OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.455

化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体-αの転写活性化試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2009), Test No. 455: Stably Transfected Human Estrogen Receptor-α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-455-2009.pdf.

©OECD(2009)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2009 年 9 月 7 日採択

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

化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体-αの転写活性化試験

はじめに

1. OECD（経済協力開発機構）では、1998 年に重点活動項目の 1 つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のためのテストガイドラインに関し、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 の概念枠組みは、5 つのレベルから構成され、それぞれ異なった生物学的複雑性のレベルに対応している(1)。本試験ガイドラインで説明する転写活性化（TA）試験は、レベル 2 の「機構に関する情報をもたらす *in vitro* 試験」に当たる。日本の化学物質評価研究機構（CERI）が、安定的形質移入による転写活性化試験の妥当性確認研究を hERα-HeLa-9903 細胞株を用いて実施し、ヒトエストロゲン受容体アルファ（hERα）を介してエストロゲンアゴニスト活性を検出する試みを行い、実施目的に関する、試験の適合性および信頼性を証明している(2)。

2. *In vitro* での TA 試験の原理は、ある化学物質が特異的な受容体に結合し、下流遺伝子の転写活性化を引き起こすことによってもたらされるレポーター遺伝子産物の生成に基づいている。レポーター遺伝子の活性化を利用する TA 試験は、エストロゲン受容体（ER）のような特異的な核内受容体によって制御される特異的な遺伝子発現を評価するスクリーニング試験としてこれまで長く使用されてきた(3)(4)(5)(6)。これらのスクリーニング試験は、ER によって制御されるエストロゲンによる転写活性化の検出法として推奨されてきた(7)(8)(9)。核内 ER には異なる遺伝子でコードされた、それぞれα、βと呼ばれる 2 種類のサブタイプが少なくともあり、互いに組織分布、相対的なリガンド結合親和性および生物学的機能が異なっている。古典的なエストロゲン応答を介在するのは核内 ERαであり、このため ER の活性化測定用に現在開発されているモデルは主に ERαを対象としている。TA 試験の目的は、ある化学物質に ERαのリガンドとして機能し、アゴニスト応答を活性化する性質があるかどうかを評価し、スクリーニングまたは優先順位付けを行うことであり、さらに機構に関する情報を得て証拠の重み付けアプローチに使用することも可能である。

3. 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。

最初に考慮すべき事項および限界

4. エストロゲン作用薬は ER のリガンドとして働き、エストロゲン応答遺伝子の転写を活性化する。この相互作用は、エストロゲンの制御を受けるシステムをかく乱することにより、健康上有害な作用を引き起こす可能性を有している。本試験ガイドラインは、hERαが介在する転写活性化を評価する試験についての説明である。この転写活性化過程は、健康被害をもたらす内分泌かく乱作用のきわめて重要なメカニズムの 1 つと考えられているが、このほかにも重要な内分泌かく乱メカニズムがいくつか存在しており、たとえば（i）内分泌系と関連している他の核内受容体を介したステロイド産生酵素との相互作用を通した作用、（ii）ホルモンの代謝活性化・不活性化作用、（iii）ホルモンの標的組織への分布、（iv）ホルモンの体外への排出などが挙げられる。本試験ガイドラインでは、もっぱらエストロゲン作用薬が hERαに結合することにより引き起こされるエストロゲンにより制御されるレポーター遺伝子の転写活性化を対象として取り扱っており、よって、本テストガイドラインを細胞過程のエストロゲン制御を検討する複雑な *in vivo* 実験系に直接外挿してはならない。また、本試験ガイドラインは、hERαと拮抗薬との相互作用および

© OECD（2009 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

これが転写にもたらす作用については対象としていない。

5. 本試験法は、エンドポイントとして化学発光を測定することにより、hERαが介在する転写活性化を特異的に検出できるよう設計されている。しかしながら、植物エストロゲンの濃度が 1 μM を超えた場合、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の過活性化により受容体非介在性の発光シグナルが生じることが報告されている(10)(11)。用量反応曲線によると、低濃度の場合には ER システムの真の活性化が見られることが示されているが、ER の安定的形質移入による TA 試験を行う場合には、植物エストロゲンまたはルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に対し、植物エストロゲン様の過活性化を引き起こす疑いのある類似化合物が高濃度に存在する場合に得られるルシフェラーゼ発現を注意深く検査する必要がある（補遺 2）。

