



第4項  
健康への影響

## 試験ガイドライン No. 493

エストロゲン受容体 (ER) 結合  
親和性化学物質の検出のための、  
ヒト組み換えエストロゲン受容体  
(hrER) *in vitro* 試験法に関する  
性能に基づく試験ガイドライン

2024年6月25日

経済協力開発機構 (OECD) の化学  
物質の試験に関するガイドライン



## 経済協力開発機構（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（ER）結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組み換えエストロゲン受容体（hrER）*in vitro* 試験法に関する性能に基づく試験ガイドライン

#### 概要

##### 性能に基づく試験ガイドライン

1. この性能基準準拠試験ガイドライン（PBTG）では、エストロゲン受容体結合親和性を有する物質を検出するため、ヒト組み換え *in vitro* 試験法（hrER 結合試験）の手順について説明する。この hrER 結合試験は、エストロゲン受容体（すなわち ER $\alpha$ ）結合物質特定のための、機序および機能的にみた 2 つの類似試験法からなり、「危険有害性評価のための新規または改正試験法のバリデーションおよび国際的な受け入れに関する OECD ガイダンス文書（GD）」（1）に記載されているバリデーションの原則に従い、類似した新しい試験法や修正された試験法の開発を促進するものである。この PBTG の基礎となる、十分に検証された参考試験法（補遺 2 および補遺 3）を以下に示す：

- ・ 完全長ヒト組み換え ER $\alpha$  を用いた Freyberger-Wilson (FW) の *in vitro* エストロゲン受容体 (ER) 結合試験（2）、および
- ・ ヒト組み換えリガンド結合ドメインタンパク質を用いた化学物質評価研究機構（CERI）の *in vitro* エストロゲン受容体結合試験（2）。

同一の危険有害性エンドポイントに関し、類似試験法の開発およびバリデーションを促進し、新規類似試験法を最新の PBTG に追加できるよう本 PBTG を適宜改訂可能にするには、性能基準（PS）（3）が有用である。ただし、類似試験法の追加は、性能基準を満たすことを検討し合意した後にのみ行われる。本試験ガイドライン記載の試験法を用いると、エストロゲン受容体結合試験の結果に関する各国の要件への対処に一律に使用できると共に、「データの相互受け入れ」による有益性を得られる。

#### PBTG 記載の試験法の背景と原理

2. OECD（経済協力開発機構）では、1998年に重点活動項目の 1 つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のための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（CF）は、2012年に改訂された。初版および改訂版の CF は、「内分泌かく乱化学物質の評価に関する標準化された試験ガイドラインのガイダンス文書（4）」の補遺として記載されている。CF は 5 つのレベルからなり、各レベルが様々なレベルの生物学的複雑性に対応している。本 PBTG 記載の ER 結合試験はレベル 2 に当たり、このレベルには「選択された内分泌機構／経路に関するデータを提供する *in vitro* 試験」が該当する。本 PBTG では、ヒトエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) に対するリガンドを特定できるよう設計された *in vitro* 受容体結合試験法について説明する。

3. 生物学的機能に対する *in vitro* ER 結合試験の妥当性は、明確に立証されている。ER 結合試験は、エストロゲンホルモン経路をかく乱する可能性のある化学物質を特定できるよう設計されており、ER の組織分布の特性を明らかにするため、また、ER アゴニスト／アンタゴニストを特定するため、過去 20 年間に

わたり広く使用されてきた。これらの試験に反映されるのは、エストロゲンシグナル伝達経路の初期段階であり、かつすべての脊椎動物の生殖機能に不可欠である、リガンドと受容体との相互作用である。

4. 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、非ゲノム作用を誘導することがあり、このことが細胞増殖、正常な胎児発生、および生殖機能に必要なプロセスなど、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（5）（6）（7）。正常なエストロゲン系のかく乱は、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の誘因となる可能性がある。不適切な ER シグナル伝達により、ホルモン依存性がん、生殖障害、胎児の成長および発達における変化のリスク上昇など、複数の影響をもたらす可能性がある（8）。

5. *In vitro* 結合試験は、遺伝子の転写を制御する特定の受容体リガンド結合部位と物質との直接的な相互作用に基づいている。ヒト組み換えエストロゲン受容体  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) 結合試験の重要な構成要素として、被験化学物質（すなわち競合物質）の濃度上昇条件下で、放射標識リガンド ( $[^3\text{H}]$ -17 $\beta$ -エストラジオール) の ER への結合能を測定する。ER に高親和性の被験化学物質は、ER に低親和性の被験化学物質に比べ、より低濃度で放射標識リガンドと競合する。本試験は、2 つの主要な構成要素からなる。1 つは、受容体-リガンド相互作用のパラメータの特性を明らかにし ER の特異性を立証する飽和結合実験と、続くもう 1 つは、被験化学物質と放射標識リガンドとの ER 結合への競合特性を明らかにする競合結合実験である。

6. CERI および FW の結合試験について、バリデーション試験では、試験本来の目的に対する妥当性および信頼性が立証されている（2）。

7. 本試験ガイドラインに使用した用語の定義および略語の説明を 補遺 1 に提示する。

#### 受容体結合試験に関連する適用範囲および限界

8. これらの試験法はスクリーニングおよび優先順位付けを目的として提案されているが、証拠の重み付けアプローチに使用可能な分子レベルの初期事象 (MIE) に関する情報も得られる。これらの試験法は、*in vitro* 系における ER $\alpha$  リガンド結合ドメインとの化学結合に焦点を当てている。したがって、結果を *in vivo* における健全な内分泌系の複雑なシグナル伝達および制御に直接外挿するべきではない。

9. 天然リガンドである 17 $\beta$ -エストラジオールの結合は、標的遺伝子の転写を活性化し最終的に生理学的变化をもたらす、一連の分子レベルでの事象の第 1 段階に当たる（9）。したがって、ER $\alpha$  リガンド結合ドメインとの結合は、ER を介した内分泌かく乱 (ED) の主要なメカニズムの 1 つであると考えられるが、ED が起こりうるメカニズムは、その他にも (i) リガンド結合ポケット以外の ER $\alpha$  部位との相互作用、(ii) エストロゲンシグナル伝達に関連する他の受容体である ER $\beta$  および G タンパク質共役エストロゲン受容体、他の受容体および内分泌系内の酵素系との相互作用、(iii) ホルモン合成、(iv) ホルモンの代謝活性化および／または不活性化、(v) 標的組織へのホルモンの分配、(vi) 体外へのホルモンの排出などが挙げられる。本 PBTG の下で、これらの作用機序に対処している試験法はない。

10. 本 PBTG では物質とヒト ER $\alpha$  との結合能に対処し、ER $\alpha$  がアゴニストかアンタゴニストかの識別はしない。また、本試験法では、遺伝子転写や、生理学的变化といったさらなる下流の事象のいずれも取り扱わない。バリデーション中に单一物質のみを使用したことを考慮し、混合物を試験に適用可能とする扱いにもしていない。しかし理論上は、本試験法は多成分物質および混合物の試験に適用可能である。規制上の目的を意図して混合物のデータを得る場合、本試験ガイドラインを用いる前に、その目的に十分な結果が得られるのか否か、また得られる場合にはその理由を検討する。混合物の試験実施に関する規制要件がある場合、こうした考慮は必要ない。

11. 無細胞受容体系には内因性の代謝能がなく、また、代謝酵素系との併用に関するバリデーションは行われなかった。それでも、試験デザインへの代謝活性の組み入れは可能であると考えられるが、それに はさらなるバリデーションへの取り組みが必要であると考えられる。

12. アッセイ緩衝液の pH を変化させうる界面活性物質や化学物質など、特定のタンパク質（すなわち、受容体タンパク質）を変性させうる化学物質では、試験を行わないか、こうした相互作用を起こさない濃度でのみ試験を行うことができる。これに該当しなくとも、本試験法において被験化学物質が試験可能な濃度範囲は、アッセイ緩衝液中での当該被験化学物質の溶解度により制限を受ける。

情報提供のため、本 PBTG 記載の十分に検証された 2 つの試験法で試験を行った 24 物質の試験結果について、表 1 に示す。ER 転写活性化に関する *in vitro* 試験および／または子宮肥大試験など公表された報告に基づくと、これらの物質のうち 17 物質が ER 結合物質、6 物質が ER 非結合物質に分類される（9）（10）（11）（12）（13）（14）（15）。表 1 に要約したデータを参照すると、2 つの試験法では最大  $10^{-4}$  M まですべての物質の分類についてほぼ 100%一致し、各物質は ER 結合物質か非結合物質に正しく分類された。この一群の物質およびバリデーション試験の間に ER 結合試験法で試験を行った追加の物質に関する補足情報を、hrER 結合試験に関する性能基準（3）補遺 2（表 1、2、3）に示す。

**表 1： FW および CERI での hrER 結合試験による ER 結合物質または非結合物質への分類および予測される反応との比較**

	物質名	CAS 番号	予測される反応	FW の試験		CERI の試験		MeSH 化学物質分類	製品分類
				濃度範囲 (M)	分類	濃度範囲 (M)	分類		
1	17 $\beta$ -エストラジオール	50-28-2	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
2	ノルエチノドレル	68-23-5	結合物質	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	結合物質	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
3	ノルエチンドロン	68-22-4	結合物質	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	結合物質	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
4	フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル	84-74-2	非結合物質*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	非結合物質†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	非結合物質†	炭化水素（環式）、エステル	可塑剤、化学中間体
5	DES	56-53-1	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用医薬品
6	17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール	57-63-6	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
7	meso-ヘキセストロール	84-16-2	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用医薬品
8	ゲニステイン	446-72-0	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	炭化水素（複素環式）、フラボノイド	天然物
9	エクオール	531-95-3	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	植物エストロゲン代謝産物	天然物
10	ブチルパラベン（4-ヒドロキシ安息香酸 <i>n</i> -ブチル）	94-26-8	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	パラベン	保存剤
11	ノニルフェノール（混合物）	84852-15-3	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	アルキルフェノール	中間化合物
12	<i>o,p</i> -DDT	789-02-6	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	有機塩素	殺虫剤
13	コルチコステロン	50-22-6	非結合物質*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	非結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	非結合物質	ステロイド	天然物
14	ゼアラレノン	17924-	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	結合物質	炭化水素（複素環式）	天然物

		92-4						素環式) 、 ラクトン	
15	タモキシフェン	10540-29-1	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	炭化水素 (環式)	医薬品、動物用医薬品
16	5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン	521-18-6	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	ステロイド、非フェノール性	天然物
17	ビスフェノールA	80-05-7	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	フェノール	化学中間体
18	4- <i>n</i> -ヘプチルフェノール	1987-50-4	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	不確定 <sup>a</sup>	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	アルキルフェノール	中間体
19	ケポン (クロルデコン)	143-50-0	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	炭化水素 (ハロゲン化物)	農薬
20	ベンズ(a)アントラセン	56-55-3	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	非結合物質 <sup>b</sup>	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	非結合物質 <sup>b</sup>	芳香族炭化水素	中間体
21	エンテロラクトン	78473-71-9	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	結合物質	植物エストロゲン	天然物
22	プロゲステロン	57-83-0	非結合物質*	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	非結合物質	ステロイド	天然物
23	オクチルトリエトキシシラン	2943-75-1	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-3</sup>	非結合物質	シラン	表面改質剤
24	アトラジン	1912-24-9	非結合物質*	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> –1x10 <sup>-4</sup>	非結合物質	複素環式化合物	除草剤

\* 溶解度限界 :  $1 \times 10^{-4}$  M 未満。

\* 非結合物質としてのフタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) の使用および分類は、プレバリデーション試験の間に一部の試験実施施設において、本物質が  $10^{-3}$  M で不溶性 (例: 濁り) を認めたため、最大  $10^{-4}$  M までの試験結果に基づいた。

<sup>a</sup> バリデーション試験の間、フタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) は、最大  $10^{-3}$  Mまでの濃度でコード化された被験化学物質として試験した。本条件下において、一部の試験実施施設では、最大濃度 ( $10^{-3}$  M) での放射標識リガンド結合の低下および/または曖昧な曲線適合が認められた。これらのランでは、CERI の試験を用いた試験実施施設の 3/5 および FW の試験を用いた試験実施施設の 5/6 が、DBP を「不確定」または「結合物質」と分類した (参考文献 (2) セクション IV.B.3a、b および VI.A を参照)。

<sup>a</sup> 分類が予測される分類と一致しなかった。試験実施施設の 3/5 で「不確定」または「非結合物質」と分類された 4-*n*-ヘプチルフェノールは、平均により「不確定」と分類された。より厳密な調査により、この分類は、完全な結合曲線の提示を妨げる化学的溶解度の限界に起因することが明らかにされた。

<sup>b</sup> バリデーション試験の間に、ベンズ(a)アントラセンは、本物質について報告された *in vitro* エストロゲン活性 (16) が主にその代謝活性に依存することを立証した公表文献 (17) (18) に基づき、非結合物質 (すなわち、陰性) に再分類された。酵素による本物質の代謝活性は、今回の施設間バリデーション試験で用いられた無細胞系の hrER 結合試験では予測されないと考えられる。したがって、FW および CERI の試験での実験条件下で本物質を用いた場合、正しい分類は「非結合物質」となる。

## hrER 結合試験法の構成要素

### 試験法の必須構成要素

13. 本 PBTG は、ER 受容体と、本受容体に対し適切な強度のリガンド一本試験法のマーカー／トレーサーとして使用でき、また、被験化学物質の濃度上昇に伴い解離する—to 用いた方法に適用する。結合試験は、1) 飽和結合と 2) 競合結合の 2 つの主要な構成要素からなる。飽和結合試験は受容体標品の特異性および活性の確認に用い、競合結合実験は被験化学物質の hrER 結合能の評価に用いる。

### 対照物質

14. 提案する同時基準エストロゲンおよび同時対照の根拠を記述すること。適切な場合、同時対照

(溶剤 (溶媒) 対照、陽性対照 (ER 結合物質 ; 高親和性、低親和性) 、陰性対照 (非結合物質) ) は試験法が試験条件下で有効であることを示すのに役立ち、実験間比較の根拠となる。同時対照は通常、所定の実験の許容基準の一部である (1)。各ランの間 1 プレートにおいて、基準エストロゲンおよび対照物質 (すなわち、弱結合物質、および非結合物質) の完全な濃度曲線を用いること。その他すべてのプレートには、1) 高濃度 (放射標識リガンドをほぼ完全に解離させる濃度) および中濃度 (IC50 程度) の E2 および弱結合物質それぞれを 3 つずつ、2) 溶剤対照および非特異的結合をそれぞれ 3 つずつ含めること。

### 標準品質管理手順

15. 標準品質管理手順を各試験の記述どおり実施することで、活性化した受容体、正しい化学物質濃度、信頼限界が複数のレプリケートを通じ安定した状態であり、また、予測される ER 結合反応を試験期間中示せるよう確保すること。

### 試験実施施設の習熟度の立証

16. 本 PBTG の下で、未知の化学物質をいずれの試験法により試験する場合も、それに先立ち、各試験実施施設は ER 標品の特異性および活性を確認する飽和試験、ならびに基準エストロゲンおよび対照物質 (弱結合物質および非結合物質) による競合結合試験を実施することで、当該試験法使用の際の習熟度を立証すること。試験実施施設は、異なる日に 3~5 回独立して実施した実験から得られた基準エストロゲンおよび対照物質の結果について、履歴データベースを確立すること。これらの実験は、当該試験実施施設の基準エストロゲンおよび歴史的対照の基盤となり、将来のランでは、試験の許容性について部分的な評価材料として用いられる。

試験系の反応性も、表 2 に示す習熟度確認物質の試験により確認する。習熟度確認物質の一覧は、ER 結合試験の性能基準 (3) 記載の参照物質の一部である。これらの物質は市販品であり、ER 結合活性と通常関連する化学物質分類を代表し、ER 結合 (すなわち、強い結合から弱い結合まで) および非結合物質 (すなわち、陰性物質) について、予測される適切な範囲の強度を示す。各習熟度確認物質の試験濃度は、表 2 に示す範囲を満たすこと。各物質について 3 回以上実験を行い、結果が予測される化学的活性と一致していること。各実験は、独立して (すなわち、受容体、化学物質、試薬の新たな希釀液を用いて) 濃度ごとに 3 つのレプリケートで行うこと。習熟度は、各習熟度確認物質の正しい分類 (陽性／陰性) により立証される。習熟度試験は、各技術者が試験法を学習する場合に実施すること。

表 2 : hrER 競合結合試験用の対照物質および習熟度確認物質の一覧<sup>1</sup>

No.	物質名	CAS RN <sup>2</sup>	予測される 反応 <sup>3,4</sup>	試験濃度範囲 (M)	MeSH 化学物質 分類 <sup>5</sup>	製品分類 <sup>6</sup>
対照 (基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質)						
1	17 $\beta$ -エストラジオール	50-28-2	結合物質	1x10 <sup>-11</sup> – 1x10 <sup>-6</sup>	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
2	ノルエチノドレル (または) ノルエチンドロン	68-23-5 (or) 68-22-4	結合物質	3x10 <sup>-9</sup> – 30x10 <sup>-6</sup>	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
3	オクチルトリエトキシシラン	2943-75-1	非結合物質	1x10 <sup>-10</sup> – 1x10 <sup>-3</sup>	シラン	表面改質剤
習熟度確認物質 <sup>6</sup>						

