15）ページを読むこと。本試験法ガイドラインで使用する定義および略語は、補遺1に記載している。

本試験法の原理（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

5. 本試験法は、ER リガンド結合とそれに続く受容体-リガンド複合体の細胞核への移行を示すために使用される。核の中で、受容体-リガンド複合体は特異的な DNA 応答エレメントと結合し、レポーター遺伝子（*luc*）を転写活性化し、ルシフェラーゼの生成とそれに続く発光を引き起こし、照度計を用いてこれを定量化することができる。ルシフェラーゼ活性は、市販されている数多くのキットを用いることで速やかに、かつ低廉な費用で測定することができる。VM7Luc ER TA は、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターの上流に位置する4つのエストロゲン応答エレメントの制御の下でホタル *luc* レポーター構築物を安定に形質移入した ER 応答性ヒト乳癌細胞株 VM7 を利用して、*in vitro* の ER アゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する物質を検出する。この MMTV プロモーターが示す、他のステロイドおよび非ステロイドホルモンとの交差反応性はわずかである(8)。データ解釈の基準については、段落 41 で詳細に説明している。略述すると、重なり合わないエラーバー（平均±SD）を有する少なくとも 3 つのポイントを含む濃度応答曲線、および参照物質（アゴニストアッセイの場合には 17β-エストラジオール（E2、CASRN 50-28-2）、アンタゴニストアッセイの場合には塩酸ラロキシフェン（Ral、CASRN 84449-90-1）/E2）について最大値の少なくとも 20%の振幅変化（正規化相対発光量（RLU））によって陽性応答を特定する。

手順

細胞株

6. 試験には、安定に形質移入した VM7Luc4E2 細胞株を使用する。現在、本細胞株は、米国カリフォルニア州デービスのカリフォルニア大学デービス校⁵（University of California, Davis, California, USA）、および米国ノースカロライナ州ダラムの Xenobiotic Detection Systems Inc.⁶から技術ライセンス契約によってのみ入手可能である。

細胞株の安定性

⁵ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616、Eメール：msdenison@ucdavis.edu、電話：(530) 754-8649

⁶ Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA、Eメール：info@dioxins.com、電話：919-688-4804、ファックス：919-688-4404

7. 細胞株の安定性および完全性を維持するため、細胞を凍結保存状態から細胞維持培地で 2 代以上継代させる（段落 9 参照）。細胞は 30 代を超えて継代させない。VM7Luc4E2 細胞株の場合、約 3 ヶ月で 30 継代に達する。

細胞培養および播種条件

8. 細胞培養の優良規範に関するガイダンスに規定されている手順(5)(6)に従い、実施する作業の完全性、妥当性、および再現性を維持するため、すべての材料および方法の品質を保証する。

9. VM7Luc4E2 細胞は、0.9%ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 8.0%ウシ胎児血清（FBS）を添加した RPMI 1640 培地で、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $90\%\pm 5\%$ 、 $5.0\%\pm 1\%\text{CO}_2$ /空気に設定した専用の組織培養インキュベーターにて維持する。

10. VM7Luc4E2 細胞密集度が約 80%に達した時点で、細胞を 96 ウェルプレートに播いて被験物質に曝露させてルシフェラーゼ活性のエストロゲン依存誘導を解析する前に、48 時間継代培養してエストロゲンを含まない環境に馴化させる。エストロゲンを含まない培地（EFM）は、4.5% チャコール/デキストラン処理 FBS、1.9% L-グルタミン、および 0.9%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した、フェノールレッドを含まないダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を含む。いずれのプラスチック器具もエストロゲン活性があってはならない〔詳細な手順(7)を参照〕。

許容基準

11. 試験の合否判定は 96 ウェルプレートで実施した各実験からの参照標準と対照の結果の評価に基づいて行う。各参照標準を複数の濃度で試験し、各参照および対照濃度の複数の試料が存在する。結果を、各施設が習熟度を確認する際に作成したアゴニストおよびアンタゴニストの履歴データベースに由来するこれらのパラメータ用の品質対照（QC）と比較する。履歴データベースは参照標準および対照の値で常に更新される。装置や試験施設の条件を変更すると、更新した履歴データベースの作成が必要になる場合がある。

アゴニスト試験

範囲設定試験

- 誘導：最大 E2 参照標準の相対発光量（RLU）値の平均を DMSO 対照の RLU 値の平均で除することによってプレート誘導を測定する。通常 5 倍の誘導が達成されるが、許容するためには、誘導は 4 倍以上である必要がある。
- DMSO 対照の結果：溶媒対照の RLU 値は過去の溶媒対照の平均 RLU 値の標準偏差の 2.5 倍以内である必要がある。
- いずれかの許容基準を満たさなかった実験は破棄し、やり直す。

包括試験

これにはアゴニスト範囲設定試験の許容基準および次の事項が含まれる。

- 参照標準の結果：E2 参照標準の濃度応答曲線はシグモイド状で、濃度応答曲線の直線部分に少なくとも値が 3 つある必要がある。

- 陽性対照の結果：メトキシクロール対照の RLU 値は DMSO の平均に標準偏差の 3 倍を加えた値よりも大きい必要がある。
- いずれか 1 つの許容基準でも満たさない実験は破棄し、やり直すこと。

アンタゴニスト試験

範囲設定試験

- 抑制：最大 Ral/E2 参照基準の RLU 値の平均を DMSO 対照の RLU 値の平均で除することによってプレート抑制を測定する。通常 5 倍の抑制が達成されるが、許容するためには、抑制は 3 倍以上である必要がある。
- E2 対照の結果：E2 対照の RLU 値は、過去の E2 対照の平均 RLU 値の標準偏差の 2.5 倍以内である必要がある。
- DMSO 対照の結果：DMSO 対照の RLU 値は、過去の溶剤対照の平均 RLU 値の標準偏差の 2.5 倍以内である必要がある。
- いずれか 1 つの許容基準でも満たさない実験は破棄し、やり直す。

包括試験

これにはアンタゴニスト範囲設定試験の許容基準および次の事項が含まれる。

- 参照標準の結果：Ral/E2 参照標準の濃度応答曲線はシグモイド状で、濃度応答曲線の直線部分に少なくとも値が 3 つある必要がある。
- 陽性対照の結果：タモキシフェン/E2 対照の RLU 値は、E2 対照の平均から標準偏差の 3 倍を引いた値よりも小さくなければならない。
- いずれか 1 つの許容基準でも満たさない実験は破棄し、やり直す。

参照標準、陽性対照、および溶媒対照

溶媒対照（アゴニストおよびアンタゴニストアッセイ）

12. 被験物質の溶解に用いる溶媒は溶媒対照として試験する必要がある。VM7Luc ER TA 試験法のバリデーションの際に用いる溶媒は、1% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO, CASRN 67-68-5) であった（段落 24 参照）。DMSO 以外の溶媒を用いる場合には、必要に応じ、参照標準、対照および被験物質をすべて同じ溶媒で試験する。

参照標準（アゴニスト範囲設定試験）

13. 参照標準は E2 (CASRN 50-28-2) である。範囲設定試験の場合、参照標準は 4 濃度の E2 の 4 つの濃度の段階希釈 (1.84×10^{-10} 、 4.59×10^{-11} 、 1.15×10^{-11} 、および 2.87×10^{-12} M) で構成され、各濃度を 2 系列のウェルで試験する。

参照標準（アゴニスト包括試験）

14. 包括試験用の E2 は 2 系列のウェル内の 11 の濃度 (3.67×10^{-10} から 3.59×10^{-13} M までの範囲) からなる E2 の 1:2 段階希釈で構成される。

参照標準（アンタゴニスト範囲設定試験）

15. 参照標準は Ral (CASRN 84449-90-1) と E2 (CASRN 50-28-2) の組み合わせである。範囲設定試験用の Ral/E2 は 2 系列のウェル内に Ral の 3 つの濃度の段階希釈 (3.06×10^{-9} 、 7.67×10^{-10} 、および 1.92×10^{-10} M) と固定濃度 (9.18×10^{-11} M) の E2 で構成される。

参照標準（アンタゴニスト包括試験）

16. 包括試験用の Ral/E2 は 1:2 段階希釈の Ral (2.45×10^{-8} から 9.57×10^{-11} M までの範囲) と固定濃度 (9.18×10^{-11} M) の E2 で構成され、9 つの濃度の Ral/E2 を 2 系列のウェル内に入れたものである。

弱陽性対照（アゴニスト）

17. 弱陽性対照は EFM 内の 9.06×10^{-6} M の *p,p'*-メトキシクロール（メトキシクロール、CASRN 72-43-5）である。

弱陽性対照（アンタゴニスト）

18. 弱陽性対照は EFM 内のタモキシフェン（CASRN 10540-29-1） 3.36×10^{-6} M と E2 9.18×10^{-11} M で構成される。

E2 対照（アンタゴニストアッセイのみ）

19. E2 対照は EFM 内の 9.18×10^{-11} M の E2 であり、ベースラインの陰性対照として用いられる。

誘導倍率（アゴニスト）

20. 参照標準（E2）のルシフェラーゼ活性の誘導は、最大の E2 参照基準の RLU 値の平均を DMSO 対照の RLU 値の平均で除することによって計測し、結果が 4 倍よりも大きい必要がある。

抑制倍率（アンタゴニスト）

21. 参照標準（Ral/E2）の平均ルシフェラーゼ活性は、最大の Ral/E2 参照基準の RLU 値の平均を DMSO 対照の RLU 値の平均で除することによって計測し、3 倍よりも大きい必要がある。