6. hERα-HeLa-9903 細胞株を使用する本試験は、現在までに開発され妥当性が確認されている数種類の ER 転写活性化試験法の 1 つにすぎないことがわかっている。このため、全般的な試験性能に基づく試験ガイドラインが開発され認可されたら、できる限り速やかに本試験ガイドラインと差し替えることを目指している。

試験の概要

7. レポーター遺伝子技術を用いる TA 試験は、機構に関するデータを提供する *in vitro* 手法である。本試験は、エストロゲン受容体のリガンドとの結合を信号化する目的で使用される。リガンドと結合すると、受容体-リガンド複合体は細胞核へ移行し、そこで特異的な DNA 応答要素と結合し、ホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子の転写活性化を引き起こすことによりルシフェラーゼ酵素の細胞内発現量を増加させる。ルシフェリンはルシフェラーゼ酵素の基質であり、本酵素により照度計での定量的測定が可能な生物発光生成物に変換される。ルシフェラーゼ活性は、市販されている数多くの試験キットを用いることで速やかにかつ低廉な費用で測定することができる。

8. 本試験ガイドラインで取り上げる試験システムで使用される hERα-HeLa-9903 細胞株は、ヒトの子宮頚癌に由来するもので、次の 2 種類の構成体を安定的に挿入されている：（i）hERα 発現構成体（ヒト受容体の全体をコード）および（ii）マウスのメタロチオネイン（MT）遺伝子のプロモーター部位である TATA エレメントによって駆動される、ビテロゲニン由来のエストロゲン応答エレメント（ERE）のタンデムリピートを 5 個含むホタルルシフェラーゼのレポーター構成体。マウス MT の TATA 遺伝子構成体は、最も良好な試験性能を有することが確認されており、このため広く使用されている。そのため、hERα-HeLa-9903 細胞株を用いることにより、被験化学物質が有する hERα介在によるルシフェラーゼ遺伝子発現の転写活性化を誘発する能力を測定することができる。

9. 本試験のデータ判定は、被験化学物質によってもたらされる最大応答レベルが陽性対照（PC）である 17β-エストラジオール（E2）を最大誘発濃度（1 nM）で添加した場合に引き起こされるアゴニスト応答の 10%（すなわち、PC10）と同等、またはそれ以上であるかどうかに基づいて行われる。データの解析および判定については、段落 34～45 でより詳しく説明している。

手順

細胞株

10. 試験には、安定に形質移入したhERα-HeLa-9903 細胞株を使用する必要がある。本細胞株は、JCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）細胞バンク [1]から、物質移動合意書（MTA; Material Transfer Agreement）に署名した上で入手することができる。

[1] JCRB 細胞バンク：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7－6－8　医薬基盤研究所
ファクシミリ：072-641-9812

11. 試験には、マイコプラズマフリーであることが確認された細胞のみを使用すること。RT PCR（リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応）がマイコプラズマ感染の高感度な検出法の選択肢として挙げられる(12)(13)(14)。

細胞株の安定性

12. 細胞株の安定性をモニターするため、17β-エストラジオール（E2）、17α-エストラジオールおよびコルチコステロンを参照化学物質として用い、表 1 に示す試験用濃度範囲に完全に対応した濃度反応曲線を、試験を実施するたびに少なくとも 1 回測定し、表 1 に提示した結果と一致する結果が得られる必要がある。

細胞培養および培養条件

13. 細胞はフェノールレッドを含まないイーグル最少必須培地（EMEM）に、60 mg/L のカナマイシン（抗生物質）、10%のチャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清（DCC-FBS）を添加した培地に入れ、37 ± 1°C に設定した CO_2 インキュベータ（5% CO_2）にて維持する。細胞密集度が 75～90%に達すると、1 mL あたり 0.4×10^5～1×10^5 個の細胞を含む液 10 mL を採り、100 mm の細胞培養ディッシュに移してサブカルチャーを行うことができる。細胞は 10% FBS-EMEM（DCC-FBS を添加した EMEM）に懸濁し、マイクロプレートのウェルに 1×10^4 細胞/100 µL/ウェルの密度で播く。次に細胞を 5% CO_2 インキュベータ内に入れ、37 ± 1°C で 3 時間、プレインキュベーションを行ってから化学物質処理を行う。プラスチック製品は、エストロゲン活性を有さないものを使用すること。