4	ジエチルスチルベストロール	56-53-1	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用医薬品
5	17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール	57-63-6	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	ステロイド	医薬品、動物用医薬品
6	meso-ヘキセストロール	84-16-2	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用医薬品
7	タモキシフェン	10540-29-1	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	炭化水素（環式）	医薬品、動物用医薬品
8	ゲニステイン	446-72-0	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	複素環式化合物、フラボノイド	天然物
9	ビスフェノールA	80-05-7	結合物質	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	フェノール	化学中間体
10	ゼアラレノン	17924-92-4	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	複素環式化合物、ラクトン	天然物
11	ブチルパラベン	94-26-8	結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	カルボン酸、フェノール	保存剤
12	アトラジン	1912-24-9	非結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	複素環式化合物	除草剤
13	フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル(DBP) <sup>7</sup>	84-74-2	非結合物質 <sup>8</sup>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	炭化水素（環式）、エステル	可塑剤、化学中間体
14	コルチコステロン	50-22-6	非結合物質	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	ステロイド	天然物

<sup>1</sup> 習熟度確認物質が既に市販されていない場合、同一の ER 結合分類、同程度の強度および化学物質分類の物質を使用できる。

<sup>2</sup> 略語 : CAS RN : ケミカルアブストラクトサービス (CAS) 登録番号。

<sup>3</sup> CERI および FW の hrER 結合試験に対するバリデーション試験における ER $\alpha$  結合物質または非結合物質としての分類 (2)。

<sup>4</sup> ER 結合活性は、ER 結合および転写活性化 (TA) 試験法に関する米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会 (ICCVAM) 背景レビュー文書 (BRD) (9)、ならびに、公表および検討された参考試験から得られた経験的データその他の情報 (10) (11) (12) (13) (14) (15) に基づいた。

<sup>5</sup> 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、各物質を 1 つまたは複数の化学物質分類に分類した (<http://www.nlm.nih.gov/mesh> より入手可能)。

<sup>6</sup> 米国国立医学図書館の有害物質データベースを用いて、各物質を 1 つまたは複数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)。

<sup>7</sup> DBP は、代替の対照非結合物質として使用でき、最大濃度  $10^{-4}$  M で試験を行える。

<sup>8</sup> 本物質の溶解度限界は  $10^{-4}$  M である。非結合物質としてのフタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) の使用および分類は、プレバリデーション試験の間に一部の試験実施施設において、本物質が  $10^{-3}$  M で不溶性 (例: 濁り) を認めたため、最大  $10^{-4}$  M までの試験結果に基づいた。

### 被験化学物質の溶解度試験および濃度範囲設定

17. 予備的試験を実施し、各被験化学物質の溶解度限界を判定すると共に、試験実施時に用いる適切な濃度範囲を特定すること。各被験化学物質の溶解度は最初に溶剤で決定し、さらに試験条件下で確認する。本試験で試験を行う最終濃度は、1 mM を超えないこと。範囲設定試験は、溶剤対照と共に最大許容濃度

(例：溶解度限界に基づき 1 mM 以下) から開始する 8 種類の対数段階希釀、濁りまたは沈殿の存在の確認からなる。濃度-反応曲線の特性をより明らかにするため、2 回目および 3 回目の実験では、必要に応じて濃度を調整すること。

### テストランの許容基準

18. テストランの合否は、各実験に用いた基準エストロゲンおよび対照について得られた結果の評価に基づく。まず、プレート 1 について、各実験から得られた基準対照の完全な濃度曲線が、CERI および FW の各試験プロトコール（補遺 2、補遺 3）に基づいた曲線適合パラメータ（例：IC<sub>50</sub>、ヒル勾配など）を伴う測定成績、および本試験を実施する試験実施施設から得られた歴史的対照データと一致していること。すべての対照（基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質）が、実験ごとに正しく分類されること。次に、その後のプレートすべての対照では、プレート 1 との一致について評価する必要がある。競合結合曲線の頂点を明確に定義するため、十分な濃度範囲の被験化学物質を用いること。被験化学物質の各濃度でのレプリケートおよび独立した 3 回のラン間におけるばらつきは、合理的で科学的に正当化できること。本試験法での一貫した実行能を、基準エストロゲンおよび対照の履歴データベースの作成および維持により立証すること。複数の実験から得られた基準エストロゲンおよび対照である弱結合物質の曲線適合パラメータの平均値については、その標準偏差 (SD) または変動係数 (CV) を、試験実施施設内の再現性の尺度として使用できる。各ランのプレート対照および各被験化学物質の結果を検討する場合、専門家の判断を適用すること。

さらに、許容基準に関する以下の原則を満たすこと：

- データが ER 結合の定量的評価に十分であること。
- 試験濃度は、被験化学物質の溶解度の範囲内であること。

### データの分析

19. 飽和結合および競合結合のデータに關し定義されるデータの分析手順は、受容体-リガンド相互作用を特徴づける主要な原則に従うこと。通常、飽和結合のデータは、全結合および非特異的結合からなる非線形回帰モデルを用いて解析される。B<sub>max</sub> および K<sub>d</sub> を求める場合、リガンド枯渇の補正（例：Swillens, 1995 (19)）が必要となりうる。競合結合試験のデータは通常に従って、値を変換される（例：特異的結合率 (%) および被験化学物質の濃度 (log M) など）。適切な非線形曲線フィットソフトウェアを用いて、4 つのパラメータをヒルの式にあてはめ、各被験化学物質の log (IC<sub>50</sub>) 推定値を求める。初回分析後、結合データと作成した競合結合曲線との適合の程度について、曲線フィットパラメータおよび視覚的に検討する。場合によっては、最良の曲線適合を得るために、追加の解析を必要としうる（例：曲線の頂点および／または底点の制約、10% ルールの適用、補遺 4 および参考文献 2 (セクション III.A.2) を参照）。

20. 許容基準（段落 20）を満たせば、本試験系の適切な処理を意味するが、どの試験でも正確なデータが得られるということを保証するものではない。初回試験の正しい結果をレプリケートにより示すことが、正確なデータ作成の最も優れた指標である。

### 一般的なデータ解釈の基準

21. 現時点では、ER 結合データの解釈について広く合意された方法はない。しかし、hrER を介した活性の定性的評価（例：結合物質／非結合物質）および／または定量的評価（例：log IC<sub>50</sub>、相対結合親和性 (RBA) など）は、いずれも経験的データおよび妥当な科学的判断に基づいていること。

### 試験報告書

22. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

試験法 :

- 使用した試験法

対照／参照／被験化学物質

- 入手可能である場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 既知の場合、被験化学物質それ自体の安定性
- 既知の場合、溶剤中での被験化学物質の溶解度および安定性
- 必要に応じて、被験化学物質が添加された培地の pH、浸透圧および沈殿物の測定値。

単一成分物質:

- 外観、水溶性および、さらに関連する物理化学的特性
- IUPAC 名または CAS 名称、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、純度、必要に応じ、また実質的に実行可能な場合には不純物の化学的同定などの化学物質識別情報

多成分物質、UVBC、混合物

- 構成成分の化学物質識別情報（上記参照）、定量的組成および関連する物理化学的特性等による可能な限りの特徴づけ。

溶剤／溶媒 :

- 特性（性質、供給元、ロット番号）
- 溶剤／溶媒選択の根拠
- 既知の場合、溶剤／溶媒中での被験化学物質の溶解度および安定性

受容体 :

- 受容体の供給源（供給者、カタログ番号、ロット番号、受容体種、供給者より提供された活性受容体濃度、供給者の証明書）
- 受容体の特性（飽和結合試験の結果を含む）: Kd、Bmax
- 受容体の保存
- 放射標識リガンド
- 供給者、カタログ番号、ロット番号、特異的活性

試験条件 :

- 試験条件下での溶解度の限界
- 結合緩衝液の組成
- 受容体濃度
- トレーサー（すなわち、放射標識リガンド）の濃度
- 被験化学物質の濃度
- 最終試験での溶媒の割合 (%)
- インキュベーションの温度および時間
- 結合／非結合分離の方法
- 陽性対照、陰性対照、参照物質
- 試験結果を陽性、陰性、または不確定と判定する基準

許容性の確認 :

- 同時陽性対照／参照物質に関する IC<sub>50</sub> およびヒル勾配の実測値

結果 :

- 生データおよび結合／非結合データ

- 必要に応じて、変性の確認チェック
- 存在する場合、最低有効濃度（LEC）
- 必要に応じて、RBA および／または IC<sub>50</sub> 値
- 可能な場合、濃度反応関係
- もしあれば、統計解析結果と、併せて誤差および信頼度の尺度（例：SEM、SD、CV、または 95% CI）およびその値の取得方法の記述

**結果の考察：**

- 10%ルールの適用

**結論**

**LITERATURE**

- 1) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 2) OECD (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 3) OECD (2015), Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) OECD (2012), Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 5) Cavailles V. (2002), Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: p.20-6.
- 6) 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.
- 7) Younes M. and Honma N. (2011), Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.
- 8) Diamanti-Kandarakis et al. (2009), Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- 9) ICCVAM (2002), Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- 10) ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 11) ICCVAM (2006), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 12) Akahori Y. et al. (2008), Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- 13) OECD. (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 67.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) Takeyoshi, M. (2006), Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation

and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

- 15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004), Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- 16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Necá, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008), Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- 17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004), Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- 18) Santodonato, J. (1997), Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- 19) Swillens S (1995), Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

**補遺 1：定義と略語**

**10%ルール**：[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの特異的結合率（%）のレプリケートの平均値が、低濃度で認められた平均値より10%以上高い場合、分析データポイントから除外する選択肢（補遺4を参照）。

**許容基準**：実験対照および参考基準の性能に関する最低基準。1回の実験を有効とみなすには、すべての許容基準を満たすこと。

**正確度（一致度）**：試験法の結果と許容される参考値との間の一致の近さ。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は「一致度」と同義で使用されることが多く、試験法から得られた正しい結果の割合を意味する（1）。

**CF**：内分泌かく乱物質の試験および評価に関するOECDの概念的枠組み。

**CV**：変動係数

**E2**：17 $\beta$ -エストラジオール

**ED**：内分泌かく乱

**hER $\alpha$** ：ヒトエストロゲン受容体アルファ

**ER**：エストロゲン受容体

**エストロゲン活性**：エストロゲン受容体結合能に関し、化学物質が17 $\beta$ -エストラジオールを模倣する能力。hER $\alpha$ への結合は、本PBTGにより検出できる。

**IC<sub>50</sub>**：阻害被験化学物質の50%効果濃度。

**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**：適格性が確認された異なる試験実施施設が、同一のプロトコールを用いて同一物質を試験した場合に、定性的および定量的に同程度の結果を生じる程度に関する尺度。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で判定され、試験実施施設間で試験法の技術移転できる程度を示す。なお、本用語は"inter-laboratory reproducibility"の他、"between-laboratory reproducibility"とも言われる（1）。

**施設内再現性**：同一試験施設内で適格性が確認された者が、特定のプロトコールを用いて異なる時期にレプリケートの結果に成功する程度について判定すること。なお、本用語は"intra-laboratory reproducibility"の他、"within-laboratory reproducibility"とも言われる（1）。

**LEC**：最低有効濃度の略で、反応を引き起こす被験化学物質の最低濃度（すなわち、誘導倍率が同時溶媒対照と統計学的有意差を示す時点での被験化学物質の最低濃度）である。

**模倣的試験**：検証され許容された参考試験法と構造的および機能的に類似した試験法の口語表現。類似試験法と同義で使用される。

**PBTG**：性能に基づく試験ガイドライン

**性能基準**：機序および機能的に類似する提案された試験法の同等性評価の基盤となる、検証済み試験法に準拠した基準。その内容には、（1）試験法に不可欠な構成要素、（2）検証済み試験法に対し許容可能な性能であることを立証するために用いられた化学物質について、その中から選択された参考化学物質の最小限の一覧、および、（3）参考化学物質の最小限の一覧を用いた評価の際、提案された本試験法が立証すべき正確度および信頼性が、検証済み試験法で得られた結果に基づいて同程度のレベルであること、が挙げられる（1）。

**習熟度確認物質**：標準化された試験法による技術的能力を立証するため、試験実施施設により使用される性能基準に記載されている参考物質の一部。習熟度確認物質の選択基準には、通常、その物質が反応の範囲を代表していること、市販品であること、および入手可能な高品質の参考データを有することが挙げられる。

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

**基準エストロゲン**：17 $\beta$ -エストラジオール (E2、CAS 番号 50-28-2)。

**参照試験法**：本 PBTG の基盤となる試験法。

**RBA**：相対結合親和性。ある物質の RBA は、17 $\beta$ -エストラジオールの  $\log (IC_{50})$ に対する当該物質の  $\log (IC_{50})$ の割合 (%) として算出される。

**妥当性**：試験とその対象となる作用との関係、および、当該試験が特定の目的にとって有意義かつ有用であるか否かに関する説明。その試験が、対象となる生物学的作用を正しく測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の正確度（一致度）を考慮に入れる (1)。

**信頼性**：ある試験法を同一プロトコールを用いて実施した場合、施設内および施設間で長期的に再現性を示せる程度を表す尺度。施設内および施設間の再現性を算出することにより評価する。

**SD**：標準偏差。

**検証済み試験法**：バリデーション試験が完了し、特定の目的に対する妥当性（正確度を含む）および信頼性が判定されている試験法。検証済み試験法は、提案された目的に対しては、正確度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**：定義済みの目的に関し、特定のアプローチ、方法、プロセス、または評価の信頼性および妥当性を確立するプロセス (1)。

補遺 2 : 完全長組み換え ER $\alpha$  を用いた Freyberger-Wilson の *in vitro* エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) 飽和／競合結合試験

最初に考慮すべき事項および限界 (1 ページの「概要」も参照)

1. 本 *in vitro* エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) 飽和／競合結合試験法では、バキュロウイルス感染昆虫細胞から作製および単離された完全長ヒト受容体である ER $\alpha$  (hrER $\alpha$ ) を用いる。Freyberger および Wilson により作成されたプロトコールについて国際多施設共同バリデーション試験 (2) が行われ、本試験法の意図する目的に対する妥当性および信頼性が立証された。
2. 本試験法は、完全長 hrER $\alpha$  に結合可能な物質を特定するためのスクリーニング手順である。本試験法は、hrER $\alpha$  への結合に関し、被験化学物質と  $17\beta$ -エストラジオールとの競合能を測定するのに用いられる。定量試験の結果には、IC<sub>50</sub> (hrER $\alpha$  から [<sup>3</sup>H]- $17\beta$ -エストラジオールの 50% を解離させるのに必要な被験化学物質の濃度)、および、hrER $\alpha$  に関する被験化学物質の  $17\beta$ -エストラジオールに対する相対結合親和性が含まれる。化学物質のスクリーニングを目的とした許容可能な定性試験の結果には、結合曲線に関し記述された基準に準拠した被験化学物質の hrER $\alpha$  結合物質、非結合物質、または不確定いずれかへの分類が含まれる。
3. 本試験法では、試験実施施設での放射性物質の認可を要する放射標識リガンドを使用する。放射性同位元素および危険有害化学物質に関するすべての手順は、国の法律に定められた規制および手順に従うこと。
4. 規制上の目的で本試験法を使用する際には、事前に「概要」および「hrER 結合試験法の構成要素」(1~14 ページ) を閲読すること。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 に記載する。

試験法の原理 (1 ページの「概要」も参照)

5. hrER $\alpha$  結合試験は、被験化学物質 (すなわち競合物質) の濃度を上昇させながら、放射標識リガンド ([<sup>3</sup>H]- $17\beta$ -エストラジオール) と ER との結合能を測定する。ER に高親和性の被験化学物質は、ER に低親和性の被験化学物質に比べ、より低濃度で放射標識リガンドと競合する。
6. 本試験法は、2 つの主要な構成要素からなる。1 つは、受容体-リガンド相互作用のパラメータの特性を明らかにする飽和結合実験と、続くもう 1 つは、ER への結合について被験化学物質と放射標識リガンドとの競合特性を明らかにする競合結合実験である。
7. 飽和結合実験の目的は、競合結合実験での準備として、結合親和性および結合数について、特定のバッチの受容体を特徴づけることである。飽和結合実験では、平衡状態下で、一定濃度のエストロゲン受容体の天然リガンドに対する親和性 (解離定数 K<sub>d</sub> で表される) および活性受容体部位の濃度 (B<sub>max</sub>) を測定する。
8. 競合結合実験は、ER への結合について [<sup>3</sup>H]- $17\beta$ -エストラジオールと競合する物質の親和性を測定する。親和性は、平衡状態で、[<sup>3</sup>H]- $17\beta$ -エストラジオールの特異的結合を 50% 阻害する被験化学物質の濃度 (「50% 阻害濃度」または IC<sub>50</sub> と称する) により定量化する。親和性は、相対結合親和性 (RBA、同一のランで別々に測定されるエストラジオールの IC<sub>50</sub> に対する相対値) を用いて評価することもできる。競合結合実験では、一定濃度において、広範な濃度 (8 枝の範囲) の被験化学物質存在下で、[<sup>3</sup>H]- $17\beta$ -エストラジオールの結合について測定する。可能である場合、次に、一部位での競合結合物質による放射標識リガンドの

解離を表すヒルの式 (Hill, 1910) 中にデータを適用する。平衡状態での放射標識エストラジオールの解離の程度を用いて、被験化学物質を結合物質、非結合物質、または不確定の反応を生成として特徴づける。

## 手順

### hrER $\alpha$ タンパク質が許容可能な性能であることの照明

9. 飽和／競合結合試験を定期的に実施する前に、hrER $\alpha$  の新たなバッチごとに、使用する試験実施施設において正しく機能していることを示すこと。性能の立証には、2段階のプロセスを用いること。そのプロセスは次のとおりである。

