OECD/OCDE

2020/06/26

試験ガイドライン No.458

化学物質のアンドロゲンアゴニストおよび
アンタ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アンドロゲン受容体の転写活性化試験

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 (2020), Test No. 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist 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-458-2020.pdf.

©OECD(2020)

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

採択:
2020 年 6 月 26 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

安定に形質移入された細胞株を用いた化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験

目次

はじめに **2**

参考文献 **5**

補遺 A. 定義と略語 **6**

補遺 B. 3 つの試験法に関連する情報。 **12**

補遺 C.（試験法 1）安定に形質移入されたヒト AR-EcoScreen™細胞株を用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験 **26**

補遺 D.（試験法 2）:安定に形質移入されたヒト AR-CALUX®細胞株を 用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト 活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験 **49**

補遺 E（試験法 3）:安定に形質移入されたヒト 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株を用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニ スト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験 **68**

© OECD, (2020)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

はじめに

類似の in vitro 法によるアンドロゲン受容体転写活性化（ARTA）試験ガイドライン

1. 内分泌系かく乱は、（i）内分泌系に関連する核内受容体を介したホルモン作用、（ii）ステロイド産生酵素等を介したホルモン産生、（iii）ホルモンの代謝活性化または不活性化、（iv）標的組織へのホルモン分布、（v）ホルモンの体内からのクリアランス等を含む様々な機序により発生する。本試験ガイドライン（TG）は、アンドロゲン調節性レポーター遺伝子の転写活性化および阻害のみを対象とする。

2. 本試験ガイドライン記載の試験法の結果を、*in vivo* の細胞または生理学的プロセスにおけるアンドロゲン調節の複雑な状況に直接外挿するべきではない。

3. 本試験ガイドラインでは、アゴニストおよびアンタゴニストを検出するアンドロゲン受容体転写活性化（ARTA）試験法について説明する。本ガイドラインは、アンドロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニスト同定のための、機構的および機能的に類似した複数の試験法で構成されている。本試験ガイドラインに記載されている、十分に検証された参照試験法は以下のとおりである。

- AR-EcoScreen™ 細胞株(1)を用いた AR-EcoScreen™ 法（試験法 1、補遺 C に記載）
- AR-CALUX®細胞株(2)を用いた AR-CALUX®法（試験法 2、補遺 D に記載）
- 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株(3)を用いた ARTA 法（試験法 3、補遺 E に記載）

4. これらの 3 つの試験法は、同じ評価項目、すなわちリガンドが結合したアンドロゲン受容体によるレポーター遺伝子の転写活性化を対象としている（段落 5 および 6 参照）。試験法間の類似点および相違点の概要を補遺 B（表 B.1 および B.2）に示す。これらの 3 つの試験法はすべて 96 ウェルプレートで実施されるが、AR-CALUX®試験法についてはハイスループットの適用例も報告されている（しかし、OECD ガイダンス文書 34、2020 によれば検証はまだ行われていない）(4)。試験法 1 には、アンタゴニストではなくアゴニスト検出のための特異性対照が含まれるのに対し、試験法 2 および試験法 3 には、測定対象が競合的アンタゴニストであることを保証するために、アンタゴニストアッセイのための特異性対照が含まれる。各試験法には、異なるプロトコルおよび試験ランの許容基準がある。各試験法には、アゴニストおよびアンタゴニスト活性を結論付けるための、それぞれ固有のデータ解析基準がある。

本試験ガイドライン記載の試験法の背景と原理

5. *In vitro* 転写活性化（TA）法は、化学物質の特定の受容体への結合、転写活性化に続くレポーター遺伝子（luc 遺伝子等）の転写および翻訳に基づいている。これらの試験では様々なレポーター遺伝子を用いることができる。TA 法は、エストロゲン受容体（ER）やアンドロゲン受容体（AR）などの特異的な核内受容体によって制御される遺伝子発現プロファイルの評価に用いられている(5) (6) (7) (8)。

©OECD 2020

これらは、核内受容体介在性の転写活性化の検出法として推奨されてきた(5) (6) (9)。

6. アンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニストは AR 結合を介して AR のリガンドとして作用し、アンドロゲン応答性遺伝子の転写を活性化または阻害する可能性がある。この相互作用は、アンドロゲン調節系（細胞増殖、正常な胎児発育、生殖機能などに必要なプロセス）をかく乱することにより、健康への悪影響を引き起こす可能性がある。

7. 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、既存のものの改訂および新規に作成する作業を開始した。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(10)。この試験ガイドラインに記載されている 3 つの ARTA 法は、レベル 2「*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 アッセイ（哺乳類および非哺乳類試験法）*」に該当する。

8. 本試験ガイドライン記載の試験法は、単独で安全性評価の判断に使用することはできない。これらは、*in vitro*（抗）アンドロゲン活性を有する化学物質の濃度反応データを提供する。このデータは、スクリーニングや優先順位付けの目的に使用できる他、証拠の重み付けアプローチにおいて機序に関する情報としても使用することができる。

9. バリデーション試験により、AR-EcoScreen™ 試験法、AR-CALUX®試験法、および 22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法の妥当性と信頼性が実証されている(1, 3, 11)。

10. 各試験法の主な特性、許容基準および用いた主な略語の概要を補遺 B に示す（表 B.1 および B.2）。参考のため、補遺 B の表 B.3a および B.3b に、本試験ガイドラインの 2 つ以上の試験法で共通して試験した化学物質の結果を示す。分類の比較は、2003 年の ICCVAM リスト(6)（2016 年採用の AR-EcoScreen™ の参照リストとして使用）および近年更新された 2017 年の ICCVAM リスト(12)を用いて行う。アンタゴニスト試験について、3 つの試験法の結果は一致したが、アゴニスト試験の結果は 4 つの分類において 22Rv1/MMTV_GR-KO 法と不一致となった。この理由として、3 つの異なる試験法において異なる細胞株を用いたことが考えられる(1, 3, 11)。ER アゴニストとして知られている化学物質である 17β-エストラジオールは、3 つの試験法すべてで AR アゴニスト活性を示すが、AR-CALUX®法では弱い活性しか認められなかった。

11. これらの化学物質および AR-CALUX®法で試験した追加の 13 種類の化学物質に関する補足情報は、バリデーション試験報告書に記載されている(1, 3, 11)。

12. 本試験ガイドライン記載の試験法に用いる一般的および試験法に固有の定義および略語は、補遺 A に記載されている。

実験室習熟度の実証

13. 活性が未知の化学物質の試験に試験法を用いる前に、各実験室は選択した試験法の使用に関する習熟度を実証しなければならない。習熟度は、アゴニスト活性について 8 種類の習熟度確認化学物質（補遺 B の表 B.4a 参照）、アンタゴニスト活性について 9 種類の習熟度確認化学物質（補遺 B の表 B.4b および B.4c 参照）

©OECD 2020

を試験することにより実証される。この試験では試験系の応答性も確認する。試験は異なる日に少なくとも 2 回実施し、結果は表 B.4a および B.4a に記載されている分類および値と一致しなければならない。さらに、参照標準および媒体/溶媒対照を用いて得られたデータの履歴データベースを維持し、試験法の再現性を各実験室において経時的に確認しなければならない。

試験報告書

14. 試験結果の報告には、各試験法について補遺 B に示したテンプレートを使用すること。

©OECD 2020

参考文献

1. OECD (2016), Validation report of Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transactivation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 241), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2. Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)androgenic potential using AR-CALUX® cells (2019). Available at (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07).

3. Validation Study Report of the 22Rv1/MMTV_GR-KO ARTA assay (2019). Available at (http://www.nifds.go.kr/brd/m_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1) .

4. Van der Burg, B., Pieterse, B., Buist, H., Lewin, G., van der Linden, S.C., Man, H.Y., Rorije, E., Piersma, A.H., Mangelsdorf, I., Wolterbeek, A.P., Kroese, E.D., van Vught-Lussemburg, B. (2015). A high troughput screening system for predicting chemically-induced reproductive organ deformities. Reprod Toxicol 55, 95-103.

5. EDSTAC (1998), Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Available at (https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final).

6. ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. Available at (https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinrpt.pdf).

7. 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.

8. 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.

9. Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.,* 102-103, 677-680.

10. OECD (2018), Revised Guidance Document No 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264304741-en .

11. Validation Study Report on the Performance assessment of the AR-CALUX® *in vitro* method (2019). Available at (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07) .

12. Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Watt, E.D., Martin, M., Houck, K., Browne, P., Thomas, R.S., Casey, W.M., Dix, D.J., Allen, D., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Judson, R. (2017). Development and Validation of a Computational Model for Androgen Receptor Activity. *Chem Res Toxicol*., 30(4):946-964.

©OECD 2020

補遺 A. 定義と略語

本試験ガイドライン記載のすべての試験法および/または補遺 B の表に適用される一般的な定義および略語

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

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化学物質。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

アンドロゲン活性:アンド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リガンドと類似した作用

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、アゴニストが介する応答をブロックまたは抑制する受容体リガンドまたは化学物質の 1 種

抗アンドロゲン作用:アンドロゲン受容体介在性のアゴニストリガンドの作用を抑制する、化学物質の能力。本試験ガイドラインでは、AR 介在性の特異的な抗アンドロゲン活性の検出が可能である。

AR:アンドロゲン受容体

ARE:アンドロゲン受容体エレメント

ARTA:アンドロゲン受容体転写活性化

BDS: BioDetection Systems（オランダ）

BLR:室間再現精度:

CERI:化学物質評価研究機構（日本）

CASRN:ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号

CRISPR-Cas9:クラスター化反復短回文配列リピート-CRISPR 関連

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で、最終的に細胞死を引き起こす。細胞毒性物質による曝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媒体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。

DHT:5α-ジヒドロテストステロン

DMSO:ジメチルスルホキシド

EC_{50}:被験刺激化学物質（アゴニスト）の半数効果濃度

ED:内分泌かく乱物質

©OECD 2020

ER:エストロゲン受容体

FBS:ウシ胎児血清

IF:誘導係数/倍率

InhF:阻害係数/倍率

GR:グルココルチコイド受容体

IC_{50}:被験阻害化学物質（アンタゴニスト）の半数効果濃度

InChI:国際化学物質識別子

IUPAC:国際純正・応用化学連合

KO:ノックアウト

Luc:ルシフェラーゼ遺伝子

MTA:物質移動合意書

MFDS:食品医薬品安全処（韓国）

MMTV:マウス乳腺腫瘍ウイルス

陰性対照:試験系が応答しないことが知られている化学物質で処理した、試験系の独立した一部分。陰性対照は、実際のアッセイの条件下で試験系が応答しないことを示す証拠となる

NIHS:国立医薬品食品衛生研究所（日本）

PCR:ポリメラーゼ連鎖反応

PR:プロゲステロン受容体

陽性対照：試験系が応答することが知られている化学物質で処理した、試験系の独立した一部分。陽性対照は、実際のアッセイの条件下で試験系が応答することを示す証拠となる

R^2:相関係数の二乗（特異性対照試験の基準）

参照化学物質：被験化学物質との比較の基準を示すために使用される化学物質

参照標準：試験法の妥当性を実証するために使用する。本試験ガイドラインでは、参照標準とは、3 種類の化学物質のうち、2 種類が陽性応答を示し（用量反応または 1 種類の固定濃度で）、1 種類が反応を示さない化学物質を指す。2 種類の化学物質のうち、陽性の用量反応を示す 1 種類が参照化学物質である

信頼性：同一プロトコルを用いて試験法を実施した場合に、実験室内および実験室間で経時的に高い再現性で実施可能な程度を表す尺度。WLR と BLR を算出して評価する

RI:相対誘導能

RLU:相対発光量

ラン：試験法の生物学的結果における化学的作用を評価する個別の*実験*。各ランは、共通の細

©OECD 2020

胞のプールから同時に蒔かれた細胞の複製ウェルで実施する 1 つの完結した実験である

SD:標準偏差

SMILES:単純化分子ライン入力システム

検討（試験）:特定の試験法を用いて単一の特定の化学物質を評価するために実施されるあらゆる実験作業。本試験ガイドラインにおいて、検討は試験培地での被験化学物質の希釈試験、ラン（プレスクリーニングランおよび包括的ラン等）、データ解析、品質保証、細胞毒性評価などのすべての段階からなる。検討の完了により、用いた試験法および陽性参照化学物質に対する効力の推定による評価に基づいた、毒性標的に対する被験化学物質の活性の分類が可能となる

TA:転写活性化。アンドロゲン受容体へのアンドロゲンの結合などの特定の化学的シグナルに応答して mRNA 合成を開始すること

被験化学物質：試験される物質で、単一化学物質、多成分化学物質および/または混合物の試験へのアッセイの適用可能性に関連しないもの

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

試験系:試験で使用される生物学的、化学的または物理的システムまたはそれらの組み合わせ。*In vitro* 試験系は主に生物学的システム（細胞、組織等）である

UN GHS:国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム

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

検証された試験法：特定の目的に対する妥当性（正確性を含む）および信頼性を判断するためのバリデーション試験が完了した試験法。検証された試験法は、正確性および信頼性の点で十分な性能が得られず、掲げられた目的に適合していると判断できない場合があることに留意する必要がある

検証（バリデーション）：明確な目的のために、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

媒体対照：被験化学物質および参照標準の溶解に用いる溶媒（媒体）。化学物質を溶解せず、媒体のみで試験する

WLR:室内再現精度

試験法固有の用語

AR-EcoScreen™ 試験法

AG 参照:アゴニストアッセイにおけるアゴニスト参照標準（500 pM DHT）

©OECD 2020

BPA:ビスフェノール A

DCC-FBS:チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清

DEHP:フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）

HF:ヒドロキシフルタミド

IC_{30}：アンタゴニストアッセイで測定された活性が、各プレートで 500 pM DHT により誘発された最大活性を 30%抑制するような被験化学物質の濃度

PC_{AGO}:10 nM DHT による陽性応答を示す AR アゴニスト対照

PC_{ATG}:500 pM DHT および 1 µM HF による陽性応答を示す AR アンタゴニスト対照

PC_{CT}:細胞毒性対照（10 µg/mL シクロヘキシミド）の応答

PC_{10}:アゴニストアッセイにおける応答が、各プレート上で参照化学物質（10 nM DHT）により誘導される応答の 10%となる被験化学物質の濃度

PC_{50}:アゴニストアッセイにおける応答が、各プレート上で参照化学物質（10 nM DHT）により誘導される応答の 50%となる被験化学物質の濃度

PC_{max}:RPC_{max} を誘導するときの被験化学物質の濃度

RPC_{max}: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 PC_{AGO}（10 nM DHT）によって誘導される応答に対する割合（%）で表される

RTA:相対的転写活性

AR-CALUX®試験法

ARE:アンドロゲン応答エレメント

AU:吸光度単位

包括的ラン：プレスクリーニングラン実施後に実行される実験で、より高い精度のパラメータを計算するために、より少ない希釈ステップ（例えば 2、3、または 5）で行うもの

DF:希釈倍率

DMEM:ダルベッコ改変イーグル培地

EC_{10}、EC_{50}:被験化学物質の最大誘導応答の 10%または 50%が観測される同物質の濃度

FLU:フルタミド

hAR:ヒトアンドロゲン受容体

HTS:ハイスループットスクリーニング

IATA：試験および評価に関する統合的アプローチ。IATA は、化学物質の危険有害性を特徴づけるための実用的な科学的に裏付けられたアプローチであり、試験戦略を用いた新たな情報の生成と連動した、既存の情報の統合的分析に基づいている

©OECD 2020

IC_{20}、IC_{50}:被験化学物質の最大応答と比較して 20%または 50%の阻害が観測される同物質の濃度

IP:知的財産権

LDH:乳酸脱水素酵素

PC_{10}、PC_{50}、PC_{80}:参照化学物質 DHT（アゴニスト）または溶媒対照（アンタゴニスト）の最大誘導能と比較して 10%、50%または 80%の誘導（または阻害）を示す被験化学物質の濃度

PC_{max}、PC_{min}:応答が最大（RPC_{max}に相当）または最小（RPC_{min}）となる被験化学物質の濃度

プレスクリーニングラン:用量反応を評価する実験。完全な用量反応を得るために、（可能であれば）通常は大きな希釈ステップ（例えば 10）で実施する。後に続く包括的ランで使用する濃度範囲の決定を行う。

REF RPC_{10}、REF RPC_{50}、REF RPC_{80}:参照化学物質 DHT またはフルタミドの 10%、50%、または 80%の応答レベル（相対誘導能（RI）により判定）

REF EC_{50}:（アゴニストアッセイにおいて）参照化学物質 DHT の最大応答の 50%が観察される同物質の濃度

REF IC_{50}:（アンタゴニストアッセイにおいて）参照化学物質フルタミドの最大応答の 50%が観察される同物質の濃度

RPC_{max}:被験化学物質の最大応答レベル（最大誘導）

RPC_{min}:被験化学物質の最小応答レベル（最大阻害）

RI:相対誘導能

特異性対照:アンタゴニスト応答が AR との競合的結合によるものであるかどうかを評価するために実施される試験

***S_c*:**相対誘導能で表した特定の濃度 c における特異性対照の応答。

***S_c^n*:**相対誘導能で表した特定の濃度 c における正規化した特異性対照の応答

SC:溶媒対照（アゴニスト：試験培地に 0.1%溶媒を添加；アンタゴニスト：試験培地に 0.1%溶媒および EC_{50}濃度の DHT を添加）

VC:媒体対照（試験培地に 0.1%溶媒を添加したもので、アンタゴニストアッセイで使用）

***Y_{ic}*:**相対誘導能および技術的反復 i（1～3）で表した濃度 c（C1～C8）での標準応答

Y_c*:**3 回の技術的反復における標準応答 ***Y_{ic}の平均

ZF:Z 係数

22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法

ATCC:米国培養細胞系統保存機関

©OECD 2020

包括的ラン：プレスクリーニングラン実施後に実行される実験で、より高い精度でパラメータを計算するために、より少ない希釈ステップ（例えば 3 または 5）で行うもの

DCC-FBS:チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清

DEHP:フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）

GF-AFC:グリシルフェニルアラニル-アミノフルオロクマリン

IC_{30}:AR アンタゴニストアッセイにおいて、その阻害応答が AR アゴニスト対照（800 pM DHT）の最大応答の 30%に相当する化学物質の濃度

KTR:韓国化学試験研究院

NIFDS:韓国国立食品医薬品安全評価研究所

PC_{10}:AR アゴニストアッセイにおいて、その応答が AR アゴニスト対照（10 nM DHT）の最大応答の 10%に相当する化学物質の濃度

PC_{50}:AR アゴニストアッセイにおいて、その応答が AR アゴニスト対照（10 nM DHT）の最大応答の 50%に相当する化学物質の濃度

PC_{AGO1}:10 nM DHT により陽性応答を示す AR アゴニストアッセイ用の対照

PC_{AGO2}:AR アンタゴニストアッセイ用のアゴニスト対照（800 pM DHT）

PC_{ANTA}:800 pM DHT および 1 μM ビカルタミドにより陽性応答を示すアンタゴニスト対照。

PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）

プレスクリーニングラン:用量反応を評価する実験。完全な用量反応を得るために、（可能であれば）通常は大きな希釈ステップ（例えば 10）で実施する。後に続く包括的ランで使用する濃度範囲の決定を行う。