試験施設の習熟度証明（本試験ガイドライン（8～15 ページ）の段落 14 ならびに「ER TA 試験法の構成要素」の表 3 および表 4 を参照）

溶媒

22. 被験物質は当該被験物質を溶解することができ、細胞培地と混和可能な溶剤に溶解する。適切な溶媒は、水、エタノール（純度 95%～100%）および DMSO である。DMSO を用いる場合には、濃度が 1.0%（v/v）を超えないようにする。いずれの溶媒についても、最大使用量で細胞毒性を示さず、試験の性能に影響しないことを実証しなければならない。参照標準および対照を 100%の溶剤に溶解した後、EFM に適切な濃度に希釈する。

被験物質の調製

23. 被験物質を 100%の DMSO（または適切な溶剤）に溶解した後、EFM に適切な濃度に希釈する。被験物質はすべて、溶解および希釈前に室温に平衡化させる。被験物質の溶液は、各実験用に新たに調製する。溶液には目立った沈殿または混濁があってはならない。参照標準および対照のストックはまとめて調製してもよいが、最終的な参照標準、対照希釈液および被験物質は各実験用に新たに調製し、調製後 24 時間以内に使用する。

溶解度および細胞毒性：範囲設定のための検討

24. 範囲設定試験は2系列の1:10段階希釈ランの7つのポイントからなる。まず、アゴニスト試験の場合は最大濃度1 mg/mL（約1 mM）まで、アンタゴニスト試験の場合は20 µg/mL（約10 µM）まで被験物質の試験を行う。範囲設定実験は次のことを決定するために用いられる。

- 包括試験の際に用いるべき被験物質の開始濃度
- 包括試験の際に用いるべき被験物質の希釈度（1:2 または 1:5）

25. 細胞の生存率／細胞毒性の評価は、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法の手順(7)に含まれており、範囲設定試験および包括試験に組み込まれている。VM7Luc ER TA (1) のバリデーションの際に細胞生存率を評価するために用いた細胞毒性試験法は、スケーリングによる定性的目視観察法であったが、細胞毒性を判定するための定量化法を用いることができる（手順(7)を参照）。生存率を20%を超えて低下させる被験物質濃度のデータは使用できない。

被験物質の曝露およびアッセイプレートの構成

26. 細胞を計数して96ウェルの組織培養プレート（ 2×10^5 細胞／ウェル）のEFMに入れ、24時間培養して細胞をプレートに付着させる。EFMを取り除き、EFMに入った被験物質および参照物質で置き換え、19～24時間培養する。近隣の対照物質ウェルが偽陽性の結果を示す場合があるため、揮発性の高い物質には特別の配慮を払う必要がある。このような場合、「プレートシーラー」は、試験中に各ウェルを効果的に分離するのに役立つ可能性があるため、推奨される。

範囲設定試験

27. 範囲設定試験では、96ウェルプレートのすべてのウェルを使用して、2系列の7ポイントの1:10段階希釈として、最大6つの物質を試験する（[図1](#)および[図2](#)参照）。

- アゴニストの範囲設定試験では、参照標準として4つの濃度のE2を2系列で、およびDMSO対照用に4つのレプリケートウェルを使用する。
- アンタゴニストの範囲設定試験では、参照標準として 9.18×10^{-11} MのE2を含んだ3つの濃度のRal/E2を2系列で、およびE2とDMSO対照用に3つのレプリケートウェルを使用する。

図 1 : アゴニストの範囲設定試験の 96 ウェルプレート配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

略語：E2-1～E2-4 = E2 参照標準の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC1-1～TC1-7 = 被験物質 1（TC1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC2-1～TC2-7 = 被験物質 2（TC2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC3-1～TC3-7 = 被験物質 3（TC3）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC4-1～TC4-7 = 被験物質 4（TC4）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC5-1～TC5-7 = 被験物質 5（TC5）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC6-1～TC6-7 = 被験物質 6（TC6）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM））。

図 2 : アンタゴニストの範囲設定試験の 96 ウェルプレート配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

略語：E2 = E2 対照、Ral-1～Ral-3 = ラロキシフェン/E2 参照標準の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC1-1～TC1-7 = 被験物質 1（TC1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC2-1～TC2-7 = 被験物質 2（TC2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC3-1～TC3-7 = 被験物質 3（TC3）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC4-1～TC4-7 = 被験物質 4（TC4）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC5-1～TC5-7 = 被験物質 5（TC5）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC6-1～TC6-7 = 被験物質 6（TC6）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM））。

注：被験物質はすべて、 9.18×10^{-11} M E2 の存在下で試験する。

28. 各ウェルに必要な最終的な培地の推奨量は 200 μ L である。すべてのウェル内の細胞が 80% 以上の生存率を示す試験プレートだけを使用する。

29. アゴニストの包括試験用の開始濃度の決定については、アゴニスト試験手順書(7)に詳細を記載している。略述すると、以下の判定基準を使用する。

- 被験物質の濃度曲線に、平均プラス DMSO 対照の標準偏差の 3 倍を超えるポイントがない場合には、包括試験は最大溶解濃度から始まる 11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いて実施する。

- 被験物質の濃度曲線に、平均プラス DMSO 対照の標準偏差の 3 倍を超えるポイントがある場合には、包括試験において 11 ポイントの希釈方法で使用する開始濃度は、範囲設定試験で最大の RLU 調整値が得られる濃度よりも 1 log 高いものとする。11 ポイントの希釈方法は次の判断基準に従って、1:2 または 1:5 のいずれかの希釈に基づく。

結果の濃度範囲が範囲設定試験で作成された濃度応答曲線に基づく応答の範囲全体を包含することになる場合には、11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いる。それ以外の場合は、1:5 希釈を用いる。

- 範囲設定試験において被験物質が二相の濃度応答曲線を示す場合には、包括試験で両相を分解する必要がある。

30. **アンタゴニスト**の包括試験の開始濃度の決定については、アンタゴニスト試験手順書(7)に詳細を記載している。略述すると、以下の判定基準を使用する。

- 被験物質の濃度曲線に、平均マイナス E2 対照の標準偏差の 3 倍を下回るポイントがない場合には、対照の包括試験は最大溶解濃度から始まる 11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いて実施する。
- 被験物質の濃度曲線に、平均マイナス E2 対照の標準偏差の 3 倍を下回るポイントがある場合には、包括試験で 11 ポイントの希釈方法で使用する開始濃度は、次のいずれか 1 つとする。
 - 範囲設定試験で最小の RLU 調整値が得られる濃度
 - 最大溶解濃度（アンタゴニスト試験手順書(7)、図 14-2 参照）
 - 最低細胞毒性濃度（関連する例については、アンタゴニスト試験手順書(7)、図 14-3 参照）。
- 11 ポイントの希釈方法は次の判断基準に従って、1:2 または 1:5 のいずれかの段階希釈に基づく。

結果の濃度範囲が範囲設定試験で作成された濃度応答曲線に基づく応答の範囲全体を包含することになる場合には、11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いる。それ以外の場合は、1:5 希釈を用いる。

包括試験

31. 包括試験は、11 ポイントの段階希釈（包括試験の基準の開始濃度に基づいて 1:2 または 1:5 段階希釈のいずれか）で構成され、各濃度を 96 ウェルプレート の 3 連のウェルで試験を行う（図 3および図 4を参照）。

- アゴニストの包括試験では、参照標準として 11 の濃度の E2 を 2 系列で使用する。各プレートは DMSO 対照用の 4 つのレプリケートウェルおよびメトキシクロール対照 (9.06×10^{-6} M) 用の 4 つのレプリケートウェルを含んでいる。
- アンタゴニストの包括試験では、参照標準として 9.18×10^{-11} M の E2 を含んだ 9 つの濃度の Ral/E2 を 2 系列で使用する、 9.18×10^{-11} M の E2 対照用の 4 つのレプリケートウェル、DMSO 対照用の 4 つのレプリケートウェル、 3.36×10^{-6} M のタモキシフェン用の 4 つのレプリケートウェルを含んでいる。

図 3 : アゴニストの包括試験の 96 ウェルプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

略語：TC11-1～TC1-11 = 被験物質 1 の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC2-1～TC2-11 = 被験物質 2 の濃度（高濃度から低濃度の順）、E2-1～E2-11 = E2 参照標準の濃度（高濃度から低濃度の順）、Meth = p,p'-メトキシクロール弱陽性対照、VC = DMSO（1% v/v）EFM 溶媒対照。

図 4 : アンタゴニストの包括試験の 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

略語：E2 = E2 対照、Ral-1～Ral-9 = ラロキシフェン/E2 参照標準の濃度（高濃度から低濃度の順）、Tam = タモキシフェン/E2 弱陽性対照、TC1-1～TC1-11 = 被験物質 1（TC1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TC2-1～TC2-11 = 被験物質 2（TC2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM））

注：上述のとおり、すべての参照ウェルと試験ウェルには固定濃度の E2（ 9.18×10^{-11} M）が含まれる。

32. 同一化学物質に対する包括試験は日を改め再度実施し、独立性を確保する。包括試験は、少なくとも 2 回実施する。試験結果が互いに矛盾する場合（1 つの試験では陽性、他方では陰性など）、または試験の 1 つが不十分である場合には、第 3 の追加試験を実施する。

発光の測定

33. 発光は、インジェクション照度計を使用してインジェクション量と測定間隔を制御するソフトウェアによって 300 nm～650 nm の範囲で測定する(7)。各ウェルからの発光はウェルごとに RLU で表す。