- $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ 飽和結合試験を実施し、hrER $\alpha$  の特異性および飽和状態を立証する。これらのデータの非線形回帰分析（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）およびそれに続く Scatchard プロットにより、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の hrER $\alpha$  結合親和性 ( $K_d$ ) および hrER $\alpha$  の各バッチの受容体数 ( $B_{\max}$ ) を記録すること。
- 対照物質（基準エストロゲン（ $17\beta$ -エストラジオール）、弱結合物質（例：ノルエチノドレルまたはノルエチンドロン）、非結合物質（オクチルトリエトキシシラン、OTES））を用いて競合結合試験を実施する。各試験実施施設は履歴データベースを確立し、基準エストロゲンおよび弱結合物質の実験間および異なる hrER $\alpha$  バッチ間での  $IC_{50}$  その他関連する値の一貫性を記録すること。対照物質に関する競合結合曲線のパラメータは、本試験法のバリデーション試験参加施設で得られたデータを用いて作成した 95% 信頼区間の限界内（表 1 を参照）にあること（2）。

表 1. 基準エストロゲンおよび弱結合物質用に作成された性能基準：FW の hrER 結合試験

物質	パラメータ	平均値 <sup>a</sup>	標準偏差 (n)	95%信頼区間 <sup>b</sup>	
				下限	上限
17 $\beta$ -エストラジオール	頂点 (%)	100.44	10.84 (67)	97.8	103.1
	底点 (%)	0.29	1.25 (67)	-0.01	0.60
	ヒル勾配	-1.06	0.20 (67)	-1.11	-1.02
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-8.92 <sup>c</sup>	0.18 (67)	-8.97	-8.88
ノルエチノドレル	頂点 (%)	99.42	8.90 (68)	97.27	101.60
	底点 (%)	2.02	3.42 (68)	1.19	2.84
	ヒル勾配	-1.01	0.38 (68)	-1.10	-0.92
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-6.39	0.27 (68)	-6.46	-6.33
ノルエチンドロン <sup>c</sup>	頂点 (%)	96.14	8.44 (27)	92.80	99.48
	底点 (%)	2.38	5.02 (27)	0.40	4.37
	ヒル勾配	-1.41	0.32 (27)	-1.53	-1.28
	LogIC <sub>50</sub> (M)	-5.73	0.27 (27)	-5.84	-5.62

<sup>a</sup> バリデーション試験中、4つの試験実施施設で実施された対照でのランに関する曲線フィットパラメータ推定値（ヒルの式のパラメータ4つ）を用いて、平均 ( $n$ )  $\pm$  標準偏差 ( $SD$ ) を算出した（参考文献 2 補遺 N を参照）。

<sup>b</sup> 許容基準の指針として、95%信頼区間を提示する。

<sup>c</sup> バリデーション試験中、サブタスク 4 ではノルエチンドロンの試験は任意であった（参考文献 2、サブタスク 4 を参照）。したがって、2つの試験実施施設で実施された対照でのランに関する曲線フィットパラメータ推定値（ヒルの式のパラメータ4つ）を用いて、平均  $\pm SD$  ( $n$ ) を算出した。

IC<sub>50</sub> の範囲は、各試験実施施設内で使用する受容体標品の *Kd* および放射標識リガンドの濃度に左右される。本試験法の実施に用いた条件に基づいて、IC<sub>50</sub> の範囲を適切に調整することは許容される。

### 試験実施施設の習熟度の立証

10. 本試験ガイドラインの「hrER 結合試験法の構成要素」の段落 17、18 および表 2 を参照のこと。各試験（飽和／競合結合）は、異なる日の独立した 3 回のラン（すなわち、受容体、化学物質、試薬の新たな希釈液を用いる）からなり、各ランは 3 つのレプリケートを含むこと。

### 受容体 (hrER<sub>a</sub>) 濃度の測定

11. 活性受容体の濃度は、バッチおよび保存条件によりわずかに異なる。そのため、供給者から受領した活性受容体の濃度を測定すること。これにより、ランの時点で適切な濃度の活性受容体が得られる。

12. 競合結合相当条件（すなわち、1 nM [<sup>3</sup>H]-エストラジオール）の下、名目上の濃度 0.25、0.5、0.75、1 nM の受容体を 1 μM の非標識エストラジオール非存在下（全結合量）および存在下（非特異的結合量）でインキュベートすること。特異的結合量—全結合量と非特異的結合量の差として算出一を、受容体の名目上の濃度に対してプロットする。添加した放射標識リガンドの 20%に相当する特異的結合量の値を示す受容体濃度は、対応する受容体の名目上の濃度と関連しており、この受容体濃度を飽和／競合結合実験に用いること。多くの場合、hrER の最終濃度 0.5 nM がこの条件に適合する。

13. 20%の基準を繰り返し満たせない場合、実験の設定に誤りの可能性がないか確認すること。20%の基準を達成できなかった場合、組み換え受容体バッチには活性受容体がほとんどないことを示している可能性があり、次に別の受容体バッチの使用を検討すること。

### 飽和試験

14. 8 段階の濃度上昇条件下で、[<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオールを次の 3 つの条件で 3 つずつ評価すること（表 2 を参照）：

- 非標識 17β-エストラジオール非存在下でかつ ER 存在下：本条件は、[<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオールのみを含むウェルの放射能測定による全結合量の測定に当たる。
- 標識 17β-エストラジオールの 1000 倍超の濃度での非標識 17β-エストラジオール存在下で、かつ ER 存在下：本条件は、活性結合部位を非標識 17β-エストラジオールで飽和させ、ウェルの放射能測定により、非特異的結合を測定することを意図している。非標識エストラジオールが受容体上で結合可能なすべての特異的部位に結合するほどの高濃度であるはずであるため、受容体に結合できる残りの放射性エストラジオールはいずれも、非特異的部位での結合とみなされる。
- 非標識 17β-エストラジオール非存在下でかつ ER 非存在下（総放射能の測定）

### [<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオール溶液および非標識 17β-エストラジオール溶液の調製

15. [<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオール希釈液は、12 nM の [<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオールストック溶液にアッセイ緩衝液を加えることで、まず濃度範囲 0.12~12 nM を得るよう調製すること。これらの溶液 40 μL を 96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験ウェルに添加することで（最終容量 160 μL）、最終的な試験濃度範囲である 0.03~3.0 nM を得る。アッセイ緩衝液、[<sup>3</sup>H]-17β-エストラジオールストック溶液、および希釈液の調製、ならびに濃度の測定に関する詳細は、FW のプロトコール（2）に記述されている。

16. 17β-エストラジオールのエタノール希釈液は、アッセイ緩衝液の添加により、濃度範囲 0.06~6 μM の 8 段階の濃度が得られるよう調製する。これらの溶液 80 μL を 96 ウェルマイクロタイタープレート

の各試験ウェルに添加することで（最終容量 160  $\mu\text{L}$ ）、最終的な試験濃度範囲である 0.03~3  $\mu\text{M}$  を得る。個々の非特異的結合試験用ウェルにおける非標識 17 $\beta$ -エストラジオールの最終濃度は、標識 [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオールの濃度の 1000 倍とすること。非標識 17 $\beta$ -エストラジオール希釀液の調製に関する詳細は、FW のプロトコール (2) に記述されている。

17. 20  $\pm$  5%の特異的結合を示す受容体の名目上の濃度を用いること（段落 12~13 を参照）。hrER $\alpha$  溶液は、使用直前に調製すること。

18. 96 ウェルマイクロタイタープレート上では表 2 に示すとおり調製し、濃度ごとに 3 つのレプリケートで行うこと。 [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオール、非標識 17 $\beta$ -エストラジオール、緩衝液、および受容体について、プレートでの濃度および容量の割り付け例を付録 2 に示す。

表 2：飽和結合試験でのマイクロタイタープレートのレイアウト

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	0.03 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			0.06 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			0.08 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			0.10 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			全結合 (溶剤)
<b>B</b>	0.30 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			0.60 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			1.0 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			3.0 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			
<b>C</b>													
<b>D</b>	0.03 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.03 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			0.06 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.06 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			0.08 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.08 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			0.10 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.10 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			非特異的 結合
<b>E</b>	0.30 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.30 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			0.60 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 0.60 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			1.0 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER			3.0 nM [ $^3\text{H}$ ] E <sub>2</sub> + ER + 3.0 $\mu\text{M}$ E <sub>2</sub>			
<b>F</b>													
<b>G</b>													
<b>H</b>													

[ $^3\text{H}$ ] E<sub>2</sub> : [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオール

ER : エストロゲン受容体

E<sub>2</sub> : 非標識 17 $\beta$ -エストラジオール

19. 試験用マイクロタイタープレートは 2~8°C で 16~20 時間インキュベートし、インキュベーション時間中はローテーターに静置すること。

#### hrER $\alpha$ に結合した [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオールの測定

20. 各ウェルに冷却したデキストラン被覆活性炭 (DCC) 懸濁液 80  $\mu\text{L}$  を添加し、マイクロタイタープレートを 10 分間振とう後、約 2500 RPM で 10 分間遠心することで、hrER $\alpha$  に結合した [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオールを遊離 [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオールから分離すること。本プロセス中に結合した [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオールが hrER $\alpha$  から解離するのを最小限にするには、緩衝液および試験ウェルを 2~8°C に保ち、各手順を速やかに実施することが極めて重要である。プレートを効率的かつ迅速に処理するには、マイクロタイタープレート用の振とう機が必要である。

21. 次に、DCC との接触によるウェルの汚染を回避するため、細心の注意を払い、hrER $\alpha$  に結合した [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオール含有上清 50  $\mu\text{L}$  を収集し、2 番目のマイクロタイタープレートに静置すること。

22. 次に、核放出の運動エネルギーを光エネルギーに変換できるシンチレーション液 200  $\mu\text{L}$  を各ウェル (A1~B12 および D1~E12) に添加する。ウェル G1~H12 (全 dpm と認識) は [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -エストラジオ

ール (40  $\mu$ L) の段階希釈液を示し、この段階希釈液は、表 3 に示すとおり測定プレートのウェル内のシンチレーション液に直接加えること。すなわち、これらのウェルは、シンチレーション液 200  $\mu$ L および [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの適切な希釈液のみ含有する。これらの測定結果により、全結合および非特異的結合について、どれほどの [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールが dpm 単位で一連の各ウェルに添加されたかが立証される。

表 3：飽和結合試験でのマイクロタイプレートのレイアウト：放射能測定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER		0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER				全結合 (溶剤)
<b>B</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER		3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER				
<b>C</b>													
<b>D</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.03 $\mu$ M E <sub>2</sub>			0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.06 $\mu$ M E <sub>2</sub>			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.08 $\mu$ M E <sub>2</sub>		0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.10 $\mu$ M E <sub>2</sub>				非特異的 結合
<b>E</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.30 $\mu$ M E <sub>2</sub>			0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.60 $\mu$ M E <sub>2</sub>			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER		3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 3.0 $\mu$ M E <sub>2</sub>				
<b>F</b>													
<b>G</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> (total dpms)			0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>		0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>				全 dpms*
<b>H</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>		3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>				

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub> : [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール

ER : エストロゲン受容体

E<sub>2</sub> : 非標識 17 $\beta$ -エストラジオール

dpms : 壊変毎分

\*ここでの [<sup>3</sup>H]標識エストラジオールの放射性段階希釈液は、ウェル G1～H12 のシンチレーション液 200  $\mu$ L に直接添加すること。

23. 測定は 2 時間以上経過後に開始し、計数時間は 1 ウェル当たり 40 分とすること。クエンチ補正を用いて dpm/ウェルを測定するには、マイクロタイプレート用シンチレーションカウンターを使用すること。マイクロタイプレート用シンチレーションカウンター入手できない場合、代替として、従来のカウンターで試料を測定できる。これらの条件下では、計数時間の短縮が考慮されうる。

### 競合結合試験

24. 競合結合試験では、異なる濃度の被験化学物質の存在下で、単一濃度の [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの結合を測定する。1 回のランの範囲内で、各濃度 3 つの同時レプリケートを用いること。さらに、被験化学物質ごとに時期を変えて 3 回のランを実施すること。本試験は、1 つまたは複数の 96 ウェルマイクロタイプレートにおいて設定すること。

### 対照

25. 本試験を実施する場合、各実験に同時の溶剤および対照（すなわち、基準エストロゲン、弱結合物質、および非結合物質）を含めること。各ランの間 1 プレートにおいて、基準エストロゲンおよび対照物質（すなわち、弱結合物質、および非結合物質）の完全な濃度曲線を用いること。その他すべてのプレートには、(i) 高濃度（最大解離濃度）および中濃度（IC50 程度）の E<sub>2</sub> および弱結合物質それぞれを 3 つず

つ、(ii) 溶剤対照および非特異的結合をそれぞれ少なくとも 3 つずつ含めること。アッセイ緩衝液、対照、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ 、hrER $\alpha$ 、および被験化学物質溶液の調製手順は、参考文献 2 (補遺 K、FW の試験プロトコールを参照) に記述されている。

- 溶剤対照 :

26. 溶剤対照は、溶剤が試験系と相互作用せず、全結合 (TB) も測定することを意味する。望ましい溶剤はエタノールである。最大濃度の被験化学物質がエタノールに溶解しない場合、代替として、DMSO を使用できる。エタノールまたは DMSO を用いる場合、最終的な試験ウェルの濃度は 1.5% とし、2% 超にはしない。

- 緩衝液対照 :

27. 緩衝液対照 (BC) には、溶剤も被験化学物質を除く、本試験のすべての成分を含めること。緩衝液対照の結果を溶剤対照と比較し、使用する溶剤が本試験系に影響を及ぼさないことを検証する。

- 強結合物質 (基準エストロゲン)

28.  $17\beta\text{-エストラジオール}$  (CAS 番号 50-28-2) は内因性リガンドであり、ER サブタイプ  $\alpha$  に高い親和性で結合する。hrER $\alpha$  競合結合試験ごとに非標識  $17\beta\text{-エストラジオール}$  を用いた検量線を作成し、同一試験実施施設内で本試験を経時的に実施する場合に、ばらつきを評価可能にすること。非標識  $17\beta\text{-エストラジオール}$  のエタノール溶液を 8 種類調製し、試験ウェル内の濃度範囲を  $100 \text{ nM} \sim 10 \text{ pM}$  ( $-7[\log\text{M}] \sim -11[\log\text{M}]$ )、間隔を  $-7[\log\text{M}]$ 、 $-8[\log\text{M}]$ 、 $-8.5[\log\text{M}]$ 、 $-9[\log\text{M}]$ 、 $-9.5[\log\text{M}]$ 、 $-10[\log\text{M}]$ 、 $-11[\log\text{M}]$  とすること。最大濃度の非標識  $17\beta\text{-エストラジオール}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) は、非特異的結合の指標としても機能する。この濃度も検量線の一部ではあるが、表 4 では「非特異的結合 (NSB)」の表示により識別される。

- 弱結合物質

29. 弱結合物質 (ノルエチノドレル (CAS 番号 68-23-5) またはノルエチンドロン (CAS 番号 68-22-4)) を対象にすることで、各実験の感度を立証し、本試験を経時的に実施する場合に、ばらつきを評価可能にすること。弱結合物質のエタノール溶液を 8 種類調製し、試験ウェル内の濃度範囲を  $3 \text{ nM} \sim 30 \mu\text{M}$  ( $-8.5[\log\text{M}] \sim -4.5[\log\text{M}]$ )、間隔を  $-4.5[\log\text{M}]$ 、 $-5[\log\text{M}]$ 、 $-5.5[\log\text{M}]$ 、 $-6[\log\text{M}]$ 、 $-6.5[\log\text{M}]$ 、 $-7[\log\text{M}]$ 、 $-7.5[\log\text{M}]$ 、 $-8.5[\log\text{M}]$  とすること。

- 非結合物質

30. オクチルトリエトキシシラン (OTES、CAS 番号 2943-75-1) を、陰性対照 (非結合物質) として用いること。陰性対照は、被験化学物質が hrER $\alpha$  に結合しない場合、そのことをランとしての本試験が検出することを保証する。非結合物質のエタノール溶液を 8 種類調製し、試験ウェル内の濃度は対数増分で  $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \mu\text{M}$  (対数増分では  $-10[\log\text{M}] \sim -3[\log\text{M}]$ ) の範囲とすること。フタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP) を、代替の対照非結合物質として使用できる。DBP の最大溶解度は、 $-4[\log\text{M}]$  であることが示されている。

hrER $\alpha$  濃度

31.  $1 \text{ nM}$  の放射標識リガンドが  $20 \pm 5\%$  の特異的結合を示す受容体量を用いること (補遺 2 段落 12~13 を参照)。hrER $\alpha$  溶液は、使用直前に調製すること。

$[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$

32. 試験ウェル内の  $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の濃度は、 $1.0 \text{ nM}$  とすること。

被験化学物質

33. まず、溶解度試験を実施し、各被験化学物質の溶解度限界を判定すると共に、試験プロトコール実施時に用いる適切な濃度範囲を特定する必要がある。各被験化学物質の溶解度限界は最初に溶剤中で測定し、さらに試験条件下で確認する。本試験で試験を行う最終濃度は、 $1 \text{ mM}$  を超えないこと。範囲設定試験

は、溶剤対照と共に最大許容濃度（例：溶解度限界に基づき 1 mM 以下）から開始する 8 種類の対数段階希釈、濁りまたは沈殿の存在の確認からなる（段落 35 も参照）。被験化学物質は、先の範囲設定試験による定義どおり、8 種類の間隔の対数濃度曲線を用いて試験すること。濃度-反応曲線の特性をより明らかにするため、2 回目および 3 回目の実験では、必要に応じて濃度を調整すること。

34. 被験化学物質の希釈液は、適切な溶剤を用いて調製すること（補遺 2 段落 26 を参照）。被験化学物質の最大濃度ではエタノール、DMSO のいずれにも溶解せず、かつ溶剤をさらに追加することにより最終的なチューブ内の溶剤濃度が許容限界を超えると考えられる場合、最大濃度を次に低い濃度に下げることができる。この場合、一連の濃度の下限において、追加の濃度を加えることができる。一連の濃度の中で、その他の濃度は変えないこと。

