OECD/OCDE

2012/10/02

試験ガイドライン No.457

エストロゲン受容体アゴニストとアンタゴニストを特定するための
のBG1Lucエストロゲン受容体転写活性化試験法

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.

Information: Following the OECD Council decision, the Test Guideline 457 was deleted on 29 January 2018.

Those who would like to obtain it should contact ehscont@oecd.org

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

2012 年 10 月 2 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

エストロゲン受容体アゴニストとアンタゴニストを特定するための BG1Luc エストロゲン受容体転写活性化試験法

はじめに

1. 経済協力開発機構（OECD）は 1998 年に内分泌かく乱物質のスクリーニングおよび試験のための、改訂および新規試験ガイドライン（TG）の作成を開始した。それ以来、いくつかの可能性あるアッセイが TG として作成されており、さらなるアッセイがまだなお開発されている。これらのアッセイは 2012 年に改訂された「内分泌かく乱物質の試験および評価に関する OECD の概念枠組み」（CF）に含まれている。当初の CF および改訂された CF は補遺として化学物質の内分泌かく乱性評価のための標準化された試験ガイドラインに関するガイダンス文書に含まれている(1)。改訂された CF は 5 つのレベルから構成され、それぞれの異なったレベルの生物学的複雑性に対応している(1)。エストロゲン受容体アゴニストとアンタゴニストを特定するための BG1Luc エストロゲン受容体転写活性化（BG1Luc ER TA）試験方法は「*選択された内分泌機構／経路に関する情報をもたらす in vitro アッセイ（哺乳類および非哺乳類の方法）*」でレベル 2 に含まれている(1)。

2. *In vitro* での TA アッセイは、化学物質の特異的な受容体との結合およびその下流の転写活性化により、化学物質によって誘発されるレポーター遺伝子産物が生成されている。レポーター遺伝子の活性化を利用する TA アッセイは、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ために長く使用されてきたスクリーニングアッセイである(2)(3)(4)(5)。これらのスクリーニングアッセイは、ER によって制御されるエストロゲン転写活性化の検出法として推奨されてきた(6)(7)(8)。

3. 脊椎動物種では、核内 ER には異なる遺伝子でコードされた、それぞれ α、β と呼ばれる少なくとも 2 種類の主要なサブタイプがあり、それぞれのタンパク質は組織分布、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(9)(10)(11)。核内 ERα は古典的なエストロゲン応答を介在し(12)(13)(14)(15)、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。BG1Luc 細胞株は内因性 ERα および少量の内因性 ERβ を主に発現する(27)(28)(29)。この方法は、スクリーニングおよび優先順位付けを目的として推奨されてい

© OECD（2012 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。

るが、証拠の重み付けに使用することができるメカニズムに関する情報を提供することもできる。

4. BG1Luc ER TA 試験方法は、（米）代替毒性の試験法の評価に関する毒性プログラム省庁間センター（NICEATM）および（米）代替試験法の検証に関する省庁間調整委員会（ICCVAM）によって妥当性の確認がなされてきた(16)。この方法では、ヒト卵巣腺癌細胞株 BG-1 において安定的に形質移入した ER 応答ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて *in vitro* ER アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する物質に関する濃度反応データを提供する(17)。類似の試験方法の開発および妥当性の確認を容易にするための性能標準が利用可能である（アゴニスト部分については(31)、およびアンタゴニスト部分については(32)）。データの相互受け入れは、性能標準に従って開発された試験方法について、OECD によって確認および採択された場合にのみ保証される。

5. 本 TG に使用した用語の定義および略語の説明を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

6. 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し、細胞増殖、正常な胎児発生、および成体ホメオスタシスに必要なものを含む細胞プロセスの開始または阻害につながる可能性がある(18)(19)(20)。正常なエストロゲンシステムの混乱は健康上有害な作用を引き起こす可能性をもつ場合がある。

7. 本 TG では、BG1Luc4E2 細胞株を用いて ERα および ERβ 両方が介在する TA を評価するアッセイについて説明する。ER が介在する TA は、内分泌かく乱（ED）の主要なメカニズムの 1 つと考えられているが、このほかにも ED が発生し得るメカニズムがあり、例えば（i）他の受容体および酵素システムと内分泌システムとの相互作用、（ii）ホルモンの代謝活性化や不活性化、（iii）組織へのホルモンの分布、および（iv）ホルモンの体外への排出などが挙げられる。本試験方法は、*in vitro* システムでのルシフェラーゼ生成によって示されるように ER への化学結合により誘発される TA を取扱っている。したがって、*in vivo* の完全な内分泌システムの複雑な情報伝達および制御に結果を直接外挿してはならない。

8. 本 TG は、ジメチルスルホキシド（DMSO、CASRN 67-68-5）に溶解させることができ、DMSO または細胞培養培地と反応せず、また被験濃度において細胞毒性がない限りにおいて、幅広い物質に適用することができる。DMSO が使用できない場合には、エタノールまたは水といった他の溶媒を用いてもよい（段落 20 を参照）。BG1Luc ER TA アゴニスト（アンタゴニスト）試験方法の実証された性能は、本試験方法で作成されたデータが ER 介在の作用メカニズムに関して情報をもたらす場合があり、さらなる試験のための物質の優先順位付けのために考慮し得ることを示唆している。

© OECD（2012 年）

9. 本試験方法は、評価指標として化学発光を測定することによって hERα および hERβ が介在する TA を検出するために、特異的に設計されている。発光が高い S/B 比を持つことからバイオアッセイにおける化学発光の利用が広がっている(21)。ただし、細胞ベースアッセイにおけるホタルルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼ酵素を阻害する化合物により悪化させられ、タンパク質安定化に起因する明らかな阻害または発光増加の両方をもたらす可能性がある(21)。さらに、いくつかのルシフェラーゼベースの ER レポーター遺伝子アッセイでは、植物エストロゲンの濃度が 1 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る受容体非介在性の発光シグナルが報告されている(2)(22)。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 アッセイシステムでは、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(23)。

試験の概要

10. レポーター遺伝子を用いた *in vitro* の TA アッセイは作用機構に関するデータを提供する。本アッセイは、ER のリガンドとの結合を示すために使用される。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する。核の中で、受容体-リガンド複合体は特異的な DNA 応答エレメントと結合し、レポーター遺伝子（*luc*）を転写活性化し、ルシフェラーゼの生成とそれに続く発光を引き起こし、照度計を用いてこれを定量化することができる。ルシフェラーゼ活性は、市販されている数多くのキットで速やかにかつ低廉な費用で評価することができる。