データの分析

EC₅₀/IC₅₀ の決定

34. EC₅₀ の値（被験物質（アゴニスト）の 50%効果濃度）および IC₅₀ の値（被験物質（アンタゴニスト）の 50%阻害濃度）を濃度応答データから求める。1 つ以上の濃度において陽性である物質については、Hill 関数分析または適切な代替法を用いて、半最大応答（IC₅₀または EC₅₀）をもたらす被験物質の濃度はヒル関数分析または適切な代替手段を用いて算出する。ヒル関数は、以下の等式を用いて被験物質濃度と応答（一般的にシグモイド曲線に従う）を関連づける 4 パラメータのロジスティック数学モデルである。

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\lg \text{EC}_{50} - X) \text{ヒル勾配}}}$$

式中、Y = 応答（すなわち RLU）、X = 濃度の対数、Bottom = 最小応答、Top = 最大応答、lg EC₅₀（または lg IC₅₀）= Top と Bottom との中間の応答としての X の対数とし、ヒル勾配は曲線の傾きを示すものとする。本モデルは、Top、Bottom、ヒル勾配、ならびに IC₅₀ および EC₅₀ のパラメータとして最適なものを出算する。EC₅₀ および IC₅₀ の値の計算には、適切な統計ソフトウェアを使用する（Graphpad Prism®統計ソフトウェアなど）。

外れ値の決定

35. Q 検定（アゴニストおよびアンタゴニストの試験手順書(7)を参照）を含める（ただし、これらに限定されない）ことにより、データ解析から除外する「使用できない」ウェルを判断するための的確な統計的判断を容易にできる可能性がある。

36. E2 参照標準のレプリケート（試料サイズ 2）については、任意の E2 濃度のレプリケートについてのいかなる RLU 調整値も、その値が履歴データベースにおいてその濃度についての RLU 調整値より 20%を超えて上回っているか下回っている場合には、外れ値であると見なす。

範囲設定試験用の照度計データの収集および調整

37. 照度計の生データを、本試験法用に設計されたスプレッドシートのテンプレートに転送する。除外する必要がある外れ値のデータポイントがあるかどうかを判断する必要がある。（解析で決定されるパラメータについては、試験許容基準を参照。）次の計算を実施する。

アゴニスト

- ステップ 1 DMSO 溶媒対照（VC）について平均値を計算する。
- ステップ 2 DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
- ステップ 3 参照標準（E2）について平均誘導倍率を計算する。

ステップ 4 被験物質について平均 EC₅₀ 値を計算する。

アンタゴニスト

- ステップ 1 DMSO VC について平均値を計算する。
- ステップ 2 DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
- ステップ 3 参照標準 (Ra/E2) について平均抑制比率を計算する。
- ステップ 4 E2 参照標準について平均値を計算する。
- ステップ 5 被験物質について IC₅₀ の平均値を計算する。

包括試験用の照度計データの収集および調整

38. 照度計の生データを、本試験法用に設計されたスプレッドシートのテンプレートに転送する。除外する必要がある外れ値のデータポイントがあるかどうかを判断する必要がある。（解析で決定されるパラメータについては、試験許容基準を参照。）次の計算を実施する。

アゴニスト

- ステップ 1 DMSO VC について平均値を計算する。
- ステップ 2 DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
- ステップ 3 参照標準 (E2) について平均誘導倍率を計算する。
- ステップ 4 E2 および被験物質について EC₅₀ の平均値を計算する。
- ステップ 5 メトキシクロールについて RLU 調整値の平均値を計算する。

アンタゴニスト

- ステップ 1 DMSO VC について平均値を計算する。
- ステップ 2 DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
- ステップ 3 参照標準 (Ra/E2) について平均誘導倍率を計算する。
- ステップ 4 Ra/E2 および被験物質について IC₅₀ の平均値を計算する。
- ステップ 5 タモキシフェンについて RLU 調整値の平均値を計算する。
- ステップ 6 E2 参照標準について平均値を計算する。

データ解釈の基準

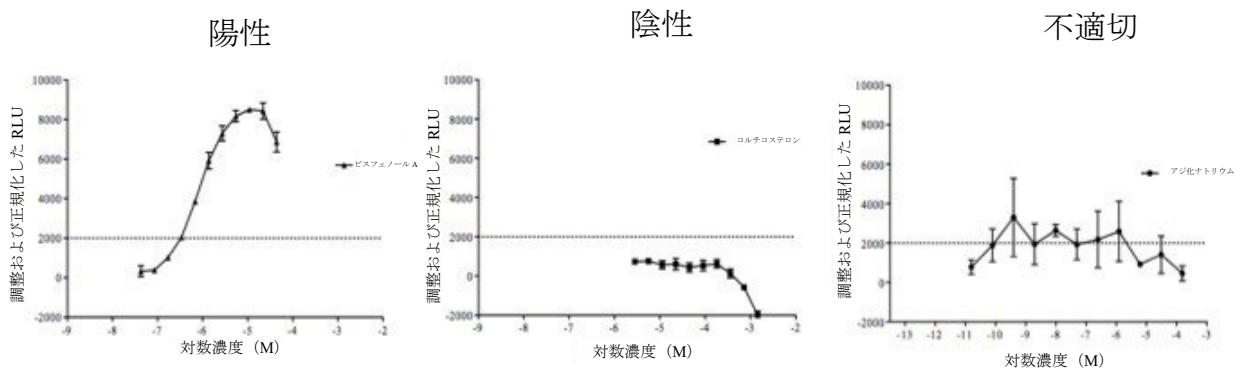
39. VM7Luc ER TA は、*in vivo* での ED 試験のための物質の優先順位付けに資するための証拠の重み付けアプローチの一環として意図されている。この優先順位付け手順の一部は、被験物質の ER アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性のいずれかについて陽性または陰性に分類することになる。VM7Luc ER TA バリデーション試験で使用される陽性または陰性の判定基準を表 1 に示す。

表 1: 陽性および陰性の判定基準

アゴニスト活性	
陽性	- ER アゴニスト活性について陽性に分類される被験物質はすべて、ベースライン、それに正の勾配が続き、プラトーまたはピークで終わる濃度応答曲線を有している必要がある。場合によっては、これらの特性のうち2つ（ベースライン - 勾配または勾配 - ピーク）のみが定義されていてもよい。 - 正の勾配を定義する線には、エラーバー（平均±SD）が重ならない3つ以上のポイントが含まれていなければならない。ベースラインを形成するポイントは除外するが、曲線の直線部分にはピークまたはプラトートの最初のポイントが含まれていてもよい。 - 陽性分類には、参照標準 E2 について最大値の 20%以上の応答振幅（ベースラインとピークとの差）が必要である（すなわち、参照標準（E2）の最大応答値が 10,000 RLU に調整される場合、2,000 RLU 以上）。 - 可能であれば、EC₅₀ の値は陽性物質ごとに算出する。
陰性	所定の濃度に対する平均の RLU 調整値は、DMSO 対照の RLU 値の平均プラス DMSO の RLU 値の標準偏差の 3 倍以下である。
不適切	主要な定性的または定量的限界のために活性の有無を示すのに有効であるとは解釈できないデータは不適切と見なし、被験物質が陽性か陰性かを判定するために使用することはできない。当該物質は再試験するものとする。
アンタゴニスト活性	
陽性	- 被験物質のデータから、ベースラインとそれに続く負の勾配からなる濃度応答曲線が得られる。 - 負の勾配を定義する線には、エラーバーが重ならない3つ以上のポイントが含まれていなければならない。ベースラインを形成するポイントは除外するが、曲線の直線部分にはプラトートの最初のポイントが含まれていてもよい。 - 参照標準 Ral/E2 について最大値から 20%以上の活性抑制がなければならない（すなわち、参照標準（Ral/E2）の最大応答値が 10,000 RLU に調節される場合、8,000 RLU 以下）。 - 被験物質の最大非細胞毒性濃度は 1x10⁻⁵ M 以下とする。 - 可能であれば、IC₅₀ の値は陽性物質ごとに算出する。
陰性	1.0 × 10 ⁻⁵ M 未満の濃度において、すべてのデータポイントが ED ₈₀ の値（E2 応答の 80%、すなわち 8000 RLU）を上回っている。
不適切	主要な定性的または定量的限界のために活性の有無を示すのに有効であるとは解釈できないデータは不適切と見なし、被験物質が陽性か陰性かを判定するために使用することはできない。物質は再試験するものとする。

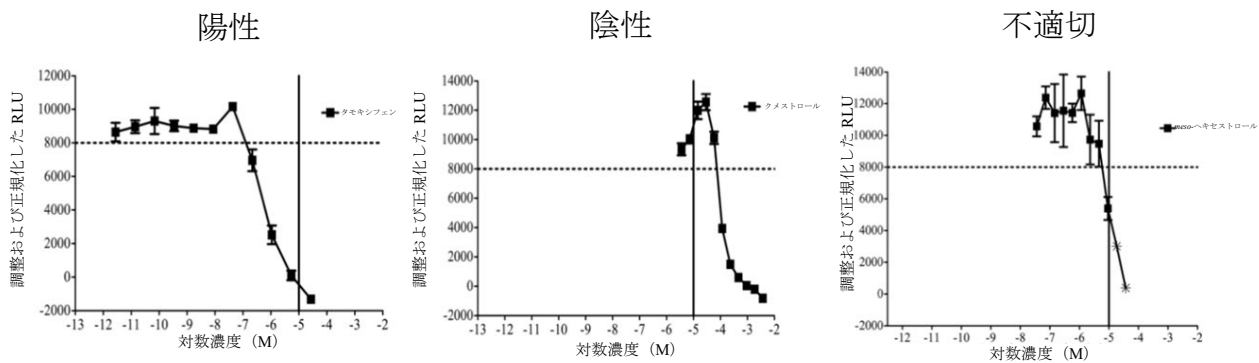
40. 可能であれば、陽性の結果は、作用の程度およびその作用をもたらした濃度の両方によって説明づけられる。陽性、陰性、および不適切なデータの例を図 5 および図 6 に示す。