35. 被験化学物質溶液を試験ウェルに添加する場合、被験化学物質が試験ウェルへの添加時に沈殿する可能性があるため、厳密に監視すること。沈殿を含むすべてのウェルのデータを曲線適合から除外し、データの除外理由を記述すること。

36. 事前に既存の情報として、他の資料から被験化学物質の  $\log (IC_{50})$  が得られている場合、希釈液を幾何級数的な間隔（すなわち、予測される  $\log (IC_{50})$  前後で 0.5 対数単位）にすることが適切であると考えられる。最終的な結果では、結合曲線の特性が十分に明らかにできるよう、「頂点」および「底点」など、 $\log (IC_{50})$  の両側で十分な濃度幅を反映させること。

#### 試験プレートの構成

37. ラベル表示したマイクロタイタープレートを準備し、溶剤対照、非特異的結合 (NSB) の指標としても機能する最大濃度の基準エストロゲン、および緩衝液対照についてコード化して 6 つずつインキュベーション結果を検討し、また、8 濃度の非結合対照（オクチルトリエトキシシラン）、最大濃度より低い 7 濃度の基準エストロゲン、8 濃度の用量からなる弱結合物質、および 8 濃度の各被験化学物質 (TC) についてそれぞれコード化して 3 つずつインキュベーション結果を検討すること。基準エストロゲンおよび対照に関する完全な濃度曲線用に、プレートのレイアウトの例を略図にして下表 4 に示す。被験化学物質には追加のマイクロタイタープレートを使用し、プレート対照（すなわち、1) 高濃度（最大限の置換）および中濃度 (IC<sub>50</sub> 程度) の E2 および弱結合物質をそれぞれ 3 つずつ、2) 溶剤対照および非特異的結合それぞれ 6 つずつを含めること（表 5）。3 種類の未知の被験化学物質を用いた競合結合試験用マイクロタイタープレートのレイアウトのワークシートについて、一例を補遺 2 付録 3 に示す。表 4 および表 5 に示す濃度は、本試験の最終濃度である。E2 の最大濃度は  $1 \times 10^{-7}$  M とし、弱結合物質では、プレート 1 で弱結合物質に用いた最大濃度を用いること。IC<sub>50</sub> は、試験実施施設が有する対照の履歴データベースに基づいて測定されなければならない。この値は、バリデーション試験で認められた値（表 1 を参照）と同程度になるものと予測される。

表 4：競合結合試験でのマイクロタイプレートのレイアウト：基準エストロゲンおよび対照の完全な濃度曲線用（プレート 1）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TB (溶剤のみ)			TB (溶剤のみ)			NSB			NSB		
<b>B</b>	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8.5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-9}$ )		
<b>C</b>	E2 ( $1 \times 10^{-9.5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-10}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-11}$ )			ブランク*		
<b>D</b>	NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>E</b>	NE ( $1 \times 10^{-6.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-8.5}$ )		
<b>F</b>	OTES ( $1 \times 10^{-3}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-4}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-5}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>G</b>	OTES ( $1 \times 10^{-7}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-8}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-9}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>H</b>	ブランク（放射活性量用）**			ブランク（放射活性量用）**			緩衝液対照			緩衝液対照		

この例では、弱結合物質はノルエチノドレル（NE）とする。

\* 真のブランク。使用されていないウェル。

\*\* インキュベーション中には使用されないブランクであるが、添加された総放射能の確認に使用。

表 5：競合結合試験でのマイクロタイタープレートのレイアウト：被験化学物質およびプレート対照の完全な濃度曲線用

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TB (溶剤のみ)		TB (溶剤のみ)			NSB			NSB			
<b>B</b>	TC1 ( $1 \times 10^{-3}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-4}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-5}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>C</b>	TC1 ( $1 \times 10^{-7}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-8}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-9}$ )			TC1 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>D</b>	TC2 ( $1 \times 10^{-3}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-4}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-5}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>E</b>	TC2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-9}$ )			TC2 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>F</b>	TC3 ( $1 \times 10^{-3}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-4}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-5}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>G</b>	TC3 ( $1 \times 10^{-7}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-8}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-9}$ )			TC3 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>H</b>	NE (IC50)			NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ )			E <sub>2</sub> (IC50)			E <sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-7}$ )		

この例では、弱結合物質はノルエチノドレル (NE) とする。

#### 競合結合試験の完了

38. 表 6 に示すとおり、溶剤対照、緩衝液対照、基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質、およびアッセイ緩衝液で調製した被験化学物質 80  $\mu$ L をウェルに添加すること。次に、4 nM の [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール溶液 40  $\mu$ L を各ウェルに添加すること。2~8°C で 10~15 分穩やかに回転させた後、hrER $\alpha$  溶液 40  $\mu$ L を添加すること。試験用マイクロタイタープレートは 2~8°C で 16~20 時間インキュベートし、インキュベーション時間中はローテーターに静置すること。

表 6：hrER 競合結合試験での試験成分の容量：マイクロタイタープレート用

容量 ( $\mu$ L)	成分
80	非標識 17 $\beta$ -エストラジオール、ノルエチノドレル、OTES、被験化学物質、溶剤、または緩衝液
40	4 nM の [ <sup>3</sup> H]-17 $\beta$ -エストラジオール溶液
40	定められた濃度の hrER $\alpha$ 溶液
160	各試験ウェルの合計容量

39. 次に、飽和結合試験の段落 20~23 記載のとおり、各ウェルに冷却した DCC 懸濁液 80  $\mu$ L を添加することで、hrER $\alpha$  に結合した [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールを遊離 [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールから分離後、hrER $\alpha$  に結合した [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの定量を行うこと。

40. ウェル H1~6 (表 4 で「ブランク (放射活性量用)」と認識) は、標識した [<sup>3</sup>H]-エストラジオール 40  $\mu$ L の dpm を表す。ウェル H1~6 のシンチレーション液に、40  $\mu$ L ずつ直接添加すること。

**許容基準****飽和結合試験**

41.  $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の濃度上昇に伴い、特異的結合曲線がプラトーに達し、リガンドによる hrER $\alpha$  の飽和を示すこと。
42. 1 nM の  $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の特異的結合量は、ラン全体で添加された総放射能測定結果の平均値の 15~25% の許容範囲内であること。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが一貫してこの範囲外であり、あるいは、特定のランが著しくこの範囲を外れる場合、タンパク質濃度を調整し飽和結合試験を再度実施すること。
43. これらのデータから、線形 Scatchard プロットが得られることになる。
44. 非特異的結合量は過剰でないこと。非特異的結合の値は通常、全結合の 35% 未満であること。ただし、試験した放射標識  $17\beta\text{-エストラジオール}$  の最低濃度で極めて低い dpm を測定した場合、非特異的結合量の割合が時にこの範囲を超える可能性がある。

**競合結合試験**

45. 非標識  $17\beta\text{-エストラジオール}$  の濃度上昇に伴い、一部位競合結合の様式に従って、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  が受容体から解離する。
46. 基準エストロゲン（すなわち、 $17\beta\text{-エストラジオール}$ ）の IC<sub>50</sub> は、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  のモル濃度 + 飽和結合試験から求めた Kd の値とほぼ同等になるはずである。
47. 各ウェルに添加された総放射能測定濃度の平均値がラン全体で 1 nM であった場合、全特異的結合は、一貫して  $20 \pm 5\%$  の許容範囲内であること。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが一貫してこの範囲外であり、あるいは、特定のランが著しくこの範囲を外れる場合、タンパク質濃度を調整すること。
48. 溶剤により、本試験の感度も再現性も変化しないこと。溶剤対照（TB 用ウェル）の結果を緩衝液対照と比較し、使用する溶剤が本試験系に影響を及ぼさないことを検証する。溶剤が本試験に影響を及ぼさない場合、TB および緩衝液対照の結果は同程度になるはずである。
49. 非結合物質では、最大  $10^{-3}$  M (OTES) または  $10^{-4}$  M (DBP) まで試験を行った場合、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の hrER $\alpha$  からの解離は 25% を超えないこと。
50. 基準エストロゲンおよび 2 種類の弱結合物質（例：ノルエチノドレル、ノルエチンドロン）を対象に、FW の hrER 結合試験（参考文献 2 補遺 N）のバリデーション試験データを用いて性能基準が作成された。バリデーション試験に参加した試験実施施設間で実施されたすべての対照でのランについて、平均 (n) +/- SD の 95% 信頼区間が提示されている。95% 信頼区間は、基準エストロゲンおよび弱結合物質の曲線フィットパラメータ（すなわち、頂点、底点、ヒル勾配、 $\log(\text{IC}_{50})$ ）、ならびに、弱結合物質の基準エストロゲンに対する  $\log_{10}$  RBA について算出された後、陽性対照の性能基準として提示されている。性能基準として使用可能な曲線フィットパラメータについて、予測される範囲を表 1 に示す。実際には、IC<sub>50</sub> の範囲は、受容体標品の Kd およびリガンドの濃度に基づくと、わずかに異なる可能性がある。
51. 被験化学物質となりうる既存の物質は多岐にわたり、また、潜在的な親和性および結果（例：完全な曲線、部分的な曲線、曲線適合なし）にばらつきがあることから、被験化学物質のフィットパラメータに関する性能基準は作成しなかった。ただし、各ランの被験化学物質の結果を検討する場合、専門家の判断

を適用すること。競合結合曲線の頂点を明確に定義する（例：90～100%の結合）ため、十分な濃度範囲の被験化学物質を用いること。被験化学物質の各濃度でのレプリケートおよび同時でない3回のラン間におけるばらつきは、合理的で科学的に正当化できること。被験化学物質の各ランにおける対照は、このFWの試験について報告された性能基準に達し、かつそれぞれの試験実施施設ごとの歴史的対照データと一致していること。

## データの分析

### 飽和結合試験

52. 全結合および非特異的結合の両方を測定する。これらの値から、平衡条件下で濃度上昇に伴う $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合量を、全結合量から非特異的結合量を減じることにより算出する。 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ 濃度に対する特異的結合量を示したグラフでは、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ によるhrER $\alpha$ の飽和を示す最大特異的結合量でプラトーに達すること。さらに、データ分析により、単一の高親和性結合部位への $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の結合について立証すること。非特異的結合量、全結合量、および特異的結合量を飽和結合曲線上に示すこと。これらのデータのさらなる分析では、非線形回帰分析（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）を用い、最終的なデータをScatchardプロットとして示すこと。

53. データ分析では、別のある方法の使用が正当化される場合を除き、非特異的結合が線形であるとの仮定を用い、全結合データのみから $B_{\text{max}}$ および $K_d$ を求める。また、正当化されない限り、最良適合を判定する場合、ロバスト回帰を用いること。ロバスト回帰に向け選択した方法を記載すること。飽和結合データから $B_{\text{max}}$ および $K_d$ を求める場合、リガンド枯渇の補正（例：Swillens 1995の方法を使用）を常に用いること。

### 競合結合試験

54. 競合結合曲線は、競合物質の濃度（log 10 単位）に対する $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合量としてプロットされる。 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の最大の特異的結合を50%阻害する被験化学物質の濃度が、 $IC_{50}$ 値である。

55. 非線形曲線用の適切な曲線フィットソフトウェア（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）を用いて、4つのパラメータをヒルの式にあてはめ、陽性対照（例：基準エストロゲンおよび弱結合物質）の $\log (IC_{50})$ 推定値を求める。これらの曲線をあてはめる場合、頂点、底点、勾配、および $\log (IC_{50})$ には通常制約をつけないこと。正当化されない限り、最良適合を判定する場合、ロバスト回帰を用いること。リガンド枯渇の補正は用いないこと。初回の分析に続き、各結合曲線がモデルへ適切にフィットするよう検討すること。弱結合物質の相対結合親和性（RBA）を、 $17\beta\text{-エストラジオール}$ の $\log (IC_{50})$ に対する弱結合物質の $\log (IC_{50})$ の割合（%）として算出すること。陽性対照および非結合対照の結果は、本補遺2段落45～50記載の本試験法における性能基準を用いて評価すること。

56. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されることを保証するため、すべての被験化学物質のデータを段階的アプローチにより分析すること。被験化学物質の各ランでは、まず対照である基準エストロゲンおよび弱結合物質に用いたデータ分析と同一の標準化されたデータ分析を行うことが推奨される（上記段落55を参照）。完了したら、各ランについてデータと作成した競合結合曲線との適合の程度について、曲線フィットパラメータの技術的検討および目視による検討結果から導くこと。本技術的検討の間、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合率（%）の濃度依存性の低下が認められること、化学物質濃度ごとのテクニカルレプリケート間のばらつきの少なさ、および3回のラン間における曲線フィットパラメータの一貫性が認められることは、本試験およびデータ分析が適切に行われたことを示す良好な指標と

なる。

### データの解釈

57. すべての許容基準を満たすという条件下では、結合曲線が適合可能であり、かつデータ範囲内の反応曲線の最小値が 50%未満にあれば、被験化学物質は hrER $\alpha$  の結合物質であると判定する（図 1）。

58. すべての許容基準を満たすという条件下では、以下の場合、被験化学物質は hrER $\alpha$  の非結合物質と判定する：

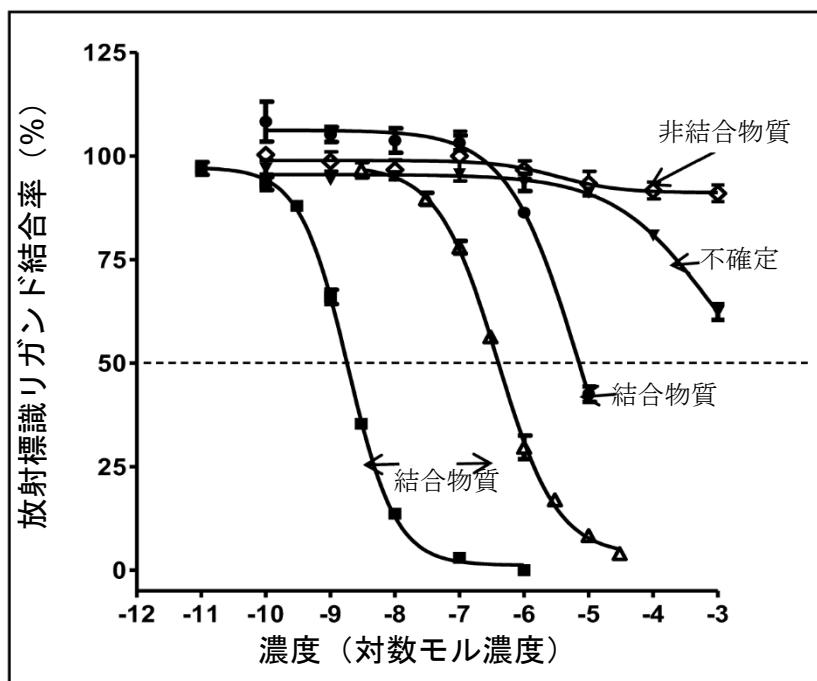
- 結合曲線が適合可能であり、かつ適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%超にある、または
- 結合曲線が適合不能であり、かつデータ内のある濃度群における結合割合（%）の非平滑化平均の最低値が 75%超にある。

59. 上記条件のいずれも満たさない場合（例：適合した反応曲線の最小値が 76~51%の間にある）、被験化学物質は不確定と判定する。

表 7.被験化学物質の競合結合曲線に基づく分類の割り当て基準

分類	基準
結合物質 <sup>a</sup>	結合曲線が適合可能。 <ul style="list-style-type: none"> <li>• データ範囲内の反応曲線の最小値が 50%未満。</li> </ul>
非結合物質 <sup>b</sup>	結合曲線が適合可能である場合、 <ul style="list-style-type: none"> <li>• データ範囲内のこの適合した反応曲線の最小値が 75%超。</li> </ul> 結合曲線が適合不能である場合、 <ul style="list-style-type: none"> <li>• データ内のある濃度群における結合割合（%）の非平滑化平均の最低値が 75%超。</li> </ul>
不確定 <sup>c</sup>	結合物質でも非結合物質でもない試験可能なラン（例：適合した反応曲線の最小値が 76~51%の間）

図 1. 競合結合曲線を用いた被験化学物質の分類例



60. 被験化学物質について試験実施施設内で行われた複数のランは、表 8 に示すとおり、ランごとに数値を割り当て、ラン全体での平均値を求ることで統合する。試験実施施設内ごとに統合したランの結果を、各被験化学物質について予測される分類と比較する。

表 8. 試験実施施設内で複数のランを用いた被験化学物質の分類法

ランごとに割り当てる数値：	
分類	数値
結合物質	2
不確定	1
非結合物質	0
ラン全体での数値の平均値の分類：	
分類	数値
結合物質	平均値 $\geq 1.5$
不確定	$0.5 \leq \text{平均値} < 1.5$
非結合物質	平均値 $< 0.5$

### 試験報告書

61. 本試験ガイドラインの「hrER 結合試験法の構成要素」の段落 22(p9)を参照。

## 付録 1：用語一覧

[<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>：トリチウムで放射標識した 17 $\beta$ -エストラジオール

DCC：デキストラン被覆活性炭

E<sub>2</sub>：非標識 17 $\beta$ -エストラジオール（不活性）

アッセイ緩衝液：10 mM Tris、10 mg/mL ウシ血清アルブミン、2 mM ジチオトレイクトール（DTT）、10% グリセロール、0.2 mM ロイペプチド、pH 7.5

hrER $\alpha$ ：ヒト組み換えエストロゲン受容体  $\alpha$ （リガンド結合ドメイン）

レプリケート：同一濃度で同一成分を含み、1 回のランの範囲内で同時に試験される複数ウェルの 1 つ。本プロトコールでは、被験化学物質の各濃度は 3 つずつ試験する。すなわち、被験化学物質の各濃度で同時に試験されるレプリケートが 3 つ存在する。