11. BG1Luc ER TA は、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターの上流に位置する 4 つのエストロゲン応答エレメントの制御の下でホタル *luc* レポーター構成体を安定的に形質移入した ER 応答ヒト卵巣腺癌細胞株 BG-1 を利用して、*in vitro* の ER アゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する物質を検出する。この MMTV プロモーターは他のステロイドおよび非ステロイドホルモンとのマイナーな交叉反応しか示さない(17)。本 TG 用のプロトコル（アゴニストおよびアンタゴニスト）は、ICCVAM によって推奨された *in vitro* の ER TA アッセイのために不可欠な試験方法の要素を組み込んでいる。

12. データ解釈の基準について段落 51 から 53 に詳細に説明する。簡潔にいえば、重なり合わないエラーバー（平均±SD）を有する少なくとも 3 つのポイントを含む濃度反応曲線、および参照物質（アゴニストアッセイの場合には 17β-エストラジオール（E2、CASRN 50-28-2）、アンタゴニストアッセイの場合には塩酸ラロキシフェン（Ral、CASRN 84449-90-1）/E2）について最大値の少なくとも 20%の振幅変化（正規化相対発光量（RLU））によって陽性反応を特定する。

© OECD（2012 年）

手順

細胞株

13. アッセイには安定的に形質移入した BG1Luc4E2 細胞株を使用する。細胞株は、米国カリフォルニア州デービスのカリフォルニア大学デービス校[1](University of California, Davis, California, USA)から、および米国ノースカロライナ州ダラムの Xenobiotic Detection Systems Inc.[2]から技術ライセンス契約と共に入手可能である。

細胞株の安定性

14. 細胞株の安定性および完全性を維持するため、細胞を凍結保存状態から細胞維持培地で 2 代以上継代させる（段落 16）。細胞は 30 代を超えて継代させない。BG1Luc4E2 細胞株の場合、約 3 カ月で 30 継代に達する。

細胞培養および培養条件

15. 細胞培養の優良規範に関するガイダンスに規定されている手順(24)(25)に従い、実施する作業の完全性、妥当性、および再現性を維持するため、すべての材料および方法の品質を保証する。

16. BG1Luc4E2 細胞は、0.9%の Pen-Strep と 8.0%のウシ胎仔血清（FBS）を添加した PRMI1640 培地に入れ、37±1°C、湿度 90%±5%、5.0%±1%CO_2/air に設定した専用の組織培養インキュベータにて維持する。

17. BG1Luc4E2 細胞密集度が約 80%に達すると、細胞を 96 ウェルのプレートに播いて被験物質に暴露しルシフェラーゼ活性のエストロゲン依存誘導を解析する前に、48 時間サブカルチャーしてエストロゲンフリーの環境に調整することができる。エストロゲンフリーの培地（EFM）は、4.5%のチャコール／デキストラン処理した FBS、1.9%の L-グルタミン、および 0.9%の Pen-Strep を添加したフェーノールレッド不含のダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を含む。エストロゲン活性のない状態とすること。

[1] Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616（ミハエル S.デニソン、カリフォルニア大学デービス校環境毒性学部教授、薬学博士）、E メール：msdenison@ucdavis.edu、電話：（530） 754-8649

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

© OECD（2012 年）

許容基準

18. 試験の合否判定は 96 ウェルのプレートで実施した各実験からの参照基準と対照の結果の評価に基づいて行う。各参照基準を複数の濃度で試験し、各参照および対照濃度の複数のサンプルが存在する。結果を、各施設が習熟度を確認する際に作成したアゴニストおよびアンタゴニストの履歴データベースに由来するこれらのパラメータ用の品質対照（QC）と比較する。履歴データベースは参照基準および対照の値で常に更新される。装置または実験室条件の変化により、更新した履歴データの作成が必要になる場合がある。

アゴニストの試験

範囲設定試験

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

包括的試験

これにはアゴニスト範囲設定試験からの許容基準および次の事項が含まれる。

- 参照基準の結果：E2 参照基準の濃度反応曲線はシグモイド形状で、濃度反応曲線の直線部分に少なくとも値が 3 つある必要がある。
- 陽性対照の結果：メトキシクロール対照の RLU 値は DMSO の平均に標準偏差の 3 倍を加えた値よりも大きい必要がある。
- 何れか 1 つの許容基準でも満たさない実験は破棄し、やり直す。

アンタゴニストの試験

範囲設定試験

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

© OECD（2012 年）

包括的試験

これにはアンタゴニスト範囲設定試験からの許容基準および次の事項が含まれる。

- 参照基準の結果：Ral/E2 参照基準の濃度反応曲線はシグモイド形状で、濃度反応曲線の直線部分に少なくとも値が 3 つある必要がある。
- 陽性対照の結果：タモキシフェン/E2 対照の RLU 値は E2 対照の平均から標準偏差の 3 倍を引いた値よりも小さい必要がある。
- 何れか 1 つの許容基準でも満たさない実験は破棄し、やり直す。

参照基準、陽性対照、および溶媒対照

19. 参照基準および対照を段落 20 から 29 に示す。

溶媒対照（アゴニストおよびアンタゴニストアッセイ）

20. 試験物質の溶解に用いる溶媒は溶媒対照として試験する必要がある。BG1Luc 法のバリデーションの際に用いる溶媒は、1% v/v のジメチルスルホキシド（DMSO、（CASRN 67-68-5））（段落 33 を参照）。DMSO 以外の溶媒を用いる場合には、必要に応じてすべての参照基準、対照、および被験物質を同じ溶媒中で試験する。

参照基準（アゴニスト範囲設定試験）

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

参照基準（アゴニスト包括試験）

22. 包括試験用の E2 は 2 系列のウェル内の 11 の濃度（3.76×10^{-10} から 3.59×10^{-13} M までの範囲）からなる E2 の 1:2 段階希釈で構成される。

参照基準（アンタゴニスト範囲設定試験）

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

参照基準（アンタゴニスト包括試験）

24. 包括試験用の Ral//E2 は 2 系列のウェル内の 9 つの濃度の Ral/E2 からなる 1:2 段階希釈の Ral（2.45×10^{-8} から 9.57×10^{-11} M までの範囲）と固定濃度（9.18×10^{-11} M）の E2 を加えた物で構成される。