図 5：アゴニストの例：陽性、陰性、および不適切なデータ



破線は E2 応答の 20%、すなわち調整および正規化した 2,000 RLU を示す。

図 6：アンタゴニストの例：陽性、陰性、および不適切なデータ



破線は Ral/E2 応答の 80%、すなわち調整および正規化した 8,000 RLU を示す。

実線は 1.00×10^{-5} M を示す。陽性と考えられる応答は、8,000 RLU の線よりも下で、濃度が 1.00×10^{-5} M 未満でなければならない。

meso-ヘキセストールのグラフのアスタリスク (*) のついた濃度は、生存率スコア「2」以上を示す。

meso-ヘキセストールについての試験結果は、8,000 RLU 未満の応答が 1.00×10^{-5} M で生じているのみであるため、データが不十分と考えられる。

41. EC_{50} および IC_{50} の計算は、4 パラメータのヒル関数（詳細はアゴニスト試験の手順書およびアンタゴニスト試験の手順書(7)を参照）を使用して行うことができる。許容基準に適合することは当該試験系が正しく動作していることを示しているが、ある特定のランで正確なデータが得られることを保証するものではない。最初のランの結果を重ねることが、正確なデータが生成されたことを保証するのに最適である（本試験ガイドラインの「ER TA 試験法の構成要素」15 ページの段落 19 を参照）。

試験報告書

44. 「ER TA 試験法の構成要素」（本試験ガイドラインの 8～15 ページ）の段落 20 を参照。

参考文献 (3)

1. ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., et al. (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls M., et al. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): p. 270-273.
- (6) Coecke S., et al. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: p. 261-287.
- (7) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No. 11-7850.
- (8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A., et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- (10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646-57.
- (11) Kuiper G.G, et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (13) Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.

- (14) Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

補遺 4

ER α CALUX 細胞株を用いた化学物質のエストロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性検出のための、安定に形質移入したヒトエストロゲン受容体- α 転写活性試験法

初期検討事項および制限事項（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

1. ER α CALUX を用いた転写活性化試験では、ヒト U2OS 細胞株を用いて、ヒトエストロゲン受容体 α (hER α) を介したエストロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検出する。BioDetection Systems BV（オランダ、アムステルダム）による安定に形質移入した ER α CALUX を用いたバイオアッセイのバリデーション試験では、この試験法の意図する目的の妥当性および信頼性が立証された(1)。ER α CALUX 細胞株は安定に形質移入したヒト ER α のみを発現する(2)(3)。
2. 本試験法は、生物発光をエンドポイントとして測定することにより、hER α を介した転写活性化を検出するように特別に設計されている。生物発光はシグナル対ノイズ比が高いため、様々なバイオアッセイで一般的に使用されている(4)。
3. 植物エストロゲンの濃度が 1 μ M を超えた場合、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過活性化により受容体非介在性の発光シグナルが生じることが報告されている(5)(6)(7)。したがって、ルシフェラーゼ発現の過活性化を引き起こす可能性のある高濃度の植物エストロゲンまたは他の類似化合物は、安定に形質移入した ER 転写活性試験において慎重に検討しなければならない（補遺 2 を参照）。
4. 規制目的で本試験法を使用する前に、「一般的な緒言」 および 「ER TA 試験法の構成要素」（1～15）ページ）を読むこと。本試験法ガイドラインで使用する定義および略語は、補遺 1 に記載している。

本試験法の原理（1 ページの「一般的な緒言」も参照）

5. 本バイオアッセイは、ER リガンド結合とそれに続く受容体-リガンド複合体の細胞核への移行を評価するために用いられる。核の中で、受容体-リガンド複合体は特異的な DNA 応答エレメントと結合し、ホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子を転写活性化することで、ルシフェラーゼ酵素の細胞発現を増加させる。ルシフェラーゼ基質であるルシフェリンを添加すると、ルシフェリンが生物発光生成物に変換される。生成された光は、照度計を用いて容易に検出・定量できる。

6. 本試験系は、安定に形質移入した ER α CALUX 細胞を用いる。ER α CALUX 細胞はヒト骨芽細胞型骨肉腫 U2OS 細胞株に由来している。リン酸カルシウム共沈法を用いて、ヒト U2OS 細胞に 3xHRE-TATA-Luc および pSG5-neo-hER α を安定に形質移入した。U2OS 細胞株は、内因性受容体活性がほとんどないか全くないという所見に基づき、U2OS 細胞株をエストロゲン（および他のステロイドホルモン）応答性レポーター細胞株の優れた候補として選択した。内因性受容体がないことをルシフェラーゼレポータープラスミドのみを用いて評価したところ、受容体リガンドを添加しても活性を示さなかった。さらに、同族受容体を一過的に導入したところ、この細胞株は強力なホルモン介在性応答を示した(2)(3)(8)。

7. ER α CALUX 細胞株を用いて行う化学物質のエストロゲン活性または抗エストロゲン活性の試験には、プレスクリーニングランと包括的ランが含まれる。プレスクリーニングランでは、包括試験のために、被験物質の溶解度、細胞毒性および正確な濃度範囲を求める。包括的ランでは、被験物質の正確な濃度範囲を ER α CALUX を用いたバイオアッセイにて試験した後、被験物質をアゴニストまたはアンタゴニストに分類する。

8. データ解釈の基準については、段落 59 で詳細に説明している。略述すると、被験物質が連続した 2 つ以上の濃度で参照標準 17 β -エストラジオール (PC₁₀) による最大応答の 10%以上の応答を示した場合、当該被験物質をアゴニスト作用について陽性とみなす。被験物質が連続した 2 つ以上の濃度で参照標準タモキシフェン (PC₈₀) の最大応答による 80%以下の応答を示した場合、当該被験物質をアンタゴニスト作用について陽性とみなす。

手順

細胞株

9. 安定に形質移入した U2OS ER α CALUX 細胞株を用いる。この細胞株は、技術ライセンス契約を結んだ上で、オランダのアムステルダムにある BioDetection Systems BV から入手することができる。

10. マイコプラズマを含まない培養細胞のみを使用する。使用する細胞ロットは、マイコプラズマ汚染が陰性であることが保証されているものを使用するか、使用前にマイコプラズマ否定試験を実施すること。マイコプラズマ感染を高感度で検出するには、RT-PCR（リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応）法を使用する必要がある(9)。

細胞株の安定性

11. CALUX 細胞は、安定性および完全性を維持するために液体窒素（-80°C）で保存する。細胞は、解凍して新たな培養を開始した後、少なくとも 2 回継代培養してから化学物質のエストロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト作用の評価に使用する。細胞は 30 継代を超えて培養してはならない。

12. 細胞株の経時的な安定性をモニターするために、参照標準の EC₅₀ または IC₅₀ を評価することにより、アゴニストおよびアンタゴニスト試験系の応答性を検証する必要がある。また、陽性対照試料 (PC) と陰性対照試料 (NC) の相対誘導能をモニターすること。結果は、ER α CALUX を用いたアゴニスト（表 3C）またはアンタゴニストのバイオアッセイ（表 4C）の許容基準に一致しなければならない。参照標準、陽性対照および陰性対照を、アゴニストおよびアンタゴニストモードのそれぞれについて表 1 および表 2 に示す。

細胞培養および播種条件

13. U2OS 細胞は、pH 指示薬としてフェノールレッド、ウシ胎児血清（7.5%）、非必須アミノ酸（1%）、ペニシリン（10 単位/mL）、ストレプトマイシンおよび選択マーカーとしてジェネティシン（G-418）を添加した増殖培地（DMEM/F12（1:1））で培養する。37°C、湿度 100%の CO₂ インキュベーター（5% CO₂）に細胞を入れる。細胞密集度が 85~95%に達したら、細胞を継代培養するか、調製して 96 ウェルマイクロタイタープレートに播種する。後者の場合、エストロゲンを含まない試験培地（フェノールレッドを含まない、チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清（5% v/v）、非必須アミノ酸（1% v/v）、ペニシリン（10 単位/mL）およびストレプトマイシン（10 µg/mL）を添加した DMEM/F12（1:1）培地）中に細胞を 1 x 10⁵ 細胞/mL で再懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレートのウェルに播種する（均質化した細胞懸濁液 100 µL）。細胞は、曝露前に CO₂ インキュベーター（5% CO₂、37°C、湿度 100%）内で 24 時間前培養する。プラスチックはエストロゲンを含んでいてはならない。

許容基準

14. 被験物質のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を一連の試験で試験する。一連の試験は、最大 6 枚のマイクロタイタープレートで構成される。一連の試験にはそれぞれ、参照標準、陽性対照試料、陰性対照試料および溶剤対照の少なくとも 1 つの一連の希釈液が含まれる。図 1 および 2 に、アゴニストおよびアンタゴニストの一連の試験のプレート設定を示す。

15. 参照標準、被験物質、すべての溶剤対照、ならびに陽性および陰性対照の各希釈液を 3 回ずつ分析する。3回の分析はそれぞれ、表 3A および表 4A に示す要件を満たさなければならない。