ラン：マイクロタイタープレートにより同時に実行される試験ウェル一式のことで、被験化学物質の hrER $\alpha$ への結合を特徴づけるのに必要なすべての情報（すなわち、様々な濃度の被験化学物質で試験ウェルに添加された [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの全量、[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールと hrER $\alpha$ との最大結合量、非特異的結合量、および全結合量）を提供する。1 回のランは、1 濃度当たりわずか 1 つの試験ウェル（すなわち、レプリケート）からなると考えられるが、本プロトコールは 3 つずつでの試験実施を要するため、1 回のランは濃度ごとに 3 つの試験ウェルからなる。さらに、本プロトコールでは、化学物質ごとに 3 回の独立した（すなわち、同時でない）ランを必要とする。

付録 2 : 3 連ウェルを用いた典型的な[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール飽和試験

3 連ウェルを用いた典型的な[ <sup>3</sup> H]-17 $\beta$ -エストラジオール飽和試験											
位置	レブリケート	ウェルタイプ/コード	放射性 E <sub>2</sub> 初期濃度 (nM)	放射性 E <sub>2</sub> 容量 (μL)	放射性 E <sub>2</sub> 最終濃度 (nM)	非放射性 E <sub>2</sub> 初期濃度 (μM)	非放射性 E <sub>2</sub> 容量 (μL)	非放射性 E <sub>2</sub> 最終濃度 (μM)	緩衝液容量 (μL)	受容体容量 (μL)	ウェル全容量
A1	1	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B9	3	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D2	2	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D3	3	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D4	1	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D5	2	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D6	3	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D7	1	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D8	2	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D9	3	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D10	1	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D11	2	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D12	3	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160

3連ウェルを用いた典型的な<sup>[3]H</sup>-17 $\beta$ -エストラジオール飽和試験

位置	レブリケート ウェルタイプ/ コード	放射性E <sub>2</sub> 初期 濃度 (nM)	放射性E <sub>2</sub> 容量 ( $\mu$ L)	放射性E <sub>2</sub> 最終 濃度 (nM)	非放射性E <sub>2</sub> 初 期濃度 ( $\mu$ M)	非放射性E <sub>2</sub> 容 量 ( $\mu$ L)	非放射性E <sub>2</sub> 最 終濃度 ( $\mu$ M)	緩衝液容量 ( $\mu$ L)	受容体容量 ( $\mu$ L)	ウェル全容量	
E1	1	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E2	2	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E3	3	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E4	1	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E5	2	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E6	3	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E7	1	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40

「Hot」と記載のウェルは、インキュベーション中、空であることに留意すること。シンチレーションの計数にのみ 40  $\mu$ L を添加する。

## 付録3：競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート	位置	レプリケート	ウェルタイプ	ドロード	ドロード濃度	競合物質初期濃度 (M)	hERストップ液 (1:1)	緩衝液容量 (μL)	トマト(放射性 E2)容量 (μL)	希釈プレートからのおよび容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質最終濃度 (M)
S	A1	1	全結合	TB	TB1	-	40	-	40	80	160	-
S	A2	2	全結合	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
S	A3	3	全結合	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
S	A4	1	全結合	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
S	A5	2	全結合	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
S	A6	3	全結合	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
S	A7	1	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	非放射性 E2 (高)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	非放射性 E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	非放射性 E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	非放射性 E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	非放射性 E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	非放射性 E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	非放射性 E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	非放射性 E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	非放射性 E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	非放射性 E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	非放射性 E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	非放射性 E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	非放射性 E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	非放射性 E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	非放射性 E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	非放射性 E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	非放射性 E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	非放射性 E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	非放射性 E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	非放射性 E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	非放射性 E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	非放射性 E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	ブランク	ブランク	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	ブランク	ブランク	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	ブランク	ブランク	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	ノルエチノドレル	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	ノルエチノドレル	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	ノルエチノドレル	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	ノルエチノドレル	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	ノルエチノドレル	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	ノルエチノドレル	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	ノルエチノドレル	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	ノルエチノドレル	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	ノルエチノドレル	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	ノルエチノドレル	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	ノルエチノドレル	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	ノルエチノドレル	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06

## 競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート番号	位置	レプリケート番号	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度コード	競合物質初期濃度 (M)	hER ストック溶液 (μL)	緩衝液容量 (μL)	トマトレーザー(放射性E2)容量 (μL)	希釈プレートからの容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質最終濃度 (M)
S E1	1	ノルエチノドレル 3.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP5	6.00E-07	40	-	-	40	80	160
S E2	2	ノルエチノドレル 3.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP5	6.00E-07	40	-	-	40	80	160
S E3	3	ノルエチノドレル 3.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP5	6.00E-07	40	-	-	40	80	160
S E4	1	ノルエチノドレル 1.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP6	2.00E-07	40	-	-	40	80	160
S E5	2	ノルエチノドレル 1.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP6	2.00E-07	40	-	-	40	80	160
S E6	3	ノルエチノドレル 1.0E-07	ノルエチノドレル	NE	WP6	2.00E-07	40	-	-	40	80	160
S D7	1	ノルエチノドレル 3.0E-08	ノルエチノドレル	NE	WP7	6.00E-08	40	-	-	40	80	160
S E8	2	ノルエチノドレル 3.0E-08	ノルエチノドレル	NE	WP7	6.00E-08	40	-	-	40	80	160
S E9	3	ノルエチノドレル 3.0E-08	ノルエチノドレル	NE	WP7	6.00E-08	40	-	-	40	80	160
S E10	1	ノルエチノドレル 3.0E-09	ノルエチノドレル	NE	WP8	6.00E-09	40	-	-	40	80	160
S E11	2	ノルエチノドレル 3.0E-09	ノルエチノドレル	NE	WP8	6.00E-09	40	-	-	40	80	160
S E12	3	ノルエチノドレル 3.0E-09	ノルエチノドレル	NE	WP8	6.00E-09	40	-	-	40	80	160
S F1	1	OTES 1.0E-03	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	-	40	80	160
S F2	2	OTES 1.0E-03	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	-	40	80	160
S F3	3	OTES 1.0E-03	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	-	40	80	160
S F4	1	OTES 1.0E-04	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	-	40	80	160
S F5	2	OTES 1.0E-04	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	-	40	80	160
S F6	3	OTES 1.0E-04	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	-	40	80	160
S F7	1	OTES 1.0E-05	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	-	40	80	160
S F8	2	OTES 1.0E-05	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	-	40	80	160
S F9	3	OTES 1.0E-05	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	-	40	80	160
S F10	1	OTES 1.0E-06	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	-	40	80	160
S F11	2	OTES 1.0E-06	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	-	40	80	160
S F12	3	OTES 1.0E-06	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	-	40	80	160
S G1	1	OTES 1.0E-07	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	-	40	80	160
S G2	2	OTES 1.0E-07	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	-	40	80	160
S G3	3	OTES 1.0E-07	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	-	40	80	160

「Hot」と記載のウェルは、インキュベーション中、空であることに留意すること。シンチレーションの計数にのみ 40 μL を添加する。

## 競合結合試験でのウェルのレイアウト

ト ー プレ ー	位置	ト ー レ リケ ー レ	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度 (M)	競合物質初期濃度 (M)	hrER ストック溶液 (μL)	緩衝液容量 (μL)	トレーサー (放射性 E2) 容量 (μL)	希釈プレートからの容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質の最終濃度 (M)
P1	A1	1	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	全結合	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	非放射性 E2 (高)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	被験化学物質 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	被験化学物質 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	被験化学物質 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	被験化学物質 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	被験化学物質 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	被験化学物質 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	被験化学物質 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	被験化学物質 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	被験化学物質 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	被験化学物質 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	被験化学物質 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	被験化学物質 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	C1	1	被験化学物質 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	被験化学物質 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	被験化学物質 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	被験化学物質 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	被験化学物質 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	被験化学物質 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	被験化学物質 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	被験化学物質 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	被験化学物質 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	被験化学物質 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	被験化学物質 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	被験化学物質 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	被験化学物質 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	被験化学物質 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	被験化学物質 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	被験化学物質 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	被験化学物質 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	被験化学物質 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	被験化学物質 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	被験化学物質 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	被験化学物質 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	被験化学物質 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	被験化学物質 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	被験化学物質 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	E1	1	被験化学物質 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	被験化学物質 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	被験化学物質 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07

## 競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート	位置	レプリケート	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度コード	競合物質初期濃度 (M)	hrER ストック溶液 (μL)	緩衝液容量 (μL)	トレーナー (放射性 E2) 容量 (μL)			希釈プレートからの容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質の最終濃度 (M)
									40	0	40	80	160	
P1	E4	1	被験化学物質 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	E5	2	被験化学物質 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	E6	3	被験化学物質 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	E7	1	被験化学物質 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	E8	2	被験化学物質 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	E9	3	被験化学物質 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	E10	1	被験化学物質 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	E11	2	被験化学物質 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	E12	3	被験化学物質 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	F1	1	被験化学物質 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	160	1.0E-03	
P1	F2	2	被験化学物質 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	160	1.0E-03	
P1	F3	3	被験化学物質 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	160	1.0E-03	
P1	F4	1	被験化学物質 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	160	1.0E-04	
P1	F5	2	被験化学物質 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	160	1.0E-04	
P1	F6	3	被験化学物質 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	160	1.0E-04	
P1	F7	1	被験化学物質 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	160	1.0E-05	
P1	F8	2	被験化学物質 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	160	1.0E-05	
P1	F9	3	被験化学物質 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	160	1.0E-05	
P1	F10	1	被験化学物質 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	160	1.0E-06	
P1	F11	2	被験化学物質 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	160	1.0E-06	
P1	F12	3	被験化学物質 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	160	1.0E-06	
P1	G1	1	被験化学物質 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	160	1.0E-07	
P1	G2	2	被験化学物質 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	160	1.0E-07	
P1	G3	3	被験化学物質 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	160	1.0E-07	
P1	G4	1	被験化学物質 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	G5	2	被験化学物質 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	G6	3	被験化学物質 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	160	1.0E-08	
P1	G7	1	被験化学物質 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	G8	2	被験化学物質 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	G9	3	被験化学物質 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	160	1.0E-09	
P1	G10	1	被験化学物質 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	G11	2	被験化学物質 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	G12	3	被験化学物質 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	160	1.0E-10	
P1	H1	1	ノルエチノドレル	NE	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H2	2	ノルエチノドレル	NE	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H3	3	ノルエチノドレル	NE	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H4	1	ノルエチノドレル	NE	1.00E-4.5	40	0	40	80	160				
P1	H5	2	ノルエチノドレル	NE	1.00E-4.5	40	0	40	80	160				
P1	H6	3	ノルエチノドレル	NE	1.00E-4.5	40	0	40	80	160				
P1	H7	1	非放射性 E2	S	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H8	2	非放射性 E2	S	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H9	3	非放射性 E2	S	IC50	40	0	40	80	160				
P1	H10	1	非放射性 E2	S	1.00E-7	40	0	40	80	160				
P1	H11	2	非放射性 E2	S	1.00E-7	40	0	40	80	160				
P1	H12	3	非放射性 E2	S	1.00E-7	40	0	40	80	160				

補遺3：ヒト組み換え ER $\alpha$  リガンド結合ドメインタンパク質を用いた化学物質評価研究機構（CERI）の *in vitro* エストロゲン受容体結合試験

最初に考慮すべき事項および限界（1ページの「概要」も参照）

1. 本 *in vitro* エストロゲン受容体（ER $\alpha$ ）飽和／競合結合試験法では、ヒト ER $\alpha$  (hrER $\alpha$ ) のリガンド結合ドメイン（LBD）を用いる。本タンパク質構築物は、日本の化学物質評価研究機構（CERI）により作製された。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質として存在し、大腸菌（*E. coli*）において発現する。CERI のプロトコールについて国際多施設共同バリデーション試験（2）が行われ、本試験法の意図する目的に対する妥当性および信頼性が立証された。
2. 本試験法は、hrER $\alpha$  に結合可能な物質を特定するためのスクリーニング手順である。本試験法は、hrER $\alpha$  と LBD との結合に関し、被験化学物質と  $17\beta$ -エストラジオールとの競合能を測定するのに用いられる。定量試験の結果には、IC<sub>50</sub> (hrER $\alpha$  から [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの半分を解離させるのに必要な被験化学物質の濃度の尺度)、および、hrER $\alpha$  に関する被験化学物質の  $17\beta$ -エストラジオールに対する相対結合親和性が挙げられうる。化学物質のスクリーニングを目的とした許容可能な定性試験の結果には、結合曲線に関し記述された基準に準拠した被験化学物質の hrER $\alpha$  結合物質、非結合物質、または不確定いずれかへの分類が挙げられうる。
3. 本試験法では、試験実施施設での放射性物質の認可を要する放射標識リガンドを使用する。放射性同位元素および危険有害化学物質に関するすべての手順は、国の法律に定められた規制および手順に従うこと。
4. 規制上の目的で本試験法を使用する際には、事前に「概要」および「hrER 結合試験法の構成要素」（1～14 ページ）を閲読すること。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に記載する。

試験法の原理（1ページの「概要」も参照）

5. hrER $\alpha$  結合試験は、被験化学物質（すなわち競合物質）の濃度を上昇させながら、放射標識リガンド（[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール）と ER との結合能を測定する。ER に高親和性の被験化学物質は、ER に低親和性の被験化学物質に比べ、より低濃度で放射標識リガンドと競合する。
6. 本試験法は、2 つの主要な構成要素からなる。1 つは、受容体-リガンド相互作用のパラメータの特性を明らかにする飽和結合実験と、続くもう 1 つは、ER への結合について被験化学物質と放射標識リガンドとの競合特性を明らかにする競合結合実験である。
7. 飽和結合実験の目的は、競合結合実験での準備として、結合親和性および結合数について、特定のバッチの受容体を特徴づけることである。飽和結合実験では、平衡状態で、一定濃度のエストロゲン受容体の天然リガンドに対する親和性（解離定数 K<sub>d</sub> で表される）および活性受容体部位の濃度（B<sub>max</sub>）を測定する。
8. 競合結合実験は、ER への結合について [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールと競合する物質の親和性を測定する。親和性は、平衡状態で、[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの特異的結合を 50% 阻害する被験化学物質の濃度（「50% 阻害濃度」または IC<sub>50</sub> と称する）により定量化する。親和性は、相対結合親和性（RBA、同一のランで別々に測定されるエストラジオールの IC<sub>50</sub> に対する相対値）を用いて評価することもできる。競合結合実験では、一定濃度において、広範な濃度（8 枝の範囲）の被験化学物質存在下で、[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの結合について測定する。可能である場合、次に、一部位での競合結合物質による放射標識リガンドの解離を表すヒルの式（Hill, 1910）中にデータを適用する。平衡状態での放射標識エストラジオールの解離

の程度を用いて、被験化学物質を結合物質、非結合物質、または不確定の反応を生成として特徴づける。

## 手順

### hrER $\alpha$ タンパク質が許容可能な性能であることの立証

9. 飽和／競合結合試験を定期的に実施する前に、新たな hrER $\alpha$  のバッチごとに、使用する試験実施施設において正しく機能していることを示すこと。性能の立証には、2段階のプロセスを用いること。その段階は次のとおりである。

- $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ 飽和結合試験を実施し、hrER $\alpha$  の特異性および飽和状態を立証する。これらのデータの非線形回帰分析（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）およびそれに続く Scatchard プロットにより、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$ の hrER $\alpha$  結合親和性（ $K_d$ ）および一群の特定の hrER $\alpha$  について受容体数（ $B_{\text{max}}$ ）を記録すること。
- 対照物質（基準エストロゲン（ $17\beta\text{-エストラジオール}$ ）、弱結合物質（例：ノルエチノドレルまたはノルエチンドロン）、非結合物質（オクチルトリエトキシシラン、OTES））を用いて競合結合試験を実施する。各試験実施施設は履歴データベースを確立することで、基準エストロゲンおよび弱結合物質の実験間および異なる hrER $\alpha$  バッチ間での  $\text{IC}_{50}$  および関連する値の一貫性を立証すること。さらに、対照物質に関する競合結合曲線のパラメータは、本試験法のバリデーション試験参加施設で得られたデータを用いて作成した 95% 信頼区間の限界内（表 1 を参照）にあること（2）。

表 1. 基準エストロゲンおよび弱結合物質用に作成された性能基準：CERI の hrER 結合試験

物質	パラメータ	平均値 <sup>a</sup>	標準偏差 (n)	95%信頼区間 <sup>b</sup>	
				下限	上限
17 $\beta$ -エストラジオール	頂点	104.74	13.12 (70)	101.6	107.9
	底点	0.85	2.41 (70)	0.28	1.43
	ヒル勾配	-1.22	0.20 (70)	-1.27	-1.17
	Log $\text{IC}_{50}$	-8.93	0.23 (70)	-8.98	-8.87
ノルエチノドレル	頂点	101.31	10.55 (68)	98.76	103.90
	底点	2.39	5.01 (68)	1.18	3.60
	ヒル勾配	-1.04	0.21 (68)	-1.09	-0.99
	Log $\text{IC}_{50}$	-6.19	0.40 (68)	-6.29	-6.10
ノルエチンドロン <sup>c</sup>	頂点	92.27	7.79 (23)	88.90	95.63
	底点	16.52	10.59 (23)	11.94	21.10
	ヒル勾配	-1.18	0.32 (23)	-1.31	-1.04
	Log $\text{IC}_{50}$	-6.01	0.54 (23)	-6.25	-5.78