© OECD（2012 年）

弱陽性対照（アゴニスト）

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

弱陽性対照（アンタゴニスト）

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

E2 対照（アンタゴニストアッセイのみ）

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

誘導比率（アゴニスト）

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

抑制比率（アンタゴニスト）

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

施設の習熟度確認

30. BG1Luc ER TA 試験方法についての習熟度を確認するには、施設は参照基準および対照のデータと共に、アゴニストおよびアンタゴニストの履歴データベースを、異なる日に実施した少なくとも 10 回の独立したアゴニストの実験と 10 回の独立したアンタゴニストの実験から蓄積する必要がある。これらの実験は参照基準および既存対照についての基礎である。将来の許容可能な結果がデータベースに付け加えられる。習熟度確認の成功は、既存対照の 2.5 標準偏差以下の値を得ることで達成される（段落 18 を参照）。

31. 履歴データベースを蓄積したら、表 1 および表 2 に記載されているアゴニストおよびアンタゴニスト技能実証物質をそれぞれ試験する。表 1 および表 2 に報告されている EC_{50} および IC_{50} の値が情報として提供されている。施設は、ここに報告されている値に近い EC_{50} および IC_{50} の値を得る必要がある。

© OECD（2012 年）

表 1：施設の習熟度確認のためのアゴニスト物質

物質	CASRN	予想される反応 [a]	BG1Luc ER TA の平均 EC_{50}（M） [b,c]	MeSH 化学物質クラス [d]	製品クラス [e]
エチルパラベン	120-47-8	POS	2.48×10^{-5}	カルボン酸、フェノール	医薬品、保存剤
ケンフェロール	520-18-3	POS	3.99×10^{-6}	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物
ブチルベンジルフタレート	85-68-7	POS	1.98×10^{-6}	カルボン酸、エステル、フタル酸	可塑剤、工業用化学薬品
アピゲニン	520-36-5	POS	1.60×10^{-6}	ヘテロ環化合物	染色剤、天然物、医薬品中間体
ダイゼイン	486-66-8	POS	7.95×10^{-7}	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物
ビスフェノール A	80-05-7	POS	5.33×10^{-7}	フェノール	化学中間体、難燃剤、防かび剤
ゲニステイン	446-72-0	POS	2.71×10^{-7}	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物、医薬品
クメストロール	479-13-0	POS	1.32×10^{-7}	ヘテロ環化合物	天然物
17∝-エストラジオール	57-91-0	POS	1.40×10^{-9}	ステロイド	医薬品、獣医用薬剤
エストロン	53-16-7	POS	2.34×10^{-10}	ステロイド	医薬品、獣医用薬剤
ジエチルスチルベストロール	56-53-1	POS	3.34×10^{-11}	炭化水素（環基）	医薬品、獣医用薬剤
17 ∝エチニルエストラジオール	57-63-6	POS	7.31×10^{-12}	ステロイド	医薬品、獣医用薬剤
アトラジン	1912-24-9	NEG	-	ヘテロ環化合物	除草剤
コルチコステロン	50-22-6	NEG	-	ステロイド	医薬品
リニュロン	330-55-2	NEG	-	尿素	除草剤
スピロノラクトン	52-01-7	NEG	-	ラクトン、ステロイド	医薬品

略語：CASRN = 化学情報検索サービス機関登録番号（CAS 番号）、EC_{50} = 被験物質の 50%効果濃度、MeSH = 米国医学図書館作成の医学問題表題集、NEG = 陰性、POS = 陽性。

[a] 独立科学ピアレビューパネル報告書で編集／報告された ICCVAM のコンセンサスデータ：LUMI-CELL®ER（BG1Luc ER TA）試験方法の評価(16)。

[b] BG1Luc ER TA バリデーション試験にて施設によって報告された値から計算した平均の EC_{50}(26)。

[c] 表は BG1Luc アッセイにおける応答について期待される EC_{50}（M）の順番にソートされている。

[d] 物質は、国際的に認められている標準化された分類法である、米国医学図書館作成の医学問題表題集（MeSH）（http://www.nlm.nih.gov/mesh で入手可能）を用いて 1 つ以上の化学物質クラスに割付けられている。

[e] 物質は、米国医学図書館作成の有害物質データベース（http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB で入手可能）を用いて 1 つ以上の製品クラスに割付けられている。

© OECD（2012 年）

表 2：施設の習熟度確認ためのアンタゴニスト物質

物質	CASRN	予想される反応 [a]	BG1Luc ER TA の平均 IC_{50}（M） [b,c]	MeSH 化学物質クラス [d]	製品クラス [e]
タモキシフェン	10540-29-1	POS	8.17×10^{-7}	炭化水素（環基）	医薬品
4-ヒドロキシタモキシフェン	68047-06-3	POS	2.08×10^{-7}	炭化水素（環基）	医薬品
塩酸ラロキシフェン	82640-04-8	POS	1.19×10^{-9}	炭化水素（環基）	医薬品
17 αエチニルエストラジオール	57-63-6	NEG	-	ステロイド	医薬品、獣医用薬剤
アピゲニン	520-36-5	NEG	-	ヘテロ環化合物	染色剤、天然物、医薬品中間体
クリシン	480-40-0	NEG	-	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物
クメストロール	479-13-0	NEG	-	ヘテロ環化合物	天然物
ゲニステイン	446-72-0	NEG	-	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物、医薬品
ケンフェロール	520-18-3	NEG	-	フラボノイド、ヘテロ環化合物	天然物
レスベラトロール	501-36-0	NEG	-	炭化水素（環基）	天然物

略語：CASRN = 化学情報検索サービス機関登録番号（CAS 番号）、IC_{50} = 50%阻害濃度、MeSH = 米国医学図書館作成の医学問題表題集、NEG = 陰性、POS = 陽性。

[a] 独立科学ピアレビューパネル報告書で編集／報告された ICCVAM のコンセンサスデータ：LUMI-CELL®ER（BG1Luc ER TA）試験方法の評価(16)。

[b] BG1Luc ER TA バリデーション試験にて施設によって報告された値から計算した平均の IC_{50}。

[c] 表は BG1Luc アッセイにおける応答について期待される IC_{50}（M）の順番にソートされている。

[d] 物質は、国際的に認められている標準化された分類法である、米国医学図書館作成の医学問題表題集（MeSH）（http://www.nlm.nih.gov/mesh で入手可能）を用いて 1 つ以上の化学物質クラスに割付けられている。