14. 応答の完全性を維持するため、細胞は凍結保存状態から取り出した後、条件培地にて 2 代以上継代させる。ただし、継代回数は 40 代を超えないようにする。hERα-HeLa-9903 細胞株の場合、3 カ月足らずで 40 代に達する。

15. DCC-FBS は、補遺 3 の説明に従って調製することもできるし、市販されているものを購入してもよい。

許容基準

陽性および陰性の参照化学物質

16. 試験前および試験期間中には、試験系の応答性の検証を強力なエストロゲン（E2）、弱いエストロゲン（17α-エストラジオール）、きわめて弱い作用薬（17α-メチルテストステロン）および陰性化合物（コルチコステロン）を適切な濃度で用いて行う必要がある。検証試験で得られた許容値の範囲を表 1 に示す(2)。これら 4 種類の参照化学物質について同時に行う検証は、実験のたびに行い、結果が規定の許容範囲内に収まらなければならない。もし収まらなかった場合には、許容基準を満たせなかった原因を特定し（細胞の取り扱い上の問題、血清や抗生物質の品質または濃度の問題等）、試験をやり直す。許容基準を満たせた場合には、EC50、PC50 および PC10 の値のばらつきを最小限に抑えるため、常に同じ材料を使用して細胞培養を行うようにする。3 種類の陽性参照化学物質による PC10 値が許容基準内に収まるとともに、算出される PC50 および EC50 もまた許容基準内に収まらなければならないことから、4 種類の参照化学物質を用いた同時並行検証を実験ごとに（材料、細胞の継代数の程度、および実施者を同一にそろえた条件下で）行うことで、試験の感度を保証することができる（表 1 参照）。

© OCDE（2009 年）

表 1. 安定的形質移入による転写活性化（STTA）試験に用いる 4 種類の参照化学物質の許容値の範囲（平均 ± 2SD［SD：標準偏差］）

化学物質名	logPC50	logPC10	logEC50	ヒル勾配	被験範囲
17β-エストラジオール（E2） CAS 番号：50-28-2	-11.4～-10.1	<-11	-11.3～-10.1	0.7～1.5	10^{-14}～18^{-8}M
17α-エストラジオール CAS 番号：57-91-0	-9.6～-8.1	-10.7～-9.3	-9.6～-8.4	0.9～2.0	10^{-12}～10^{-6}M
コルチコステロン CAS 番号：50-22-6	-	-	-	-	10^{-10}～10^{-4}M
17α-メチルテストステロン CAS 番号：58-18-4	-6.0～-5.1	-8.0～-6.2	-	-	10^{-11}～10^{-5}M

陽性対照および溶媒対照

17. 陽性対照（PC）（1 nM の E2）の試験は、プレートごとに少なくとも 3 連により実施する。被験化学物質の溶解に用いる溶媒も、溶媒対照（VC）として、プレートごとに少なくとも 3 連により試験する。PC を溶解する溶媒が被験化学物質に用いる上記 VC と異なる場合には、さらにこの VC についても PC と同じプレート上で少なくとも 3 連により試験を行う。

誘導倍率（発光量）

18. PC（1 nM の E2）の平均ルシフェラーゼ活性は、各プレートにおいて平均 VC の値の少なくとも 4 倍はなければならない。この基準は、検証試験で得られたエンドポイント値の信頼性に基づいて設定された（既存データでは 4 倍から 30 倍の間）。

19. 試験の品質管理に関して、同時対照 PC（1 nM の E2）の PC10 値に対応する誘導倍率は同時対照 VC の誘導倍率値（= 1）の「1 + 2SD」に当たる数値よりも大きくなければならない。優先順位付けを目的とする場合、PC10 値は必要なデータ解析を統計解析に比べてより簡略化する上で有用となる。統計解析は有意性に関する情報は得られるものの、この種の解析は濃度に基づく活性に関する量的パラメータではなく、したがって優先順位付けを目的とした場合の有用性は高くない。