<sup>a</sup> バリデーション試験中、4つの試験実施施設で実施された対照でのランに関する曲線フィットパラメータ推定値（ヒルの式のパラメータ 4つ）を用いて、平均  $\pm$  標準偏差（SD）およびサンプルサイズ（n）を算出した（参考文献 2 補遺 N を参照）。

<sup>b</sup> 許容基準の指針として、95% 信頼区間を提示する。

<sup>c</sup> バリデーション試験中、サブタスク 4 ではノルエチンドロンの試験は任意であった（参考文献 2、サブタスク 4 を参照）。したがって、2つの試験実施施設で実施された対照でのランに関する曲線適合パラメータ推定

値（ヒルの式のパラメータ4つ）を用いて、平均 $\pm$ SD ( $n$ ) を算出した。

IC50 の範囲は、各試験実施施設内で使用する受容体調製物の  $K_d$  および放射標識リガンドの濃度に左右される。本試験法の実施に用いた条件に基づいて、IC50 の範囲を適切に調整することは許容される。

### 試験実施施設の習熟度の立証

10. 本試験ガイドラインの「hrER 結合試験法の構成要素」の段落 17、18 および表 2 を参照のこと。各試験（飽和／競合結合）は、異なる日の独立した3回のラン（すなわち、受容体、化学物質、試薬の新たな希釀液を用いる）からなり、各ランは3つのレプリケートを含むこと。

### 受容体 (hrER $\alpha$ ) 濃度の測定

11. 活性受容体の濃度は、バッチおよび保存条件によりわずかに異なる。そのため、供給者から受領した活性受容体の濃度を測定すること。これにより、ランの時点で適切な濃度の活性受容体が得られる。

12. 競合結合相当条件（すなわち、0.5 nM [ $^3$ H]-エストラジオール）の下、名目上の濃度 0.1、0.2、0.4、0.6 nM の受容体を 1  $\mu$ M の非標識エストラジオール非存在下（全結合量）および存在下（非特異的結合量）でインキュベートすること。特異的結合量—全結合量と非特異的結合量の差として算出—を、受容体の名目上の濃度に対してプロットする。添加した放射標識リガンドの 40% に相当する特異的結合量を示す受容体濃度は、対応する受容体濃度と関連しており、この受容体濃度を飽和／競合結合実験に用いること。多くの場合、hrER の最終濃度 0.2 nM がこの条件に適合する。

13. 40%の基準を再度満たせない場合、実験の設定に誤りの可能性がないか確認すること。40%の基準を達成できなかった場合、一群の組み換え受容体には活性受容体がほとんどないことを示している可能性があり、次に別の受容体バッチの使用を検討すること。

### 飽和試験

14. 8 段階の濃度上昇条件下で、[ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールを次の3つの条件で3つずつ評価すること（表 2 を参照）：

- 非標識 17 $\beta$ -エストラジオール非存在下でかつ ER 存在下：本条件は、[ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールのみを含むウェルの放射能測定による全結合量の測定に当たる。
- 標識 17 $\beta$ -エストラジオールの 2000 倍超の濃度での非標識 17 $\beta$ -エストラジオール存在下で、かつ ER 存在下：本条件は、活性結合部位を非標識 17 $\beta$ -エストラジオールで飽和させ、ウェルの放射能測定により、非特異的結合を測定することを意図している。非標識エストラジオールが受容体上で結合可能なすべての特異的部位に結合するほどの高濃度であるはずであるため、受容体に結合できる残りの放射性エストラジオールはいずれも、非特異的部位での結合とみなされる。
- 非標識 17 $\beta$ -エストラジオール非存在下でかつ ER 非存在下（総放射能の測定）

### [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオール溶液、非標識 17 $\beta$ -エストラジオール溶液、および hrER $\alpha$ の調製

[ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールストック溶液 1  $\mu$ M 溶液から、室温で DMSO (200 nM に調製) およびアッセイ緩衝液 (40 nM に調製) を添加することで、DMSO 中で 40 nM の [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオール溶液を調製すること。この 40 nM 溶液を用いて室温でアッセイ緩衝液を加え、（表 2 レーン 12 に示すとおり）0.313～40 nM の範囲で、一連の [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオール希釀液を調製する。

15. これらの溶液 10  $\mu$ L を 96 ウェルマイクロタイプレートの各試験ウェルに添加することで、最

終的な試験濃度範囲である 0.0313~4.0 nM を得る（表 2 および表 3 を参照）。アッセイ緩衝液の調製、特異的活性に基づく元の<sup>[3]H]-17 $\beta$ -エストラジオールストック溶液の算出、希釈液の調製、および濃度の測定に関する詳細は、CERI のプロトコール（2）に記述されている。</sup>

16. 非標識 17 $\beta$ -エストラジオール希釈液は、1 nM 17 $\beta$ -エストラジオールストック溶液へのアッセイ緩衝液の添加により、濃度範囲 0.625~80  $\mu$ M の 8 段階の濃度が得られるよう調製する。これらの溶液 10  $\mu$ L を、非特異的結合測定専用の 96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験ウェルに添加することで、最終的な試験濃度範囲である 0.0625~8  $\mu$ M を得る（表 2 および表 3 を参照）。非標識 17 $\beta$ -エストラジオール希釈液の調製に関する詳細は、CERI のプロトコール（2）に記述されている。

17.  $40 \pm 10\%$  の特異的結合を示す受容体濃度を用いること（段落 12~13 を参照）。hrER $\alpha$  溶液は氷冷したアッセイ緩衝液を用いて、使用直前一すなわち、全結合、非特異的結合、および放射標識リガンド単独用のウェルすべての準備完了後一に調製すること。

18. 96 ウェルマイクロタイタープレート上では表 2 に示すとおり調製し、<sup>[3]H]-17 $\beta$ -エストラジオール濃度ごとに 3 つのレプリケートで行うこと。<sup>[3]H]-17 $\beta$ -エストラジオール、非標識 17 $\beta$ -エストラジオール、緩衝液、および受容体について、容量の割り付けを表 3 に示す。</sup></sup>

表 2：飽和結合試験でのマイクロタイタープレートのレイアウト

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	TB 測定用			NSB 測定用			放射標識リガンド単独の測定用				プレートカラム 4~6 用の非標識 $E_2$ 希釈液	プレートカラム 1~9 用の <sup>[3]H] <math>E_2</math> 希釈液</sup>
<b>A</b>	0.0313 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	0.0313 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 0.0625 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	0.0313 nM							0.625 $\mu$ M	0.313 nM	
<b>B</b>	0.0625 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	0.0625 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 0.125 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	0.0625 nM							1.25 $\mu$ M	0.625 nM	
<b>C</b>	0.125 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	0.125 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 0.25 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	0.125 nM							2.5 $\mu$ M	1.25 nM	
<b>D</b>	0.250 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	0.250 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 0.5 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	0.250 nM							5 $\mu$ M	2.5 nM	
<b>E</b>	0.50 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	0.50 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 1 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	0.50 nM							10 $\mu$ M	5 nM	
<b>F</b>	1.00 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	1.0 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 2 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	1.00 nM							20 $\mu$ M	10 nM	
<b>G</b>	2.00 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	2.00 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 4 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	2.00 nM							40 $\mu$ M	20 nM	
<b>H</b>	4.00 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + ER</sup>	4.00 nM <sup>[3]H] <math>E_2</math> + 8 <math>\mu</math>M <math>E_2</math> + ER</sup>	4.00 nM							80 $\mu$ M	40 nM	

TB : 全結合

NSB : 非特異的結合

$[^3H]E_2$  :  $[^3H]-17\beta$ -エストラジオール

$E_2$  : 非標識  $17\beta$ -エストラジオール

\*ここで示す濃度は、各ウェルの最終濃度である。

\*\*非標識  $E_2$  および  $[^3H]E_2$  希釀液は、別のプレートでの調製も可。

表 3. 飽和結合試験でのマイクロタイタープレートの試薬量

レーン番号 調製段階	1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
	TB 用ウェル			NSB 用ウェル			放射標識リガンド 単独		
上記反応ウェル の成分量および 添加順	緩衝液	60 $\mu$ L		50 $\mu$ L		90 $\mu$ L			
	表 2 レーン 11 の 非標識 $E_2$		-		10 $\mu$ L			-	
	表 2 レーン 12 の $[^3H]E_2$		10 $\mu$ L		10 $\mu$ L		10 $\mu$ L		
	hrER $\alpha$	30 $\mu$ L		30 $\mu$ L				-	
総反応量		100 $\mu$ L		100 $\mu$ L		100 $\mu$ L			
インキュベーション		2 時間インキュベーション後の反応				調製直後の放射能の 定量。インキュベー ションなし。			
0.4% DCC での処理	あり		あり		あり		なし		
0.4% DCC の容量		100 $\mu$ L		100 $\mu$ L			-		
濾過	あり		あり		あり		なし		
<b>DPM の測定</b>									
シンチレーションカクテルに添加した 定量容量		100 $\mu$ L**		100 $\mu$ L**		50 $\mu$ L			

\* dpm の測定にマイクロプレート用液体シンチレーションカウンター (LSC) を使用する場合、放射標識リガンド単独を TB 用ウェルおよび NSB 用ウェルと同一の試験プレートで調製するのは不適切である。放射標識リガンド単独は、別のプレートで調製すること。

\*\* DCC の分離に遠心分離を用いる場合、DCC の混入を避けるため、上清 50  $\mu$ L を LSC により測定すること。

19. 全結合および非特異的結合測定用の試験用マイクロタイタープレートは、室温 (22~28°C) で 2 時間インキュベートすること。

#### hrER $\alpha$ に結合した $[^3H]-17\beta$ -エストラジオールの測定

20. 2 時間インキュベーション後、氷冷した 0.4% DCC 懸濁液 100  $\mu$ L をウェルに添加することにより、hrER $\alpha$  に結合した  $[^3H]-17\beta$ -エストラジオールを遊離  $[^3H]-17\beta$ -エストラジオールから分離すること。次に、プレートを 10 分間氷上に静置し、マイクロタイタープレート用フィルターへの移動により反応混合物および DCC 懸濁液を濾過して DCC を除去すること。その後、濾液 100  $\mu$ L を LSC 用バイアル内のシンチレーション液に添加し、液体シンチレーション計数によりバイアルごとの壊変毎分 (dpm) を測定すること。

21. マイクロプレート用フィルター入手できない場合、代替として、遠心分離により DCC を除去できる。次に、DCC との接触によるウェルの汚染を回避するため、細心の注意を払い、hrER $\alpha$  に結合した  $[^3H]-17\beta$ -エストラジオール含有上清 50  $\mu$ L を収集し、シンチレーション計数に使用すること。

22. 試験ウェルに添加する  $[^3H]-17\beta$ -エストラジオールの壊変毎分 (dpm) の測定には、放射標識リガンド

ド単独の条件が用いられる。放射能は、調製直後に定量すること。これらのウェルでは、インキュベーションも DCC 懸濁液による処理もせず、その構成成分をシンチレーション液に直接加えること。これらの測定結果により、全結合および非特異的結合について、どれほどの [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールが dpm 単位で一連の各ウェルに添加されたかが立証される。

### 競合結合試験

23. 競合結合試験では、異なる濃度の被験化学物質の存在下で、単一濃度の [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの結合を測定する。1回のランの範囲内で、各濃度 3 つの同時レプリケートを用いること。さらに、被験化学物質ごとに時期を変えて 3 回のランを実施すること。本試験は、1 つまたは複数の 96 ウェルマイクロタイタープレートにおいて設定すること。

#### 対照

24. 本試験を実施する場合、各実験に同時の溶剤および対照（すなわち、基準エストロゲン、弱結合物質、および非結合物質）を含めること。各ランの間 1 プレートにおいて、基準エストロゲンおよび対照物質（すなわち、弱結合物質、および非結合物質）の完全な濃度曲線を用いること。その他すべてのプレートには、(i) 高濃度（最大解離すなわち、放射標識リガンドがほぼ完全に解離する濃度）および中濃度（IC50 程度）の E2 および弱結合物質を 3 つずつ、(ii) 溶剤対照および非特異的結合をそれぞれ 3 つずつ含めること。アッセイ緩衝液、 [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール、 hrER $\alpha$ 、および被験化学物質溶液の調製手順の詳細は、CERI のプロトコール (2) に記述されている。

#### - 溶剤対照 :

25. 溶剤対照は、溶剤が試験系と相互作用せず、全結合 (TB) も測定することを意味する。望ましい溶剤は DMSO である。最大濃度の被験化学物質が DMSO に溶解しない場合、代替として、エタノールを使用できる。最終的な試験ウェルでの DMSO 濃度は 2.05% とすること。被験化学物質の溶解度が低い場合には、最大 2.5%まで上げてもよい。溶剤がさらに高濃度になると本試験に干渉するため、濃度 2.5%超の DMSO は用いないこと。DMSO に溶解しないがエタノールには溶解する被験化学物質の場合、最大 2%のエタノールであれば干渉なしに本試験で使用できる。

#### - 緩衝液対照 :

26. 緩衝液対照 (BC) には、溶剤も被験化学物質を除く、本試験のすべての成分を含めること。緩衝液対照の結果を溶剤対照と比較し、使用する溶剤が本試験系に影響を及ぼさないことを検証する。

#### - 強結合物質（基準エストロゲン）

27. 17 $\beta$ -エストラジオール (CAS 番号 50-28-2) は内因性リガンドであり、ER サブタイプ  $\alpha$  に高い親和性で結合する。hrER $\alpha$  競合結合試験ごとに非標識 17 $\beta$ -エストラジオールを用いた検量線を作成し、同一試験実施施設内で本試験を経時的に実施する場合に、ばらつきを評価可能にすること。非標識 17 $\beta$ -エストラジオール溶液を DMSO およびアッセイ緩衝液中で 8 種類調製し、検量線に用いる試験ウェル内の最終濃度の間隔を 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-8.5</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-9.5</sup>、10<sup>-10</sup>、10<sup>-11</sup> M にすること。最大濃度の非標識 17 $\beta$ -エストラジオール (1  $\mu$ M) は、非特異的結合の指標として機能することになる。この濃度も検量線の一部ではあるが、表 4 では「非特異的結合 (NSB)」の表示により識別される。

#### - 弱結合物質

28. 弱結合物質（ノルエチノドレル (CAS 番号 68-23-5)、または代替であるノルエチンドロン (CAS 番号 68-22-4)）を対象にすることで、各実験の感度を立証し、本試験を経時的に実施する場合に、ばらつきを評価可能にすること。弱結合物質溶液を DMSO およびアッセイ緩衝液中で 8 種類調製し、試験ウェル内の最終濃度を 10<sup>-4.5</sup>、10<sup>-5.5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-6.5</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-7.5</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> M にすること。

#### - 非結合物質

29. オクチルトリエトキシシラン (OTES、CAS 番号 2943-75-1) を、陰性対照 (非結合物質) として用いること。陰性対照は、hrER $\alpha$  に結合しない被験化学物質について、その物質をランとしての本試験が検出することを保証する。非結合物質溶液を DMSO およびアッセイ緩衝液中で 8 種類調製し、試験ウェル内の最終濃度を  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  M とすること。フタル酸ジ-*n*-ブチル (DBP、CAS 番号 84-72-2) を、代替の非結合物質として使用できるが、試験可能な範囲は最大  $10^{-4}$  M までに限られる。本試験での DBP の最大溶解度は、 $10^{-4}$  M であることが立証されている。

#### hrER $\alpha$ 濃度

30.  $40 \pm 10\%$  の特異的結合を示す受容体量を用いること (補遺 3 段落 12~13 を参照)。hrER $\alpha$  溶液は、機能性 hrER $\alpha$  を氷冷したアッセイ緩衝液に希釈することにより、使用直前に調製すること。

#### [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオール

31. 試験ウェル内の [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールの最終濃度は、0.5 nM とすること。

#### 被験化学物質

32. まず、溶解度試験を実施し、各被験化学物質の溶解度限界を判定すると共に、試験プロトコール実施時に用いる適切な濃度範囲を特定する必要がある。各被験化学物質の溶解度限界を最初に溶剤中で測定後、さらに試験条件下で確認する。本試験で試験を行う最終濃度は、1 mM を超えないこと。範囲設定試験は、溶剤対照と共に最大許容濃度 (例: 溶解度限界に基づき 1 mM 以下) から開始する 8 種類以上の対数段階希釈、濁りまたは沈殿の存在の確認などからなる (補遺 3 段落 35 も参照)。試験での濃度範囲が決まつたら、先行する範囲設定試験の定義どおり、適切な間隔の 8 種類の対数濃度を用い、被験化学物質の試験を行うこと。濃度-反応曲線の特性をより明らかにするため必要があれば、2 回目および 3 回目の実験では、適切な場合、濃度をさらに調整すること。

33. 被験化学物質の希釈液は、適切な溶剤を用いて調製すること (補遺 3 段落 25 を参照)。被験化学物質の最大濃度では DMSO、エタノールのいずれにも溶解せず、かつ溶剤をさらに追加することにより最終的なチューブ内の溶剤濃度が許容限界を超えると考えられる場合、最大濃度を次に低い濃度に下げることができる。この場合、一連の濃度の下限において、追加の濃度を加えることができる。一連の濃度の中で、その他の濃度は変えないこと。

34. 被験化学物質溶液を試験ウェルに添加する場合、被験化学物質が試験ウェルへの添加時に沈殿する可能性があるため、厳密に監視すること。沈殿を含むすべてのウェルのデータを曲線適合から除外し、データの除外理由を記述すること。

35. 事前に既存の情報として、他の資料から被験化学物質の  $\log (IC_{50})$  が得られている場合、希釈液には、予測される  $\log (IC_{50})$  前後で、より厳密に幾何級数的な間隔 (すなわち、0.5 対数単位) を設けることが適切であると考えられる。最終的な結果では、結合曲線の特性が十分に明らかにできるよう、「頂点」および「底点」など、 $\log (IC_{50})$  の両側で十分に足る濃度幅を示すこと。