[e] 物質は、米国医学図書館作成の有害物質データベース（http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB で入手可能）を用いて 1 つ以上の製品クラスに割付けられている。

32. 各**習熟度確認物質**については、最初は範囲設定試験結果に基づいて開始濃度を選択し、その後包括試験を少なくとも 2 回実施する。各包括試験は、別々の実験日に実施する。試験結果が互いに矛盾する場合（1 つの試験では陽性、他方では陰性など）、または試験の 1 つが不十分である場合には、第 3 の追加試験を実施する。技能は各技能実証物質を正しく分類（陽性／陰性）することによって実証される（表 1、表 2 および表 3 を参照）。技能試験は、試験方法を修得する各技術者がやり直す必要がある。

© OECD（2012 年）

溶媒

33. 被験物質は当該被験物質を溶解することができ、細胞培地と混和可能な溶媒に溶解する。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 を用いる場合には、濃度が 1.0%（v/v）を超えないようにする。いずれの溶媒についても、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。参照基準および対照を 100%の溶媒に溶解し、次に EFM に適切な濃度に希釈する。

被験物質の調製

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

溶解性と細胞毒性：範囲設定のための検討

35. 範囲設定試験は 2 系列の 1:10 段階希釈ランの 7 つのポイントからなる。まず、アゴニスト試験の場合は最大濃度 1 mg/mL（約 1 mM）まで、そしてアンタゴニス試験の場合は 20 µg/mL（約 10 µM）まで被験物質の試験を行う。

36. 範囲設定実験は次のことを決定するために用いられる。
    - 包括試験の際に用いるべき被験物質の開始濃度
    - 包括試験の際に用いるべき被験物質の希釈（1:2 または 1:5）

37. 細胞の生存率／細胞毒性の評価は、アゴニストおよびアンタゴニスト試験方法のプロトコールに含まれており、範囲設定試験および包括試験に組み入れられる。BG1Luc ER TA(16)のバリデーションの際に細胞生存率を評価するために用いられた細胞毒性法は、スケールされた定性的目視法であったが、細胞毒性を判定するための定量化法を用いることができる（プロトコール（30）を参照）。生存率において 20%を超える抑制をもたらす被験物質濃度からのデータを用いることはできない。

被験物質の暴露およびアッセイプレートの構成

38. 細胞を計数して 96 ウェルの組織培養プレート（2×10^5 細胞／ウェル）の EFM に入れ、24 時間培養して細胞をプレートに付着させる。EFM を取り除き、EFM に入った被験化学物質および参照化学物質で置き換え、19～24 時間培養する。

© OECD（2012 年）

39. 近隣の対照物質ウェルが偽陽性の結果を示す場合があるため、揮発性の高い化合物に対しては特別の配慮を払う必要がある。このような例では、「プレートスケーラ」が試験実施中に各ウェルを効果的に分離するのに役立つ場合があるため、このような例には推奨される。

範囲設定試験

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

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

図 1：アゴニストの範囲設定試験の 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-1	TS2-1	TS2-1	TS3-1	TS3-1	TS4-1	TS4-1	TS5-1	TS5-1	TS6-1	TS6-1
B	TS1-2	TS1-2	TS2-2	TS2-2	TS3-2	TS3-2	TS4-2	TS4-2	TS5-2	TS5-2	TS6-2	TS6-2
C	TS1-3	TS1-3	TS2-3	TS2-3	TS3-3	TS3-3	TS4-3	TS4-3	TS5-3	TS5-3	TS6-3	TS6-3
D	TS1-4	TS1-4	TS2-4	TS2-4	TS3-4	TS3-4	TS4-4	TS4-4	TS5-4	TS5-4	TS6-4	TS6-4
E	TS1-5	TS1-5	TS2-5	TS2-5	TS3-5	TS3-5	TS4-5	TS4-5	TS5-5	TS5-5	TS6-5	TS6-5
F	TS1-6	TS1-6	TS2-6	TS2-6	TS3-6	TS3-6	TS4-6	TS4-6	TS5-6	TS5-6	TS6-6	TS6-6
G	TS1-7	TS1-7	TS2-7	TS2-7	TS3-7	TS3-7	TS4-7	TS4-7	TS5-7	TS5-7	TS6-7	TS6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

略語：E2-1～E2-4 = E2 参照基準の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS1-1～TS1-7 = 被験物質 1（TS1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS2-1～TS2-7 = 被験物質 2（TS2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS3-1～TS3-7 = 被験物質 3（TS3）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS4-1～TS4-7 = 被験物質 4（TS4）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS5-1～TS5-7 = 被験物質 5（TS5）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS6-1～TS6-7 = 被験物質 6（TS6）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM.））。

© OECD（2012 年）

図 2：アンタゴニストの範囲設定試験の 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-1	TS2-1	TS2-1	TS3-1	TS3-1	TS4-1	TS4-1	TS5-1	TS5-1	TS6-1	TS6-1
B	TS1-2	TS1-2	TS2-2	TS2-2	TS3-2	TS3-2	TS4-2	TS4-2	TS5-2	TS5-2	TS6-2	TS6-2
C	TS1-3	TS1-3	TS2-3	TS2-3	TS3-3	TS3-3	TS4-3	TS4-3	TS5-3	TS5-3	TS6-3	TS6-3
D	TS1-4	TS1-4	TS2-4	TS2-4	TS3-4	TS3-4	TS4-4	TS4-4	TS5-4	TS5-4	TS6-4	TS6-4
E	TS1-5	TS1-5	TS2-5	TS2-5	TS3-5	TS3-5	TS4-5	TS4-5	TS5-5	TS5-5	TS6-5	TS6-5
F	TS1-6	TS1-6	TS2-6	TS2-6	TS3-6	TS3-6	TS4-6	TS4-6	TS5-6	TS5-6	TS6-6	TS6-6
G	TS1-7	TS1-7	TS2-7	TS2-7	TS3-7	TS3-7	TS4-7	TS4-7	TS5-7	TS5-7	TS6-7	TS6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