RTA:相対的転写活性

SDS:ドデシル硫酸ナトリウム

特異性対照:アンタゴニスト応答が AR との競合的結合によるものであるかどうかを評価するために実施される試験

Sc:アンタゴニストアッセイで 100 nM DHT（特異性対照）を用いた場合の、濃度 c における被験化学物質の相対誘導能

Yc:アンタゴニストアッセイで 800 pM DHT を用いた場合の、濃度 c における被験化学物質の相対誘導能

©OECD 2020

補遺 B. 3 つの試験法に関連する情報。

習熟度確認化学物質のリストおよび概要表

表 B.1.本試験ガイドラインにおける 3 つの試験法の特徴の概要

試験法	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
開発者	大塚製薬株式会社、化学物質評価研究機構（CERI）、国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）。	BDS	食品医薬品安全処（MFDS）、高麗大学および東国大学
細胞株	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
細胞種	チャイニーズハムスター卵巣がん細胞	ヒト骨肉腫細胞	ヒト前立腺がん上皮細胞
遺伝子組換え	• ヒト AR cDNA • 熱ショックタンパク質プロモーター-4 C3 ARE-ホタル luc（*Photinus pyralis*） • SV40 プロモーター-ウミシイタケ luc（*Renilla reniformis*）（細胞毒性同時測定用）	• ヒト AR cDNA • TATA プロモーター-3xARE-ホタル luc（*Photinus pyralis*）	• 内因性 AR • ARE-ホタル luc（*Photinus pyralis*）を含む MMTV LTR プロモーター • CRISPR-Cas9 によるノックアウト GR
特記事項	• 適切なアンドロゲン応答エレメントの選択による最小 GR クロストーク • ハイスループットの適用可能性	• GR、ER および PR の発現が無いまたはほとんど無い • ハイスループットの適用可能性	• ER または PR 発現無し • GR ノックアウト

©OECD 2020

入手方法	生物資源バンク（JCRB）細胞バンクおよび細胞の所有者とのライセンス契約を含む物質移動合意書（MTA）	BDS とのライセンス契約	韓国細胞バンクおよび韓国 MFDS とのライセンス契約を含む物質移動合意書（MTA）

表 B.2a.アゴニスト特性に関する 3 つの試験法の参照標準と許容基準の概要

試験法	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
アゴニスト			
参照化学物質	5α-ジヒドロテストステロン（DHT）	5α-ジヒドロテストステロン（DHT）	5α-ジヒドロテストステロン（DHT）
基準	$logPC_{50}$範囲　-11.03/-9.00（log[M]）	EC_{50}範囲　$1.10^{-10}/1.10^{-9}$ M	$logPC_{50}$範囲　-10.6/-9.0（log[M]）
	$logPC_{10}$範囲　-12.08/-9.87（log[M]）		$logPC_{10}$範囲　-12.2/-9.7（log[M]）
	シグモイド曲線	シグモイド曲線	シグモイド曲線
	$PC_{AGO} > 6.4$ の時（PC_{AGO}:DHT 1.0 x 10^{-8} M）	DHT 1.0 x 10^{-7} M > 20 の場合	$PC_{AGO} \geq 13$ の場合（PC_{AGO}:DHT 1.0 x 10^{-8} M）
	PC_{10} > 1 + 2SD（VC 誘導）の場合		PC_{10} > 1 + 2SD（VC 誘導）の場合
	3 連ウェルで CV < 20%の場合	|CV| $logEC_{50}$ < 1.5%	
		ZF > 0.5	
陽性対照	メスタノロン	17α-メチルテストステロン	メスタノロン
基準	$logPC_{50}$範囲　-10.15/-9.26（log[M]）	RI > 30%	$logPC_{50}$範囲　-10.2/-8.6（log[M]）
	$logPC_{10}$範囲　-10.92/-10.41（log[M]）		$logPC_{10}$範囲　-12.3/-9.8（log[M]）
	シグモイド曲線		
	3 連ウェルで CV < 20%の場合		
陰性対照	フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）	コルチコステロン	フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）

©OECD 2020

試験法	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
基準	PC_{10}が計算できない	RI <10%	PC_{10}が計算できない
特異性対照（アゴニスト）		NA	NA
基準	AR 非介在性のルシフェラーゼ誘導を明らかにするため、強力な AR アンタゴニスト（1 μM HF）を添加して確認。		

表 B.2b.アンタゴニスト特性に関する 3 つの試験法の参照標準と許容基準の概要。

試験法	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
アンタゴニスト			
参照化学物質	ヒドロキシフルタミド（HF）	フルタミド（FLU）	ビカルタミド
基準	$logIC_{50}$範囲　-7.80/-6.17（log[M]）	IC_{50}範囲　1.0 x 10^{-7}/1.0 x 10^{-6} M	$logIC_{50}$範囲　-7.0/-5.8（log[M]）
	$logIC_{30}$範囲　-8.37/-6.41（log[M]）		$logIC_{30}$範囲　-7.5/-6.2（log[M]）
	RTA の PC_{ATG} < 46%（PC_{ATG}:500 pM DHT + HF 1 μM）	InhF FLU 3.10^{-5} M > 10	RTA の PC_{ATG} ≤ 53.6 %（PC_{ATG}:800 pM DHT + ビカルタミド 1 μM）
	シグモイド曲線	シグモイド曲線	シグモイド曲線
	3 連ウェルで CV < 20%	|CV| $logIC_{50}$ < 3%	
		ZF > 0.5	
陽性対照	ビスフェノール A	リニュロン	ビスフェノール A
基準	$logIC_{50}$範囲　-7.05/-4.29（log[M]）	RI < 60%	$logIC_{50}$範囲　-6.2/-5.0（log[M]）
	$logIC_{30}$範囲　-7.52/-4.48（log[M]）		$logIC_{30}$範囲　-6.6/-5.4（log[M]）
	3 連ウェルで CV < 20%		

©OECD 2020

試験法	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
陰性対照	DEHP	レボノルゲストレル	DEHP
基準	IC_{30}が計算できない	RI > 85%	IC_{30}が計算できない
その他の対照	AG_{ref} > 5 の場合 （AG_{ref}:500 pM DHT）	NA	AG_{ref} ≥ 10 の場合 （AG_{ref}:800 pM DHT）
特異性対照（アンタゴニスト）		DHT	DHT
基準	NA	被験化学物質 $R^2 \leq 0.9$	被験化学物質 $R^2 < 0.9$
		R^2 FLU ≤ 0.7	

NA: 該当無し

注：1）IC_{50}、IC_{30} の計算において、3 つの試験法では異なる数学的技法を使用する（AR-EcoScreen™ 試験法および 22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法では内挿、AR-CALUX®試験法ではカーブフィッティング）、2）アンタゴニストアッセイでは、異なる濃度の DHT を添加した（AR-EcoScreen™試験法では 500 pM、AR-CALUX® の試験法では 300 pM、22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法では 800 pM）。

表 B.3a.本試験ガイドライン記載の 3 つの試験法から得られた結果の概要。化学物質を、アゴニストの特性について 2 つまたは 3 つの試験法で試験した

		予想される結果 [1]		AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			化学物質分類 [5]	製品分類 [6]
化学物質名	CASRN	Ref.（2003）	Ref.（2017）	バリデーション結果 [2]	log PC_{10} [2]（M）	log PC_{50} [2]（M）	バリデーション結果 [3]	log PC_{10} [3]（M）	log EC_{50} [3]（M）	バリデーション結果 [3]	log PC_{10} [4]（M）	log PC_{50} [4]（M）		
5α-ジヒドロテストステロン	521-18-6	P	P	P	-12.08/-9-87	-11.03/-9.00	P	-10.64/-10.14	-9.98/-9.42	P	-10.60/-9-83	-9-73/-8.95	ステロイド、非フェノール性	医薬品
メスタノロン（メチルジヒドロテストステロン）	521-11-9	P		P	-10.92/-10.41	-10.15/-9.26	P	-10.26/-9.99	-9.53/-9.39	P	-10.36/-9.66	-9.65/-8.39	ステロイド、非フェノール性	医薬品

©OECD 2020

テストステロン	58-22-0	P	P	P	-10.42/-9-73	-9.46/-8.96	P	-9-81/-9.60	-9.25/-8-80	P	-10.28/-9.91	-9.67/-8.66	ステロイド、非フェノール性	医薬品
17β-エストラジオール	50-28-2	P		P	-7-74/-6-75	-5.34/-4-88	P	-6-70/-5-85	-	P	-8-76/-8.49	-7.19/-6.03	ステロイド、フェノール性	医薬品
17-酢酸メドロキシプロゲステロン	71-58-9	P	P	P	-9.64/-8-89	-8-77/-8.37	P	-9.91/-8.32	-9.23/-7-75	P	-8-77/-8.20	-7.64/-6.01	ステロイド、非フェノール性	医薬品
17α-エチニルエストラジオール	57-63-6	N		N	-		N	-		P	-6.21/-5.27	-	ステロイド、フェノール性	医薬品
フタル酸ブチルベンジル	85-68-7	N	N	N	-		N	-		N	-		フタル酸塩	可塑剤
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）	117-81-7	N		N	-		N	-		N	-		フタル酸塩	化学中間体、可塑剤
ヒドロキシフルタミド	52806-53-8	N		N	-		N	-		P	-5.54/-5.04	-	アニリド	医薬品代謝物
ビスフェノール A	80-05-7	N		N	-		N	-		N	-		ビスフェノール	化学中間体
メチルテストステロン	58-18-4	P	P		NT	NT	P	-9-73/-9.57	-9.11/-8.95	P	-10.39/-9.99	-9.63/-9.28	ステロイド、非フェノール性	医薬品
プロゲステロン	57-83-0	P			NT	NT	N			P	-7.13/-6.19	-5.50/-5.01	ステロイド、非フェノール性	医薬品
コルチコステロン	50-22-6	N			NT	NT	N			P	-7.16/-5.47	,	ステロイド、非フェノール性	医薬品
レボノルゲストレル	797-63-7	P	P		NT	NT	P	-9.42/-9.26	-8.91/-8.61	P	-10.28/-9-73	-9.06/-8.46	ステロイド、非フェノール性	医薬品
ビンクロゾリン	50471-44-8	N			NT	NT	N	-		N	-		有機塩素	農薬
プロクロラズ	67747-09-5		N		NT	NT	N	-		N	-		イミダゾール	農薬
アトラジン	1912-24-9	N	N		NT	NT	N	-		N	-		トリアジン、芳香族アミン	農薬
6-プロピル-2-チオウラシル	51-52-5	N			NT	NT	N	-		N	-		ピリミジン	医薬品
o,p-DDT	789-02-6	N	N		NT	NT	N	-		N	-		有機塩素	農薬
ビカルタミド	90357-06-5	N			NT	NT	N	-		N	-		アニリド	医薬品

©OECD 2020

リニュロン	330-55-2	P			NT	NT	N	-	N	-	尿素	農薬

表 B.3b.本試験ガイドライン記載の 3 つの試験法から得られた結果の概要。化学物質を、アンタゴニストの特性について 2 つまたは 3 つの試験法で試験した

		予想される結果 [1]		AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			化学物質分類 [5]	製品分類 [6]
化学物質名	CASRN	Ref. (2003)	Ref. (2017)	バリデーション結果 [1]	log IC_{30} [2] (M)	log IC_{50} [2] (M)	バリデーション結果 [3]	log PC_{80} [3] (M)	log IC_{50} [3] (M)	バリデーション結果 [4]	log IC_{30} [4] (M)	log IC_{50} [4] (M)		
ヒドロキシフルタミド	52806-53-8	P	P	P	-8.37/ -6.41	-7-80/-6.17	P	-8.63/-8.01	-7-80/-7.54	P	-8.17/-7.45	-7-79/-7.11	アニリド	医薬品代謝物
ビスフェノール A	80-05-7	P	P	P	-7.52/ -4.48	-7.05/-4.29	P	-6-75/-6.12	-5.93/-5-81	P	-5.92/-5.56	-5.68/-5.29	ビスフェノール	化学中間体
フルタミド	13311-84-7	P		P	-6.20/ -5.69	-5.66/-5.43	P	-7.51/-6-71	-6.60/-6.23	P	-7.11/-6.62	-6-70/-6.26	アニリド	医薬品
プロクロラズ	67747-09-5	P	P	P	-5-77/ -5.47	-5.44/-5.12	P	-6.42/-6.02	-5-78/-5.59	P	-6.02/-5.30	-5.47/-4.95	イミダゾール	農薬
ピンクロゾリン	50471-44-8	P	P	P	-6-83/ -6.32	-6.47/-5-85	P	-7.91/-7.00	-7.50/-6-75	P	-7.22/-6-74	-6.94/-6.44	有機塩素	農薬
5α-ジヒドロテストステロン	521-18-6	N		N	-		N	-		N	-	-	ステロイド、非フェノール性	医薬品
メスタノロン	521-11-9	N		N	-		N	-		N	-	-	ステロイド、非フェノール性	医薬品
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）	117-81-7	N		N	-		N	-		N	-	-	フタル酸塩	化学中間体、可塑剤
アトラジン	1912-24-9	N	N	N	-		N	-		N	-	-	トリアジン、芳香族アミン	農薬
6-プロピル-2-チオウラシル	51-52-5	N		N	-		N	-		N	-	-	ピリミジン	医薬品
17β-エストラジオール	50-28-2	P			NT	NT	P	-9.05/-8.04	-8.40/-7.64	P	-7.98/-7.20	-	ステロイド、フェノール性	医薬品

©OECD 2020

17α-エチニルエストラジオール	57-63-6	N			NT	NT	P	-8.42/-7.75	-7.57/-7.26	P	-7.91/-7.29	-7.54/-6-88	ステロイド、フェノール性	医薬品
フタル酸ブチルベンジル	85-68-7	N			NT	NT	P	-6.13/-5.46	-5-81/-5.11	P	-5.10/-4.57	-4-86/-4.28	フタル酸塩	可塑剤
プロゲステロン	57-83-0	P			NT	NT	P	-8-78/-8.57	-8.07/-8.03	P	-7.40/-6.30	-6-88/-5.97	ステロイド、非フェノール性	医薬品
コルチコステロン	50-22-6	N			NT	NT	P	-6-85/-6-77	-6.35/-6.33	P	-6.36/-6.11	-5.91-5.51	ステロイド、非フェノール性	医薬品
o,p-DDT	789-02-6	P	P		NT	NT	P	-7.33/-6-84	-6.36/-6.24	P	-5-82/-5.48	-5.56/-5.21	有機塩素	農薬
ビカルタミド	90357-06-5	P	P		NT	NT	P	-8.18/-7.19	-7.23/-6.69	P	-6.92/-6.37	-6.39/-6.10	アニリド	医薬品
リニュロン	330-55-2	P	P		NT	NT	P	-6.64/-6.38	-5-85/-5-70	P	-5.64/-5.33	-5.33/-5.11	尿素	農薬
17-酢酸メドロキシプロゲステロン	71-58-9	N			NT	NT	N	-		N	-		ステロイド、非フェノール性	医薬品
レボノルゲストレル	797-63-7	N			NT	NT	N	-		N	-		ステロイド、非フェノール性	医薬品

表 B.3a および B.3b の略語:M：モル、P：陽性、N：陰性、NT：未試験

[1] 予想される結果：2003 年の ICCVAM 評価(5)および 2017 年の ICCVAM AR-参照リスト(12)で報告された分類。2017 年の参照リストには、参照化学物質が 2 つ以上のアッセイで活性（陽性）を示す、または 2 つ以上のアッセイで活性を示さない、および陽性活性を示さない（陰性）ことを独立して確認するための、追加の基準が含まれている。そのため、2003 年の参照リストで特定された化学物質の中には、これらの基準を満たすのに十分なデータがないものがあり、後の参照リストでは除外した。

[2] AR-EcoScreen™ 法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。

[3] AR-CALUX®法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。

[4] 22Rv1/MMTV_GR-KO 法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。

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

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

©OECD 2020

表 B.3a.本試験ガイドライン記載の 3 つの試験法（アゴニストアッセイ）のそれぞれについて技術的習熟度を実証するための習熟度確認化学物質のリスト。

			AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			化学物質分類 [5]	製品分類 [6]
化学物質名	CASRN	AR 参照リスト [1]	分類 [2]	log PC_{10} [2]（M）	log PC_{50} [2]（M）	分類 [3]	log PC_{10} [3]（M）	log EC_{50} [3]（M）	分類 [4]	log PC_{10} [4]（M）	log PC_{50} [4]（M）		
5α-ジヒドロテストステロン	521-18-6	P	P	-12.08/ -9.87	-11.03/ -9.00	P	-10.64/-10.14	-9.98/-9.42	P	-10.60/-9.83	-9.73/-8.95	ステロイド、非フェノール性	医薬品
メスタノロン（メチルジヒドロテストステロン）	521-11-9		P	-10.92/ -10.41	-10.15/-9.26	P	-10.26/-9.99	-9.53/-9.39	P	-10.36/-9.66	-9.65/-8.39	ステロイド、非フェノール性	医薬品
テストステロン	58-22-0	P	P	-10.42/ -9.73	-9.46/-8.96	P	-9.81/-9.60	-9.25/-8.80	P	-10.28/-9.91	-9.67/-8.66	ステロイド、非フェノール性	医薬品
17β-エストラジオール	50-28-2		P	-7.74/ -6.75	-5.34/-4.88	P	-6.70/-5.85	-	P	-8.76/-8.49	-7.19/-6.03	ステロイド、フェノール性	医薬品
17-酢酸メドロキシプロゲステロン	71-58-9	P	P	-9.64/-8.89	-8.77/-8.37	P	-9.91/-8.32	-9.23/-7.75	P	-8.77/-8.20	-7.64/-6.01	ステロイド、非フェノール性	医薬品
フタル酸ブチルベンジル	85-68-7	N	N	-		N	-		N	-		フタル酸塩	可塑剤
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）	117-81-7		N	-			-		N	-		フタル酸塩	化学中間体、可塑剤
ビスフェノール A	80-05-7		N	-		N	-		N	-		ビスフェノール	化学中間体

略語：M：モル、P：陽性、N：陰性

[1] ICCVAM AR-参照リスト（2017）(12)。

©OECD 2020

[2] AR-EcoScreen™法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。
[3] AR-CALUX®法のバリデーション試験報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小および最大値）。
[4] 22Rv1/MMTV_GR-KO 法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。
[5] 国際的に認められ標準化された分類法である米国国立医学図書館の医学件名標目表（MeSH）を用いて、各化学物質を一つ以上の化学物質分類に分類した（http://www.nlm.nih.gov/mesh より入手可能）。
[6] 米国国立医学図書館の有害物質データバンクを用いて、各化学物質を一つ以上の製品分類に分類した（http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB より入手可能）。

表 B.4b.本試験ガイドライン記載の 3 つの試験法（アンタゴニストアッセイ）のそれぞれについて技術的習熟度を実証するための習熟度確認化学物質のリスト。

			AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			化学物質分類 [5]	製品分類 [6]
化学物質名	CASRN	AR 参照リスト [1]	分類 [2]	log IC_{30} [2] (M)	log IC_{50} [2] (M)	分類 [3]	log PC_{80} [3] (M)	log IC_{50} [3] (M)	分類 [4]	log IC_{30} [4] (M)	log IC_{50} [4] (M)		
ヒドロキシフルタミド	52806-53-8		P	-8.37/-6.41	-7.80/-6.17	P	-8.63/-801	-7.80/-7.54	P	-8.17/-7.45	-7.79/-7.11	アニリド	医薬品代謝物
ビスフェノール A	80-05-7		P	-7.52/-4.48	-7.05/-4.29	P	-6.75/-6.12	-5.93/-5.81	P	-5.92/-5.56	-5.68/-5.29	ビスフェノール	化学中間体
フルタミド	13311-84-7		P	-6.20/-5.69	-5.66/-5.43	P	-7.51/-6.71	-6.60/-6.23	P	-7.11/-6.62	-6.70/-6.26	アニリド	医薬品
プロクロラズ	67747-09-5		P	-5.77/-5.47	-5.44/-5.12	P	-6.42/-6.02	-5.78/-5.59	P	-6.02/-5.30	-5.47/-4.95	イミダゾール	農薬
ビンクロゾリン	50471-44-8		P	-6.83/-6.32	-6.47/-5.85	P	-7.91/-7.00	-7.50/-6.75	P	-7.22/-6.74	-6.94/-6.44	有機塩素	農薬
メスタノロン	521-11-9		N	-		N	-		N	-		ステロイド、非フェノール性	医薬品
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）	117-81-7		N	-		N	-		N	-		フタル酸塩	化学中間体、可塑剤