実験室技能証明用の化学物質

20. STTA 試験で未知の化学物質を試験する前に、試験系の応答性を各実験室で確認する。確認は、凍結保存状態から取り出した新規に調製したバッチの細胞ストックのそれぞれについて少なくとも 1 回、表 2 に示した 10 種類の技能試験用化学物質を独立に試験することにより行う。この確認作業は日を改めて少なくとも 2 回実施し、結果は表 2 と同等となる必要があり、逸脱に対しては妥当性を明示する。

表 2. 技能試験用化学物質の一覧表

化合物名	CAS 番号	クラス [2]	試験濃度範囲	注記
ジエチルスチルベストロール（DES）	56-53-1	陽性	10^{-14} – 10^{-8}M	
17α-エチニルエストラジオール（EE）	57-63-6	陽性	10^{-14} – 10^{-8}M	
ヘキセストロール	84-16-2	陽性	10^{-13} – 10^{-7}M	
ゲニステイン	446-72-0	陽性	10^{-12} – 10^{-5}M	（0.01）[4]、0.1 および 1 mM で細胞毒性
エストロン	53-16-7	陽性	10^{-12} – 10^{-6}M	
ブチルパラベン	94-26-8	陽性	10^{-11} – 10^{-4}M	（0.1）[4] および 1 mM で細胞毒性
1, 3, 5-トリス（4-ヒドロキシフェニル）ベンゼン [1]	15797-52-1	陽性	10^{-12} – 10^{-5}M	100 μM で細胞毒性。PC_{max}: PC の約 15%。hERαと結合し、ER 拮抗作用を有する。
フタル酸ジブチル（DBP）	84-72-2	陰性 [3]	10^{-11} – 10^{-4}M	1 mM で細胞毒性
アトラジン	1912-24-9	陰性	10^{-11} – 10^{-4}M	1 mM で細胞毒性 [4]
コルチコステロン	50-22-6	陰性	10^{-10} – 10^{-4}M	1 mM で細胞毒性を示さない場合、これを最大試験濃度とする。

[1] 溶解度と細胞毒性を試す目的で選択した化合物

[2] 陽性と陰性の定義については表 5 を参照。

[3] ERα介在性の転写活性化については陰性であるが、ERα非介在性の転写活性化については陰性ではない場合がある。このため、DBP を用いる本試験で陽性の結果が得られた場合、当該試験系が純粋に ERαを介したもの以外の活性を検出していることを示すため、この結果は受け入れられない。

[4] 80%に近い細胞毒性を示す。

溶媒

21. さまざまな陽性対照、陰性対照および被験化学物質に使用しているものと同濃度のジメチルスルホキシド（DMSO）または他の適切な溶媒を同時対照 VC として用いる。被験物質は当該物質を溶解することができ、細胞培地と混和可能な溶媒に溶解する。適切な溶媒としては、水、エタノール（純度：95～100%）および DMSO が挙げられる。DMSO を使用する場合は、濃度が 0.1%（v/v）を超えないようにする。いずれの溶媒についても使用される最大容量で細胞毒性を示さず、試験性能を妨害しないことを証明しておかなければならない。

被験化学物質の調製

22. 通常、被験化学物質は DMSO または他の適切な溶媒に溶解し、さらに同じ溶媒を用いて、1:10 の公比で順次希釈を行い、培地での希釈溶液を調製する。

© OCDE（2009 年）

溶解性と細胞毒性：範囲設定のための検討

23. 予備的試験を実施し、被験化学物質について適切な濃度範囲を決定するとともに、これらの化学物質に溶解性および細胞毒性上の問題がないかどうかを確認する。まず、1 μL/mL、1 mg/mL、1 mM のうち、最も低い濃度にあたるものを最大濃度として化学物質の試験を行う。予備的試験で認められた細胞毒性または溶解性の欠如の程度に基づき、初回の確定用ランを実施し、最大許容濃度（1 mM、100 μM、10 μM 等）からの対数段階希釈法により化学物質を試験し、混濁や沈殿または細胞毒性の徴候の有無を確認する。2 回目、必要があれば 3 回目の確定用ランにおいては化学物質の濃度を適切に調整して濃度反応曲線をさらに良好に推定し、不溶性となる、または過剰な細胞毒性を引き起こすことが示された濃度を除外する。