略語：E2 = E2 対照、Ral-1～Ral-3 = ラロキシフェン／E2 参照基準の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS1-1～TS1-7 = 被験物質 1（TS1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS2-1～TS2-7 = 被験物質 2（TS2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS3-1～TS3-7 = 被験物質 3（TS3）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS4-1～TS4-7 = 被験物質 4（TS4）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS5-1～TS5-7 = 被験物質 5（TS5）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS6-1～TS6-7 = 被験物質 6（TS6）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM.））。
注記：すべての被験化合物は 9.18×10^{-11} M の E2 の存在のもとで試験する。

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

42. 包括*アゴニスト*試験用の開始濃度の決定についてはアゴニストプロトコル(30)に詳しく説明している(30)。簡潔にいうと、以下の判定基準を使用する。

- 被験物質の濃度曲線に、平均プラス DMSO 対照の標準偏差の 3 倍を超えるポイントがない場合には、包括試験は最大溶解濃度から始まる 11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いて実施することになる。
- 被験物質の濃度曲線に、平均プラス DMSO 対照の標準偏差の 3 倍を超えるポイントがある場合には、包括試験において 11 ポイントの希釈方法で使用する開始濃度は、範囲設定試験で最大の RLU 調整値が得られる濃度よりも 1 log 高いものとする。11 ポイントの希釈方法は次の判断基準に従って、1:2 または 1:5 希釈に基づくことになる。

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

- 範囲設定試験において物質が二相の濃度反応曲線を示す場合には、包括試験で両方の相の分解も行なう。

© OECD（2012 年）

43. 包括*アンタゴニスト*試験用の開始濃度の決定についてはアンタゴニストプロトコルに詳しく説明している(30)。簡潔にいうと、以下の判定基準を使用する。

- 被験物質の濃度曲線に、平均マイナス E2 対照の標準偏差の 3 倍を下回るポイントがない場合には、包括試験は最大溶解濃度から始まる 11 ポイントの 1:2 段階希釈を用いて実施することになる。
- 被験物質の濃度曲線に、平均マイナス E2 対照の標準偏差の 3 倍を下回るポイントがある場合には、包括試験で 11 ポイントの希釈方法で使用する開始濃度は、次のいずれか 1 つとする。

  – 範囲設定試験で最小の RLU 調整値が得られる濃度
  – 最大溶解濃度（アンタゴニストプロトコル(30)、図 14-2 を参照）
  – 最低細胞毒性濃度（関連する例についてはアンタゴニストプロトコル(30)、図 14-3 を参照）

- 11 ポイントの希釈方法は次の判断基準に従って、1:2 または 1:5 希釈のいずれかに基づくことになる。

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

包括試験

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

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

© OECD（2012 年）

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

図 3：アゴニストの包括試験の 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
B	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
C	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
D	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	VC
E	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Meth
F	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

略語： TS11-1～TS1-11 = 被験物質 1 の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS2-1～TS2-11 = 被験物質 2 の濃度（高濃度から低濃度の順）、E2-1～E2-11 = E2 参照基準の濃度（高濃度から低濃度の順）、Meth = p,p'メトキシクロール弱陽性対照、VC = DMSO（1% v/v）EFM 溶媒対照。

図 4：アンタゴニストの包括試験の 96 ウェルプレートの配置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
B	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
C	TS1-1	TS1-2	TS1-3	TS1-4	TS1-5	TS1-6	TS1-7	TS1-8	TS1-9	TS1-10	TS1-11	VC
D	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	VC
E	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Tam
F	TS2-1	TS2-2	TS2-3	TS2-4	TS2-5	TS2-6	TS2-7	TS2-8	TS2-9	TS2-10	TS2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

略語：E2 = E2 対照、Ral-1～Ral-9 = ラロキシフェン／E2 参照基準の濃度（高濃度から低濃度の順）、Tam = タモキシフェン／E2 弱陽性対照、TS1-1～TS1-11 = 被験物質 1（TS1）の濃度（高濃度から低濃度の順）、TS2-1～TS2-11 = 被験物質 2（TS2）の濃度（高濃度から低濃度の順）、VC = 溶媒対照（DMSO（1% v/v EFM.））。
注記：既に記載したように、すべての参照および試験ウェルは固定濃度の E2（9.18×10^{-11} M）を含んでいる。

© OECD（2012 年）

発光の測定

45. 発光は、インジェクション照度計を使用してインジェクション量と測定間隔を制御するソフトウェアによって 300 nm～650 nm の範囲で測定する(30)。各ウェルからの発光はウェルごとに RLU で表される。

データの分析

EC_{50}／IC_{50} の決定

46. EC_{50} の値（被験物質（アゴニスト）の 50%効果濃度）および IC_{50} の値（被験物質（アンタゴニスト）の 50%阻害濃度）を濃度反応データから決定する。1 つ以上の濃度において陽性である物質については、半最大応答（IC_{50} または EC_{50}）をもたらす被験物質の濃度はヒル関数分析または適切な代替手段を用いて算出する。ヒル関数は、応答に対する物質濃度（一般的にシグモイド曲線に従う）に関連する以下の等式を用いた 4 パラメータのロジスティック数学モデルである。

Y = Bottom + (Top − Bottom) / (1 + 10 exp ((lg EC50 − X) × ヒル勾配))

式中、Y = 応答（すなわち RLU）、X = 濃度の対数、Bottom = 最小応答、Top = 最大応答、lg EC_{50}（または lg IC_{50}）= Top と Bottom との中間の反応としての X の対数とし、ヒル勾配は曲線の傾きを示すものとする。本モデルは、Top、Bottom、ヒル勾配、ならびに IC_{50} および EC_{50} のパラメータとして最適なものを算出する。EC_{50} および IC_{50} の値の計算には、適切な統計ソフトウェアを使用する（Graphpad Prism®統計ソフトウェアなど）。

外れ値の決定

47. Q 検定（アゴニストおよびアンタゴニストプロトコール(30)を参照）を含める（これには限らないが）ことにより、データ分析から除外することになる「使用できない」ウェルを決定するための的確な統計的判断を容易にできる可能性がある。

48. E2 参照基準のレプリカ（サンプルサイズ 2）については、与えられた濃度の E2 でのレプリカについてのいかなる RLU 調整値も、その値が履歴データベースにおいてその濃度についての RLU 調整値より 20%を超えて上回っているかまたは下回っている場合には、外れ値であると見なされる。