#### 試験プレートの構成

36. ラベル表示したマイクロタイタープレートを準備し、溶剤対照、非特異的結合 (NSB) の指標としても機能する最大濃度の基準エストロゲン (E2)、緩衝液対照、8 濃度の非結合対照 (オクチルトリエトキシシラン)、最大濃度より低い 7 濃度の基準エストロゲン (E2)、8 濃度の弱結合物質 (ノルエチノドレルまたはノルエチンドロン)、および 8 濃度の各被験化学物質 (TC) について、6 つずつインキュベーション結果を用いること。基準エストロゲンおよび対照に関する完全な濃度曲線用に、プレートのレイアウトの例をレイアウト略図にして下表 4 に示す。被験化学物質には追加のマイクロタイタープレートを使用し、プ

レート対照（すなわち、(i) 高濃度（最大解離濃度）および中濃度（IC<sub>50</sub>程度）の E2 および弱結合物質を 3 つずつ、(ii)（全結合として）溶剤対照および非特異的結合をそれぞれ 6 つずつ）を含めること（表 5）。3 種類の未知の被験化学物質を用いた競合結合試験用マイクロタイタープレートのレイアウトのワークシートについて、一例を補遺 3 付録 3 に示す。ワークシート、表 4、および表 5 に示す濃度は、各試験ウェルで用いる最終濃度とする。E2 の最大濃度は  $1 \times 10^{-7}$  M とし、弱結合物質では、プレート 1 で弱結合物質に用いた最大濃度を用いること。IC<sub>50</sub> は、試験実施施設が有する対照の履歴データベースに基づいて測定されなければならない。この値は、バリデーション試験で認められた値（表 1 を参照）と同程度になるものと予測される。

表 4：競合結合試験でのマイクロタイタープレートのレイアウト<sup>1,2</sup>：基準エストロゲンおよび対照の完全な濃度曲線用（プレート 1）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	緩衝液対照および陽性対照（E2）			弱陽性（ノルエチノドレル）		陰性対照（OTES）			TB および NSB			
A	ブランク*			$1 \times 10^{-9}$ M		$1 \times 10^{-10}$ M						
B	E2 ( $1 \times 10^{-11}$ M)			$1 \times 10^{-8}$ M		$1 \times 10^{-9}$ M			TB（溶剤対照） (2.05% DMSO)			
C	E2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			$1 \times 10^{-7.5}$ M		$1 \times 10^{-8}$ M						
D	E2 ( $1 \times 10^{-9.5}$ M)			$1 \times 10^{-7}$ M		$1 \times 10^{-7}$ M			NSB ( $10^{-6}$ M E <sub>2</sub> )			
E	E2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			$1 \times 10^{-6.5}$ M		$1 \times 10^{-6}$ M						
F	E2 ( $1 \times 10^{-8.5}$ M)			$1 \times 10^{-6}$ M		$1 \times 10^{-5}$ M			緩衝液対照			
G	E2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			$1 \times 10^{-5.5}$ M		$1 \times 10^{-4}$ M						
H	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			$1 \times 10^{-4.5}$ M		$1 \times 10^{-3}$ M			ブランク（放射活性量用）**			

<sup>1</sup> 各実験で実行される標準マイクロタイタープレートのサンプル設定。

<sup>2</sup> 本マイクロタイタープレートは、これまでのセクションの諸基準に記載の希釈プレートで調製された希釈液を用いて作製されることに留意すること。

この例では、弱結合物質はノルエチノドレル (NE) とする。

\* 真のブランク。使用されていないウェル。

\*\* インキュベーション中には使用されないブランクであるが、添加された総放射能の確認に使用。

表 5：競合結合試験でのマイクロタイタープレートのレイアウト：被験化学物質 (TC) およびプレート対照用の追加プレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	被験化学物質-1 (TC-1)		被験化学物質-2 (TC-2)		被験化学物質-3 (TC-3)		対照					
<b>A</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-10}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-10}$ M)		E <sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-7}$ M)					
<b>B</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-9}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-9}$ M)		E <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> )					
<b>C</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-8}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-8}$ M)		NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ M)					
<b>D</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		NE (IC <sub>50</sub> )					
<b>E</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-6}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-6}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-6}$ M)		NSB ( $10^{-6}$ M E <sub>2</sub> )					
<b>F</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-5}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-5}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-5}$ M)							
<b>G</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-4}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-4}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-4}$ M)		TB (溶剤対照)					
<b>H</b>	TC-1 ( $1 \times 10^{-3}$ M)		TC-2 ( $1 \times 10^{-3}$ M)		TC-3 ( $1 \times 10^{-3}$ M)							

この例では、弱結合物質はノルエチノドレル (NE) とする。

#### 競合結合試験の完了

37. 全結合用および（放射活性量用）ブランク用のウェルを除き、表 6 に示すとおり、各ウェルにアッセイ緩衝液 50  $\mu$ L を加え、溶剤対照、基準エストロゲン (E<sub>2</sub>)、弱結合物質、非結合物質、および被験化学物質それぞれ 10  $\mu$ L と、5 nM の[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール溶液 10  $\mu$ L とを混合すること。次に、氷冷した受容体溶液 30  $\mu$ L を、各プレートに添加して穏やかに混合する。hrER $\alpha$  溶液は、最後に添加する試薬とすること。アッセイマイクロタイタープレートを、室温 (22~28°C) で 2 時間インキュベートすること。

表 6：hrER 競合結合試験での試験構成要素の容量：マイクロタイタープレート用

レーン番号調整段階		TB 用ウェル以外	TB 用ウェル	ブランク (放射活性量用)
上記反応ウェルの構成成分量および添加順	室温でのアッセイ緩衝液	50 $\mu$ L	60 $\mu$ L	90 $\mu$ L
	非標識 E <sub>2</sub> 、弱結合物質、非結合物質、溶剤、および被験化学物質*	10 $\mu$ L	-	-
	最終濃度が 0.5 nM となる[ <sup>3</sup> H]-17 $\beta$ -エストラジオール (すなわち 5 nM)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
	測定される rER $\alpha$ 濃度 (段落 12~13 を参照)	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L	-
各試験ウェルの合計容量		100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

\*終濃度が許容可能な溶剤濃度になるよう適切に調製。

38. 次に、飽和結合試験の補遺 3 段落 21~23 記載のとおり、各ウェルに氷冷した DCC 懸濁液 100  $\mu$ L を添加することで、hrER $\alpha$  に結合した[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールを遊離[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールから分離後、hrER $\alpha$  に結合した[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの定量を行うこと。

39. ウェル G10~12 および H10~12 (表 4 で「ブランク (放射活性量用)」と認識) は、標識した[<sup>3</sup>H]-エストラジオール 10  $\mu$ L の dpm を表す。シンチレーション液に、10  $\mu$ L ずつ直接添加すること。

**許容基準****飽和結合試験**

40.  $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の濃度上昇を用いた場合、特異的結合曲線がプラトーに達し、リガンドによる hrER $\alpha$  の飽和を示すこと。
41. 0.5 nM の  $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の特異的結合は、ラン全体で添加された総放射能測定結果の平均値の 30~50% の許容範囲内であること。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが一貫してこの範囲外であり、あるいは、特定のランが著しくこの範囲を外れる場合、タンパク質濃度を調整し飽和結合試験を再度実施すること。
42. これらのデータから、線形 Scatchard プロットが得られることになる。
43. 非特異的結合量は過剰でないこと。非特異的結合の値は通常、全結合の 35% 未満であること。ただし、試験した放射標識  $17\beta$ -エストラジオールの最低濃度で極めて低い dpm を測定した場合、非特異的結合量の割合は時にこの範囲を超える可能性がある。

**競合結合試験**

44. 非標識  $17\beta$ -エストラジオールの濃度上昇に伴い、一部位競合結合の様式に従って、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  が受容体から解離する。
45. 基準エストロゲン（すなわち、 $17\beta$ -エストラジオール）の  $\text{IC}_{50}$  は、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  のモル濃度 + 飽和結合試験から求めた  $\text{Kd}$  の値とほぼ同等になるはずである。
46. 各ウェルに添加された総放射能測定濃度の平均値がラン全体で 0.5 nM であった場合、全特異的結合は、一貫して  $40 \pm 10\%$  の許容範囲内であること。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが一貫してこの範囲外であり、あるいは、特定のランが著しくこの範囲を外れる場合、タンパク質濃度を調整すること。
47. 溶剤により、本試験の感度も再現性も変化しないこと。溶剤対照（TB 用ウェル）の結果を緩衝液対照と比較し、使用する溶剤が本試験系に影響を及ぼさないことを検証する。溶剤が本試験に影響を及ぼさない場合、TB および緩衝液対照の結果は同程度になるはずである。
48. 非結合物質では、最大  $10^{-3}$  M (OTES) または  $10^{-4}$  M (DBP) まで試験を行った場合、 $[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{-エストラジオール}$  の hrER $\alpha$  からの解離は 25% を超えないこと。
49. 基準エストロゲンおよび 2 種類の弱結合物質（例：ノルエチノドレル、ノルエチンドロン）を対象に、CERI の hrER 結合試験（参考文献 2 補遺 N）のバリデーション試験データを用いて性能基準が作成された。バリデーション試験に参加した 4 試験実施施設間で実施されたすべての対照でのランについて、平均  $\pm$  SD (n) の 95% 信頼区間が提示されている。95% 信頼区間は、基準エストロゲンおよび弱結合物質の曲線適合パラメータ（すなわち、頂点、底点、ヒル勾配、 $\log (\text{IC}_{50})$ ）、ならびに、弱結合物質の基準エストロゲンに対する  $\log_{10} \text{RBA}$  について算出された。性能基準として使用可能な曲線フィットパラメータについて、予測される範囲を表 1 に示す。実際には、 $\text{IC}_{50}$  の範囲は、実験により得られた受容体標品の  $\text{Kd}$ 、および本試験法に用いられるリガンドの濃度に基づくと、わずかに異なる可能性がある。

50. 被験化学物質となりうる既存の物質は多岐にわたり、また、潜在的な親和性および結果（例：完全な曲線、部分的な曲線、曲線適合なし）にばらつきがあることから、被験化学物質の曲線フィットパラメータに関する性能基準は作成しなかった。ただし、各ランの被験化学物質の結果を検討する場合、専門家の判断を適用すること。競合結合曲線の頂点を明確に定義する（例：90~100% の結合）ため、十分な濃度範囲の被験化学物質を用いること。被験化学物質の各濃度でのレプリケートおよび同時でない 3 回のラン間に

おけるばらつきは、合理的で科学的に正当化できること。被験化学物質の各ランにおける対照は、このCERIの試験法について報告された性能基準に達し、かつそれぞれの試験実施施設ごとの歴史的対照データと一致していること。

## データの分析

### 飽和結合試験

51. 全結合および非特異的結合の両方を測定する。これらの値から、平衡条件下で濃度上昇に伴う $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合量を、全結合量から非特異的結合量を減じることにより算出する。 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ 濃度に対する特異的結合量を示したグラフでは、 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ によるhrER $\alpha$ の飽和を示す最大特異的結合量でプラトーに達すること。さらに、データ分析により、単一の高親和性結合部位への $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の結合について立証すること。非特異的結合量、全結合量、および特異的結合量を飽和結合曲線上に示すこと。これらのデータのさらなる分析では、非線形回帰分析（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）を用い、最終的なデータをScatchardプロットとして示すこと。

52. データ分析では、別のある方法の使用が正当化される場合を除き、非特異的結合が線形であるとの仮定を用い、全結合データのみから $B_{\text{max}}$ および $K_d$ を求める。また、正当化されない限り、最良適合を判定する場合、ロバスト回帰を用いること。ロバスト回帰に向け選択した方法を記載すること。飽和結合データから $B_{\text{max}}$ および $K_d$ を求める場合、リガンド枯渇の補正（例：Swillens 1995の方法を使用）を常に用いること。

### 競合結合試験

53. 競合結合曲線は、競合物質の濃度（log 10 単位）に対する $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合量としてプロットされる。 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の最大の特異的結合を50%阻害する被験化学物質の濃度が、 $IC_{50}$ 値である。

54. 非線形曲線用の適切な曲線フィットソフトウェア（例：BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995）を用いて、4つのパラメータをヒルの式にあてはめ、陽性対照（例：基準エストロゲンおよび弱結合物質）の $\log (IC_{50})$ 推定値を求める。これらの曲線をあてはめる場合、頂点、底点、勾配、および $\log (IC_{50})$ には通常制約をつけないこと。正当化されない限り、最良適合を判定する場合、ロバスト回帰を用いること。リガンド枯渇の補正は用いないこと。初回の分析に続き、各結合曲線がモデルへ適切にフィットするよう検討すること。弱結合物質の相対結合親和性（RBA）を、 $17\beta\text{-エストラジオール}$ の $\log (IC_{50})$ に対する弱結合物質の $\log (IC_{50})$ の割合（%）として算出すること。陽性対照および非結合対照の結果は、本補遺3段落44～49記載の本試験法における性能基準を用いて評価すること。

55. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されることを保証するため、すべての被験化学物質のデータを段階的アプローチにより分析すること。被験化学物質の各ランでは、まず対照である基準エストロゲンおよび弱結合物質に用いたデータ分析と同一の標準化されたデータ分析を行うことが推奨される（本補遺3段落54を参照）。完了したら、各ランについてデータと作成した競合結合曲線との適合の程度について、曲線フィットパラメータの技術的検討および目視による検討結果から導くこと。本技術的検討において、 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合率（%）に濃度依存性の低下が認められること、被験化学物質濃度ごとのテクニカルレプリケート間のばらつきの少なさ、および3回のラン間における曲線適合パラメータの一貫性が認められることは、本試験およびデータ分析が適切に行われたことを示す良好な指標となる。

### データの解釈

56. すべての許容基準を満たすという条件下では、結合曲線が適合可能であり、かつデータ範囲内の反応曲線の最小値が50%未満にあれば、被験化学物質はhrER $\alpha$ の結合物質であると判定する（図1）。

57. すべての許容基準を満たすという条件下では、以下の場合、被験化学物質は hrER $\alpha$  の非結合物質と判定する：

- 結合曲線が適合可能であり、かつ適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%超にある、または
- 結合曲線が適合不能であり、かつデータ内のある濃度群における結合割合（%）の非平滑化平均の最低値が 75%超にある。

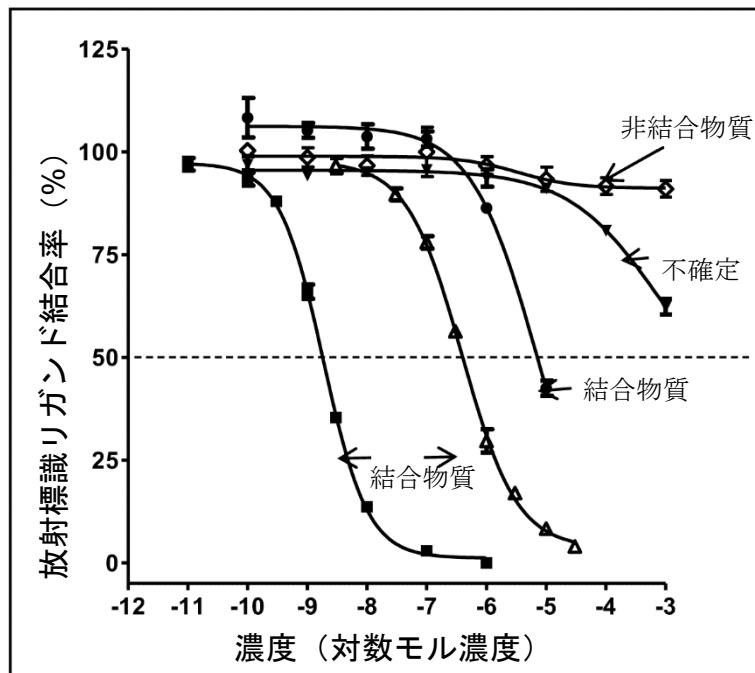
58. 上記条件のいずれも満たさない場合（例：適合した反応曲線の最小値が 76~51%の間にある）、被験化学物質は不確定と判定する。

表 7. 被験化学物質の競合結合曲線に基づく分類の割り当て基準

分類	基準
結合物質 <sup>a</sup>	結合曲線が適合可能。 <ul style="list-style-type: none"> <li>データ範囲内での反応曲線の最小値が 50%未満。</li> </ul>
非結合物質 <sup>b</sup>	結合曲線が適合可能である場合、 <ul style="list-style-type: none"> <li>データ範囲内でのこの適合した反応曲線の最小値が 75%超。</li> </ul> 結合曲線が適合不能である場合、 <ul style="list-style-type: none"> <li>データ内のある濃度群における結合割合（%）の非平滑化平均の最低値が 75%超。</li> </ul>
不確定 <sup>c</sup>	結合物質でも非結合物質でもない試験可能なラン（例：適合した反応曲線の最小値が 76~51%の間）

訳者注：原著 a,b,c 脚注なし

図 1. 競合結合曲線を用いた被験化学物質の分類例



59. 被験化学物質について試験実施施設内で行われた複数のランは、表 8 に示すとおり、ランごとに数値を割り当て、ラン全体での平均値を求めて統合する。試験実施施設内ごとに統合したランの結果を、各被験化学物質について予測される分類と比較する。

表 8. 試験実施施設内で複数のランを用いた被験化学物質の分類法

ランごとに割り当てる数値：	
分類	数値
結合物質	2
不確定	1
非結合物質	0
ラン全体での数値の平均値の分類：	
分類	数値
結合物質	平均値 $\geq 1.5$
不確定	$0.5 \leq$ 平均値 $< 1.5$
非結合物質	平均値 $< 0.5$