24. ER アゴニストについては、高いレベルの細胞毒性があると典型的なシグモイド応答を有意に変化させたり、認められなくする場合があるため、データを解釈する際には考慮に入れる必要がある。細胞毒性の試験法は 80%の細胞生存率に関する情報が得られるものを選択し、実験室の経験に基づいた適切なアッセイを利用して実施する。

25. 細胞毒性試験の結果、被験物質のある濃度において細胞数が 20%以上減少した場合、この濃度は細胞毒性を示すとみなし、細胞毒性濃度およびこれを超える濃度は評価から除外する。

化学物質の添加およびアッセイプレートの作成

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

ステップ 1： 各被験化学物質は DMSO または適切な溶媒で段階的に希釈し、予備的な濃度範囲設定試験で決定した最終的な段階的濃度（濃度段階の典型的な例：1 mM、100 μM、10 μM、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、100 pM および 10 pM［10^{-3}～10^{-11} M］；各濃度につき 3 組）が得られるよう、マイクロプレートのウェルに分注する。

ステップ 2： 化学物質の希釈：最初に、被験化学物質を含む溶媒を 1.5 μL 採り、500 μL の培地で希釈して一定の濃度とする。

ステップ 3： 化学物質の細胞への添加：（ステップ 2 で調製した）培地での希釈物を 50 μL 採り、10^4 細胞/100 μL/ウェルを含むアッセイウェルに添加する。

各ウェルに加えるべき培地の最終的容量は 150 μL となることが望ましい。

被験試料および参照化学物質は、表 3 に示すように割り付けることができる。

表 3.：参照化学物質のアッセイプレート上におけるプレート濃度割り付けの例

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

プレート対照 = VC: 溶媒対照（DMSO）；PC: 陽性対照（1 nM の E2）

27. 参照化学物質（E2、17α-エストラジオール、17α-メチルテストステロンおよびコルチコステロン）の試験は、すべてのランで実施する（表 3）。各被験物質のアッセイプレートには、E2 の最大誘導能がもたらされる 1 nM の E2 で処理した PC ウェル、および DMSO（または適切な溶媒）のみで処理した VC ウェルを必ず含めること（表 4）。由来の異なる細胞（継代数やロットが異なる場合等）を同一の実験に用いる場合は、各由来源の細胞について参照化学物質の試験を行う必要がある。

表 4.：被験化学物質およびプレート対照化学物質のアッセイプレート上におけるプレート濃度割り付けの例

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

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

29. 化学物質を添加した後、アッセイプレートを 5% CO_2 インキュベータに入れ、37 ± 1°C で 20～24 時間にわたり培養を行い、レポーター遺伝子産物を誘導発現させる。

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

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

ルシフェラーゼアッセイ

32. 本アッセイには、市販のルシフェラーゼアッセイ試薬（例：Steady-Glo® Luciferase Assay System［Promega、E2510 等の製造業者］）または標準ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega、E1500 等の製造業者）を、許容基準を満たす限り使用することができる。アッセイ試薬は、使用する照度計の感度に基づいて選択する。標準ルシフェラーゼアッセイシステムを使用する場合は、基質を添加する前に Cell Culture Lysis Reagent（Promega、E1531 等の製造業者）を使用しなければならない。ルシフェラーゼ試薬は、製造業者作成の使用説明書に従って適用する。

© OCDE（2009 年）

データの分析

33. PC（1 nM の E2）に対する相対的な転写活性を求めるため、同一プレートから出る発光シグナルの分析を次のステップに従って行うことができる（他の同等な数学的手法も使用可能）。

ステップ 1： VC について平均値を計算する。

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

ステップ 3： 正規化した PC について平均値を計算する。

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

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

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

EC50、PC50 および PC10 誘導の検討

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

35. ヒルのロジスティック式を濃度反応データに適用できる場合は、次の式に従って EC50 を算出する(15)。

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10 \exp ((\log EC50 - X) \times \text{ヒル勾配}))$$