© OECD（2012 年）

範囲設定試験に関する照度計データの収集および調整

49. 照度計からの生データを本試験方法用に設計されたスプレッドシートのテンプレートへ転送する。取り除く必要がある外れ値のデータポイントがあるか判断する必要がある。（分析の中で決定されるパラメータについては試験許容基準を参照）。次の計算を実施する。

アゴニスト

ステップ 1：DMSO 溶媒対照（VC）について平均値を計算する。
ステップ 2：DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
ステップ 3：参照基準（E2）について平均誘導比率を計算する。
ステップ 4：被験物質について EC_{50} の平均値を計算する。

アンタゴニスト

ステップ 1：DMSO VC について平均値を計算する。
ステップ 2：DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
ステップ 3：参照基準（Ral/E2）について平均抑制比率を計算する。
ステップ 4：E2 参照基準について平均値を計算する。
ステップ 5：被験物質について IC_{50} の平均値を計算する。

包括試験に関する照度計データの収集および調整

50. 照度計からの生データを本試験方法用に設計されたスプレッドシートのテンプレートへ転送する。取り除く必要がある外れ値のデータポイントがあるか判断する。（分析の中で決定されるパラメータについては試験許容基準を参照）。次の計算を実施する。

アゴニスト

ステップ 1：DMSO VC について平均値を計算する。
ステップ 2：DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
ステップ 3：参照基準（E2）について平均誘導比率を計算する。
ステップ 4：E2 および被験物質について EC_{50} の平均値を計算する。
ステップ 5：メトキシクロールについて RLU 調整値の平均値を計算する。

アンタゴニスト

ステップ 1：DMSO VC について平均値を計算する。
ステップ 2：DMSO VC の平均値を各ウェルの値から引いて、データを正規化する。
ステップ 3：参照基準（Ral/E2）について平均誘導比率を計算する。
ステップ 4：Ral/E2 および被験物質について IC_{50} の平均値を計算する。

© OECD（2012 年）

ステップ 5：タモキシフェンついて RLU 調整値の平均値を計算する。
ステップ 6：E2 参照基準について平均値を計算する。

データ判定基準

51. BG1Luc ER TA は、in vivo での ED 試験のための物質の優先順位付けに資するための証拠の重み付けアプローチの一環として意図されている。この優先順位付け手順の一部は被験物質の ER アゴニストまたはアンタゴニスト活性に対する陽性または陰性としての分類ということになる。BG1Luc ER TA バリデーション試験で使用される陽性または陰性の判定基準を表 3 に示す。

表 3：陽性および陰性の判定基準

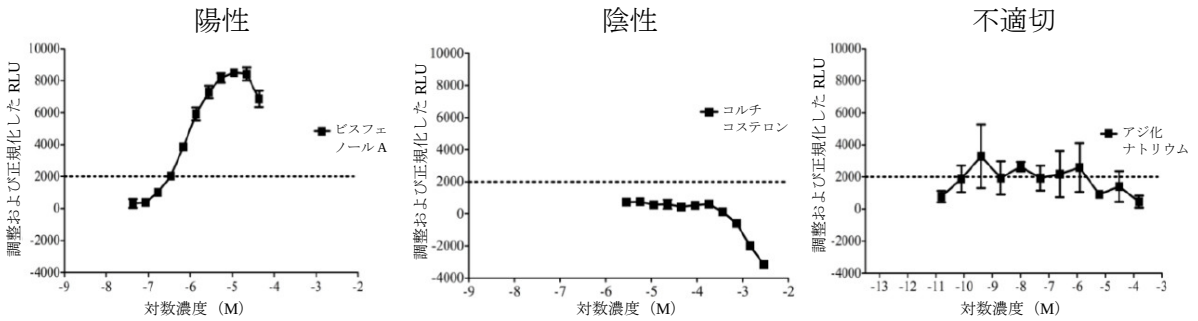
アゴニスト活性	
陽性	– ER アゴニスト活性に対して*陽性*として分類される被験物質はすべて、それに正の勾配が続いて平坦域またはピークになるベースラインからなる濃度反応曲線を有しているものとする。ケースによっては、これらの特徴の 2 つだけ（ベースライン – 勾配、勾配 – ピーク）が定義されていてもよい。 – 正の勾配を定義するラインは重なり合わないエラーバー（平均±SD）を有する少なくとも 3 つのポイントを含んでいるものとする。ベースラインを形成するポイントは除外されるが、曲線の直線部分にはピークまたは平坦域の最初のポイントを含んでいてもよい。 – 陽性分類には、参照物質 E2 について最大値の 20%以上の反応振幅（ベースラインとピークとの差）が必要である（すなわち、参照物質（E2）の最大反応値が 10,000 RLU に調節される場合、2,000 RLU 以上）。 – 可能であれば、EC_{50} の値は陽性物質ごとに算出する。
陰性	与えられた濃度に対する平均の RLU 調整値が、DMSO 対照の RLU 値の平均プラス DMSO の RLU 値の標準偏差の 3 倍以下である。
不適切	深刻な質的または量的な制約によって活性の有無を示すのに有効であるとは解釈することができないデータは、不適切と見なされ、被験物質が陽性か陰性かを決定するのに使用することができない。物質は再試験するものとする。

© OECD（2012 年）

アンタゴニスト活性	
陽性	– 被験物質データが、それに負の勾配が続くベースラインからなる濃度反応曲線を生成する。 – 負の勾配を定義するラインは重なり合わないエラーバーを有する少なくとも 3 つのポイントを含んでいるものとし、ベースラインを形成するポイントは除外されるが、曲線の直線部分には平坦域の最初のポイントを含んでいてもよい。 – 参照物質 Ral/E2 について最大値から 20%以上の活性抑制があるものとする（すなわち、参照物質（Ral/E2）の最大反応値が 10,000 RLU に調節される場合、8,000 RLU 以下）。 – 被験物質の最大非細胞毒性濃度は 1×10^{-5} M 以下とする。 – 可能であれば、IC_{50} の値は陽性物質ごとに算出する。
陰性	1.0×10^{-5} M 未満の濃度において、すべてのデータポイントが ED_{80} の値（E2 反応の 80%、または 8,000 RLU）より上である。
不適切	深刻な質的または量的な制約によって活性の有無を示すのに有効であるとは解釈することができないデータは、不適切と見なされ、被験物質が陽性か陰性かを決定するのに使用することができない。物質は再試験する必要がある。