16. 参照標準（アゴニスト作用については 17β-エストラジオール、アンタゴニスト作用についてはタモキシフェン）の完全な一連の希釈液は、一連の試験それぞれの最初のプレートで測定する。残りの 5 枚のマイクロタイタープレートの分析結果を、参照標準の完全な濃度応答曲線を含む最初の 1 枚のマイクロタイタープレートと比較できるようにするには、すべてのプレートに、溶剤対照、試験した参照標準の最高濃度、および参照標準のおおよその EC₅₀（アゴニズム）または IC₅₀（アンタゴニスト）濃度の 3 つの対照試料を含める必要がある。最初のプレートと残りの 5 枚のプレート上の平均対照試料の比は、表 3C（アゴニスト作用）または表 4C（アンタゴニスト作用）に示す要件を満たさなければならない。

17. 一連の試験内の各マイクロタイタープレートについて、z 係数を計算する(10)。参照標準の最高濃度および最低濃度での応答を用いて z 係数を計算する。マイクロタイタープレートは、表 3C（アゴニスト作用）または表 4C（アンタゴニスト作用）に示された要件を満たす場合に、有効とみなす。

18. 参照標準はシグモイド状の用量応答曲線を示すこと。参照標準の一連の希釈液の応答から得られる EC₅₀ または IC₅₀ は、表 3C（アゴニスト作用）または表 4C（アンタゴニスト作用）に示す要件を満たさなければならない。

19. 一連の試験のそれぞれには、陽性対照および陰性対照試料を含める。陽性対照試料と陰性対照試料の両方について算出した相対誘導能は、表 3C（アゴニスト作用）または表 4C（アンタゴニスト作用）に示す要件を満たす必要がある。

20. すべての測定において、参照標準の最高濃度の誘導係数は、参照標準 17β-エストラジオールの平均最高相対発光量（RLU）の応答を参照溶剤対照の平均 RLU 応答で除することによって算出する。この誘導係数は、表 3C（アゴニスト作用）または表 4C（アンタゴニスト作用）に示すとおり、誘導倍率の最小要件を満たさなければならない。

21. 上述のすべての許容基準を満たすマイクロタイタープレートのみが有効とみなされ、被験物質の応答を評価するために使用できる。

22. 許容基準は、プレスクリーニングランおよび包括的ランの両方に適用できる。

表 1 CALUX を用いたアゴニストのバイオアッセイにおける参照標準、陽性対照（PC）および陰性対照（NC）の濃度

	物質	CAS RN	試験範囲 (M)
参照標準	17β-エストラジオール	50-28-2	1.0*10 ⁻¹³ - 1.0*10 ⁻¹⁰
陽性対照 (PC)	17α-メチルテストステロン	58-18-4	3.0*10 ⁻⁰⁶
陰性対照 (NC)	コルチコステロン	50-22-6	1.0*10 ⁻⁰⁸

表 2 CALUX を用いたアンタゴニストのバイオアッセイにおける参照標準、陽性対照（PC）および陰性対照（NC）の濃度

	物質	CAS RN	試験範囲 (M)
参照標準	タモキシフェン	10540-29-1	3.0*10 ⁻⁰⁹ - 1.0*10 ⁻⁰⁵
陽性対照 (PC)	4-ヒドロキシタモキシフェン	68047-06-3	1.0*10 ⁻⁰⁹
陰性対照 (NC)	レスベラトロール	501-36-0	1.0*10 ⁻⁰⁵

表 3 ERα CALUX を用いたアゴニストのバイオアッセイの許容基準

A - プレート上の個々の試料		判定基準
1	3 連のウェルの最大%SD (NC、PC、被験物質および参照標準の各希釈液、C0 を除く)	< 15%
2	3 連のウェルの最大%SD (参照標準および被験物質の溶剤対照 (C0、SC))	< 30%
3	LDH 最高漏出率 (細胞毒性の指標として)	< 120%
B - 1 枚のマイクロタイタープレート内		
4	参照標準溶剤対照 (C0; プレート 1) と被験物質溶剤対照 (SC、プレート 2~x) の比率	0.5~2.0
5	プレート 1 の EC ₅₀ の近似値および参照標準の最高濃度と、プレート 2~x (C4、C8) の EC ₅₀ の近似値および参照標準の最高濃度の比率	0.70~1.30
6	各プレートの Z 係数	> 0.6
C - 単一の一連の分析内 (単一の一連の分析内のすべてのプレート)		
7	参照標準のシグモイド曲線	あり (17β-エストラジオール)
8	参照標準 17β-エストラジオールの EC ₅₀ 範囲	4 x 10 ⁻¹² - 4 x 10 ⁻¹¹ M
9	参照標準溶剤対照に対する 17β-エストラジオール最高濃度の最小誘導倍率	5
10	PC の相対誘導能 (%)	> 30%
11	NC の相対誘導能 (%)	< 10%

Appr: 近似値、PC: 陽性対照、NC: 陰性対照、SC: 被験物質溶剤対照、C0: 参照標準溶剤対照、SD: 標準偏差、LDH: 乳酸脱水素酵素

表 4 ERα CALUX を用いたアンタゴニストのバイオアッセイの許容基準

A - プレート上の個々の試料		判定基準
1	3 連のウェルの最大%SD (NC、PC、被験物質および参照標準の各希釈液、溶剤対照 (C0))	< 15%
2	3 連のウェルの最大%SD (溶媒対照 (VC) および参照標準の最高濃度 (C8))	< 30%
3	LDH 最高漏出率 (細胞毒性の指標として)	< 120%
B - 1 枚のマイクロタイタープレート内		
4	参照標準溶剤対照 (C0; プレート 1) と被験物質溶剤対照 (SC、プレート 2~x) の比率	0.70~1.30
5	プレート 1 の参照標準の IC ₅₀ の近似値と、プレート 2~x (C4) の参照標準の IC ₅₀ の近似値の比率	0.70~1.30
6	プレート 1 の参照標準の最高濃度とプレート 2~x (C8) の参照標準の最高濃度の比率	0.50~2.0
7	各プレートの Z 係数	> 0.6
C - 単一の一連の分析内 (単一の一連の分析内のすべてのプレート)		
8	参照標準のシグモイド曲線	あり (タモキシフェン)
9	参照標準 (タモキシフェン) の IC ₅₀ 範囲	1*10 ⁻⁸ - 1*10 ⁻⁷ M
10	タモキシフェン最高濃度に対する参照標準溶剤対照の最小誘導倍率	2.5
11	PC の相対誘導能 (%)	<70%
12	NC の相対誘導能 (%)	>85%

Appr: 近似値、PC: 陽性対照、NC: 陰性対照、VC: 溶剤対照 (固定濃度のアゴニスト参照標準なしの溶剤対照)、SC: 被験物質溶剤対照、C0: 参照標準溶剤対照、SD: 標準偏差、LDH: 乳酸脱水素酵素

溶剤／溶媒対照、参照標準、陽性対照、陰性対照

23. プレスクリーニングランおよび包括的ランのいずれについても、同じ溶剤／溶媒対照、参照標準、陽性対照および陰性対照を使用すること。また、参照標準、陽性対照および陰性対照の濃度は同一でなければならない。

溶剤対照

24. 被験物質の溶解に用いる溶剤は、溶剤対照として試験する。ERα CALUX を用いたバイオアッセイのバリデーションでは、溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO, 1% (v/v) ; CASRN 67-68-5) を用いた。DMSO 以外の溶剤を使用する場合には、参照標準、対照および被験物質はすべて同じ溶媒で試験する。アンタゴニスト試験において、溶剤対照には、固定濃度のアゴニスト参照標準 17β-エストラジオール (EC₅₀ 濃度に近似) が含まれることに留意すること。アンタゴニスト試験に用いる溶剤は、溶媒対照を調製して試験する。

溶媒対照 (アンタゴニスト作用)

25. アンタゴニスト試験では、試験培地に固定濃度のアゴニスト参照標準 17β-エストラジオール (EC₅₀ 濃度に近似) を添加する。被験物質の溶解に用いる溶剤のアンタゴニスト作用について試験するには、固定濃度のアゴニスト参照標準 17β-エストラジオールなしで試験培地を調製する必要がある。この対照試料を溶媒対照とする。ERα CALUX を用いたバイオアッセイのバリデーションでは、溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO, 1% (v/v) ; CASRN 67-68-5) を用いた。DMSO 以外の溶剤を使用する場合には、参照標準、対照および被験物質はすべて同じ溶媒で試験する。

参照標準

26. アゴニスト参照標準は 17β-エストラジオールである (表 1)。参照標準は、8 つの濃度の 17β-エストラジオール (1.0 × 10⁻¹³、3.0 × 10⁻¹³、1.0 × 10⁻¹²、3.0 × 10⁻¹²、6.0 × 10⁻¹²、1.0 × 10⁻¹¹、3.0 × 10⁻¹¹、1.0 × 10⁻¹⁰ M) の一連の希釈液からなる。

27. アンタゴニスト参照標準はタモキシフェンである（表 2）。参照標準は、8 つの濃度のタモキシフェン（ 3.0×10^{-09} 、 1.0×10^{-08} 、 3.0×10^{-08} 、 1.0×10^{-07} 、 3.0×10^{-07} 、 1.0×10^{-06} 、 3.0×10^{-06} 、 1.0×10^{-05} M）の一連の希釈液からなる。各濃度のアンタゴニスト参照標準は、固定濃度のアゴニスト参照標準 17 β -エストラジオール（ 3.0×10^{-12} M）と混合培養する。