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

36. 各被験化学物質について、次の値を求める。

（i）RPCMax。これは、被験化学物質によって誘導される最大の応答レベルであり、同一プレート上で 1 nM の E2 によって誘導される応答に対する割合（%）で表す。また、RPCMax をもたらす濃度である PCMax も求める。

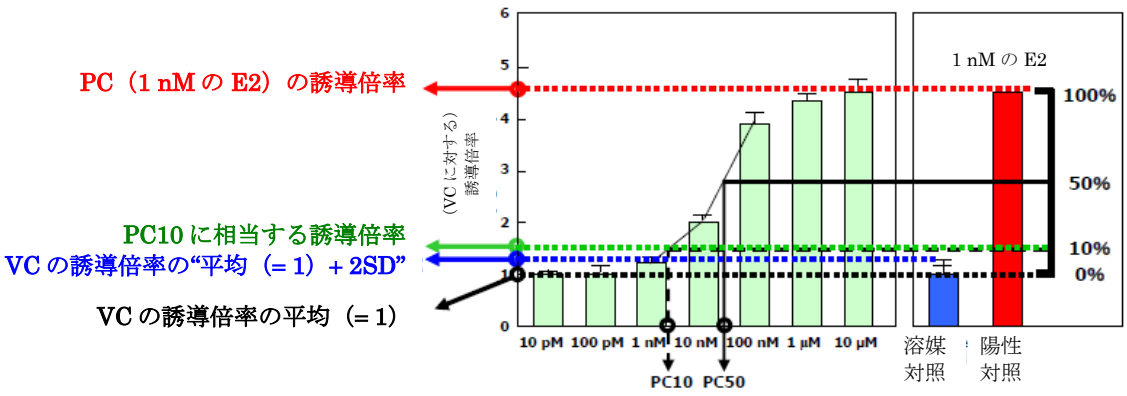
（ii）陽性の化学物質については、PC10 および適切な場合には PC50 を誘導する濃度。

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

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

38. PC 値の説明を、下の図 1 に示す。

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



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

- 性能標準要件に適合する。
  - PC（1 nM の E2）の平均ルシフェラーゼ活性が、各プレート上の VC の平均活性値の 4 倍以上であること。
  - 同時対照 PC（1 nM の E2）の PC10 値に相当する誘導倍率が、VC の誘導倍率値（= 1）の「1 + 2SD」に当たる数値よりも大きいこと。
  - 4 種類の参照化学物質の結果が、許容範囲内に収まること（表 1）。
- 再現性を有する。

データ判定基準

表 5.：陽性および陰性の判定基準

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

40. データ判定基準を表 5 に示す。陽性の結果は、作用の程度およびその作用をもたらした濃度の 2 点によって説明づけられる。すなわち、PC 値の 50%（PC50）または 10%（PC10）が得られたときの濃度として結果を表すことにより、この 2 点の目標が達成されることになる。ただし、被験化学物質によって誘導された最大応答（RPCMax）が、2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で PC の応答の 10%と同等またはこれを超えた場合は当該化学物質を陽性と判定し、RPCMax が、2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で PC の応答の 10%に満たなかった場合には、陰性とみなす。

© OCDE（2009 年）

41. PC10、PC50 およびPCMaxの計算は、OECD公式ウェブサイトのテストガイドラインのページから入手できる表計算シートを用いて行うことができる[2]。

42. PC10 値または PC50 値の算出は少なくも 2 回実施する必要がある。ただし、同じ濃度範囲におけるデータとして得られたベースライン値に容認できないほど高い変動係数（CV；%）を有するばらつきが認められた場合は、データに信頼性が欠けると判断し、大きなばらつきをもたらした原因を特定しなければならない。PC10 の計算に用いるデータポイントについて得られる 3 連による生データ（すなわち、発光強度データ）の CV は、20%未満となる必要がある。

43. 許容基準に適合することはアッセイ系が正しく作動していることを意味するが、ある特定のランで正確なデータが得られることを保証するものではない。初回のランでの結果が再現されることが、正確なデータが得られていることの最良の保証となる（段落 41 および 42 を参照）。