©OECD 2020

アトラジン	1912-24-9		N	-	N	-	N	-	トリアジン、芳香族アミン	農薬
6-プロピル-2-チオウラシル	51-52-5		N	-	N	-	N	-	ピリミジン	医薬品

表 B.4c.アンタゴニスト特異性試験のための 2 種類の習熟度確認化学物質のリスト（AR-CALUX®法のみ）。

			AR-CALUX®			
化学物質名	**CAS RN.**	**AR 参照リスト [1]**	**分類 [3]**	**低濃度および高濃度のリガンド DHT を用いた試験における特異性対照試験の観察**	**化学物質分類 [5]**	**製品分類 [6]**
ケトコナゾール	65277-42-1		N	シフト $R^2 \leq 0.9$ の 2 つの用量反応	ピペラジン	医薬品、抗真菌剤
シクロヘキシミド	66-81-9		N	シフト $R^2 \leq 0.9$ の 2 つの用量反応	ピペリドン	医薬品、殺菌剤

表 B.4b および B.4c の略語:M：モル、P：陽性、N：陰性

[1] ICCVAM AR-参照リスト（2017）(12)。

[2] AR-EcoScreen™ 法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。

[3] AR-CALUX®法のバリデーション試験報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小および最大値）。

[4] 22Rv1/MMTV_GR-KO 法のバリデーション報告書（すべての参加実験室による、すべての有効なランにおける最小/最大値）。

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

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

©OECD 2020

試験報告書

1. 3 つの試験法すべてについて、以下のテンプレートを使用すること。結果部分は、試験法に固有のものである。
2. 試験報告書には以下の情報を含める。

一般情報：

- 試験依頼者、試験実施施設および試験責任者の氏名、名称および住所
- TG 458 および試験法への言及
- 溶解度法への言及。

習熟度の実証：

- 試験法の常用前に、試験施設が試験法に習熟していることを習熟度確認化学物質試験によって実証した旨の記述

参照標準（参照化学物質、陽性および陰性対照）および被験化学物質:

- 入手可能であれば、供給元、バッチ/ロット番号、有効期限、CAS 番号
- 該当する場合で現実に実行可能であれば、純度、不純物の化学的同定
- 外観、水への溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温）
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 各被験化学物質に対する溶媒/媒体の選択およびその妥当性。

単一成分化学物質:

化学物質識別情報（IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、純度、必要性および実行可能性に応じて不純物の化学的同定）。

多成分化学物質、UVCB、混合物：

化学物質識別情報（上記参照）、定量的な含有量および成分に関連する物理化学的特性等の入手可能な限りの特徴づけ。

溶媒/媒体：

例 DMSO、水、エタノール

- 供給元、バッチ/ロット番号
- 溶媒/媒体選択の根拠

試験法の条件:

- 使用した細胞株、その供給元、保存および維持条件、試験に使用した細胞の継代数および細胞密集度
- 試験前の播種に用いた細胞の計数法および均一な細胞数分布を確保するための措置
- 使用した照度計（モデル、装置設定等）使用したルシフェラーゼ基質（製品名、供給元、ロット）

©OECD 2020

- プレートの種類とその供給元およびコード
- プロトコルに規定された適用手順および曝露時間
- 満たすべき許容基準のリスト
- 試験手順を変更した場合、その記述
- 細胞毒性手順への言及。

AR-EcoScreen^{TM} 試験法で得られた結果:

以下の参照標準の結果の作表

- すべての参照標準について：発光シグナルの正規化データおよび許容基準の適用結果
- 誤差の測定値（例、SD、% CV または 95%信頼区間）

以下の被験化学物質の結果の作表

- 既知の場合は溶解度データおよび安定性
- 必要に応じて、被験化学物質が添加された培地中の沈殿物の測定
- 各ランについて:
  - 細胞毒性データ
  - 試験濃度
  - 発光シグナルの正規化データおよび誤差の測定値（例、SD、% CV または 95%信頼区間）
  - アゴニスト試験：適切な場合、PC_{max}、log PC_{10}、log PC_{50}、EC_{50} 値、最大誘導倍率
  - アンタゴニスト試験：log IC_{30}、log IC_{50}、最大阻害倍率
  - 判定基準適用後の化学物質ごとの結果（陽性または陰性）。
  - （2 回または 3 回のランの結果に基づく）化学物質ごとの結論（陽性または陰性）
- ラン実施数
- 参照化学物質および被験化学物質の濃度-反応関係を表すグラフ
- その他の関連する知見の記述。

AR-CALUX® 試験法で得られた結果:

以下の参照標準の結果の作表

- すべての参照標準について：発光シグナルの正規化データおよび許容基準の適用結果
- さらに、参照化学物質について：DHT の EC_{10} および EC_{50} 値、フルタミドの IC_{20} および IC_{50} 値
- 変動係数などの誤差の測定

以下の被験化学物質の結果の作表

- 既知の場合は溶解度データおよび安定性
- 必要に応じて、被験化学物質が添加された培地中の沈殿物の測定
- プレスクリーニングランについて：
  - 細胞毒性データ（LDH 漏出および顕微鏡観察）
  - 試験濃度
    - 発光シグナルの正規化データおよび誤差の測定値（例、SD、% CV または 95%信頼区間）

©OECD 2020

- 包括的ランについて：
  - 細胞毒性データ（顕微鏡観察）
  - 希釈係数を含む、試験濃度
  - 発光シグナルの正規化データおよび誤差の測定値（例、SD、% CV または 95%信頼区間）
  - アゴニスト試験：適切な場合、RPCmax、PCmax、EC10、EC50、PC10、PC50、logEC50 の|CV|
  - アンタゴニスト試験：適切な場合、RPCmin、PCmin、IC20、IC50、PC80、PC50、logIC50 の|CV|
  - 特異性対照:R2
  - （包括的ランに基づく）判定基準適用後の化学物質ごとの結果（陽性または陰性）。
- 特異性対照のグラフを含む、参照化学物質および被験化学物質の濃度-反応関係を表すグラフ
- その他の関連する知見の記述。

22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法で得られた結果:

以下の参照標準の結果の作表

- すべての参照標準について：発光シグナルの正規化データおよび許容基準の適用結果
- 誤差の測定値（例、SD、% CV または 95%信頼区間）

以下の被験化学物質の結果の作表

- 既知の場合は溶解度データおよび安定性
- 必要に応じて、被験化学物質が添加された培地中の沈殿物の測定
- 各プレスクリーニングランおよび各包括的ランについて:
  - 細胞毒性データ
  - 希釈係数を含む、試験濃度
  - 発光シグナルの正規化データおよび誤差の測定値（変動係数等）
  - アゴニスト試験：log PC_{10}、log PC_{50}、最大誘導倍率
  - アンタゴニスト試験：log IC_{30}、log IC_{50}、最大阻害倍率
  - 特異性対照:R^2
  - 判定基準適用後の化学物質ごとの結果（陽性または陰性）。
- （2 回または 3 回のプレスクリーニングランまたは 2 回または 3 回の包括的ランの結果に基づく）化学物質ごとの結論（陽性または陰性）。
- 実施したランの回数（プレスクリーニングおよび包括的試験）
- 特異性対照のグラフを含む、参照化学物質および被験化学物質の濃度-反応関係を表すグラフ
- その他の関連する知見の記述。

©OECD 2020

結果の考察

結論

©OECD 2020

補遺 C.（試験法 1）安定に形質移入されたヒト AR-EcoScreen™細胞株を用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験

最初に考慮すべき事項および限界

1. 本試験法を使用する前に「はじめに」を読むこと（本文 6〜9 頁）。

2. AR-EcoScreen™ 法では、AR-EcoScreen™ 細胞株を用いて（抗）アンドロゲン活性を検出する。本試験法では、もっぱらヒト AR に結合することにより引き起こされるアンドロゲン調節レポーター遺伝子の転写活性化および阻害を対象としているため、複雑な *in vivo* 系である細胞過程のアンドロゲン調節に直接外挿してはならない。また、*in vitro* 細胞系の代謝能が限られていることを考慮すると、この試験は、親分子の活性に関する情報のみを示している可能性が高い。

3. 本試験法は、エンドポイントとしてルシフェラーゼ活性を測定することにより、ヒト AR が介在する転写活性化および阻害を特異的に検出できるよう設計されている。PC 値と固定用量フォーマットを使用することで、ハイスループットのアッセイデザインを実現することができる。しかし、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイシステムの過剰活性化または阻害により、発光シグナルに対する化学物質依存性の干渉が発生することが知られている(1) (2) (3)。従って、ルシフェラーゼレポーター遺伝子とのこのような干渉が AR-EcoScreen™ ルシフェラーゼアッセイシステムにも発生する可能性がある。データを評価する際にはこれを考慮しなければならない。

4. この細胞株は、グルココルチコイド受容体（GR）介在性の応答を最小限にするように開発されたが、AR 選択性における制限は、GR クロストークの可能性を意味する(4) (5)。場合によっては、これにより、GR を活性化する化学物質が試験法で陽性に分類されることがある。さらに調査する必要があると判断された場合は、AR アンタゴニスト（ヒドロキシフルタミド（HF）など）を用いて被験化学物質を培養試験して受容体非介在性ルシフェラーゼシグナルおよび GR 活性化の両方を試験し、被験化学物質による応答がブロックされるかどうかを確認することができる（付録 1 参照）。

5. 試験法は単一の化学物質を用いて検証されたため、被験混合物への適用可能性は検討されていない。しかし理論上は、本試験法は多成分化学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たデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。

6. 本試験法に使用した用語の定義および略語の説明を本試験ガイドラインの補遺 A に示す。

7. AR-EcoScreen™ の試験法は、OECD 非動物試験検証管理グループからの試験管理チームの支援を受けて、化学物質評価研究機構（CERI）と国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）の共同研究により検証されている(6)。

©OECD 2020

8. 以前の TG458 草案（2016）に、0.1 µM HF を用いたアンタゴニストアッセイで AR EcoScreen™ 試験法が実施されたことが記載されている。これを 1.0 µM HF（表 B.2b 参照）に更新して、アッセイの感度を高め、アンタゴニストアッセイのバリデーションで用いた濃度と一致させた。性能基準が満たされた場合、0.1 µM HF を用いて実施した過去の試験の結果は信頼できるものである。

試験法の原理

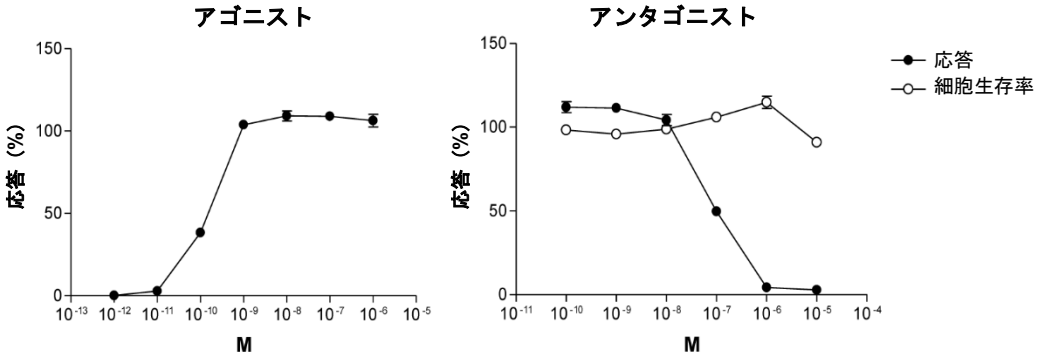
9. レポーター遺伝子技術を用いる本試験法は、機構に関するデータを提供する *in vitro* のツールである。この試験法は、リガンドによって引き起こされる AR のシグナル活性化またはブロックを証明するために用いる。リガンドと結合すると、受容体-リガンド複合体は細胞核へ移行し、そこで特異的な DNA 応答エレメントと結合し、ホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子の転写活性化を引き起こすことによりルシフェラーゼ酵素の細胞内発現量を増加させる。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ酵素により照度計での定量的測定が可能な生物発光生成物に変換される基質である。ルシフェラーゼ活性は、市販されている数多くの試験キットを用いることで速やかにかつ低廉な費用で測定することができる。

10. この補遺に示す試験系は、チャイニーズハムスター卵巣細胞株（CHO-K1）に由来する安定的に挿入された以下の 3 つの構築物を持つ AR-EcoScreen™ 細胞株を用いている：(i)ヒト AR 発現構築物（21 回の CAG トリヌクレオチドショートタンデムリピートを持つ Genbank ID M20132 と同一の、完全長のヒトレポーター遺伝子をコードする）、および(ii)最小熱ショックタンパク質プロモーターによって駆動される前立腺 C3 遺伝子応答エレメントの 4 本のタンデムリピートを有するホタルルシフェラーゼレポーター構築物。C3 遺伝子由来のアンドロゲン応答エレメントは、GR 介在性の応答を最小限に抑えるよう選択する。また、(iii)細胞生存率評価では、純粋なアンタゴニスト作用と細胞毒性に関連したルシフェラーゼ活性の低下とを区別するため、SV40 プロモーター下で安定的かつ非誘導的に発現させたウミシイタケシフェラーゼレポーター構築物を形質移入した。2 つの酵素活性は、同じ細胞および同じウェル内で同時に測定することができる。この特徴により、アンタゴニストの検出が容易になる(7) (8)。AR-Ecoscreen GR KO M1（JCRB1761）は、遺伝子編集により改変された GR KO を有する細胞株であり、まだ正式には検証されていないが、AR 介在性アンタゴニスト作用についてのより厳格な検討のために JCRB から入手することが可能である(9)。

11. **AR アゴニスト作用**のデータ判定は、被験化学物質により誘発される最大応答レベルに基づいている。この応答が、AR アゴニスト対照（PC_{AGO}）である 10 nM 5α-ジヒドロテストステロン（DHT）により誘発された応答の 10%（すなわち log PC_{10}）以上である場合、その被験化学物質を陽性とみなす。被験化学物質の **AR アンタゴニスト作用**のデータ判定は、500 pM DHT に対する 30%阻害応答（すなわち log IC_{30}）のカットオフ値に基づいている。応答がこの 30%AR ブロッキングを超える場合、その化学物質を AR アンタゴニスト陽性とみなす。データの解析および判定については、段落 48～60 でより詳しく説明している。典型的なアゴニストおよびアンタゴニストの参照化学物質曲線（DHT および HF）を図 C.1 に示す。

©OECD 2020

図 C.1.典型的な陽性対照の応答



実験室習熟度の実証

12. AR EcoScreen™で活性が未知の化学物質を試験する前に、試験系の応答性について、期待される結果が得られること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、新規に調製した細胞ストックのバッチそれぞれについて少なくとも 1 回行う。この確認は、アゴニスト作用については本試験ガイドライン補遺 B の表 B.4a、アンタゴニスト作用については同表 B.4b 記載の習熟度確認化学物質を独立して試験することによって行う。これは異なる日に少なくとも 2 回実施し、結果は補遺 B の表 B.4a および B.4b の分類および値と一致しなければならない。逸脱があればその正当性を示すこと。表 B.2a および B.2b では既知の主要な活性によって習熟度確認物質を分類しているが、習熟度評価にはこれを使用する。

手順

細胞株

13. アッセイには、安定に形質移入した AR-EcoScreen™細胞株を使用する必要がある。この細胞株は、参照 No. JCRB1328 として JCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）細胞バンクから、ライセンス契約を含めた物質移動合意書（MTA; Material Transfer Agreement）に署名した上で入手することができる。

14. 試験には、マイコプラズマを含まないことが確認された細胞のみを使用すること。マイコプラズマ感染の高感度検出には、PCR に基づく試験法が推奨される(10) (11) (12)。

細胞株の安定性

15. **アゴニストアッセイにおける**細胞株の安定性をモニターするため、DHT、メスタノロンおよびフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）を参照標準として使用すること。各アッセイ実施時に少なくとも 1 回は、表 C.1b に示す試験濃度範囲および表 C.a に示すプレート濃度の割り付けで、3 つの参照標準すべてについて完全な濃度反応曲線が得られ、結果は表 C.1a および C.1b に示す結果と一致しなければならない。

©OECD 2020

16. **AR アンタゴニスト作用**測定における細胞株の安定性をモニターするため、HF、ビスフェノール A（BPA）および DEHP を参照標準として使用すること。各アッセイ実施時に少なくとも 1 回は、表 C.1d に示す試験濃度範囲および表 C.2b に示すプレート濃度の割付で、3 つの参照標準すべてについて完全な濃度反応曲線が得られ、結果は表 C.1c および C.1d に示す結果と一致しなければならない。

細胞培養および播種条件

17. 以下の媒体を調製する。

- 希釈用培地:フェノールレッドを含まない D-MEM/F-12。
- 細胞増殖用培地:フェノールレッドを含まない D-MEM/F-12 に 5% v/v ウシ胎児血清（FBS）、ゼオシン（200 µg/mL）、ハイグロマイシン（100 µg/mL）、ペニシリン（100 units/mL）およびストレプトマイシン（100 µg/mL）を添加したもの。
- アッセイプレート用培地:フェノールレッドを含まない D-MEM/F-12 に 5% v/v チャコール・デキストラン処理（DCC）-FBS、ペニシリン（100 units/mL）およびストレプトマイシン（100 µg/mL）を添加したもの。

18. 細胞は、細胞増殖用培地と共に CO_2 インキュベーター（5% CO_2）内で 37±1°C で維持する。細胞密集度が 75～90%（すなわち 3～4 日ごと）になったら、φ100 mm の細胞培養ディッシュに細胞を継代し、10mL、密度 0.4～0.8 × 10^5 細胞/mL にする。アッセイプレート（96 ウェルプレート）の作製では、細胞をアッセイプレート用培地に懸濁し、90 µL/ウェル、1.0 × 10^5 細胞/mL になるようにマイクロタイタープレートのウェルに播種する。次に細胞を 5% CO_2 インキュベーターに入れ、37°±1°C で 24 時間、前培養してから化学物質への曝露を行う。

19. 応答の完全性を維持するため、細胞は凍結保存状態から取り出した後、調整済みの細胞増殖用培地にて 2 代以上継代させる。ただし、継代回数は 40 代を超えないようにする。AR-EcoScreen™細胞株は適切な培養条件下で最大 3 ヵ月間安定である。

20. DCC-FBS は市販品を入手することができる。DCC-FBS の選択はアッセイの性能にとって重要である。従って、増殖能および参照標準を用いたアッセイ性能への影響の確認に基づいて、適切な DCC-FBS を選択すべきである。

許容基準

陽性および陰性の参照標準

21. 試験前および試験中には、表 C.1b および C.1d に示す適切な濃度の既知の参照標準（アゴニストアッセイの陽性参照標準として DHT およびメスタノロン、アンタゴニストアッセイの陽性参照標準として HF および BPA、また、アゴニストおよびアンタゴニストアッセイの陰性参照標準として DEHP）を用いて試験系の応答性を検証する必要がある。バリデーション試験で得られた許容範囲値を表 C.1b および C.1c に示す(2)。各 AR アゴニスト/アンタゴニストアッセイにおける、これら 3 つの同時参照標準を各 AR アゴニスト/アンタゴニスト実験（材料、細胞の継代数を含め同じ条件下で、同じ技術者が実施）に含めなければならず、その結果は所

©OECD 2020

定の許容限度内であり、陽性参照標準の濃度反応曲線の形状はS字状でなければならない。これが満たされない場合には、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、血清や抗生物質の品質、濃度等）、アッセイをやり直す。許容基準を満たせた場合には、log PC_{50}、log PC_{10}、log IC_{30}、log IC_{50} の値のばらつきを最小限に抑えるため、常に同じ材料を使用して細胞培養を行うことが重要である。

22. 3 つの同時参照標準の許容基準は、アッセイの定量感度の精度を保証することができるが、定性的評価を目的とする場合、品質基準が満たされれば、参照標準の許容範囲（表 C.1b および C.1c に規定）からの逸脱を許容できることがある。ただし、各実験に参照標準を含め、表 C.1b および C.1c に示すパラメータに従って結果を判定しなければならず、陽性参照標準（参照化学物質および陽性対照）の濃度反応曲線は S 字状でなければならない。