陽性対照

28. アゴニスト試験の陽性対照は 17 α -メチルテストステロンである（表 1）。

29. アンタゴニスト試験の陽性対照は 4-ヒドロキシタモキシフェンである（表 2）。このアンタゴニスト陽性対照は、固定濃度のアゴニスト参照標準 17 β -エストラジオール（ 3.0×10^{-12} M）と混合培養する。

陰性対照

30. アゴニスト試験の陰性対照はコルチコステロンである（表 1）。

31. アンタゴニスト試験の陰性対照はレスバトロールである（表 2）。このアンタゴニスト陰性対照は、固定濃度のアゴニスト参照標準 17 β -エストラジオール（ 3.0×10^{-12} M）と混合培養する。

試験施設の習熟度証明（本試験ガイドライン（8～15 ページ）の段落 14 ならびに「ER TA 試験法の構成要素」の表 3 および表 4 を参照）

溶媒

32. 被験物質の溶解に使用する溶剤は、被験物質を完全に可溶化し、細胞培地との混和性があるものでなければならない。DMSO、水およびエタノール（純度 95%～100%）が適切な溶剤である。DMSO を溶剤として使用する場合、培養中の DMSO の最高濃度は 1%（v/v）を超えてはならない。使用前に、溶剤に細胞毒性がないか、また、試験法の性能の妨げとならないかを試験する必要がある。

参照標準、陽性対照、陰性対照および被験物質の調製

33. 参照標準、陽性対照、陰性対照および被験物質は 100% DMSO（または適切な溶剤）を溶解させる。次に、同じ溶剤で適切な（段階）希釈液を調製する。被験物質はすべて、溶解前に室温に平衡化させる。新たに調製した参照標準、陽性対照、陰性対照および被験物質の原液には、顕著な沈殿または混濁を認めてはならない。参照標準および対照の原液は、まとめて調製してもよい。被験物質の原液は、実験ごとに新しく調製する。参照標準、陽性対照、陰性対照および被験物質の最終希釈液は、実験ごとに新しく調製し、調製後 24 時間以内に使用すること。

溶解度、細胞毒性および濃度範囲設定試験

34. プレスクリーニングランでは、選択した溶剤中の被験物質の溶解度を求める。0.1 M の最大ストック濃度で調製する。この濃度で溶解性に問題がある場合は、被験物質が完全に溶解するまで濃度を下げて原液を調製する。プレスクリーニングランでは、被験物質の 1:10 段階希釈液を試験する。アゴニスト試験またはアンタゴニスト試験の最高試験濃度は 1 mM である。プレスクリーニング後、包括的ランで試験すべき適切で正確な濃度範囲を導出する。包括的試験に使用する

希釈倍率は、1 倍、3 倍、10 倍、30 倍、100 倍、300 倍、1000 倍および 3000 倍とする。

35. 細胞毒性試験は、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法の手順書に記載されている(11)。また、細胞毒性試験は、プレスクリーニングと包括的ランの両方に組み込まれている。ERα CALUX を用いたバイオアッセイのバリデーションで細胞毒性の評価に用いた方法は、被験物質への曝露後の乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出試験および細胞の定性的目視検査 (補遺 1 参照) であった。ただし、細胞毒性を測定するために他の定量的方法 (テトラゾリウムベースの比色 (MTT) 分析法または CALUX を用いた細胞毒性バイオアッセイなど) を使用することができる。一般に、細胞生存率が 20% を超えて低下する被験物質濃度は細胞毒性があるとみなされるため、データの評価には使用できない。LDH 漏出試験に関しては、LDH 漏出率が 120% を超える場合、その被験物質濃度は細胞毒性があるとみなされる。

被験物質の曝露およびアッセイプレートの構成

36. フラスコのコンフルエントな培養細胞をトリプシン処理した後、細胞を 1×10^5 個/mL でエストロゲンを含まない試験培地中に再懸濁する。再懸濁した細胞百 μL を 96 ウェルマイクロタイタープレートの内側のウェルに播種する。外側のウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 200 μL を充填する (図 1 および図 2 参照)。播種した細胞は、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C、湿度 100%) で 24 時間前培養する。

37. 前培養後、細胞毒性 (補遺 1 参照)、汚染および細胞密集度についてプレートを目視で検査する。目視で細胞毒性や汚染が認められず、細胞密集度が 85% 以上のプレートのみを試験に使用する。内側のウェルの培地を慎重に取り除き、参照標準、被験物質、陽性対照、陰性対照および溶剤対照の適切な一連の希釈液を含み、エストロゲンを含まない試験培地 200 μL に置き換える (表 5: アゴニスト試験、表 6: アンタゴニスト試験)。すべての参照標準、被験物質、陽性対照、陰性対照および溶剤対照は 3 回ずつ試験する。図 1 に、アゴニスト試験のプレート配置を示す。図 2 に、アンタゴニスト試験のプレート配置を示す。プレスクリーニング試験と包括試験のプレート配置は同一である。アンタゴニスト試験では、溶媒対照のウェル (VC) を除くすべての内側のウェルにも、固定濃度のアゴニスト参照標準 17 β -エストラジオール (3.0×10^{-12} M) が含まれている。各 TC プレートに参照標準 C8 および C4 を添加しなければならないことに留意すること。

38. すべての化学物質に細胞を曝露させた後、96 ウェルマイクロタイタープレートを CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C、湿度 100%) 内でさらに 24 時間培養する。

図 1

プレスクリーニングおよびアゴニスト作用評価のための 96 ウェルマイクロタイタープレートのプレート配置。

プレート 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

以降のプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

- C0 = 参照標準溶剤。
 C(1-8) = 参照標準の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）。
 PC = 陽性対照。
 NC = 陰性対照。
 TCx-(1-8) = プレスクリーニングランおよび被験物質 x のアゴニスト作用評価のための被験物質の希釈液（1～8、低～高濃度）。
 SC = 被験物質溶剤対照（C0 と同じ溶媒であることが望ましいが、別のロットのものである可能性もある）。
 グレーセル： = 200 μ l の PBS を満たした外側のウェル。

図 2 アンタゴニストのプレスクリーニングおよびアンタゴニスト作用評価のための 96 ウェルマイクロタイタープレートのプレート配置。

プレート 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
F		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
G		NC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	PC	
H												

以降のプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

- C0 = 参照標準溶剤。
 C(1-8) = 参照標準の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）。
 NC = 陰性対照。
 PC = 陽性対照。
 TCx-(1-8) = プレスクリーニングおよび被験物質 x のアゴニスト作用評価のための被験物質の希釈液（1～8、低～高濃度）。
 SC = 被験物質溶剤対照（C0 と同じ溶媒であることが望ましいが、別のロットのものである可能性もある）。
 VC = 溶媒対照（固定濃度のアゴニスト参照標準 17β-エストラジオールを含まない溶剤対照）。
 グレーセル： = 200 μl の PBS を満たした外側のウェル。
 注： 溶媒対照のウェル（VC）を除くすべての内側のウェルにも、固定濃度のアゴニスト参照標準 17β-エストラジオール（ 3.0×10^{-12} M）が含まれている。

発光の測定

39. 発光の測定については、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法の手順書で詳細に説明している(10)。細胞膜を開いてルシフェラーゼ活性を測定できるようにするため、24 時間培養後にウェルから培地を取り除き、細胞を溶解する。

40. 発光を測定するには、この手順では 2 つのインジェクターを備えた照度計が必要となる。ルシフェラーゼ応答は、基質であるルシフェリンを注入することにより開始する。0.2 M NaOH を加えて応答を停止させる。応答を停止して、1 つのウェルからもう 1 つのウェルへの発光の持ち越しを防ぐ。

41. 各ウェルから放出される光は、ウェルあたりの相対発光量（RLU）として表す。

プレスクリーニングラン

42. プレスクリーニング分析の結果を用いて、包括試験のために被験物質の正確な濃度範囲を求める。プレスクリーニング分析結果の評価および包括試験のための被験物質の正確な濃度範囲の決定については、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法の手順書(10)に詳細に記載している。ここでは、アゴニストおよびアンタゴニスト試験のための被験物質の濃度範囲を決定する手順の概要を示す。一連の希釈液デザインのガイダンスについては、表 5 および表 6 を参照のこと。

アゴニスト作用評価のための濃度選択

43. プレスクリーニングランで、表 5（アゴニスト作用）および表 6（アンタゴニスト作用）に示すように、一連の希釈液を用いて被験物質を試験する。すべての濃度について、図 1（アゴニスト作用）または図 2（アンタゴニスト作用）に示すプレート配置に従って、3 連のウェルで試験すること。

44. 許容基準（表 3）を満たす分析結果のみを有効とみなし、被験物質に対する応答の評価に用いる。一連の分析において 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートを再分析する。参照標準の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、一連の試験全体（6 プレート）を再分析しなければならない。

45. 以下の場合、被験物質の初期濃度範囲を調整し、プレスクリーニングランを再度実施する。

- 細胞毒性が認められる場合。プレスクリーニング手順は、被験物質の非細胞毒性濃度を下げて再度実施する必要がある。
- 被験物質のプレスクリーニングで、被験濃度により最大誘導が生じるために、完全な用量応答曲線がみられない場合。被験物質の濃度を下げてプレスクリーニングランを再度実施する必要がある。

46. 有効な用量依存性応答が認められた場合、最大誘導が認められ、細胞毒性を示さない（最低）濃度を選択すること。包括的ランで試験する被験物質の最高濃度は、この選択した濃度の 3 倍でなければならない。