44. 陽性の被験化合物、とりわけ PC10～PC49 に当たる化学物質およびルシフェラーゼを過剰に刺激することが疑われる化学物質に関して、本試験ガイドラインで目的とするスクリーニングおよび優先順位付けに加えてさらに情報が必要な場合には、観察されたルシフェラーゼ活性がERα特異的な応答のみによることを、ERα拮抗薬を用いて確認することができる（補遺 3 を参照）。

試験報告書

45. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質：

- 識別データおよび既知の場合は CAS 番号
- 物理的性質および純度
- 試験の実施に関連する物理化学的特性
- 被験物質の安定性

溶剤／溶媒：

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

細胞：

- 種類および細胞の供給源
- 細胞継代数
- 細胞の培養維持方法

試験条件：

細胞毒性データ（および方法選択の根拠）ならびに溶解性の限界は必ず報告する。また、以下の情報を報告する。

[2] [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

- 培地の組成、CO_2 濃度
- 被験化学物質の濃度
- 溶媒および添加した被験物質の容量
- インキュベーションの温度および湿度
- 処理時間
- 処理期間中の細胞密度
- 陽性および陰性の参照化学物質
- 処理期間の持続時間
- ルシフェラーゼアッセイ試薬（製品名、供給者およびロット番号）
- 許容基準およびデータ判定基準

信頼性の確認：

- アッセイプレートごとの誘導倍率
- 同時対照の参照化学物質についての logEC50、logPC50、logPC10 およびヒル勾配の実測値

結果：

- 発光シグナルの生データおよび正規化したデータ
- 可能な場合、濃度反応関係
- 必要に応じて、RPCMax、PCMax、PC50 または PC10 の値
- 必要な場合、EC50 値
- もしあれば、統計解析結果。併せて誤差の測定値（SD、CV または 95%信頼区間等）ならびにこれらの数値を算出した方法の説明。

結果の考察

結論

© OCDE（2009 年）

参考文献

1. OECD (2007), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in annex 2 of: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 440, the Uterotrophic Bioassay in Rodents: A Short-term Screening Test for Oestrogenic Properties, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
2. CERI (2006), Draft validation report of TA assay using HeLa-hER-9903 to detect estrogenic activity. [Available at: http://www.oecd.org/document/62/0,3343,en_2649_34377_2348606_1_1_1_1,00.html]
3. Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Sawaki, M., Nakai, M., Noda, S. and Takatsuki, M. (2002), The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions. *Toxicol. Lett.* 126, 91-98.
4. Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Clark, G. and Newbold R. (2002), Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J. Chromat. B.,* 777, 179-189.
5. Sonneveld, E., Riteco, J.A., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. and van der Burg, B. (2006), Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89, 173-187.
6. Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailles, V. and Balaguer, P. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.
7. Gray, L.E. Jr. (1998), Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.,* 102-103, 677-680.
8. EDSTAC (1998), Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Available at: [http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm]
9. ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine.htm#fineval]
10. Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailles, V. and Balaguer, P. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.
11. Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. and Gustafsson, J.A. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.
12. Spaepen, M., Angulo, A.F., Marynen, P. and Cassiman, J.J. (1992), Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 78(1), 89-94.
13. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii H (1995), Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.* 57(4), 769-71.
14. Dussurget, O. and Roulland-Dussoix D. (1994), Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(3), 953-9.
15. De Lean, A., Munson, P.J. and Rodbard D. (1978), Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 235, E97-El02.
16. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

補遺 1

定義と略語

作用薬（アゴニスト）：特異的な受容体に結合し、細胞内での応答を引き起こす物質。同じ受容体に結合する内因性のリガンドに類似した作用を発揮する。

拮抗薬（アンタゴニスト）：受容体に結合することで、生物学的応答自体を引き起こすことなく、作用薬が介する応答を阻害または抑制する受容体リガンドまたは化学物質の 1 種。

抗エストロゲン活性：特定の化学物質が有する、17β-エストラジオールがエストロゲン受容体を介して発揮する作用に対する抑制能。

CV：変動係数

細胞毒性：細胞の構造または機能に対する有害な作用をいい、最終的には細胞死をもたらす。細胞毒性物質による暴露期間の終了時には、ウェル内に存在する細胞数が減少したり、同時並行的に設けた溶媒対照と比較して細胞機能の測定値の低下がもたらされる。