表 C.1a.AR アゴニストアッセイの品質基準

PC_{AGO} の誘導倍率（10 nM DHT）	≥ 6.4
IF PC_{10}	1 + 2SD（VC 誘導）を超える

IF PC_{10}：AR アゴニスト対照（PC_{AGO}:10 nM DHT）の PC_{10}（10%）に相当する誘導倍率
SD:標準偏差、VC：媒体対照

以下の式により、PC_{AGO} の誘導倍率を算出する：

$$PC_{AGO}\text{の誘導倍率} = \frac{PC_{AGO}\text{の平均 RLU（10 nM DHT）}}{\text{VC の平均 RLU}}$$

RLU:相対発光量

表 C.1b.AR アゴニストアッセイのための参照標準の許容範囲

化学物質名 [CAS RN]	判定	logPC_{10}	logPC_{50}	試験範囲
5α-ジヒドロテストステロン（DHT）[521-18-6]	陽性：PC_{10} を算出する	-12.08 ~- 9.87	-11.03 ~ -9.00	1.0 x 10^{-12} ~ 1.0 x 10^{-6}M
メスタノロン [521-11-9]	陽性：PC_{10} を算出する	-10.92 ~- 10.41	-10.15 ~ -9.26	1.0 x 10^{-12} ~ 1.0 x 10^{-6}M
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP） [117-81-7]	陰性：PC_{10} は計算しない	-	-	1.0 x 10^{-11} ~ 1.0 x 10^{-5}M

©OECD 2020

表 C.1c.AR アンタゴニストアッセイの品質基準

AG ref の誘導倍率	≥ 5.0
PC_{ATG} の RTA（%）	≤46

AG ref = アンタゴニストアッセイにおけるアゴニスト参照（500 pM DHT）
RTA：相対的転写活性
PC_{ATG} = AR アンタゴニスト対照（500 pM DHT、1 µM HF）

以下の式により、AG ref の誘導倍率を算出する：

$$\text{AG ref の誘導倍率} = \frac{\text{AG ref（500 pM DHT）の平均 RLU}}{\text{VC の平均 RLU}}$$

VC:媒体対照、RLU：相対発光量

以下の式により、PC_{ATG} の RTA（%）を算出する。

$$PC_{ATG}\text{ の RTA（%）} = \left(\frac{PC_{ATG}\text{ の平均 RLU - VC の平均 RLU}}{\text{AG ref の平均 RLU - VC の平均 RLU}}\right) \times 100$$

©OECD 2020

表 C.1d.AR アンタゴニストアッセイのための参照標準の許容範囲

化学物質名 [CAS RN]	判定	log IC_{30}	log IC_{50}	試験範囲
ヒドロキシフルタミド（HF） [52806-53-8]	陽性： IC30 を算出する	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	1.0×10^{-10} ~ 1.0×10^{-5}M
ビスフェノール A（BPA） [80-05-7]	陽性： IC30 を算出する	-7.52 ~ -4.48	-7.05 ~ -4.29	1.0×10^{-10} ~ 1.0×10^{-5}M
フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP） [117-81-7]	陰性： IC30 は計算しない	-	-	1.0×10^{-10} ~ 1.0×10^{-5}M

媒体対照、AR アゴニスト対照および AR アンタゴニスト対照

23. **アゴニストアッセイでは**、内因性リガンド（10 nM の DHT）で処理した AR アゴニスト対照（$PC_{AGO)}$ ウェル（n=4）、媒体のみで処理した媒体対照（VC）ウェル（n=4）および細胞毒性の陽性対照（PC_{CT}、10 µg/mL のシクロヘキシミド）ウェル（n=4）を、表 C.2a および表 C.3b に示したプレートデザインに従い、各アッセイプレートで調製する。

24. **アンタゴニスト試験では**、媒体対照（n=3）、AR アゴニスト対照（PC_{AGO}、10 nM の DHT、n=3）、AR アンタゴニスト対照（PC_{ATG}、500 pM DHT および 1 µM HF、n=3）、細胞毒性の陽性対照（PC_{CT}、10 µg/mL のシクロヘキシミド、n=3）およびアゴニスト参照（AG ref、500 pM の DHT、n=12）を、表 C.2b および表 C.3b に示したプレートデザインに従い、各アッセイプレートで調製する。

AR アゴニストアッセイの品質基準

25. PC_{AGO}（10 nM DHT）のルシフェラーゼ活性の平均値は、アゴニストアッセイの各プレートの平均 VC の 6.4 倍以上であること。この基準は、バリデーション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。

26. アッセイの品質管理に関して、AR アゴニスト対照（PC_{AGO}:10 nM DHT）の log PC_{10}（10%）に対応する誘導倍率（IF PC_{10}）は、同時 VC の誘導値（= 1）の 1 + 2SD よりも大きくなければならない。

AR アンタゴニストアッセイの品質基準

27. AG ref（500 pM DHT）のルシフェラーゼ活性の平均値は、アンタゴニストアッセイにおける各プレートの平均 VC の 5.0 倍以上であること。この基準は、バリデーション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。

28. PC_{ATG}（500 pM DHT および 1 µM HF）の RTA が 46%未満であること。

要約すると：

29. 許容基準は以下のとおりである：

©OECD 2020

AR アゴニストアッセイについて：

- PC_{AGO}（10 nM DHT）のルシフェラーゼ活性の平均値は、各プレートの平均 VC の 6.4 倍以上であること。
- 同時 PC_{AGO}（10 nM DHT）の log PC_{10} 値に相当する誘導倍率が、VC の誘導倍率の値の 1 + 2SD よりも大きくなければならない。
- 陽性参照標準の濃度反応曲線の形状は S 字状でなければならない。
- 3 種類の参照標準の結果が、許容範囲内に収まること（表 C.1b）。

AR アンタゴニストアッセイについて：

- AG ref（[500 pM DHT]/[媒体対照]）の誘導倍率は、各プレートの平均 VC と比較して 5.0 以上でなければならない。
- PC_{ATG} の RTA（%）が 46 未満であること。
- 陽性参照標準の濃度反応曲線の形状は S 字状でなければならない。
- 3 種類の参照標準の結果が、許容範囲内に収まること（表 C.1d）。

媒体

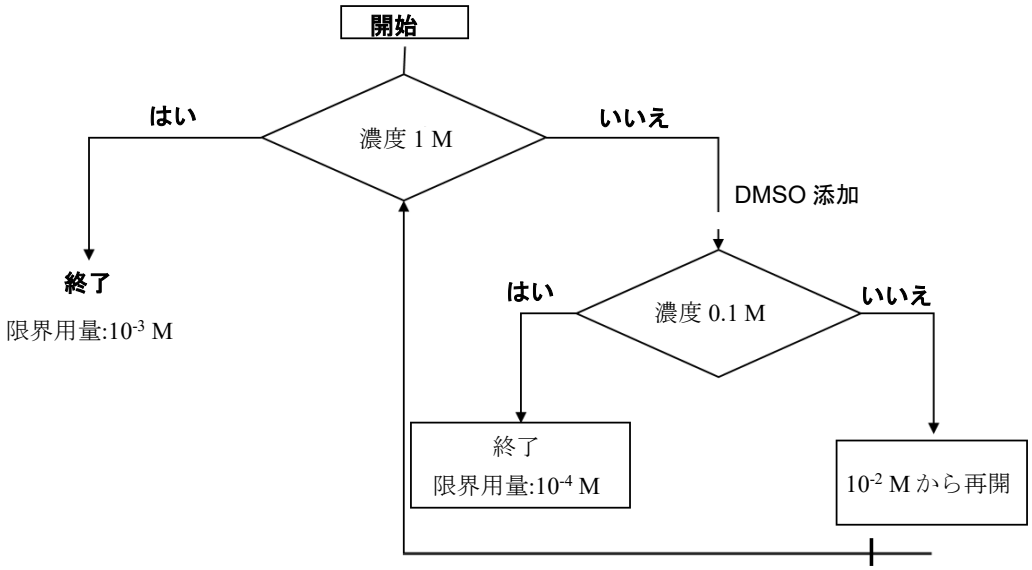
30. 様々な陽性対照、陰性対照および被験化学物質に使用しているものと同濃度の適切な溶媒を同時 VC として用いる。被験化学物質は化学物質を溶解することができ、細胞培地と混和可能な溶媒に溶解する。水、エタノール（純度 95～100%）およびジメチルスルホキシド（DMSO）が細胞に適した媒体であると考えられる。一般的には、DMSO を使用する。この場合、ウェル内の最終濃度は 0.1%（v/v）を超えてはならない。その他の媒体（例:エタノール）については、使用した最高濃度で細胞毒性を示さず、アッセイの性能に影響しないことを実証しなければならない（ウミシイタケルシフェラーゼの応答により確認）。

被験化学物質の調製

31. 被験化学物質は適当な溶媒（段落 30 参照）に溶解し、同じ溶媒で公比 1:10 で段階希釈する。被験化学物質の最高溶解濃度を決定するために、図 C.2 に示すフロー図に従って溶解度試験を実施しなければならない。

©OECD 2020

図 C.2.溶解度試験フロー図



限界用量：アッセイ濃度として試験する最高濃度。
はい：沈殿無し、いいえ：沈殿あり

32. 溶解度試験は、アッセイの最高濃度を決定するための非常に重要なステップであり、アッセイの感度に影響を及ぼす可能性がある。最高濃度は、アッセイプレート用培地中の最高濃度域で沈殿が起こらないように設定する。いずれの濃度においても沈殿には注意し、沈殿が認められた場合、その濃度は用量反応分析には含めない。

細胞毒性評価

33. AR アンタゴニストについては、高いレベルの細胞毒性があると典型的なシグモイド応答を有意に変化させたり、認められなくする場合があるため、データを判定する際には考慮に入れる必要がある。細胞毒性は、AR-EcoScreen™ 細胞株におけるウミシイタケルシフェラーゼ活性を用いて評価することができる。この細胞株はウミシイタケルシフェラーゼを構成的に発現するために確立されたものである。従って、AR 介在性の転写活性と細胞毒性は同じアッセイプレートで同時に評価すべきである。AR アゴニストについては、細胞毒性も濃度反応曲線の形状に影響を及ぼす可能性がある。その場合、同一の被験化学物質を用いたアンタゴニストアッセイの結果から細胞毒性を評価する。

34. 細胞毒性試験の結果、被験化学物質のある濃度においてウミシイタケルシフェラーゼ活性が 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。被験化学物質の初回ランの結果、固有の細胞毒性が認められた場合、最高濃度を低くするべきである。次式により各ウェルの細胞毒性（%）を算出し、各被験化学物質濃度の細胞毒性（%）について、同濃度の 3 連ウェルの平均値を算出する。

©OECD 2020

アゴニストアッセイについて、

$$\text{細胞毒性(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{各ウェルの RLU - } PC_{CT} \text{の平均 RLU}}{\text{VC の平均 RLU - } PC_{CT} \text{の平均 RLU}} \right) \times 100$$

アンタゴニストアッセイについて、

$$\text{細胞毒性(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{各ウェルの RLU - } PC_{CT} \text{の平均 RLU}}{\text{AG ref の平均 RLU - } PC_{CT} \text{の平均 RLU}} \right) \times 100$$

被験化学物質への曝露およびアッセイプレート構成

35. AR アゴニストアッセイでは、各被験化学物質をポリプロピレン製プレート上の一列またはその他の適切な物を用いて DMSO または適切な溶媒で段階希釈して最終的な段階希釈濃度、つまり溶解度試験で決定した最高濃度から始めて一般的な希釈倍率 10 で希釈し（例えば、1 mM、100 µM、10 µM、1 µM、100 nM、10 nM および 1 nM［10^{-3}～10^{-9} M］）、マイクロタイタープレートのウェルに 3 回の反復試験として加える。

36. 被験化学物質の各試験濃度について、化学物質希釈手順（ステップ 1 および 2）および細胞曝露手順（ステップ 3）は以下のように実施することができる。

- ステップ 1:化学物質の希釈：まず溶媒に溶解した被験化学物質 10 µL を培地 90 µL に希釈する。
- ステップ 2:次に、ステップ 1 で調製した希釈化学物質 10 µL を培地 90 µL に希釈する。
- ステップ 3:細胞の化学物質への曝露：（ステップ 2 で調製した）希釈化学物質 10 µL を、9×10^3 細胞/90 µL/ウェルを含むアッセイウェルに添加する。
    - 各ウェルの培地の最終的な容量は 100 µL となることが望ましい。

37. 参照標準および被験試料は、表 C.2a および表 C.3a に示すように割り付けることができる。

©OECD 2020

表 C.2a 参照標準のアゴニストアッセイ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	DHT			メスタノロン			DEHP			被験化学物質#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 µM	→	→	1 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	100 nM	→	→	100 nM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	10 nM	→	→	10 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	1 nM	→	→	1 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	100 pM	→	→	100 pM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	1 pM	→	→	1 pM	→	→	10 pM	→	→	1 nM	→	→
H	VC	→	→	→	PC_{AGO}	→	→	→	PC_{CT}	→	→	→

VC:媒体対照（DMSO）
PC_{AGO}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
PC_{CT}:細胞毒性対照（10 µg/mL シクロヘキシミド）
#: 被験化学物質の濃度は一例である

38. AR アンタゴニストアッセイでは、各被験化学物質をポリプロピレン製プレート上の一列またはその他の適切な物を用いて DMSO または適切な溶媒で段階希釈して最終的な段階希釈濃度、つまり溶解度試験で決定した最高濃度から始めて一般的な希釈倍率 10 で希釈し（例えば、1 mM、100 µM、10 µM、1 µM、100 nM および 10 nM［1.0×10^{-3}〜1.0×10^{-8} M］）、マイクロタイタープレートのウェルに 3 回の反復試験として加える。

39. 被験化学物質の各試験濃度について、化学物質希釈手順（ステップ 1 および 2）および細胞曝露手順（ステップ 3）は以下のように実施することができる。

- ステップ 1:化学物質の希釈：まず溶媒に溶解した被験化学物質 10 µL を 56 nM DHT/DMSO*を含む培地 90 µL で希釈する。
- ステップ 2:次に、ステップ 1 で調製した希釈化学物質 10 µL を培地 90 µL に希釈する。
- ステップ 3:細胞の化学物質への曝露：（ステップ 2 で調製した）希釈化学物質 10 µL を、9×10^3 細胞/90 µL/ウェルを含むアッセイウェルに添加する。
    - 各ウェルの培地の最終的な容量は 100 µL となることが望ましい。
    - * 56nM DHT/DMSO を添加して、希釈後に 500 pM DHT、0.1% DMSO となるようにする。

40. 参照標準および被験試料は、表 C.2b および表 C.3b に示すように割り付けることができる。

©OECD 2020

表 C.2b.参照標準のアンタゴニストアッセイ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	HF			ビスフェノール A			DEHP			被験化学物質#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	AG ref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	PC_{AGO}	→	→	PC_{ATG}	→	→	PC_{CT}	→	→

VC:媒体対照（DMSO）
PC_{AGO}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
AG 参照:AR アゴニスト参照（DMSO）
PC_{ATG}:AR アンタゴニスト対照（1 µM HF）
PC_{CT}:細胞毒性対照（10 µg/mL シクロヘキシミド）
**灰色のウェルは 500 pM DHT が添加されている
#: 被験化学物質の濃度は一例である

41. （表 C.2a および C.2b に示すように）各実験において参照標準（アゴニストアッセイでは DHT、メスタノロンおよび DEHP；アンタゴニストアッセイでは HF、BPA および DEHP）を試験しなければならない。10 µg/mL シクロヘキシミド（PC_{CT}）を用いた細胞毒性対照並びに、10 nM DHT（PC_{AGO}）で処理したウェル、DMSO（または適切な溶媒）のみで処理したウェル（VC）を、アゴニストアッセイの各試験アッセイプレートに含めなければならない（表 C.3a）。アンタゴニストアッセイの場合、10 nM DHT を用いた AR アゴニスト対照（PC_{AGO}）、DMSO（または適切な溶媒）を用い、500 pM DHT を添加した AR アゴニスト参照（AG ref）、1 µM HF を用い、500 pM DHT を添加した AR アンタゴニスト対照（PC_{ATG}）、および 10 µg/mL シクロヘキシミドを用いた細胞毒性対照（PC_{CT}）を、各アッセイプレートに含めなければならない（表 C.3b）。由来の異なる細胞（継代数やロット番号が異なる場合等）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標準の試験を行う必要がある。

©OECD 2020

表 C.3a.被験化学物質およびプレート対照化学物質のアゴニストアッセイの
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_{AGO}	→	→	→	PC_{CT}	→	→	→

VC:媒体対照（DMSO）
PC_{AGO}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
PC_{CT}:細胞毒性対照（10 μg/mL シクロヘキシミド）
一例として、被験化学物質の濃度を示す。

©OECD 2020

表 C.3b.被験化学物質およびプレート対照化学物質のアンタゴニストアッセイの 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	→	→	100 pM	→	→
G	AG ref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	PC_{AGO}	→	→	PC_{ATG}	→	→	PC_{CT}	→	→

VC:媒体対照（DMSO）
PC_{AGO}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
AG 参照:AR アゴニスト参照（DMSO）
PC_{ATG}-:AR アンタゴニスト対照（1 µM HF）
PC_{CT}:細胞毒性対照（10 µg/mL シクロヘキシミド）
**灰色のウェルは 500 pM DHT が添加されている
一例として、被験化学物質の濃度を示す。

43. 必要に応じて、エッジ効果が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。例えば、縁の部分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。

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

45. 揮発性の高い化学物質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場合には、「プレートシーラー」の使用が試験実施中に各ウェルを確実に分離する上で有用であり、このような例には推奨される。

46. 独立性を確保するために、新たに調製したアッセイ試薬および被験化学物質の

©OECD 2020

希釈液を用いて、同じ化学物質について確定的な試験を異なる日に反復しなければならない。1 回のランで複数の化学物質を同時に試験する場合は、化学物質の位置の影響を避けるため、化学物質を試験ウェルに添加する順序を変えながら、同じプレートデザインを維持することが望ましい。

ルシフェラーゼ活性の測定

47. 許容基準を満たす限り、AR 応答（ホタルルシフェラーゼ活性）および細胞毒性（ウミシイタケルシフェラーゼ活性）の両方を同時に検出するには、市販のデュアルレポーターアッセイシステム（Promega、E2920 または同等品）が望ましい。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。手順は製造業者の指示に従い、以下の変更を加えて行う。例えば、Dual-Glo ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega、E2920）を用いる場合、基質を添加する前にアッセイプレートのウェルから 60 µL の上清を除去し、最初の基質 40 µL をアッセイウェルに直接添加して、ホタルルシフェラーゼのシグナルを測定する。最後に、2 つ目の基質 40 µL を元のプレートのアッセイウェルに加えて、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を検出する。ルシフェラーゼアッセイ試薬［Steady-Glo® Luciferase Assay System（Promega、E2510 または同等のもの）等］または標準ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega、E1500 または同等のもの）は、AR 応答（ホタルルシフェラーゼ活性）のみの検出に使用することができる。Steady- Glo Luciferase Assay System（Promega、E2510）を用いる場合は、調製した試薬 40 µL をアッセイウェルに直接添加すること。標準ルシフェラーゼアッセイシステム（Promega、E1500 または同等のもの）を用いる場合は、基質を添加する前に Cell Culture Lysis Reagent（Promega、E1531 または同等のもの）を添加しなければならない。