47. 被験物質の一連の正確な希釈液全体を表 5 に示す希釈段階で調製し、上記で決定した最高濃度から開始する。

48. アゴニスト作用を誘発しない被験物質は、プレスクリーニングで特定した細胞毒性を示さない最高濃度から開始して包括的ランで試験する。

アンタゴニスト作用評価のための濃度選択

49. 許容基準（表 4）を満たす分析結果のみを有効とみなし、被験物質に対する応答の評価に用いる。一連の分析において 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートを再分析する。参照標準の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、一連の試験全体（6 プレート）を再分析しなければならない。

50. 以下の場合、被験物質の初期濃度範囲を調整し、プレスクリーニングランを再度実施する。

- 細胞毒性が認められる場合。プレスクリーニング手順は、被験物質の非細胞毒性濃度を下げて再度実施する必要がある。
 - 被験物質のプレスクリーニングで、被験濃度により最大阻害が生じるために、完全な用量応答曲線がみられない場合。被験物質の濃度を下げてプレスクリーニングを再度実施する必要がある。
51. 有効な用量依存性応答が認められた場合、最大阻害が認められ、かつ細胞毒性を示さない（最低）濃度を選択すること。包括的ランで試験する被験物質の最高濃度は、この選択した濃度の3倍でなければならない。
52. 被験物質の一連の正確な希釈液全体を表 6 に示す希釈段階で調製し、上記で決定した最高濃度から開始する。
53. アンタゴニスト作用を誘発しない被験物質は、プレスクリーニングで試験した細胞毒性を示さない最高濃度から開始して包括的ランで試験する。

包括的ラン

54. 正確な濃度範囲を選択した後、表 5（アゴニスト作用）および表 6（アンタゴニスト作用）に示すように、一連の希釈液を用いて包括的に被験物質を試験する。すべての濃度について、図 1（アゴニスト作用）または図 2（アンタゴニスト作用）に示すプレート配置に従って、3 連のウェルで試験すること。
55. 許容基準（表 3 および表 4）を満たす分析結果のみを有効とみなし、被験物質に対する応答の評価に用いる。一連の分析において 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートを再分析する。参照標準の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、一連の試験全体（6 プレート）を再分析しなければならない。

表5 アゴニスト試験に使用する参照標準、対照および被験物質の濃度および希釈度

参照 17β-エストラジオールの濃度(M)		TCX-プレスクリーニングランの希釈度		TCx-包括的ランの希釈度		対照の濃度(M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	3.0*10 ⁻⁰⁶
C1	1.0*10 ⁻¹³	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	1.0*10 ⁻⁰⁸
C2	3.0*10 ⁻¹³	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1.0*10 ⁻¹²	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3.0*10 ⁻¹²	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x		
C5	6.0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1.0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3.0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1.0*10 ⁻¹⁰						

TCx - 被験物質 x

PC - 陽性対照 (17α-メチルテストステロン)

NC - 陰性対照 (コルチコステロン)

C0 - 参照標準溶剤対照

SC - 被験物質溶剤対照

表6 アンタゴニスト試験に使用する参照標準、対照および被験物質の濃度および希釈度

参照タモキシフェンの濃度(M)		TCX-プレスクリーニングランの希釈度		TCx-包括的ランの希釈度		対照の濃度(M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	1.0*10 ⁻⁰⁹
C1	3.0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	1.0*10 ⁻⁰⁵
C2	1.0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3.0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1.0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x	添加アゴニストの濃度(M)	
C5	3.0*10 ⁻⁰⁷	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1.0*10 ⁻⁰⁶	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3.0*10 ⁻⁰⁶	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1.0*10 ⁻⁰⁵					17β-エストラジオール	3.0*10 ⁻¹²

TCx - 被験物質 x

PC - 陽性対照 (4-ヒドロキシタモキシフェン)

NC - 陰性対照 (レスベラトロール)

C0 - 参照標準溶剤対照

SC - 被験物質溶剤対照

VC - 溶媒対照 (アゴニスト参照標準 17β-エストラジオールの固定濃度 (3.0 × 10⁻¹² M) を含まない)

データの収集およびデータ解析

56. プレスクリーニングランおよび包括的ランの後、アゴニスト試験のために被験物質の EC₁₀、EC₅₀、PC₁₀、PC₅₀ および最大誘導 (TC_{xmax}) を求める。アンタゴニスト試験では、IC₂₀、IC₅₀、PC₈₀、PC₅₀ および最小誘導 (TC_{xmin}) を算出する。図 3 (アゴニスト作用) および図 4 (アンタゴニスト作用) に、これらのパラメータを図示する。必要なパラメータは、各被験物質の相対誘導率 (参照標準の最大誘導能 (= 100%) に対する) に基づいて算出する。非線形回帰 (可変勾配、4つのパラメータ) を用いて、以下の式に従ってデータを評価する。

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogEC_{50} - x) * \text{ヒル勾配}))}}$$

X = 用量または濃度の対数
Y = 応答 (相対誘導能 (%))

Top = 最大誘導能 (%)
Bottom = 最小誘導能 (%)

LogEC₅₀ = 最大応答の 50%が観測される
濃度の対数
ヒル勾配 = ヒル勾配の勾配係数

57. 相対発光量 (RLU) で表される照度計の生データは、プレスクリーニングランおよび包括的ラン用に作成されたデータ解析用スプレッドシートに転送する。生データは、表 3A および表 3B (アゴニスト作用)、または表 4A および表 4B (アンタゴニスト作用) に示す通り、許容基準を満たしていなければならない。生データが許容基準を満たしている場合、必要なパラメータを決定するために以下の計算ステップを実施する。

アゴニスト作用

- 参照標準の各分析生データから、参照標準溶剤対照の平均 RLU を引く。
- 被験物質の各分析生データから、被験物質溶剤対照の平均 RLU を引く。
- 参照標準の各濃度の相対誘導能を算出する。参照標準の最高濃度の誘導能は 100% に設定する。
- 参照標準の最高濃度に対する各濃度の被験物質の相対誘導能を 100% として算出する。
- 非線形回帰 (可変勾配、4 パラメータ) に従って分析結果を評価する。
- 参照標準の EC_{50} および EC_{10} を求める。
- 被験物質の EC_{50} および EC_{10} を求める。
- 被験物質の最大相対誘導能 (TC_{max}) を求める。
- 被験物質の PC_{10} および PC_{50} を求める。

被験物質の場合、細胞毒性や溶解性の問題などにより、必ずしも完全な用量応答曲線が得られるとは限らない。したがって、 EC_{50} 、 EC_{10} および PC_{50} を求めることはできない。このような場合、 PC_{10} および TC_{max} のみを求めることができる。

アンタゴニスト作用

- 参照標準の各分析生データから、参照標準の最高濃度の平均 RLU を引く。
- 被験物質の各分析生データから、参照標準の最高濃度の平均 RLU を引く。
- 参照標準の各濃度の相対誘導能を算出する。参照標準の最低濃度の誘導能は 100% に設定する。
- 参照標準の最低濃度に対する各濃度の被験物質の相対誘導能を 100% として算出する。
- 非線形回帰 (可変勾配、4 パラメータ) に従って分析結果を評価する。
- 参照標準の IC_{50} および IC_{20} を求める。
- 被験物質の IC_{50} および IC_{20} を求める。
- 被験物質の最小相対誘導能 (TC_{min}) を求める。
- 被験物質の PC_{80} および PC_{50} を求める。

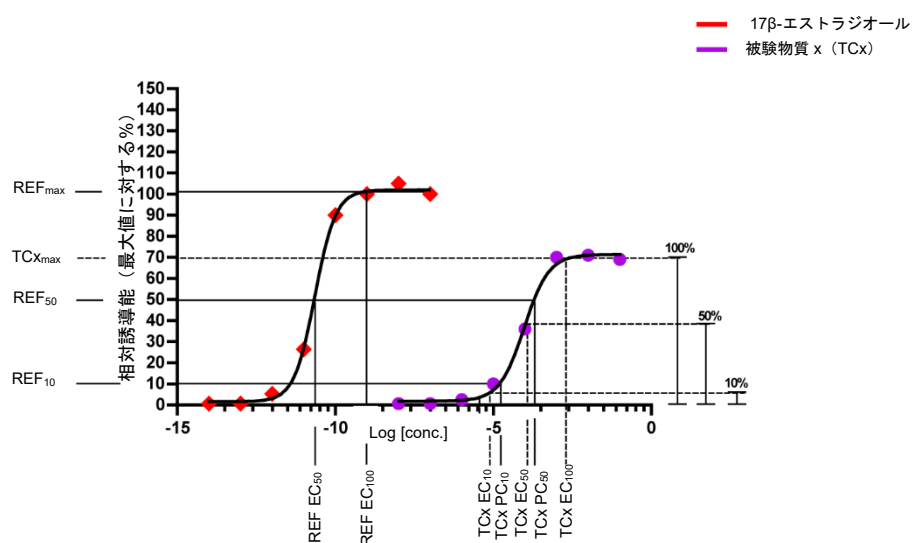


図 3 アゴニストアッセイで測定したパラメータの概要

- EC₁₀ = 最大応答の 10% が認められる物質の濃度。
 EC₅₀ = 最大応答の 50% が認められる物質の濃度。
 PC₁₀ = 応答が参照標準の EC₁₀ と等しい被験物質の濃度。
 PC₅₀ = 応答が参照標準の EC₅₀ と等しい被験物質の濃度。
 TCx_{max} = 被験物質の最大相対誘導能。