### 試験報告書

60. 本試験ガイドラインの「hrER 結合試験法の構成要素」の段落 22(p9)を参照。

## 付録 1：用語一覧

[<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>：トリチウムで放射標識した 17 $\beta$ -エストラジオール

DCC：デキストラン被覆活性炭

E<sub>2</sub>：非標識 17 $\beta$ -エストラジオール（不活性）

アッセイ緩衝液：1mM EDTA、1mM EGTA、1mM NaVO<sub>3</sub>、10%グリセロール、0.2 mM ロイペプチ、1mM ジチオスレイトール、および 10 mg/mL ウシ血清アルブミン含有 10 mM Tris-HCl、pH 7.4

hrER $\alpha$ ：ヒト組み換えエストロゲン受容体  $\alpha$ （リガンド結合ドメイン）

レプリケート：同一濃度で同一成分を含み、1回のランの範囲内で同時に試験される複数ウェルの 1つ。本プロトコールでは、被験化学物質の各濃度は 3つずつ試験する。すなわち、被験化学物質の各濃度で同時に試験されるレプリケートが 3つ存在する。

ラン：マイクロタイタープレートにより同時に実行される試験ウェル一式のことで、被験化学物質の hrER $\alpha$ への結合を特徴づけるのに必要なすべての情報（すなわち、様々な濃度の被験化学物質で試験ウェルに添加された [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールの全量、[<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオールと hrER $\alpha$ との最大結合量、非特異的結合量、および全結合量）を提供する。1回のランは、1濃度当たりわずか 1つの試験ウェル（すなわち、レプリケート）からなると考えられるが、本プロトコールは 3つずつでの試験実施を要するため、1回のランは濃度ごとに 3つの試験ウェルからなる。さらに、本プロトコールでは、化学物質ごとに 3回の独立した（すなわち、同時でない）ランを必要とする。

## 付録 2：競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート	位置	レプリケート	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度コード	競合物質初期濃度 (M)	hrERストック溶液 (μL)	緩衝液容量 (μL)	トレーサー (放射性E2) 容量	希釈プレートからの容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質最終濃度
S	A1	1	ブランク	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	ブランク	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	ブランク	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	非放射性 E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	非放射性 E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	非放射性 E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	非放射性 E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	非放射性 E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	非放射性 E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	非放射性 E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	非放射性 E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	非放射性 E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	非放射性 E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	非放射性 E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	非放射性 E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	非放射性 E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	非放射性 E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	非放射性 E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	非放射性 E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	非放射性 E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	非放射性 E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	非放射性 E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	非放射性 E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	非放射性 E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	ノルエチノドレル	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	ノルエチノドレル	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	ノルエチノドレル	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	ノルエチノドレル	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	ノルエチノドレル	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	ノルエチノドレル	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	ノルエチノドレル	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	ノルエチノドレル	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	ノルエチノドレル	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	ノルエチノドレル	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	ノルエチノドレル	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	ノルエチノドレル	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	ノルエチノドレル	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	ノルエチノドレル	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	ノルエチノドレル	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	ノルエチノドレル	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	ノルエチノドレル	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	ノルエチノドレル	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	ノルエチノドレル	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	ノルエチノドレル	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	ノルエチノドレル	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

## 競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート	位置	レプリケート	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度コード	競合物質初期濃度 (M)	hrERストック溶液 (μL)	緩衝液容量 (μL)	トレーサー(放射性E2)容量 (μL)	希釈プレートからの容量 (μL)	最終容量 (μL)	競合物質最終濃度
S	H4	1	ノルエチノド렐	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	ノルエチノド렐	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	ノルエチノド렐	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D BP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	全結合	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	全結合	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	全結合	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	全結合	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	全結合	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	全結合	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	非放射性E2(高)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	非放射性E2(高)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	非放射性E2(高)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	非放射性E2(高)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	非放射性E2(高)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	非放射性E2(高)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	緩衝液対照	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	緩衝液対照	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	緩衝液対照	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	緩衝液対照	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	緩衝液対照	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	緩衝液対照	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	ブランク(放射活性量用)	Hot	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	ブランク(放射活性量用)	Hot	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	ブランク(放射活性量用)	Hot	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	ブランク(放射活性量用)	Hot	H4	-	90	-	10	-	100	-

S	H11*	5	ブランク (放射活性量用)	Hot	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	ブランク (放射活性量用)	Hot	H6	-	90	-	10	-	100	-

\*: 「Hot」と記載のウェルは、インキュベーション中、空であることに留意すること。シンチレーションの計数にのみ 10  $\mu\text{L}$  を添加する。

### 競合結合試験でのウェルのレイアウト

プレート	位置	レプリケート	ウェルタイプ	ウェルコード	濃度コード	競合物質初期濃度 (M)	hrERストック溶液 ( $\mu\text{L}$ )	緩衝液容量 ( $\mu\text{L}$ )	トレーサー (放射性E2) 容量 ( $\mu\text{L}$ )	希釈プレートからの容量 ( $\mu\text{L}$ )	最終容量 ( $\mu\text{L}$ )	競合物質最終濃度
P1	A1	1	未知 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	未知 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	未知 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	未知 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	未知 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	未知 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	未知 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	未知 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	未知 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	未知 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	未知 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	未知 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	未知 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	未知 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	未知 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	未知 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	未知 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	未知 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	未知 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	未知 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	未知 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	未知 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	未知 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	未知 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	未知 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	未知 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	未知 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	未知 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	未知 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	未知 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	未知 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	未知 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	未知 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	未知 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	未知 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	未知 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	未知 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	未知 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	未知 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	未知 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	未知 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	未知 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	未知 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	未知 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04

P1	G6	3	未知 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	未知 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	未知 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	未知 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	未知 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	未知 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	未知 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	未知 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	未知 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	未知 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	未知 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	未知 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	未知 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	未知 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	未知 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	未知 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	未知 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	未知 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	未知 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	未知 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	未知 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	未知 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	未知 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	未知 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	未知 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	未知 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	未知 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	未知 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	対照 E2 (最大)	S	E2max	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	対照 E2 (最大)	S	E2max	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	対照 E2 (最大)	S	E2max	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	対照 E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub>	E2IC <sub>50</sub> x10	30	50	10	10	100	E2IC <sub>50</sub>
P1	B11	2	対照 E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub>	E2IC <sub>50</sub> x10	30	50	10	10	100	E2IC <sub>50</sub>
P1	B12	3	対照 E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub>	E2IC <sub>50</sub> x10	30	50	10	10	100	E2IC <sub>50</sub>
P1	C10	1	対照 NE (最大)	S	Nemax	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	対照 NE (最大)	S	Nemax	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	対照 NE (最大)	S	Nemax	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	対照 NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub>	NEIC <sub>50</sub>	30	50	10	10	100	NEIC <sub>50</sub>
P1	D11	2	対照 NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub>	NEIC <sub>50</sub>	30	50	10	10	100	NEIC <sub>50</sub>
P1	D12	3	対照 NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub>	NEIC <sub>50</sub>	30	50	10	10	100	NEIC <sub>50</sub>
P1	E10	1	非放射性 E2 (高)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	非放射性 E2 (高)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	非放射性 E2 (高)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	非放射性 E2 (高)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	非放射性 E2 (高)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	非放射性 E2 (高)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	全結合	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	全結合	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	全結合	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	全結合	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-

P1	H11	5	全結合	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	全結合	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

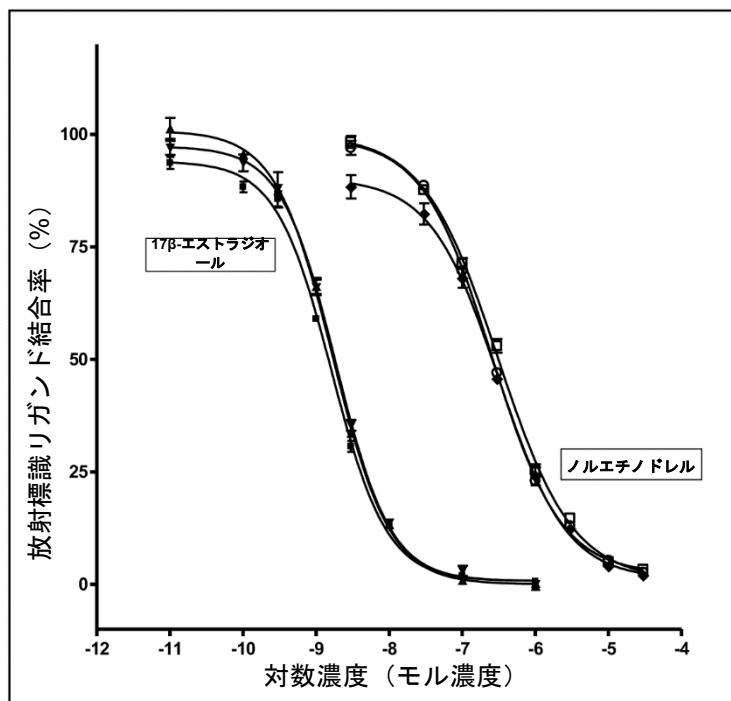
補遺 4 : hrER $\alpha$  競合結合試験のデータ分析について考慮すべき事項

1. hrER $\alpha$  競合結合試験では、被験化学物質の濃度を上昇させながら、単一濃度の [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールの結合を測定する。競合結合曲線は、競合物質の濃度 (log 10 単位) に対する [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールの特異的結合量としてプロットされる。 [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールの最大の特異的結合を 50% 阻害する被験化学物質の濃度が、IC<sub>50</sub> である。

## 基準エストロゲンおよび弱結合物質のデータ分析 (1)

2. さらなる分析のため、対照でのランのデータを変換する (すなわち、対照化学物質に対する [ $^3$ H]-17 $\beta$ -エストラジオールの特異的結合率 (%) および対数濃度)。非線形曲線用の適切な曲線フィットソフトウェア (すなわち、BioSoft 社 GraphPad Prism など) を用いて、4 つのパラメータをヒルの式に適合させることで、陽性対照 (例: 基準エストロゲンおよび弱結合物質) の log (IC<sub>50</sub>) 推定値を求める (2)。これらの曲線をあてはめる場合、頂点、底点、勾配、および log (IC<sub>50</sub>) には通常制約をつけられない。正当化されない限り、最良適合を判定する場合、ロバスト回帰を用いること。ロバスト回帰に向け選択した方法を記載すること。リガンド枯渇に対する補正は、FW および CERI の hrER 試験法では必要とされなかつたが、必要であれば検討できる。初回の分析に続き、各結合曲線が、モデルへ適切にフィットするよう検討する。弱結合物質の相対結合親和性 (RBA) は、17 $\beta$ -エストラジオールの log (IC<sub>50</sub>) に対する弱結合物質の log (IC<sub>50</sub>) の割合 (%) として算出できる。陽性対照および非結合対照の結果は、PBTG (段落 20)、補遺 2 (FW の試験、段落 41~51)、および補遺 3 (CERI の試験、段落 41~51) 記載の試験法の性能基準および許容基準を用いて評価すること。基準エストロゲンおよび弱結合物質での 3 回のランの例を、図 1 に示す。

図 1. 基準エストロゲンおよび対照である弱結合物質の競合結合曲線の例

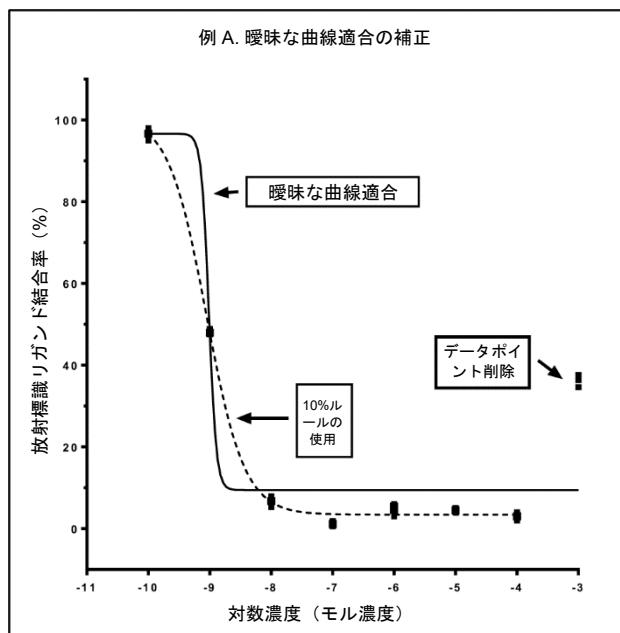


## 被験化学物質のデータ分析

3. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されることを保証するため、すべての被験化学物質のデータを段階的アプローチにより分析すること。被験化学物質の各ランでは、まず対照である基準エストロゲンおよび弱結合物質に用いたデータ分析と同一の標準化されたデータ分析を行うこと。完了したら、各ランについてデータと作成した競合結合曲線との適合の程度について、曲線フィットパラメータの技術的検討および目視による検討結果から導くこと。本技術的検討において、 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合率（%）の濃度依存性の低下が認められること、化学物質濃度ごとのテクニカルレプリケート間のばらつきの少なさ、および3回のラン間における曲線適合パラメータの一貫性が認められることは、本試験およびデータ分析が適切に行われたことを示す良好な指標となる。各ランの被験化学物質の結果を検討する場合、専門家の判断を適用し、また、各被験化学物質を結合物質または非結合物質に分類するため用いられたデータは、科学的に正当化できること。

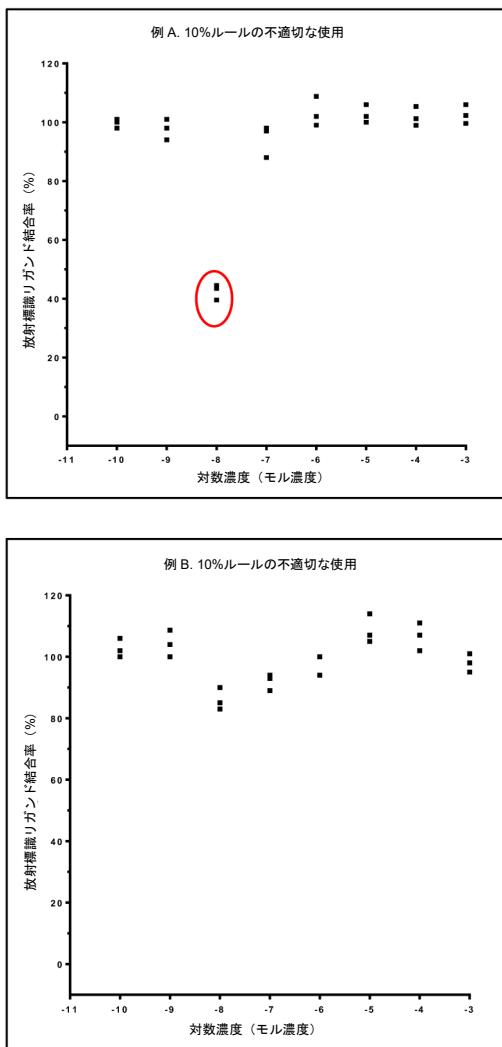
4. 時に、hrER 結合データを適切に分析および解釈するため、さらに注意を要するデータの例がある。過去の研究から、化学物質を最大濃度で試験した場合、特異的結合率（%）の上昇により、受容体競合結合データの分析および解釈が困難になりうるケースが示された（図 2）。このことは、多くの受容体競合結合試験のプロトコールを用いる場合、遭遇してきた周知の問題である（3）。こうしたケースでは、濃度依存的反応がより低濃度では認められるが、被験化学物質濃度が溶解度限界に近づくにつれ、 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の解離による低下がもはや認められなくなる。その場合、データがより高濃度になると、本試験が生物学的限界に達したことを示す。例えば、この現象は、化学物質の高濃度での不溶性および沈殿と関連していることが多く、あるいは、化学物質の最大濃度での分離手順の間、デキストラン被覆活性炭による非結合放射標識リガンドの捕捉能超過を反映していることも考えられる。競合結合データをシグモイド曲線に適合させる際、こうしたデータポイントを残しておくと、時に、被験化学物質の ER 結合性を誤って判定してしまう可能性もある（図 2）。これを避けるため、FW および CERI の hrER 結合試験のプロトコールには、 $[^3\text{H}]\text{-}17\beta\text{-エストラジオール}$ の特異的結合率（%）について、レプリケートの平均値が、低濃度で認められた平均値より 10%以上高い場合、分析データポイントから除外する選択肢（すなわち、この選択肢は、一般に 10%ルールと呼ばれる）が含まれている。10%ルールは任意の曲線について 1 回のみ使用でき、曲線を正しく分類できるよう、6 種類以上の濃度データが残っていなければならない。

図 2. 10%ルール使用時と不使用時の競合結合曲線の例



5. こうした曲線を補正する 10%ルールの適切な使用については慎重に検討し、hrER 結合物質である可能性が濃厚である場合に備えておくこと。FW の hrER 結合試験について、バリデーション試験用の実験実施中、10%ルールが時に意図的でない予期しない結果をもたらすことが認められた。受容体と相互作用しない化学物質（すなわち、真の非結合物質）は、試験した濃度範囲全体で、100%前後の放射標識リガンド結合率の変動が 10%を超えることが頻繁に観察された。最小値が低濃度で生じた場合、それを上回るすべての高濃度データは、当該化学物質が非結合物質であることを確立するにはそれらの濃度が有用であると考えられるにも関わらず、10%ルールの使用により、可能性として分析から削除されることが考えられる。10%ルールの使用が不適切な例を、図 3 に示す。

図 3. 10%ルールの使用が不適切な競合結合データの例



### References

- OECD (2015), *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ )*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Motulsky H. and Christopoulos A. (2003), *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. [Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf)
- Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006), *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.