データの分析

48. **アゴニストアッセイの場合**、陽性対照（10 nM DHT）に対する相対的な転写活性を求めるため、同一プレートからの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.媒体対照（VC）の平均値を算出する。
- ステップ 2.各ウェルの値から VC の平均値を引いて、媒体による影響またはノイズを差し引く。
- ステップ 3.補正した PC_{AGO}（= 正規化した PC_{AGO}）の平均値を算出する。
- ステップ 4.プレートの各ウェルの補正した値を、正規化した PC_{AGO} の平均値（PC_{AGO} を 100%とする）で割る。
- 各ウェルの最終的な値は、PC_{AGO} の応答性に対する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について相対的転写活性の平均値を計算する。応答には 2 つの次元がある。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（段落 51～60 参照）。

49. **アンタゴニストアッセイの場合**、相対的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）。

©OECD 2020

- ステップ 1.VC の平均値を計算する。
- ステップ 2.各ウェルの値から VC の平均値を引いて、媒体による影響またはノイズを差し引く。
- ステップ 3.補正した AG ref（= 正規化した AG ref）の平均値を算出する。
- ステップ 4.プレートの各ウェルの補正した値を、正規化した AG ref の平均値（AG ref を 100%とする）で割る。

50. 各ウェルの最終的な値は、AG ref の最大応答に対する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。応答には 2 つの次元がある。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（段落 51～60 参照）。

パラメータの算出:EC_{50}、log PC_{50}、log PC_{10}、log IC_{50} および log IC_{30} 誘導に関する考慮事項

51. EC_{50} を計算するには完全な濃度反応曲線が必要となるが、（例えば、細胞毒性や溶解度の問題等が原因で）被験物質の濃度範囲には制限があるため、この計算が常に実施可能または実際的であるとはいえない。しかし、EC_{50} 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、可能な場合にはこれらのパラメータも報告する必要がある。EC_{50} 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）。

52. 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 EC_{50} を算出する(13)。

- $Y = Bottom + (Top-Bottom) / (1 + 10 \exp((\log EC_{50} - X) \times \text{ヒル勾配}))$
- ここで、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。

53. 細胞毒性を評価するため、細胞生存率は、段落 34 に示した式に従い、アゴニストアッセイでは媒体対照ウェルのウミシイタケルシフェラーゼ活性の平均値に対する、アンタゴニストアッセイでは AG ref （500 pM DHT）ウェルのウミシイタケルシフェラーゼ活性の平均値に対する、化学処理したウェルのウミシイタケルシフェラーゼ活性の割合（%）として表す。

54. アゴニストアッセイの場合、各被験化学物質について以下の情報を示さなければならない。

(i) 同一プレート上で PC_{AGO} （10 nM DHT）によって誘導される応答に対する割合（RPC_{max}）（%）で表される、被験化学物質によって誘導される最大応答レベル。

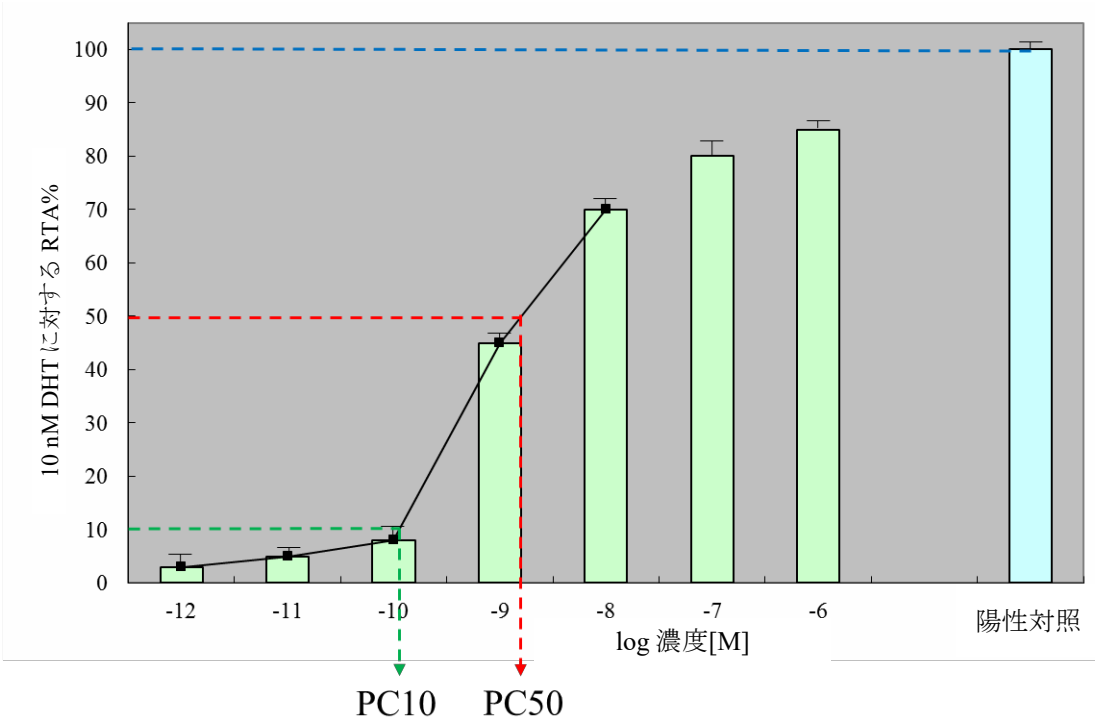
(ii) 陽性化学物質については、参照化学物質 DHT の作用の 10%に相当する作用を誘導する濃度（log PC_{10}）、および適切な場合は参照化学物質 DHT の作用の 50%に相当する作用を誘導する濃度（log PC_{50}）。

©OECD 2020

55. log PC_x 値（x は PC_{AGO} と比較して 10%または 50%の誘導といった、選択した応答を示す）の概要図を図 C.3 に示す。log PC_{10} および log PC_{50} 値は、PC_{AGO}（AR アゴニスト対照; 10 nM DHT）により誘導される転写活性の 10%または 50%を誘発すると推定される被験化学物質濃度と定義される。各 log PC_x 値は、転写活性の 2 つの変数データポイントを用いた単純な線形回帰により算出することができる。log PC_x 値のすぐ上とすぐ下のデータ点の座標を、それぞれ（a,b）および（c,d）とした場合、log PC_x 値は次の式および図 C.3 を用いて計算できる。

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

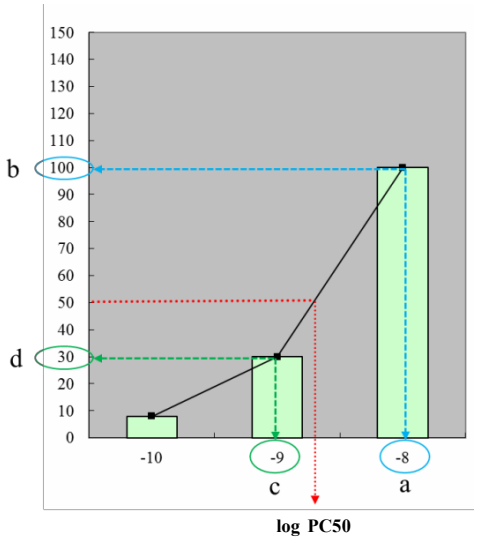
図 C.3.log PC_x 値の概要図



アゴニストアッセイでは、PC_{AGO} （AR アゴニスト対照；10 nM DHT）が各アッセイプレートに含まれる。
RTA：相対的転写活性

©OECD 2020

図 C.4.log PC_{50} の計算例



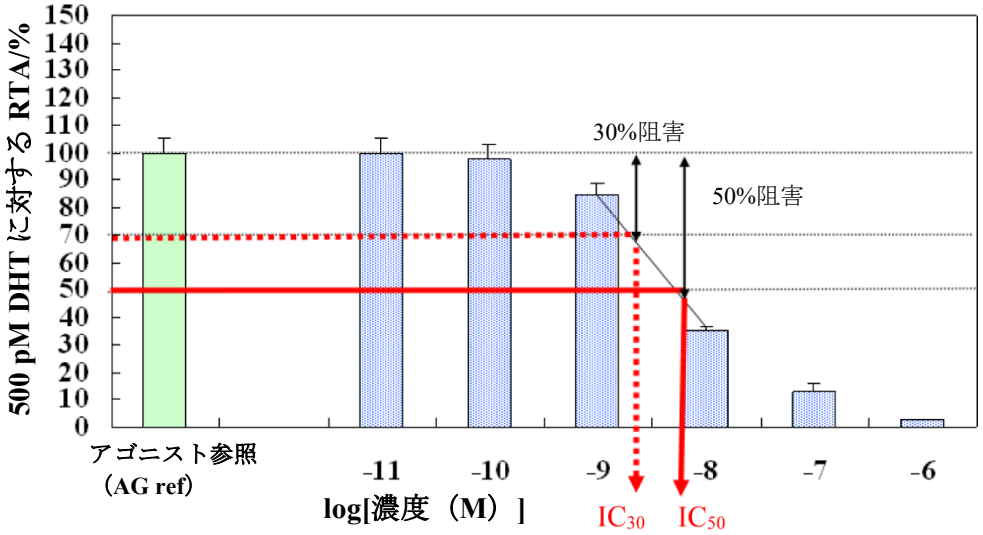
56. アンタゴニストアッセイの場合、各陽性被験化学物質について、500 pM DHT で誘導される転写活性の 30%阻害を示す濃度（log IC30）、および適切な場合は 500 pM DHT の活性の 50%阻害を示す濃度（log IC50）を提示する。

57. log IC_x 値（x は DHT 対照と比較して 30%または 50%の阻害といった、選択した応答を示す）の概要図を図 C.5 に示す。log IC_{50} および log IC_{30} 値は、500 pM DHT により誘導される転写活性の 50%または 30%を阻害すると推定される被験化学物質濃度と定義される。これらの値は、log PC 値と同じ方法で計算できる。各 log IC_x 値は、転写活性の 2 つの変数データポイントを用いた単純な線形回帰により算出することができる。log IC_x 値のすぐ上とすぐ下のデータ点の座標を、それぞれ（c,d）および（a,b）とした場合、log IC_x 値は次の式および図 C.5 を用いて計算できる。

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

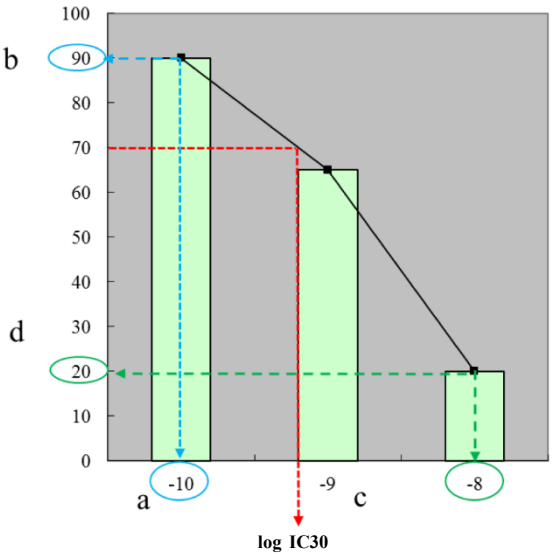
©OECD 2020

図 C.5.log IC 値の概要図



アンタゴニストアッセイでは、AG ref（500 pM DHT を添加した 0.1% DMSO）が各アッセイプレートに含まれる。
RTA：相対的転写活性

図 C.6.log IC_{30} の計算例



58. 純粋なアンタゴニスト作用と細胞毒性に関連したルシフェラーゼ活性の低下を区別するために、AR-EcoScreen™ は AR 応答エレメントにより誘導的に発現するホタルルシフェラーゼと、安定的かつ非誘導的に発現するウミシイタケルシフェラーゼの 2 種類のルシフェラーゼを発現するよう設計されている。

59. デュアルレポーターアッセイシステムを用いることで、1 回のプレートランで同じ細胞における細胞生存率とアンタゴニスト作用の両方を評価することができる。細胞毒性対照（PC_{CT}、10 µg/mL シクロヘキシミド）に対する応答は、すべ

©OECD 2020

ての試料ウェルから PC_{CT} 値（いわゆる「ウミシイタケ活性」）を差し引くことで、ウミシイタケ活性を調整するために用いられる。AR Ecoscreen™ アッセイを用いて化学物質の真の細胞毒性を評価するには、このように修正された細胞生存率を使用しなければならない。細胞生存率が被験化学物質の特定の濃度で 80%未満の場合、この/これらのデータポイントは計算から除外する。

60. 結果（すなわち被験化学物質の陽性または陰性判定）は、少なくとも 2 回または 3 回の独立したランに基づいていなければならない。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 回目のランを行わなくてもよい。許容できる結果とは、次の条件を満たすものをいう。

- 許容基準を満たしている（段落 21～29 参照）
- 3 連のウェルで再現性がある（CV<20%）。

データ判定基準

61. **アゴニストアッセイについて**、データ判定基準を表 C.4a 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、50%（log PC_{50}）または 10%（log PC_{10}）が得られる濃度として結果を表すことにより、この目標が達成される。ただし、被験化学物質によって誘導された最大応答（RPC_{max}）が、2 回のランのうち 2 回とも、もしくは 3 回のランのうち 2 回で参照化学物質の応答の 10%と同等またはこれを超えた場合は当該化学物質を陽性と判定し、RPC_{max} が、少なくとも 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 回で参照化学物質の応答の 10%に満たなかった場合には、陰性とみなす。

表 C.4a.アゴニストアッセイにおける陽性および陰性の判定基準

陽性	陽性対照の応答の 10%と同等またはこれを超える RPC_{max} が得られた場合。
陰性	RPC_{max} が陽性対照の応答の 10%に満たなかった場合。

62. **アンタゴニストアッセイについて**、データ判定基準を表 C.4b 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、50%（log IC_{50}）または 30%（log IC_{30}）が得られる濃度として結果を表すことにより、この目標が達成される。ただし、少なくとも 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 log IC_{30} が算出できた場合は被験化学物質を陽性とし、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 log IC_{30} が計算できなかった場合は陰性とする。

表 C.4b.アンタゴニストアッセイにおける陽性および陰性の判定基準

陽性	log IC_{30} が算出された場合。
陰性	log IC_{30} が計算できない場合。

©OECD 2020

63. アゴニストアッセイにおける log PC_{10}、log PC_{50}、RPC_{max} およびアンタゴニストアッセイにおける log IC_{50}、log IC_{30} の計算は、OECD 公式ウェブサイトの試験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。

64. log PC_x 値または log IC_x 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のベースライン値に高い変動係数（%CV）を有するばらつきが認められた場合は、このデータは信頼性に欠けると判断し、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。log PC_x または log IC_x の計算に用いる同一アッセイプレート上のデータポイントに関する 3 連ウェルの生データ（すなわち、発光強度データ）の%CV は、20%未満でなければならない。曖昧な結果または不確定な結果が疑われる場合は、追加のランまたはチェックを検討することができる。

65. 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。

©OECD 2020

参考文献

1. Escande, A., et al. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.

2. Kuiper, G.G., et al. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-4263.

3. Tarnow, P., Tralau, T., Hunecke, D., Luch, A.(2013), Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells. *Toxicology In Vitro.* 27, 1467-1475.

4. Satoh, K., Nonaka, R., Ohyama, K., Nagai, F. (2005), Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen). *Journal of Health Science*, 51(5), 557–568.

5. Wilson V. S., Bobseine K., Lambright C. R. and Gray Jr. L. E., (2002), A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicological. Sciences*. 66 (1): 69-81.

6. OECD (2016), Validation report of Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transactivation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.241), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

7. Araki N, Ohno K, Nakai M, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by *in vitro* reporter gene assays using AR-EcoScreen cells. *Toxicology In Vitro.* 19(6):831-842.

8. Araki N, Ohno K, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Evaluation of a rapid *in vitro* androgen receptor transcriptional activation assay using AR-EcoScreen cells. *Toxicology In Vitro.* 19(3):335-352.

9. Zwart, N, Andringa, D, de Leeuw, W-J, Kojima, H, Iida, M, Houtman, C J, de Boer, J, Kool, J, Lamoree, M H, Hamers, T. (2017). Improved androgen specificity of AR-EcoScreen by CRISPR based glucocorticoid receptor knockout. *Toxicology in Vitro.* 45, 1–9.

10. 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.

11. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii H (1995), Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.* 57(4), 769-771.

12. 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), 953-959.

13. 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. *American Journal of Physiology*, 235, E97-l02.

©OECD 2020

付録 C.1

偽陽性：AR 非介在性の発光シグナルの評価

1. 偽陽性は、AR 非介在性のルシフェラーゼ遺伝子の活性化、この遺伝子産物の直接的な活性化、または無関係の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、AR アンタゴニスト（無毒性濃度のヒドロキシフルタミド（HF）等）が応答に及ぼす影響を検査する必要がある。

2. 本アプローチの妥当性を確保するためには、次のアゴニスト作用を同一のプレート上で試験する必要がある。

- 1 µM HF の存在下、非存在下における化学物質のアゴニスト作用（3 回反復）
- VC（3 回反復）
- µM HF （3 回反復）
- PC_{AGO} として 500 pM DHT（3 回反復）

データ判定基準

3. 注：すべてのウェルを、同一濃度の媒体で処理しなければならない。

- 化学物質のアゴニスト作用が、HF の処理によって影響されない場合は、当該化学物質を「陰性」に分類する。
- 化学物質のアゴニスト作用が阻害される場合は、判定基準を適用する（表 C.5a）。
- 1 µM HF（AR アンタゴニスト）処理により、いずれかの濃度におけるアゴニスト作用が抑制された場合、AR アンタゴニスト非処理ウェルと AR アンタゴニスト処理ウェルの応答の差を算出する。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。

  真の応答 = （HF 無しの応答）-（HF 有りの応答）

データの解析

4. 性能標準を確認する。

5. 同一条件下で処理した複数のウェル間の CV を確認する。

   a VC の平均値を計算する
   b HF で処理して**いない**各ウェルの値から VC の平均値を引く
   c HF の平均値を計算する
   d HF で処理した各ウェルの値から VC の平均値を引く
   e PC_{AGO} の平均値を計算する
   f その他のすべてのウェルの、PC_{AGO} に対する相対的転写活性を計算する

©OECD 2020

補遺 D.（試験法 2）:安定に形質移入されたヒト AR-CALUX®細胞株を用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験 [1]

最初に考慮すべき事項および限界

1. 本試験法を使用する前に「はじめに」を読むこと（本文 6〜9 頁）。

2. AR-CALUX®(*)転写活性化試験では、ヒト骨肉腫 U2OS AR-CALUX®細胞株を使用して、ヒトアンドロゲン受容体（hAR）を介する（抗）アンドロゲン作用を検出する。AR-CALUX®細胞株は安定的に形質移入された hAR を発現するが、他のステロイドホルモン受容体をほとんどまたは全く発現しない(1)。

3. 本試験法は、エンドポイントとして生物発光を測定することにより、AR 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。生物発光はシグナル対ノイズ比が高いため、様々なバイオアッセイで読み出しに一般的に使用されている(2)。特定の luc 形質転換細胞株では発光シグナルに対する化学物質依存性の干渉が報告されているが、CALUX 細胞株では認められなかった。

4. 細胞株の代謝活性は低い。S9 画分を用いた試験法を組み合わせることにより、代謝が被験化学物質の活性に及ぼす影響を検討することが可能となり(3)、現在検証が行われている（2020）。

5. 当該試験法は、ハイスループットスクリーニングを目的として用いられている(4)。この試験法は OECD ガイダンス文書 34 に従ったバリデーションを受けてはいない。

6. 理論上は、本試験法は多成分化学物質および混合物の試験に適用可能である。本試験法のバリデーション試験では、主に単一の被験化学物質を使用した。混合物または試験が困難な化学物質（例えば、不安定な物質）について試験を検討する場合、そうした試験の結果が科学的に意味のある結果をもたらすか否かについて事前に考慮する必要がある。

7. AR-CALUX®試験法のバリデーション試験では、意図した目的に対するアッセイの信頼性および妥当性が実証された(5)。試験法プロトコルは参照文献(6)に記載されている。

8. 本試験法に使用した用語の定義および略語の説明を本試験ガイドラインの補遺 A に示す。

試験法の原理

9. 試験法は、レポーター遺伝子の転写活性化を評価するために用いられる。

[1] 注(*)：「CALUX」 は Abraham Brouwer が所有する登録商標である。BioDetection Systems BV（BDS）は、この商標を使用し、サブライセンスする独占的な世界的権利を取得している。