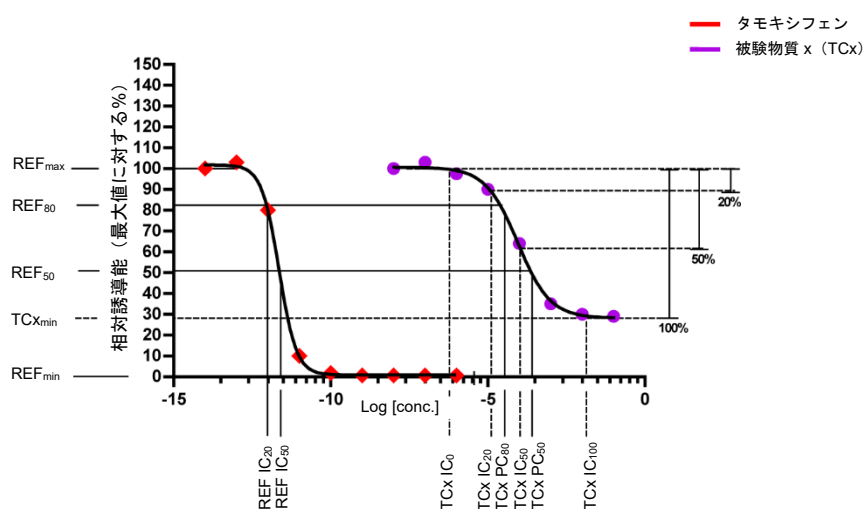


図 4 アンタゴニストアッセイで測定されたパラメータの概要。

- IC₂₀ = 最大応答の 80% が認められる物質の濃度 (20% 阻害)。
 IC₅₀ = 最大応答の 50% が認められる物質の濃度 (50% 阻害)。
 PC₈₀ = 応答が参照標準の IC₂₀ と等しい被験物質の濃度。
 PC₅₀ = 応答が参照標準の IC₅₀ と等しい被験物質の濃度。
 TCx_{min} = 被験物質の最小相対誘導能。

被験物質の場合、細胞毒性や溶解性の問題などにより、必ずしも完全な用量応答曲線が得られるとは限らない。したがって、 IC_{50} 、 IC_{20} および PC_{50} を求めることはできない。このような場合、 PC_{20} および TC_{min} のみを求めることができる。

58. 結果は、2 回（または 3 回）の独立したランに基づいて算出する必要がある。2 回のランの結果が近似しており再現性が認められる場合には、3 回目のランを行う必要はない。許容できる結果とは、次の条件を満たすものをいう。

- 許容基準を満たす（許容基準の段落 14～22 を参照）。
- 再現性を有する。

データ解釈の基準

59. データの解釈および被験物質を陽性または陰性とみなすかどうかの判断には、以下の基準を使用する。

アゴニスト作用

以下の場合、包括的ランごとに被験物質を**陽性**とみなす。

- 1 TC_{max} が参照標準の最大応答の 10% 以上 (REF_{10}) 。
- 2 被験物質の少なくとも 2 つの連続した濃度が REF_{10} 以上。

以下の場合、包括的ランごとに被験物質を**陰性**とみなす。

- 1 TC_{max} が参照標準の最大応答の 10% を超えない (REF_{10}) 。
- 2 REF_{10} 以上の被験物質の濃度が 2 つ以下。

アンタゴニスト作用

以下の場合、包括的ランごとに被験物質を**陽性**とみなす。

- 1 TC_{min} が参照標準の最大応答の 80% 以下 ($REF_{80} = 20\%$ 阻害) 。
- 2 被験物質の少なくとも 2 つの連続した濃度が REF_{80} 以下。

以下の場合、包括的ランごとに被験物質を**陰性**とみなす。

- 1 TC_{min} が参照標準の最大応答の 80% を超える ($REF_{80} = 20\%$ 阻害) 。
- 2 REF_{80} 以下の被験物質の濃度が 2 つ以下。

60. 被験物質の陽性応答の力価を特徴付けるため、作用の大きさ（アゴニスト作用： TC_{max} 、アンタゴニスト作用： TC_{min} ）およびその作用が生じる濃度（アゴニスト作用： EC_{10} 、 EC_{50} 、 PC_{10} 、 PC_{50} 、アンタゴニスト作用： IC_{20} 、 IC_{50} 、 PC_{80} 、 PC_{50} ）を報告する。

61.

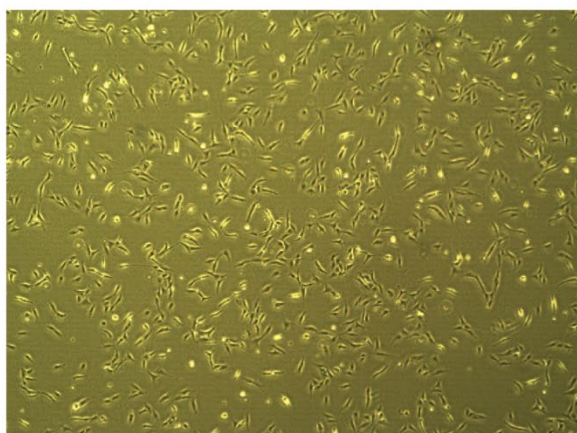
試験報告書

62. 「ER TA 試験法の構成要素」（本試験法ガイドライン 8～14 ページ）の段落 20 を参照。

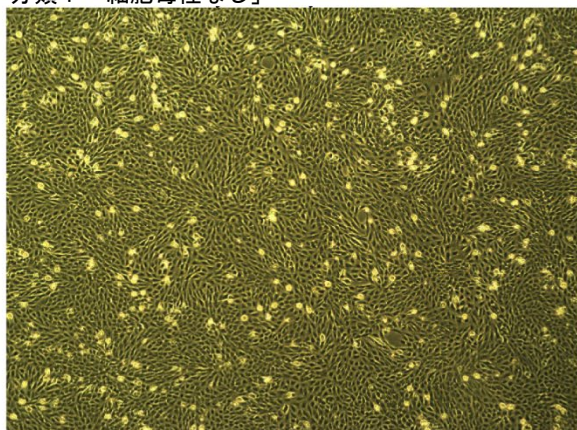
参考文献 (4)

1. OECD (2016), Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
2. Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
3. Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
4. Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-57.
5. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
6. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
7. Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
8. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
9. 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), 769-771.
10. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
11. Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

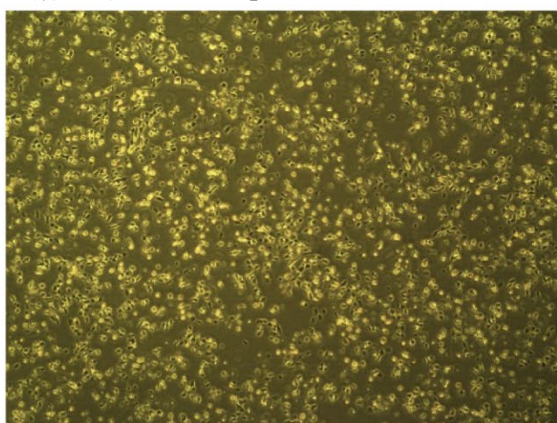
補遺 1：細胞生存率の目視検査



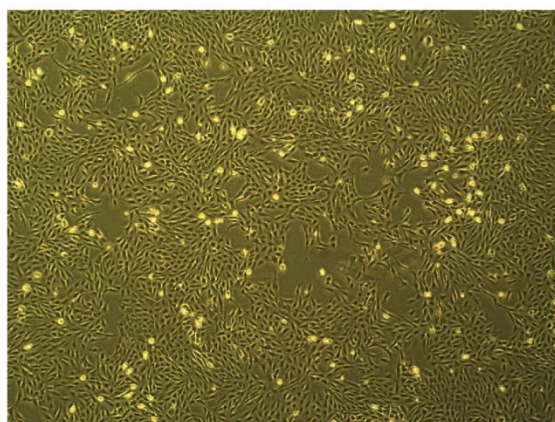
細胞密集度 5%未満。細胞は播種されたばかりである。細胞生存率 100%。
分類：「細胞毒性なし」



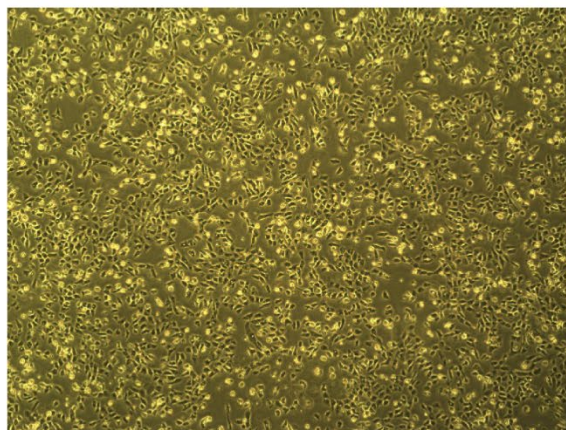
細胞密集度 95%超。細胞が密集して過剰に増殖し始める。細胞生存率 95%超。
分類：「細胞毒性なし」



細胞生存率 5%未満。細胞が完全に剥離し、細胞同士の接触が断たれる。細胞は丸みを帯びている。
分類：「細胞毒性あり」



細胞密集度 85%超。この段階では、細胞が被験物質に曝露される。細胞生存率 95%超。
分類：「細胞毒性なし」



細胞生存率 25%未満。細胞が剥離し、細胞同士の接触が減少する。細胞は丸みを帯びている。
分類：「細胞毒性あり」