52. 可能であれば、陽性の結果は効果の大きさとその効果が生じる濃度の両方で特徴づけられることになる。陽性、陰性、および不十分なデータの例を図 5 および図 6 に示す。

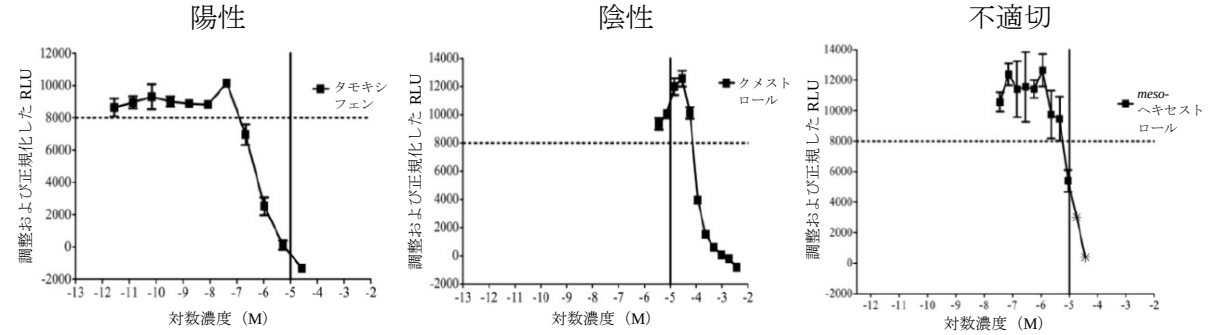
図 5：アゴニストについての陽性、陰性、および不適切なデータの例



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

© OECD（2012 年）

図 6：アンタゴニストについての陽性、陰性、および不適切なデータの例



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

実線は 1.00×10^{-5} M を示す。陽性と考えられる反応は、8,000 RLU の線よりも下で、濃度が 1.00×10^{-5} M 未満であるものとする。

*meso-*ヘキセストールのグラフ中のアステリクスト濃度は生存度スコア「2」以上を示している。

*meso-*ヘキセストールについての試験結果は、8,000 RLU 未満の応答が唯一 1.00×10^{-5} M で生じているのみであるため、データが不十分と考えられる。

53. EC_{50} および IC_{50} の計算は 4 パラメータのヒル関数（詳細はアゴニストプロトコールおよびアンタゴニストプロトコール(30)を参照）を使用して行うことができる。許容基準を満たすということは、そのアッセイシステムが適切に動作していることを示すが、任意の特定のランが正確なデータを生成することを保証するものではない。最初のランの結果を重ねることが、正確な結果が生成されたことを保証するのに最適である。

試験報告書

54. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質および対照被験物質：

- 識別データ（CAS 番号（既知の場合）、供給元、純度、既知の不純物、ロット番号など）
- 物理的性質および物理化学的特性（揮発性、安定性、溶解性など）
- 混合物の場合、組成および構成要素の相対的割合

細胞：

- 細胞の供給元
- 解凍時の細胞継代数
- 細胞継代数（解凍後）
- 細胞の培養維持方法

© OECD（2012 年）

試験条件：

- 細胞毒性データおよび溶解性の限界
- 被験物質の濃度
- 溶媒および添加した被験物質の容量
- 培養の温度、湿度、および CO_2 濃度
- 処理時間
- 処理期間中の細胞密度

許容性の確認（詳細はアゴニストプロトコールおよびアンタゴニストプロトコール(30)を参照）：

範囲設定試験の場合：

- DMSO 対照の RLU 値（平均、SD、CV）
- 各アッセイプレートについての誘導倍率または抑制倍率
- E2 対照の値（アンタゴニストアッセイのみ）
- 実験の合否、不合格の場合はどの判定基準が不合格であったか

包括実験の場合：

- DMSO 対照の RLU 値（平均、SD、CV）
- 各アッセイプレートについての誘導倍率または抑制倍率
- 陽性対照の結果
- 参照基準の結果
- E2 対照の結果（アンタゴニストアッセイのみ）
- 実験の合否、不合格の場合はどの判定基準が不合格であったか

結果：

- 発光シグナルの生データおよび正規化したデータ
- 各被験物質に使用した希釈（1:2 または 1:5）
- 被験物質の結果が陽性か陰性かまたは不十分か
- IC_{50}/EC_{50} の値（必要に応じて）
- もしあれば、統計解析結果。併せて誤差の測定値および信頼度（SEM、SD、CV または 95%CI など）の測定値ならびにこれらの値を算出した方法の説明

結果の考察：

結論：

© OECD（2012 年）

LITERATURE

1. OECD (2012), *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption Paris*, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

2. Escande, A. *et al.* (2006), "Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta", Biochem Pharmacol.71(10):1459-69.

3. Jefferson, W.N. *et al.* (2002), "Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses", J Chromatogr B.: 777(1-2):179-89.

4. Sonneveld, E. *et al.* (2006), "Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities", Toxicol Sci. [Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't], 89(1):173-87.

5. Takeyoshi, M. *et al.* (2002), "The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions", Toxicology Letters;126(2):91-8.

6. Gray, L.E. Jr. (1998), "Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens", Toxicol Lett:102-103:677-80.

7. EPA (1998), Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report, Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

8. ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of In Vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

9. Gustafsson, J.-Å. (1999), "Estrogen receptor β- A new dimension in estrogen mechanism of action", *Journal of Endocrinology* 163(3):379-83.

10. Ogawa, S. *et al.* (1998), "The complete primary structure of human estrogen receptor β (hERβ) and its heterodimerization with ERα *in vivo* and *in vitro", Biochem Biophys Res Commun.* 243(1):122-6.

11. Enmark, E. *et al.* (1997), "Human estrogen receptor β-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(12):4258-65.

12. Anderson, J.N., J.H. Clark and E.J. Peck Jr (1972), "The relationship between nuclear receptor-estrogen binding and uterotrophic responses", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48(6):1460-8.

13. Toft, D. (1972), "The interaction of uterine estrogen receptors with DNA", *Journal of Steroid Biochemistry* 3(3):515-22.

14. Gorski, J. et al. (1968), "Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus", *Recent Progress in Hormone Research* 24:45-80.

15. Jensen, E.V. *et al.* (1967), "Estrogen-receptor interactions in target tissues", *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 56(3):547-69.