©OECD 2020

ARはリガンドに結合すると核に移行する。核内で受容体-リガンド複合体は特定のDNA 配列に結合し（アンドロゲン応答性エレメント:ARE）、ホタルルシフェラーゼのレポーター遺伝子を転写活性化して、その結果ルシフェラーゼ酵素の細胞内発現量を増加させる。基質ルシフェリンの添加およびその後の触媒酸化の後、光が放出される。発光は照度計を用いて、容易に検出、定量することができる。

10. 本試験系は安定的に形質移入された AR-CALUX®細胞を用いる。AR-CALUX®細胞はヒト骨芽細胞型骨肉腫U2OS細胞株に由来している。リン酸カルシウム共沈法を用いて、ヒトU2OS細胞に3xARE-TATA-Luc および pSG5-neo-hAR を安定的に形質移入した。U2OS 細胞株は、内因性受容体活性がほとんどまたは全くないという所見に基づき、U2OS 細胞株をアンドロゲン（および他のステロイドホルモン）応答性レポーター細胞株の優れた候補として選択した。内因性受容体がないことをルシフェラーゼレポータープラスミドのみを用いて評価したところ、受容体リガンドを添加しても活性を示さなかった。さらに、コグネイト受容体を一過的に導入したところ、この細胞株は強力なホルモン介在性応答を裏付けた(1)。

11. AR-CALUX®細胞株を用いて行う化学物質の（抗）アンドロゲン活性の試験には、プレスクリーニングランおよびこれに続く包括的ラン/特異性対照試験が含まれる。プレスクリーニングランでは、被験化学物質の溶解度、細胞毒性および包括的試験のための精緻化された濃度範囲を決定する。これに続くアゴニスト作用およびアンタゴニスト作用の包括的ランでは、精緻化された濃度範囲とその後のデータ判定を用いて被験化学物質を評価する。アンタゴニスト作用については、被験化学物質の包括的ランおよび特異性対照試験を同時に評価する。

12. 特異性対照試験は、真の競合的アンタゴニストと（細胞毒性、細胞ストレスまたは特異的阻害等による）偽陽性アンタゴニストを区別するために行う。8 点の濃度の被験化学物質で処理する場合、細胞は、参照アゴニスト DHT の EC_{50} 濃度および 100x EC_{50} 濃度の両方に曝露する。これは同一のプレートで行う。これは 2 つの用量反応をもたらし、このうちの高リガンド濃度（100x EC_{50}）で得られた用量反応は右にシフトする（図 D.6 参照）。このシフトは定量的に測定することができ、判定基準が設定された（R^2）。データ判定の基準は段落 70 に詳述する。略述すると、連続した 2 つ以上の被験化学物質の濃度において、参照標準 DHT による最大応答の 10%（PC_{10}）以上の応答を示した場合、この被験化学物質をアゴニスト作用について陽性とみなす。連続した 2 つ以上の被験化学物質の濃度において、参照標準フルタミドの最大応答の 80%（PC_{80}）以下の応答を示し、特異性対照基準を満たす場合、この被験化学物質をアンタゴニスト作用について陽性とみなす。

実験室習熟度の実証

13. 活性が未知の化学物質の試験に本試験法を用いる前に、各実験室は試験法の使用に関する習熟度を実証しなければならない。習熟度は、アゴニストおよびアンタゴニスト活性について習熟度確認化学物質（補遺 B の表 B.4a および B.4b 参照）を試験することにより実証される。この試験では試験系の応答性も確認する。試験は異なる日に少なくとも 2 回実施し、結果は表 B.4a および B.4b に記載されている分類および値と一致しなければならない。さらに、参照標準および媒体/溶媒対照を用いて得られたデータの履歴データベースを維持し、試験法の再現性を各

©OECD 2020

実験室において経時的に確認しなければならない。

手順

細胞株

14. 本試験法には、安定に形質移入した U2OS AR-CALUX®細胞株を使用する必要がある。この細胞株は、技術ライセンス契約を結んだ上で、オランダのアムステルダムにある BioDetection Systems BV から入手することができる。

15. マイコプラズマを含まない細胞培養のみを使用する。使用する細胞ロットは、マイコプラズマ汚染が陰性であることが保証されているものを使用するか、使用前にマイコプラズマ否定試験を実施すること。マイコプラズマ感染の検出には、PCR 法のような高感度の検査を用いなければならない(8, 9)。

細胞株の安定性

16. AR-CALUX®細胞は、安定性および完全性を維持するために-130°C 未満（液体窒素等）で保存すること。細胞は、新たな培養を開始するために解凍後、少なくとも 2 回継代培養してから化学物質の（抗）アンドロゲン作用の評価に使用する。細胞は 30 継代を超えて培養してはならない。

17. 細胞株の経時的な安定性をモニターするために、EC_{50} または IC_{50} を評価することにより、（アゴニストおよびアンタゴニスト試験の）参照化学物質に対する細胞株の応答性を検証する必要がある。また、陽性対照（PC）および陰性対照（NC）の相対誘導能をモニターすること。結果は、アゴニスト（表 D.3）またはアンタゴニスト AR-CALUX®試験法（表 D.4）の許容基準に一致しなければならない。参照標準（すなわち参照化学物質、陽性および陰性対照）を、アゴニストおよびアンタゴニストモードのそれぞれについて、使用する濃度を含めて表 D.1 および D.2 に示す。

細胞培養および播種条件

18. AR-CALUX®細胞は、pH 指示薬としてフェノールレッドを添加し、ウシ胎児血清（7.5%）、非必須アミノ酸（1%）、ペニシリン（10 単位/mL）、ストレプトマイシン（10 µg/mL）および選択マーカーとしてジェネティシン（G-418）（0.2 mg/mL）を添加した増殖培地（DMEM/F12（1:1））で培養する。加湿した 37°C +/- 1°C の CO_2 インキュベーター（5% +/- 1% CO_2）に細胞を入れる。細胞密集度が 85～95%に達したら、細胞を継代培養するか、96 ウェルマイクロタイタープレートに播種する準備をする。後者の場合、フェノールレッドを含まない、チャコール・デキストラン処理ウシ胎児血清（5% v/v）、非必須アミノ酸（1% v/v）、ペニシリン（10 単位/mL）およびストレプトマイシン（10 µg/mL）を添加したアッセイ培地（DMEM/F12（1:1））中に細胞を 1 x 10^5 細胞/mL で再懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレートに播種する（均質化した細胞懸濁液 100 µL）。細胞は、曝露前に CO_2 インキュベーター（5% +/- 1% CO_2、37°C +/- 1°C、加湿）で 24 時間前培養する。

19. 試験を開始する前に、試験中に使用するすべての材料（ガラス管、容器、

©OECD 2020

プラスチック製器具）および試薬（血清、DMSO 等）について、プロトコル(6)の規定に従い、測定に干渉する可能性がないか調査すること。

許容基準

20. 被験化学物質のアゴニストおよびアンタゴニスト活性を、ラン（プレスクリーニングランおよび包括的ラン）で試験する。各ランは最大 6 枚のマイクロタイタープレートで構成される。各ランには、参照化学物質の一連の希釈液（C1～C8）、固定濃度の陽性対照、固定濃度の陰性対照、溶媒対照（およびアンタゴニストアッセイにおける媒体対照）、および細胞毒性の陽性対照が含まれる。図 D.1 および D.2 に、アゴニストおよびアンタゴニストランのプレート設定を示す。

21. 各ランの最初のプレートで、

- 参照化学物質（アゴニスト作用における DHT およびアンタゴニスト作用におけるフルタミド）の一連の希釈液を測定する（表 D.5 および表 D.6）。この参照化学物質は、S 字状の用量反応曲線を示さなければならない。参照化学物質の一連の希釈液の応答から得られた EC_{50} または IC_{50}、参照化学物質の log（EC_{50}）および log（IC_{50}）の CV は、表 D.3（アゴニスト作用）または表 D.4（アンタゴニスト作用）に示す要件を満たさなければならない。
- 算出された陽性および陰性対照の相対誘導能は、表 D.3 および D.4 に示す要件を満たさなければならない。

22. 1 回のランの各マイクロタイタープレートについて、次の値を算出する。

- すべての測定において、参照化学物質の誘導係数は、最高濃度（C8）における当該化学物質の平均相対発光量（RLU）を溶媒対照の平均 RLU で割って計算する。この誘導係数は、表 D.3 および D.4 に示す誘導倍率の最低要件を満たさなければならない。
- 各試験プレートについて、以下の式に従って Z 係数を算出する。この Z 係数は、表 D.3 および D.4 に示す Z 係数の最低要件を満たさなければならない。

$$Z\,係数_{プレート\,no.} = 1\text{-}3 \times \frac{(SD\ RLU_{プレート\,no.}\ [SC] + SD\ RLU_{プレート\,no.}\ [C8\ 参照])}{|(平均\ RLU_{プレート\,no.}\ [SC] - 平均\ RLU_{プレート\,no.}\ [C8\ 参照])|}$$

23. 1 回のランが表 D.3 および D.4 に記載される要件を満たす場合、このランを有効とみなし、被験化学物質の応答を評価することができる。

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

表 D.1.アゴニスト試験における参照標準の濃度

	化学物質	CASRN	ウェル内の試験濃度範囲（M）
参照化学物質	DHT	521-18-6	1.0×10^{-11} - 1.0×10^{-07}
陽性対照（PC）	17α-メチルテストステロン	58-18-4	1.0×10^{-07}
陰性対照（NC）	コルチコステロン	50-22-6	1.0×10^{-06}

©OECD 2020

表 D.2.アンタゴニスト試験における参照標準の濃度

	化学物質	CASRN	ウェル内の試験濃度範囲（M）
参照化学物質	フルタミド	13311-84-7	1.0×10^{-08} - 3.0×10^{-05}
陽性対照（PC）	リニュロン	330-55-2	1.0×10^{-05}
陰性対照（NC）	レボノルゲストレル	797-63-7	1.0×10^{-06}

表 D.3.アゴニスト作用に関するプレスクリーニングおよび包括的試験の許容基準

番号	許容基準	
1	参照化学物質 DHT のシグモイド曲線	あり
2	参照化学物質 DHT の EC_{50} 範囲	1.0×10^{-10} –1.0×10^{-09} M
3	参照化学物質 DHT の log（EC_{50}）推定値の|CV|	< 1.5%
4	PC 17α-メチルテストステロンの相対誘導能（%）	> 30%
5	NC コルチコステロンの相対誘導能（%）	< 10%
6	各プレートの溶媒対照（SC）に対する最高 DHT 濃度（C8）の最低誘導倍率	> 20
7	DHT C8 および SC を用いて算出した各プレートの Z 係数	> 0.5

©OECD 2020

表 D.4.アンタゴニスト作用に関するプレスクリーニングおよび包括的試験の許容基準

番号	許容基準	
1	参照化学物質フルタミドのシグモイド曲線	あり
2	参照化学物質フルタミドの IC_{50} 範囲	$1.0 \times 10^{-07} – 1.0 \times 10^{-06}$ M
3	参照化学物質フルタミドの log（IC_{50}）推定値の|CV|	< 3%
4	相対誘導能 PC（リニュロン）	< 60%
5	相対誘導能 NC（レボノルゲストレル）	> 85%
6	各プレートの溶媒対照（SC）に対する最高フルタミド濃度（C8）の最低阻害倍率	> 10
7	フルタミド C8 および SC を用いて算出した各プレートの Z 係数	> 0.5
8	フルタミドの Y_c と S_c^n の R^2	≤ 0.7

溶媒/媒体対照および参照標準

25. プレスクリーニングランおよび包括的ランのいずれについても、同じ溶媒/媒体対照、参照標準（参照化学物質、陽性対照および陰性対照）を使用すること。また、参照標準の濃度は同一とする。

溶媒対照および媒体対照

26. 被験化学物質の溶解に用いる溶媒は、被験化学物質を完全に溶解し、アッセイ培地と混和しなければならない。DMSO、水およびエタノール（純度 95～100%）が溶媒として適している。DMSO（CASRN 67-68-5）が第一選択であり、培養中の最高濃度は 0.1%（v/v）を超えてはならない。別の溶媒を使用する前に、実験条件をシミュレートした曝露濃度において細胞毒性を引き起こさず、アッセイの性能を妨害しないことを実証する必要がある。

27. また、被験化学物質の溶解に用いる溶媒は、被験化学物質を溶解しない場合の試験も実施する（溶媒対照（SC））。

28. アゴニスト作用の試験において、SC には溶媒を加えたアッセイ培地が含まれる。アンタゴニスト作用の試験において、SC には溶媒および固定濃度のアゴニスト参照化学物質 DHT（EC_{50} 濃度）を加えたアッセイ培地が含まれる。ただし、媒体対照（VC）には溶媒を加えたアッセイ培地が含まれるが、固定濃度のアゴニスト参照化学物質は含まれない。

参照化学物質

29. アゴニスト参照化学物質は DHT であり、8 点の濃度の一連の希釈液からなる（表 D.1 および D.5）。

30. アンタゴニスト参照化学物質はフルタミドであり、8 点の濃度の一連の希釈液からなる（表 D.2 および D.6）。各濃度のアンタゴニスト参照化学物質に、固定

©OECD 2020

濃度のアゴニスト参照化学物質 DHT（EC_{50}濃度 = 3.0 x 10^{-10} M）を添加して、アゴニスト応答の減衰を測定する。

31. 特異性対照のアンタゴニスト参照化学物質は、フルタミドの各濃度に 100X EC_{50}濃度の DHT を添加したものである。これは、8 点の濃度の一連の希釈液からなる（表 D.2 および D.6）。

陽性対照

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

33. アンタゴニスト試験の陽性対照はリニュロンである（表 D.2）。この対照には、固定濃度のアゴニスト参照化学物質 DHT（3.0 x 10^{-10} M）を添加する。

陰性対照

34. アゴニスト試験の陰性対照はコルチコステロンである（表 D.1）。

35. アンタゴニスト試験の陰性対照はレボノルゲストレルである（表 D.2）。この対照には、固定濃度のアゴニスト参照化学物質 DHT（3.0 x 10^{-10} M）を添加する。

参照標準および被験化学物質の調製

36. 参照標準（参照化学物質、陽性対照、陰性対照）および被験化学物質を 100% DMSO（または適切な溶媒）に溶解する。参照標準および被験化学物質について、同じ溶媒を用いて適切な（一連の）希釈液を調製する。すべての化学物質は、溶解前に室温に戻すこと。参照標準および被験化学物質の原液を新たに調製したとき、顕著な沈殿または混濁を認めてはならない。

37. 参照化学物質（DHT およびフルタミド）の原液は、まとめて調製し、等分割して-20°C +/- 1°C で最長 3 ヵ月間保存することができる。分割液を解凍したら、-20°C +/- 1°C で保存し、最長 3 週間再使用（解凍/凍結）することができる。被験化学物質原液は実験ごとに新しく調製する。

38. 参照標準および被験化学物質の最終希釈液（すなわち作業用溶液）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こと。

溶解度、細胞毒性および濃度範囲設定試験

39. 被験化学物質は、最高濃度 0.1 M（原液）で評価すること。多成分化学物質、高分子、混合物、UVCB 等、被験化学物質の分子量が算出できない場合には、50 mg/mL から開始して重量法を適用すること。

40. バリデーション試験で使用した溶解度プロトコルを参照文献(10)に示す。習熟度確認化学物質の試験等によって適切であることが示されている場合は、他のプロトコルを使用してもよい。選択した溶媒に対する被験化学物質の溶解度は、最高原液濃度 0.1 M から始めて決定する。この濃度で溶解性に問題がある場合は、被験化学物質が完全に溶解するまで濃度を下げて原液を調製する。続いて、アッセイ培地中での曝露濃度（曝露濃度は原液濃度の 0.1%、すなわち 0.1 mM）における被験化学物質の溶解度を評価しなければならない。

©OECD 2020

41. プレスクリーニングランでは、被験化学物質の 1:10 段階希釈液を試験する。プレスクリーニングランの結果から試験化学物質の適切で精緻化された濃度範囲を導出し、これを包括的ランで試験する。包括的試験に使用する希釈係数（DF）は以下のとおりとする：陽性応答が認められた場合（アゴニスト作用では RI ≥ 10%、アンタゴニスト作用では RI ≤ 80%）、交互に DF 3/3.3 を適用する；試験を行った最高濃度のみが、10%閾値を超える（アゴニスト作用試験）または 80%閾値を下回る（アンタゴニスト作用試験）場合、DF 2 を適用する；応答が認められない場合、DF 5 を適用する（表 D.5 および D.6 参照）。

42. 細胞毒性の評価は、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法プロトコルに含まれており、プレスクリーニングランおよび包括的ランの両方に組み込まれている。被験化学物質への曝露後、プレスクリーニングランでは乳酸脱水素酵素（LDH）漏出試験および定性的目視検査（すなわち、形態学的変化についての細胞の顕微鏡観察）の両方を用いて細胞毒性を評価する。LDH 漏出試験は細胞死（細胞溶解）のみを報告することから、目視検査は重要な評価ツールと考えられる。包括的ランについては、細胞毒性を採点するには定性的目視検査で十分である。LDH 漏出試験においては、LDH 漏出率が細胞毒性における陽性対照（0.01% トリトン X-100）の 15%を超える場合、その被験化学物質濃度は細胞毒性があるとみなされる。習熟度確認化学物質の試験等によって適切であることが示されている場合は、他の細胞毒性試験を用いてもよい。

被験化学物質への曝露およびアッセイプレート構成

43. フラスコのコンフルエントな培養細胞をトリプシン処理した後、細胞を 1 x 10^5 細胞/mL でアッセイ培地中に再懸濁する。再懸濁した細胞 100 µL を 96 ウェルマイクロタイタープレートのウェル B1～G11 に播種する。残ったウェルに 200 µL のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を充填する（図 D.1 および D.2 参照）。播種した細胞は、CO_2 インキュベーター（5% +/- 1% CO_2、37°C+/- 1°C、加湿）で 24 +/- 8 時間前培養する。

44. 前培養後、細胞の状態を目視で確認する（細胞毒性、汚染、細胞密集度（顕微鏡観察））。すべてのウェルを代表する一部のウェルにおいて目視で細胞毒性や汚染がなく、細胞密集度が 85%以上であるプレートのみを試験に使用する。ウェル B1～G11 の細胞に、参照標準、被験化学物質、溶媒対照および細胞毒性対照の適切な一連の希釈液を加えたアッセイ培地 100 µL を添加して曝露させる（表 D.5：アゴニスト試験、表 D.6:アンタゴニスト試験）。

45. すべての参照標準、被験化学物質および溶媒対照は 3 回ずつ試験し、細胞毒性対照のトリトン X-100 は 6 連のウェルで試験する。図 D.1 に、アゴニスト試験のプレート配置を示す。これは、プレスクリーニング試験および包括的試験で同一のものである。図 D.2 に、アンタゴニストプレスクリーニング試験のプレート配置を示す。媒体対照ウェル（VC）を除くすべての曝露ウェルには、固定濃度のアゴニスト参照化学物質 DHT（3.0×10^{-10} M（EC_{50}））が含まれている。図 D.3 に、DHT の 100x EC_{50} を用いた特異性対照試験を含む、アンタゴニスト包括的試験のプレート配置を示す。これは、プレート配置の C（1～8）100 にあたる。

46. 96 ウェルマイクロタイタープレートを CO_2 インキュベーター（5% +/- 1%

©OECD 2020

CO_2、37°C +/-1°C、加湿）内でさらに 24 +/- 2 時間培養する。培養後、プレートを細胞毒性および汚染について目視で検査する。プレスクリーニング試験では、各ウェルから曝露培地 100 µL を別のプレートに移し、細胞毒性試験で使用する（段落 42）。ウェル内の残りの 100 µL の曝露培地を取り除き、ウェル内の細胞を溶解基質（段落 47）に曝露して発光を測定する。