DCC-FBS：チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清

DMSO：ジメチルスルホキシド

E2：17β-エストラジオール

EC50 値：ベースライン値（Bottom）と最大応答値（Top）の中間に当たる応答を引き起こす作用薬の濃度。

EE：17α-エチニルエストラジオール

ER：エストロゲン受容体

ERE：エストロゲン応答エレメント

エストロゲン活性：エストロゲン受容体に結合し活性化させる能力に関し、特定の化学物質が有する 17β-エストラジオールと類似した作用。本テストガイドラインでは、hERα介在性の特異的なエストロゲン活性の検出が可能である。

FBS：ウシ胎児血清

hERα：ヒトエストロゲン受容体アルファ

MT：メタロチオネイン

OHT：4-ヒドロキシタモキシフェン

PC：陽性対照（1 nM の E2）

PC10：アゴニストアッセイにおいて、被験化学物質による応答が各プレート上で陽性対照（1 nM の E2）により誘導される応答の 10%となるときの被験化学物質の濃度。

PC50：アゴニストアッセイにおいて、被験化学物質による応答が各プレート上で陽性対照（1 nM の E2）により誘導される応答の 50%となるときの被験化学物質の濃度。

PCMax：RPCMax を誘導するときの被験化学物質の濃度。

© OCDE（2009 年）

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

RT PCR：リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

SD：標準偏差

STTA：安定的形質移入による転写活性化試験

TA：転写活性化

検証：特定の試験、アプローチ、手法または工程をある具体的な目的に用いる場合における信頼性および適合性を確立するために、科学的に信頼できる原理に基づいて行う工程。信頼性とは、同一の標準化されたプロトコールを用いてある試験を行った場合、試験結果が同一実験室内および複数の実験室間で常に再現できる程度と定義される。また、ある試験方法の適合性とは、当該試験と標的生物種における作用との関係を説明するものであり、試験方法が特定の目的について有意義かつ有用であるかどうかを試験の限界を特定しつつ明らかにすることである。かいつまんで言えば、ある試験方法が必要に応じて関心対象の（生物学的）作用を正確に測定し、予測することができる程度のことである(16)。

VC（溶媒対照）：被験化学物質および対照化学物質の溶解に用いる溶媒を、化学物質を溶解させない溶媒のみの状態で試験する場合をいう。

補遺 2

偽陽性：受容体非介在性の発光シグナルの検討

1. 偽陽性は、ルシフェラーゼ遺伝子の ER 非介在性の活性化、またはこの遺伝子産物の直接的な活性化、すなわち被験物質とは無関係の蛍光発光によりもたらされる。このような作用が起こったことは、不完全または異常な用量反応曲線によって示される。このような作用が疑われる場合は、ER 拮抗薬（無毒性濃度の 4-ヒドロキシタモキシフェン［OHT］等）が応答に及ぼす影響を検査する必要がある。ただし、純粋な拮抗薬である ICI 128780 は、濃度が十分に高いと VC の値を低下させ、データの解析結果に影響を与えるため、本目的には適さない。

2. 本手法の妥当性を確保するためには、次の項目を同一のプレート上で試験する必要がある。

- 10 μM の OHT の存在下、非存在下における未知の化学物質の作動活性
- VC（3 連）
- OHT（3 連）
- 作用薬 PC として 1 nM の E2（3 連）
- 1 nM の E2 + OHT（3 連）

3. *データ判定基準*

注：すべてのウェルを、同一濃度の溶媒で処理する必要がある。

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

4. *データの解析*

性能標準を確認する。
同一条件下で処理した複数のウェル間の CV を確認する。

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

© OCDE（2009 年）

補遺 3

チャコール・デキストラン（DCC）処理血清の作成

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

準備するもの

2. 必要な材料および装置を次に示す。

材料

活性炭
デキストラン
塩化マグネシウム六水和物（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）
ショ糖
1 M の HEPES 緩衝液（pH 7.4）
濾過装置で製造した超純水

装置

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

手順

3. 50 mL の遠心分離管用の手順を次に示す。

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

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

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

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