© OECD（2012 年）

16. ICCVAM (2011), ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, NIH Publication No. 11-7850 http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/ERTA-TMER.htm [cid:3419914858_20826441]

17. Rogers, J.M. and M.S. Denison (2000), "Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals", *In Vitr. Mol. Toxicol.* 13(1):67-82.

18. Cavailles, V. (2002), "Estrogens and receptors: an evolving concept", *Climacteric J.* 5 Suppl 2:20-6.

19. 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):1073-89.

20. Younes, M. and N. Honma (2011), "Estrogen receptor beta", *Arch Pathol Lab Med.*135(1):63-6.

21. Thorne, N., J. Inglese and D.S. Auld (2010), "Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology", *Chemistry and Biology* 17(6):646-57.

22. Kuiper, G.G. *et al.* (1998), "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta", *Endocrinology* 139(10):4252-63.

23. OECD (2009), *Test No. 455: The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264076372-en

24. Balls, M. *et al.* (2006), "The importance of good cell culture practice (GCCP)", *ALTEX* 23(Suppl):270-3.

25. Coecke, S., *et al.* (2005), "Guidance on good cell culture practice: a report of the Second ECVAM Task Force on good cell culture practice", *Altern. Lab. Anim.* 33:261-87.

26. ICCVAM (2011), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Evaluation of the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

27. Monje, P. and R. Boland (2001), "Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β isoforms in rabbit uterus and ovary", *J. Cell Biochem.* 82(3): 467-479.

28. Pujol, P., *et al.* (1998), "Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis", *Cancer Res.* 58(23): 5367-5373.

29. Weihua, Z., *et al.* (2000), "Estrogen receptor (ER) β, a modulator of ERα in the uterus", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 5936-5941.

© OECD（2012 年）

30. ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No. 11-7850
Appendix B1, BG1Luc ER TA – Agonist Protocol
http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB1-AgonProtocol.pdf
Appendix B2, BG1Luc ER TA – Antagonist Protocol
http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB2-AntagProtocol.pdf

31. OECD (2012), *Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455), Series on Testing and Assessment* No. 173, OECD, Paris.

32. OECD (2012), *Performance Standards for the BG1Luc ER TA Transactivation Method to Detect Estrogen Receptor Antagonists, Series on Testing and Assessment* No. 174, OECD, Paris

© OECD（2012 年）

補遺 1

定義と略語

許容基準：実験対照および参照基準の性能に関する最低基準。有効と見なされる実験についてはすべての許容基準が満たされる必要がある。

正確性：（a）試験方法の結果と許容される参照値との間の一致の程度。（b）試験方法の正しい結果の比率。

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

アンタゴニスト（拮抗薬）：特異的な受容体に結合したときに、転写などの反応を阻害する物質。

BG-1：エストロゲン受容体 α および β を内因的に発現する不死化ヒト卵巣腺癌細胞。

BG-1Luc4E2：BG-1Luc4E2 細胞株は、両方の形のエストロゲン受容体（ERα および ERβ）を内因的に発現する BG-1 不死化腺癌細胞に由来しており、プラスミド pGudLucERE を安定的に形質移入してきた。このプラスミドは、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流にエストロゲン反応エレメントを含んだ合成オリゴヌクレオチドの 4 つのコピーを含んでいる。

細胞形態：組織培養プレートの単一ウェルで単層培養された細胞の形および外見。死んでいく細胞は多くの場合異常な細胞形態を示す。

CF：内分泌かく乱物質の試験および評価に関する OECD の概念枠組み。

チャコール／デキストラン処理：細胞培養で使用される血清の処理。チャコール／デキストランでの処理（しばしば「ストリッピング」と称される）により内因性ホルモンおよびホルモン結合タンパク質を取り除く。

細胞毒性：細胞の生存、増殖や機能のために不可欠な構造やプロセスに対する妨害の結果として生じる有害な作用。大抵の物質の場合、毒性は「基本的な細胞機能」における非特異的変化がもたらす結果である（すなわち、ミトコンドリア、原形質膜完全性などを経由）。

DMEM：ダルベッコ改変イーグル培地

DMSO：ジメチルスルホキシド

© OECD（2012 年）

E2：17β-エストラジオール

EC_{50}：被験物質の 50%効果濃度

ED：内分泌かく乱物質

EE：17α-エチニルエストラジオール

EFM：エストロゲンフリーの培地。4.5%のチャコール／デキストラン処理した FBS、1.9%の L-グルタミン、および 0.9%の Pen-Strep を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）。

ER：エストロゲン受容体

ERE：エストロゲン反応エレメント

FBS：ウシ胎仔血清

hERα：ヒトエストロゲン受容体アルファ

hERβ：ヒトエストロゲン受容体ベータ

IC_{50}：阻害被験物質の 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

MMTV：マウス乳癌ウイルス

習熟度：未知の物質を試験する前に実証された、試験方法を適切に実施する能力。

習熟度確認物質：標準化された試験方法で技術能力を実証するために施設が使用することができる物質のリスト。これらの物質の選択基準としては、一般に、反応の範囲を代表していること、市販されていること、および高品質の参照データが用意されていることが挙げられる。

Ral：塩酸ラロキシフェン

Ral/E2：アンタゴニスト参照基準で、塩酸ラロキシフェン（Ral）と 17β-エストラジオール（E2）の組合せ。

© OECD（2012 年）

参照基準：試験方法の妥当性を実証するために使用する参照物質。BG1Luc ER TA の場合、17β-エストラジオールはエストロゲンの参照物質であり、塩酸ラロキシフェンは抗エストロゲンの参照物質である。

信頼性：施設内および施設間で試験方法を、時間を経て再現性良く実施することができる程度の尺度。

RLU：相対発光量

RNA：リボ核酸

RPMI：0.9%の Pen-Strep と 8.0%のウシ胎仔血清（FBS）を添加した RPMI 1640 培地

SD：標準偏差

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

TA：転写活性化

TG：試験ガイドライン

転写：mRNA 合成

転写活性：特異的化学シグナルに反応した mRNA 合成の開始で、例えばエストロゲンのエストロゲン受容体への結合など。

バリデーション：特定の目的のために手順の信頼性と精度を確立するプロセス。

媒体対照：被験化学物質および対照化学物質を溶解するために使用する溶媒（DMSO）を、化学物質を溶解させていない溶媒のみの状態で試験する。

© OECD（2012 年）