図 D.1.アゴニストのプレスクリーニングと包括的試験、およびアゴニスト作用の評価のための 96 ウェルマイクロタイタープレートのプレート配置。

プレート 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT	PC	
C	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT	PC	
D	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT	PC	
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	
H												

以降のプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 DHT	
H												

C（1-8）DHT = 参照化学物質 DHT の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
C（1-8）= 被験化学物質の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）。
SC = 被験化学物質の溶媒対照/参照標準（C（1-8）と同じ溶媒）。
PC = 陽性対照（17α-メチルテストステロン）。
NC = 陰性対照（コルチコステロン）
グレーセル（Grey cells）：= 200 µl の PBS を満たした外側のウェル。
Triton X-100 = 細胞毒性における陽性対照

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

プレート 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
C	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
D	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
E	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
F	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
G	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
H												

以降のプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
H												

©OECD 2020

C（1-8）FLU =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）参照化学物質フルタミドの一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
C（1-8） =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）被験化学物質の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
NC =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）陰性対照レボノルゲストレル
PC =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）陽性対照リニュロン
SC = 被験化学物質の溶媒対照/参照標準（C（1-8）と同じ（EC_{50}濃度の DHT を添加した）溶媒）。
VC = 媒体対照（DHT を添加しない溶媒対照）。
グレーセル（Grey cells） = 200 µl の PBS を満たした外側のウェル。
Triton X-100 = 細胞毒性における陽性対照

図 D.3.特異性対照試験を含む、アンタゴニストの包括的試験およびアンタゴニスト作用の評価のための 96 ウェルマイクロタイタープレートのプレート配置。

プレート 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
C	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
D	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
E	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
F	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
G	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
H												

以降のプレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
E	Triton X-100	NC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
F	Triton X-100	NC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
G	Triton X-100	NC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
H												

C（1-8）FLU =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）参照化学物質フルタミドの一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
C（1-8）FLU 100 =（100X EC_{50}濃度の DHT を添加した）参照化学物質フルタミドの一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
NC =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）陰性対照レボノルゲストレル
PC =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）陽性対照リニュロン
SC = 被験化学物質の溶媒対照/参照標準（C（1-8）と同じ（EC_{50}濃度の DHT を添加した）溶媒）。
VC = 媒体対照（DHT を添加しない溶媒対照）。
C（1-8） =（EC_{50}濃度の DHT を添加した）被験化学物質の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）
C（1-8）100 =（100x EC_{50}濃度の DHT を添加した）被験化学物質の一連の希釈液（1～8、低～高濃度）（特異性試験）
グレーセル（Grey cells） = 200 µl の PBS を満たした外側のウェル。
Triton X-100 = 細胞毒性における陽性対照

発光の測定

47. 発光の測定にはいくつかの選択肢がある。AR-CALUX®試験法のバリデーションで用いた方法には、市販キットの使用（フラッシュまたはグロー発光キットのいずれか）または実験室で調製した発光基質のいずれかが含まれていた。いずれのケースにおいても、24 +/- 2 時間の培養後、ウェルから培地を取り除き、細胞を溶解させてルシフェラーゼ活性を測定する。

48. 発光を測定するには、照度計が必要である。透明プレートを使用する場合、照度計には2個のインジェクターが必要である。ルシフェラーゼの反応は、基質ルシフェリンを注入することにより開始する。適切な溶媒（照度計に応じて 0.2 M

©OECD 2020

NaOH または 25% v/v 酢酸等）を加えて反応を停止させ、1 つのウェルから別のウェルへの発光の持ち越しを防ぐ。市販キットを使用する場合は、キットに添付されている固有の指示に従わなければならない。使用するキットに応じて、白色プレートにはインジェクター無しまたは 1 つのインジェクターを備えた照度計を使用することができる。

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

アゴニスト（アンタゴニスト）試験のプレスクリーニングラン

50. プレスクリーニング分析の結果は、包括的試験のための被験化学物質の精緻化された濃度範囲の決定に用いられる。プレスクリーニング分析結果の評価および包括的試験のための被験化学物質の精緻化された濃度範囲の決定については、アゴニストおよびアンタゴニスト試験法プロトコル(6)に詳述する。ここでは、アゴニストおよびアンタゴニスト試験のための被験化学物質の濃度範囲を決定する手順の概要を示す。一連の希釈液デザインのガイダンスについては、表 D.5 および D.6 を参照のこと。

51. プレスクリーニングランでは、表 D.5（アゴニスト作用）および表 D.6（アンタゴニスト作用）に示す一連の希釈液を用いて、被験化学物質を試験しなければならない。すべての濃度を、図 D.1（アゴニスト作用）または図 D.2（アンタゴニスト作用）に示すプレート配置に従って 3 連のウェルで試験する。

52. プレスクリーニング中に認められた応答が陽性か陰性かに関わらず、プレスクリーニングランの後には必ず包括的ランを実施する。表 D.7 の判定基準に従って結論を導き出すには、1 回の包括的ランで十分である。

アゴニスト（アンタゴニスト）作用評価のための濃度選択

53. 許容基準（表 D.3 および D.4）を満たす結果のみを有効とみなし、被験化学物質に対する応答の評価に用いる。1 回のランにおいて 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートを再試験する。参照化学物質の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、ラン全体（6 プレート）を再試験しなければならない。

54. 最大誘導能（アゴニスト作用）あるいは阻害（アンタゴニスト作用）が認められ、かつ細胞毒性を示さない（最低）濃度を決定する。包括的ランで試験する被験化学物質の最高濃度は、この選択した濃度の 3 倍、あるいはモル濃度が不明な化学物質の場合は最高曝露濃度 0.1 mM または 50 µg/ml とする。

55. 被験化学物質の精緻化された一連の希釈液を、上記で決定した最高濃度から開始し、表 D.5 および D.6 に示す希釈ステップを用いて調製する

56. いかなるアゴニスト（アンタゴニスト）作用も誘発しない被験化学物質については、プレスクリーニングで特定された細胞毒性を示さない最高濃度から開始し、表 D.5 および D.6 に示す希釈ステップを用いて、包括的ランで試験しなければならない。

©OECD 2020

アゴニスト試験における包括的ラン

57. 精緻化された濃度範囲を選択した後、表 D.5（アゴニスト作用）に示す一連の希釈液を用いて、被験化学物質を包括的に試験する。すべての濃度を、図 D.1（アゴニスト作用）に示すプレート配置に従って3連のウェルで試験する（段落45参照）。

58. 許容基準（表 D.3）を満たす結果のみを有効とみなし、被験化学物質に対する応答の評価に用いる。1 回のランにおいて 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートで試験した化学物質についてランを再度行い、再試験する。参照化学物質の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、ラン全体（6 プレート）を再試験しなければならない。

アンタゴニスト試験における包括的ランおよび特異性対照試験

59. 精緻化された濃度範囲を選択した後、表 D.6（アンタゴニスト作用）に示す一連の希釈液を用いて、被験化学物質を包括的試験および特異性対照試験で同時に（同じプレート上で）試験する（段落 45 参照）。すべての濃度を、図 D.3（アンタゴニスト作用）に示すプレート配置に従って 3 連のウェルで試験する。

60. 許容基準（表 D.4）を満たす結果のみを有効とみなし、被験化学物質の応答の評価に用いる。一連の分析において 1 枚以上のマイクロタイタープレートが許容基準を満たさなかった場合、それぞれのマイクロタイタープレートを再試験する。参照化学物質の一連の希釈液全体を含む最初のプレートが許容基準を満たさない場合、ラン全体（6 プレート）を再試験しなければならない。

表 D.4.アゴニスト試験に使用する参照標準および被験化学物質の濃度および希釈

参照 DHT		対照		被験化学物質	プレスクリーニングラン	包括的ラン		
ウェル内の濃度（M）		ウェル内の濃度（M）			DF 10	DF 5	DF 3/ 3.33	DF 2
C1	1.0×10^{-11}	PC	1.0×10^{-07}	C1	10,000,000 x	78125 x	3,000 x	128 x
C2	3.0×10^{-11}	NC	1.0×10^{-06}	C2	1,000,000 x	15625 x	1,000 x	64 x
C3	1.0×10^{-10}	SC	0	C3	100,000 x	3125 x	300 x	32 x
C4	3.0×10^{-10}			C4	10,000 x	625 x	100 x	16 x
C5	1.0×10^{-09}			C5	1,000 x	125 x	30 x	8 x
C6	3.0×10^{-09}			C6	100 x	25 x	10 x	4 x
C7	1.0×10^{-08}			C7	10 x	5 x	3 x	2 x
C8	$1.0 \times *10^{-07}$			C8	1 x	1 x	1 x	1 x

PC - 陽性対照（17α-メチルテストステロン）
NC - 陰性対照（コルチコステロン）
SC - 被験化学物質溶媒対照

©OECD 2020

表 D.5.アンタゴニスト試験に使用する参照標準および被験化学物質の濃度および希釈

参照フルタミド ウェル内の濃度（M）		対照 ウェル内の濃度（M）		被験化学物質	プレスクリーニングラン DF 10	包括的ラン DF 5	DF 3/3.33	DF 2
C1	1.0×10^{-08}	PC	1.0×10^{-05}	C1	10,000,000 x	78125 x	3,000 x	128 x
C2	3.0×10^{-08}	NC	1.0×10^{-06}	C2	1,000,000 x	15625 x	1,000 x	64 x
C3	1.0×10^{-07}	SC	0	C3	100,000 x	3125 x	300 x	32 x
C4	3.0×10^{-07}	VC	0	C4	10,000 x	625 x	100 x	16 x
C5	1.0×10^{-06}			C5	1,000 x	125 x	30 x	8 x
C6	3.0×10^{-06}			C6	100 x	25 x	10 x	4 x
C7	1.0×10^{-05}			C7	10 x	5 x	3 x	2 x
C8	3.0×10^{-05}			C8	1 x	1 x	1 x	1 x
		ウェル内の添加アゴニスト濃度（M）						
		DHT 3.0×10^{-10} （$=EC_{50}$）						
		添加アゴニスト濃度ウェル内の特異性対照（M）						
		DHT 3.0×10^{-8} （$=100x\ EC_{50}$）						

PC - 陽性対照（リニュロン）
NC - 陰性対照（レボノルゲストレル）
SC - 溶媒対照
VC - 媒体対照（固定濃度のアゴニスト参照化学物質を含まない）

データの分析

データの正規化

61. 照度計の生データは RLU として表す。表 D.3 および D.4 に示すように、許容基準が満たされた場合、必要なパラメータを決定するために以下の計算ステップを実施する。生データを、プレスクリーニングまたは包括的ラン用に作成されたデータ分析表計算シートに入力する。

アゴニストアッセイについて：

62. 各被験化学物質および参照化学物質 DHT について以下を計算する

- 濃度 c、技術的反復 i における相対誘導能（Y_{ic}）：

$$Y_{ic} = \frac{被験化学物質の\,RLU（反復\,i）\,-\,SC\,の平均\,RLU}{DHT_{C8}\,の平均\,RLU\,-\,SC\,の平均\,RLU} \times 100,\ i = 1,2,3$$

- 3 回の技術的反復における相対誘導能の平均（Y_c）

$$Y_c = 平均\,Y_{ic}$$

アンタゴニストアッセイについて：

63. 各被験化学物質および参照化学物質の FLU について以下を計算する。

- 濃度 c、技術的反復 i における相対誘導能（Y_{ic}）：

$$Y_{ic} = \frac{被験化学物質の\,RLU（反復\,i）\,-\,FLU_{C8}\,の平均\,RLU}{SC\,の平均\,RLU\,-\,FLU_{C8}\,の平均\,RLU} \times 100,\ i = 1,2,3$$

©OECD 2020

- 3 回の技術的反復における相対誘導能の平均（Y_c）

$$Y_c = \text{平均}\, Y_{ic}$$

注：アンタゴニストアッセイにおける SC は、EC_{50}濃度の DHT を添加したアッセイ培地である

特異性対照試験について

- 濃度 c、反復 i における被験化学物質の特異性対照 S_{ic} を算出するために、上記のアンタゴニストアッセイと同じ公式を適用するが、被験化学物質の RLU（反復 i）は、特異性対照試験（100x EC_{50} DHT を添加）で得たものとする。
- また、被験化学物質の特異性対照（S_c）の C1 濃度を 100%として、被験物質の正規化した特異性対照（S_c^n）を算出する。すなわち、

$$S_c^n = 100 \times \frac{S_c}{S_{c_1}}, \qquad c = c_1, \ldots, c_8$$

細胞毒性

64. プレスクリーニング分析で評価したすべての被験化学物質濃度について、以下の式に従って、細胞毒性陽性対照 0.01%トリトン X-100（パーセンテージを 100%に設定）に対する LDH 漏出率を算出する。

$$\%\, LDH\ 漏出率 = \frac{被験化学物質の平均\, AU - SC\ の平均\, AU}{陽性対照の平均\, AU - SC\ の平均\, AU} \times 100$$

注：AU = 吸光度単位

65. さらに、被験化学物質への曝露後に細胞の定性的目視検査を実施しなければならない。以下の場合、被験化学物質は特定の濃度で細胞毒性があると判断する。

- 3 回反復検体の LDH 漏出率の平均パーセンテージが陽性対照に対して 15%を超えている、
- または、顕微鏡で細胞毒性が認められる。

パラメータの算出

66. データの正規化後、次式を用いて、Y_{ic} データに非線形回帰（可変勾配、4 パラメータ）を適用する。

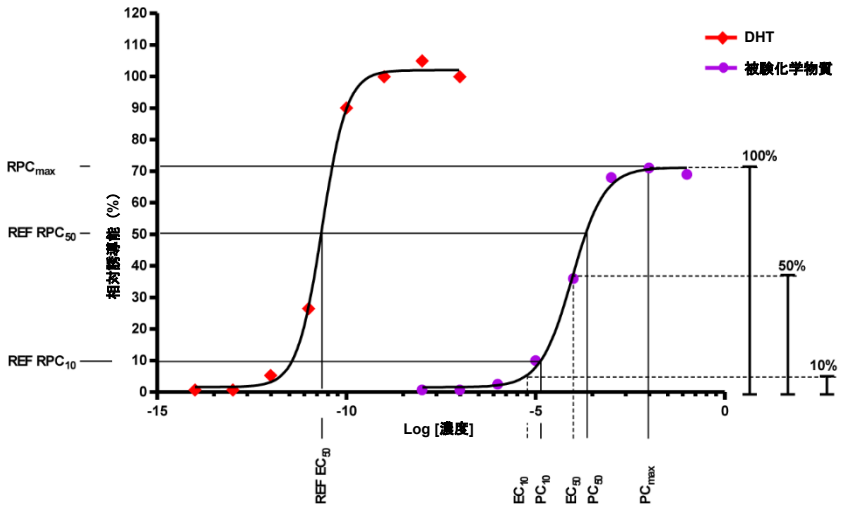
$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogEC_{50} - x) * \text{ヒル勾配})})}$$

x =	用量または濃度の対数
y =	応答（相対誘導能（%））
Top =	最大誘導能（%）
Bottom =	最小誘導能（%）
$LogEC_{50}$ =	最大応答の 50%が観測される濃度の対数
ヒル勾配 =	ヒル勾配の勾配係数

©OECD 2020

67. アゴニスト試験では、参照化学物質の EC_{10} および EC_{50} を決定し、被験化学物質の EC_{10}、EC_{50}、PC_{10} および PC_{50} を決定する。アンタゴニスト試験では、参照化学物質の IC_{50} および IC_{20} を決定し、被験化学物質の IC_{20}、IC_{50}、PC_{80} および PC_{50} を決定する。被験化学物質の強度を更に特徴づけるために、作用の程度（アゴニスト作用:RPC_{max}；アンタゴニスト作用:RPC_{min}）および作用発現濃度（アゴニスト作用:PC_{max}；アンタゴニスト作用:PC_{min}）を報告する。図 D.4（アゴニスト作用）および図 D.5（アンタゴニスト作用）に、これらのパラメータを図示する。

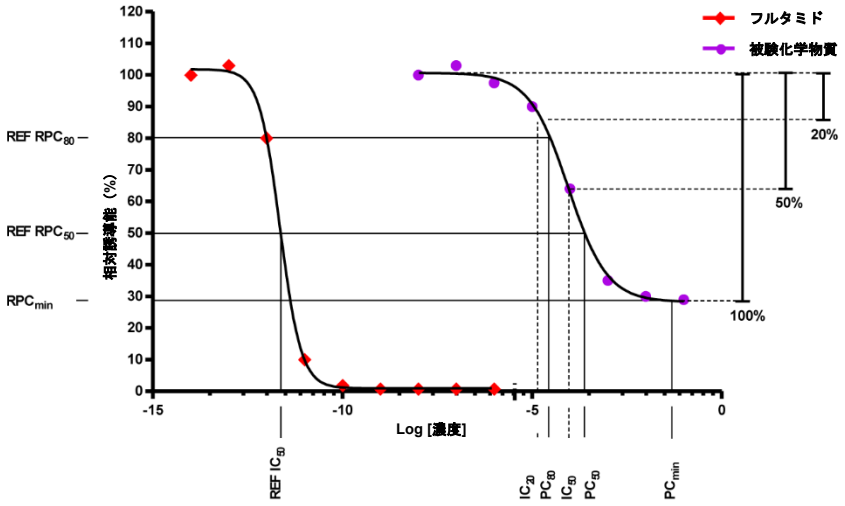
図 D.4.アゴニストアッセイで決定した被験化学物質のパラメータの概要



EC_{10} = 被験化学物質の最大応答の 10%が観測される同物質の濃度。
EC_{50} = 被験化学物質の最大応答の 50%が観測される同物質の濃度。
PC_{10} = 参照化学物質の EC_{10} と等しい応答が得られる被験化学物質の濃度（REF RPC_{10}）。
PC_{50} = 参照化学物質の EC_{50} と等しい応答が得られる被験化学物質の濃度（REF RPC_{50}）。
PC_{max} = 応答が最大となる被験化学物質の濃度（RPC_{max} に相当）
REF EC_{50} = 参照化学物質 DHT の最大応答の 50%が観察される同物質の濃度

©OECD 2020

図 D.5.アンタゴニストアッセイで決定した被験化学物質のパラメータの概要。



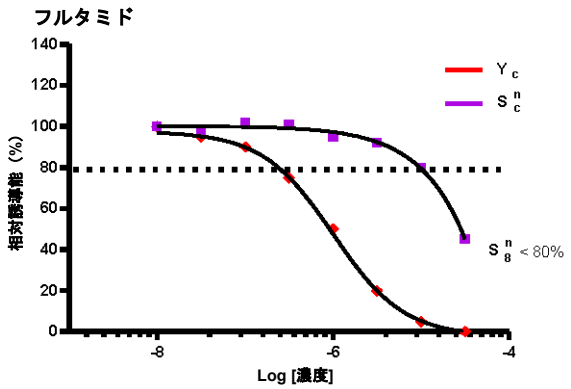
IC_{20} = 被験化学物質の最大応答の 80%が観測される同物質の濃度（20%阻害）。
IC_{50} = 被験化学物質の最大応答の 50%が観測される同物質の濃度（50%阻害）。
PC_{80} = 参照化学物質の IC_{20} と等しい応答が得られる被験化学物質の濃度（REF RPC_{80}）。
PC_{50} = 参照化学物質の IC_{50} と等しい応答が得られる被験化学物質の濃度（REF RPC_{50}）
PC_{min} = 応答が最大となる被験化学物質の濃度（RPC_{min} に相当）
REF IC_{50} = 参照化学物質の最大応答の 50%となる同物質の濃度

©OECD 2020

68. 被験化学物質については、細胞毒性や溶解度の問題から、必ずしも完全な用量反応曲線が得られるとは限らない。このような場合、アゴニスト試験における EC_{50} および EC_{10}、およびアンタゴニスト試験における IC_{50} および IC_{20} を決定することができない。従って可能であれば、PC_{10}、PC_{50}、PC_{max}（アゴニスト）および PC_{80}、PC_{50}、PC_{min}（アンタゴニスト）の決定で十分である。これらの値は、最も近い 2 つのデータポイント間の線形補間等から導き出すことができる。

69. データ判定基準（表 D.7）に示すとおり、アンタゴニスト応答の特異性（すなわち、真の競合的アンタゴニストであること）を判定する。特異性対照の結果を判定する場合は、2 つの用量反応曲線（Y_c と S_c^n）を目視検査し、アンタゴニスト試験の第 1 の陽性基準が適用できるかどうかを検証しなければならない（表 D.7 参照：全濃度で $S_c^n > 80\%$）。あるいは、標準応答の相対誘導能（Y_c）と被験化学物質の正規化特異性応答の相対誘導能（S_c^n）との間の相関係数の二乗（R^2）を計算する。このアンタゴニスト試験の第 2 の陽性基準を検証すること（表 D.7 参照：$R^2 \leq 0.9$）。（AR-CALUX®バリデーション試験(5)に示されているように）この基準は 100%確実とはみなされないため、いくつかの注意を払う必要がある。曲線の形状や外れ値の影響を受ける可能性がある。専門家の判断が必要な場合がある。

図 D.6.真の競合的アンタゴニスト（$R^2 \leq 0.9$）の、標準応答の相対誘導能（Y_c）および正規化特異性応答の相対誘導能（S_c^n）



データ判定基準

70. データの判定および被験化学物質が陽性であるか陰性であるかの判断には、表 D.7 の基準を使用する。結論を導き出すには、1 回の包括的ランで十分である。

©OECD 2020

表 D.6.判定基準

アゴニスト作用	
陽性	被験化学物質の相対誘導能（Y_c）が 2 つ以上の連続した濃度で 10%（REF RPC_{10}）以上である場合。
陰性	それ以外のすべての場合
アンタゴニスト作用	
陽性	被験化学物質の相対誘導能（Y_c）が 2 つ以上の連続した濃度で 80%（REF RPC_{80}）以下である場合、および 以下のいずれかの場合。 ● 全濃度において、被験化学物質の正規化特異性対照の相対誘導能S_c^nが 80%を超える、 または、以下の 2 つの条件を満たす場合。 ● 最高濃度において、被験化学物質の正規化特異性対照の相対誘導能S_{c8}^nが 80%以下である ● 被験化学物質の正規化特異性対照の相対誘導能（S_c^n）と相対誘導能（Y_c）との間の相関係数の二乗（R^2）が 0.9 以下である
陰性	それ以外のすべての場合

71. 表 D.7 に示す基準は、細胞毒性を伴わずに得られたデータのみに適用すること。

72. 2 つの分類（表 D.7）に加えて、効力の測定値も統合的アプローチに用いることができる。

©OECD 2020

参考文献

1. Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., Brouwer, A, van der Burg B. (2004). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. Toxicol. Sci. 83(1), 136-148.
2. Thorne, N., Inglese, J. and Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biolog. *Chemistry and Biology* 17(6), 646-57.
3. van Vugt-Lussenburg, B.M.A., van der Lee, R.B., Man, H.Y., Middelhof, I., Brouwer, A., Besselink, H., van der Burg, B. (2018) Incorporation of metabolic enzymes to improve predictivity of reporter gene assay results for estrogenic and anti-androgenic activity. *Reprod Toxicol* 75, 40-48
4. Van der Burg, B., Pieterse, B., Buist, H., Lewin, G., van der Linden, S.C., Man, H.Y., Rorije, E., Piersma, A.H., Mangelsdorf, I., Wolterbeek, A.P., Kroese, E.D., van Vught-Lussemburg, B. (2015a). A high throughput screening system for predicting chemically-induced reproductive organ deformities. *Reprod. Toxicol*. 55, 95-103.
5. Validation Study Report on the Performance assessment of the AR-CALUX® *in vitro* method (2019). Available at (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07)
6. Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)androgenic potential using AR-CALUX® cells (2019). Available at (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07)
7. Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Watt, E.D., Martin, M., Houck, K., Browne, P., Thomas, R.S., Casey, W.M., Dix, D.J., Allen, D., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Judson, R. (2017), Development and Validation of a Computational Model for Androgen Receptor Activity. *Chem Res Toxicol*., 30(4):946-964
8. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci*., 57(4), 769-771.
9. Eldering, J.A., Felten, C., Veilleux, C.A. & Potts, B.J. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. Biologicals 32, 183-93 (2004).
10. Solubility Determination by Visual Inspection (2019). Available at (https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07)

©OECD 2020

補遺 E.（試験法 3）:安定に形質移入されたヒト 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株を用いた、化学物質のアンドロゲンアゴニストおよびアンタゴニスト活性の検出を目的とした、アンドロゲン受容体の転写活性化試験

最初に考慮すべき事項および限界

1. 本試験法を使用する前に「はじめに」を読むこと（本文 6〜9 頁）。

2. 22Rv1/MMTV_GR-KO AR を介して安定的に形質移入された転写活性化（TA）試験は、AR を内因性に発現するヒト前立腺がん細胞株 22Rv1 を用いて、AR との相互作用を介した内分泌活性について化学物質をスクリーニングするために確立された（1, 2）。本試験法は、エンドポイントとしてルシフェラーゼ活性を測定することにより、ヒト AR を介した転写活性化および阻害を検出できるよう特別に設計されている。発光シグナルに対する化学物質依存性の干渉についての情報は、GR ノックアウト 22Rv1/MMTV 細胞株においては限定的である。

3. 構成的に作用する切断型 AR は 22Rv1/MMTV 細胞で発現するが、切断型 AR は活性に大きな影響を及ぼさない。溶媒対照レベル（ベースレベル）が高くなく、DHT 処理により用量に依存して誘導倍率が上昇し、他のレポーター遺伝子のアッセイと比較して上昇が非常に高いレベルであることが検証されている(2, 4)。さらに、完全長 AR は LNCaP 細胞と同程度に発現する(2)。

4. グルココルチコイド受容体（GR）は、AR と共に 22Rv1 起源細胞で内因的に発現する。GR は AR に構造的に類似しており、AR とのクロストークを示すホルモン応答エレメントを共有しているため、GR を介した最小限の応答が AR を介した応答に干渉する可能性がある(1, 3, 5)。細胞内での GR の発現を除去するため、クラスター化反復短回文配列リピート（CRISPR）/CRISPR 関連（Cas）9 システムを用いて、GR ノックアウト 22Rv1/MMTV 細胞株が開発された(1, 2, 5)。

5. バリデーション試験において、GR ノックアウト 22Rv1/MMTV 細胞株は低い代謝活性を示した(6)。バリデーションは、単一成分化学物質のみを用いて実施された。この試験法は、理論的には混合物の試験に適用可能である。この試験法を混合物に適用する前に、科学的に意味のある結果が得られるかどうかを検討すること。

6. 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 A に提示する。

7. 22Rv1/MMTV_GR-KO アッセイは、OECD VMG-NA 専門家グループのメンバーで構成される試験管理チームの支援を受けて、韓国国立食品医薬品安全評価研究所（NIFDS）、韓国化学試験研究院（KTR）および東国大学が検証した。この試験法は、「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」（6, 7, 8）におけるレベル 2 の AR アゴニストおよびアンタゴニストの検出に使用される。22Rv1/MMTV_GR-KO 法のバリデーション試験は、OECD ガイダンス文書（GD）34 に従って実施された。意図した目的に対するアッセイの妥当性および信頼性が実証された（9, 10）。

©OECD 2020

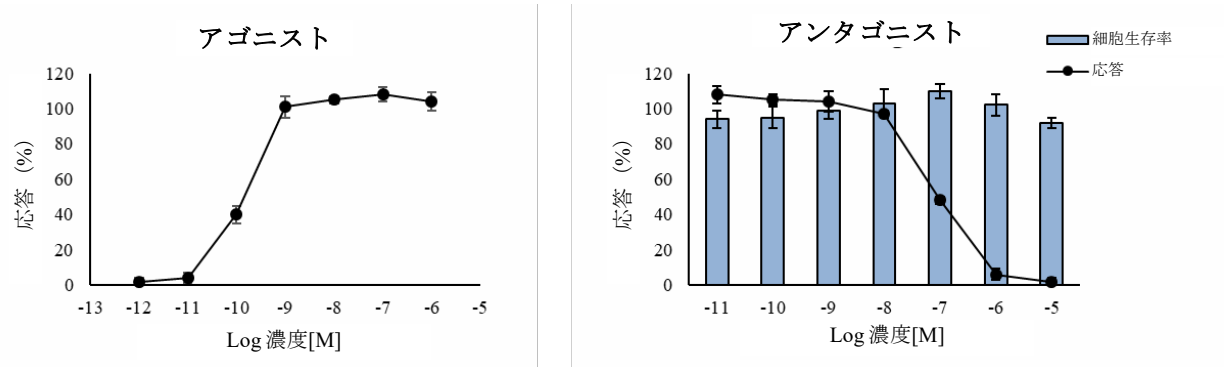
試験法の原理

8. この試験法で提供される試験系では、22Rv1 細胞株由来の 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株を用いる。22Rv1 細胞株はヒトレトロウイルス XMRV（異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス）を産生するため、22Rv1 細胞は ATCC によりバイオセーフティレベル 2 細胞株に分類されている(11)。22Rv1 細胞株を用いて実験を行う場合は、生物学的安全性を考慮しなければならない。開発した細胞株は、1 本の pGL4[*luc2P*/MMTV/Hygro]ベクターを用いて安定的に形質移入した 22Rv1 細胞で構成される。pGL4[*luc2P*/MMTV/Hygro]ベクタープロトコルは、プロメガ（Promega）社との限定使用ライセンスを課されており、i）プロメガ社から購入した発光アッセイ用試薬の使用、または ii）商業利用フリーライセンスを取得するためのプロメガ社への連絡、のいずれかが必要である。

9. 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株を用いた AR アゴニスト/アンタゴニストアッセイは段階的に実施しなければならない。プレスクリーニングランの実施後、包括的ランおよび特異性対照（AR アンタゴニストアッセイのみ）を行う。包括的ランは、アゴニストまたはアンタゴニストアッセイのいずれかにおいてプレスクリーニングが陽性活性を示した場合にのみ実施する。包括的ランにおける被験化学物質の開始濃度は、プレスクリーニングランで決定する。化学物質が真の競合的 AR 結合アンタゴニストであるかどうかを確認するには、特異性対照試験を用いなければならない（段落 28 参照）。

10. AR アゴニスト作用のデータ判定は、被験化学物質により誘発される最大応答レベルに基づいている。この応答が、AR アゴニスト対照である 10 nM 5α-DHT により誘発された応答（PC_{AGO}）の 10%以上である場合、その被験化学物質を AR アゴニストとみなす。被験化学物質の AR アンタゴニスト作用に関するデータ判定は次の 2 段階で決定される：i）800 pM DHT 存在下での被験化学物質の 30%阻害応答のカットオフ値、および ii）特異性対照試験の R^2 値が 0.9 未満（段落 40 および 43 参照）。両基準を満たす場合、その化学物質は真の AR アンタゴニストとみなされる。データ解析については段落 37～41 に詳述する。アゴニストおよびアンタゴニスト参照化学物質（DHT およびビカルタミド）の典型的な濃度反応曲線を図 E.1 に示す。

図 E.1.AR アゴニストおよびアンタゴニストアッセイにおいて、プレスクリーニングランで得られる典型的な陽性対照の応答



©OECD 2020

実験室習熟度の実証

11. 22Rv1/MMTV GR-KO 法の習熟度を検証するために、各実験室は習熟度試験を実施しなければならない。アゴニストおよびアンタゴニストアッセイのための習熟度確認化学物質を、本試験ガイドライン補遺 B の表 B.4a および B.4b に示す。この習熟度試験は異なる日に少なくとも 2 回実施し、結果は補遺 B の表 B.4a および B.4b の習熟度確認化学物質の分類および値と一致しなければならない。

手順

細胞株

12. 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株は、22Rv1 ヒト前立腺がん細胞に由来する安定的に形質移入されたアンドロゲン応答性の細胞株であり、付着性で AR 陽性である。当該細胞株は、ライセンス契約を含む物質移動合意書（MTA）に署名した上で韓国細胞バンクから入手することができる。

13. この試験法では、マイコプラズマを含まない細胞を用いなければならない。マイコプラズマ感染の検出は、PCR 分析などの高感度の方法を用いて、あらゆる実験の開始前に行わなければならない(12)。

細胞株の安定性

14. 応答の安定性と完全性を維持するために、細胞は（ディープフリーザーや液体窒素等の中で）-80°C 未満で保持しなければならない。細胞は、解凍後少なくとも 2 回継代培養し、化学物質の（抗）アンドロゲン活性の評価に使用する。細胞は 30 継代を超えて培養してはならない。細胞倍加時間は 48 時間である。

細胞株の維持および播種条件

15. 以下の培地を調製する（詳細はバリデーション報告書(10)の SOP に記載）。

- ▪ 培養培地：RPMI1640 に FBS（10% v/v）、GlutaMAX™（2 mM）、ペニシリン（100 単位/mL）、ストレプトマイシン（100 µg/mL）およびアムホテリシン B（0.25 µg/mL）を添加したもの。
- ▪ 試験培地：フェノールレッドを含まない RPMI1640 にチャコール・デキストラン処理（DCC）-FBS（5% v/v）、GlutaMAX™（2 mM）、ペニシリン（100 単位/mL）、ストレプトマイシン（100 µg/mL）およびアムホテリシン B（0.25 µg/mL）を添加したもの

16. 22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株のメンテナンスプロトコルは、ATCC 22Rv1 メンテナンスプロトコルに基づいている(11)。細胞解凍後に初めて使用するために、ルシフェラーゼ遺伝子選択マーカーとしてハイグロマイシン 200 µg/mL を含む培地中で、22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞を維持する。22Rv1/MMTV_GR-KO 細胞株の継代には、0.05% トリプシン-EDTA よりも 0.1% トリプシン-EDTA が望ましい。これは、濃度が高いほど細胞培養プレートからの細胞の分離が改善されるためである。アッセイでは、細胞を 3.0×10^5 細胞/mL で試験培地に懸濁させる。懸濁した細胞 100 µL（3.0×10^4 細胞/ウェルに相当）を 96 ウェル白色プレートに分注する。曝露前に、

©OECD 2020

細胞を 5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内で 37°C で 48 時間前培養する。

17. 試験培地中の DCC-FBS は、他の血清成分の干渉を最小限に抑えるために使用する。

媒体対照、AR アゴニスト対照および AR アンタゴニスト対照

18. AR アゴニストアッセイでは、各プレートにおいて 10 nM DHT で処理したアゴニスト対照（PC_{AGO1}）ウェル（n = 4）、0.1% DMSO のみを含む媒体対照（VC）ウェル（n = 4）、および細胞毒性対照（PC_{CT}；1 mM SDS）ウェル（n = 4）を調製する。AR アゴニストアッセイにおいて 100%の応答を達成するために 10 nM DHT 濃度を選択する。

19. AR アンタゴニストアッセイでは、VC ウェル（n = 3）、アゴニスト対照（PC_{AGO2}；800 pM DHT）ウェル（n = 3）、AR アンタゴニスト対照（PC_{ANTA}；800 pM DHT および 1 μM ビカルタミド）ウェル（n = 3）、および細胞毒性対照（PC_{CT}；800 pM DHT および 1 mM SDS）ウェル（n = 3）を各プレートに含めなければならない。

陽性および陰性の参照標準

20. 各アッセイの参照標準は、各ランで 1 枚のプレートに含めなければならない。AR アゴニストアッセイでは、特性が十分に明らかにされている 3 種類の参照標準；2 種類の陽性参照標準（DHT およびメスタノロン）および 1 種類の陰性参照標準（フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP））を含めなければならない。AR アンタゴニストアッセイの参照標準には、2 種類の陽性参照標準（ビカルタミドおよびビスフェノール A）および 1 種類の陰性参照標準（DEHP）が含まれる。

AR アゴニスト/アンタゴニストアッセイの品質基準

21. PC（AR アゴニストアッセイ:10 nM DHT（PC_{AGO1}）；AR アンタゴニストアッセイ：800 pM DHT（PC_{AGO2}））の平均ルシフェラーゼ活性は、AR アゴニストアッセイでは各プレートの平均 VC の 13 倍以上、AR アンタゴニストアッセイでは平均 VC の 10 倍以上でなければならない。アッセイの品質管理に関しては、PC_{10} の誘導倍率が、VC の誘導能の 1 + 2 標準偏差（SD）を超えなければならない。ビカルタミドの用量反応曲線の無い、1 点の濃度での PC_{ANTA}（800 pM DHT および 1 μM ビカルタミド）の相対的転写活性（RTA）は、AR アンタゴニストアッセイにおける PC_{AGO2} の 53.6%未満でなければならない。

許容基準

表 E.1.AR アゴニストアッセイの許容基準

化学物質	Log PC_{10}	Log PC_{50}	試験範囲
5α-ジヒドロテストステロン（DHT）	−12.2～−9.7	−10.6～−9.0	1.0×10^{-6} ～ 1.0×10^{-12} M

©OECD 2020

メスタノロン	−12.3～−9.8	−10.2～−8.6	1.0 x 10^{-6} ～ 1.0 x 10^{-12} M
フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）	–	–	1.0 x 10^{-5} ～ 1.0 x 10^{-11} M
PC_{AGO1} の誘導倍率	≥ 13		
PC_{10} の誘導倍率	1 + 2SD（VC の誘導能）を超える		

PC_{10} の誘導倍率：AR アゴニスト対照（PC_{AGO1}：10 nM DHT）の PC_{10}（10%）に相当
SD：標準偏差、VC：媒体対照

22. 以下の式により、PC_{AGO1} の誘導倍率を算出する。

$$PC_{AGO1}\text{の誘導倍率} = \frac{PC_{AGO1}\text{（10 nM DHT）の平均 RLU}}{\text{媒体対照の平均 RLU}}$$

- RLU：相対発光量

表 E.2.AR アンタゴニストアッセイの許容基準

化学物質	Log IC_{30}	Log IC_{50}	試験範囲
ビカルタミド	−7.5～−6.2	−7.0～−5.8	1.0 x 10^{-4} ～ 1.0 x 10^{-10} M
ビスフェノール A	−6.6～−5.4	−6.2～−5.0	1.0 x 10^{-5} ～ 1.0 x 10^{-11} M
DEHP	-	-	1.0 x 10^{-5} ～ 1.0 x 10^{-11} M
PC_{AGO2} の誘導倍率	≥ 10		
PC_{ANTA} の RTA（%）	≤ 53.6		

23. 以下の式により、PC_{AGO2} の誘導倍率を算出する。

$$PC_{AGO2}\text{の誘導倍率} = \frac{PC_{AGO2}\text{（800 pM DHT）の平均 RLU}}{\text{媒体対照の平均 RLU}}$$

$$PC_{ANTA}\text{の RTA（%）} = \frac{PC_{ANTA}\text{の平均 RLU - VC の平均 RLU}}{PC_{AGO2}\text{の平均 RLU - VC の平均 RLU}} \times 100$$

- RTA：相対的転写活性

溶解度試験

24. 溶解度試験は OECD GIVIMP に基づく(13)。DMSO または適切な溶媒中に最

©OECD 2020

高 1 M（原液；細胞を含むウェル中において原液の 0.1%すなわち 1 mM）の濃度の被験化学物質原液を調製する。析出が認められた場合は、元の原液の 10 分の 1 の濃度の新たな原液を再調製し、これを析出が認められなくなるまで繰り返す。

被験化学物質への曝露およびアッセイプレート構成

AR アゴニストアッセイにおけるプレスクリーニングラン

25. 溶解度試験（上記参照）で決定した最高原液濃度の各被験化学物質を、DMSO（または別の適切な溶媒）で 1:10 の比で段階的に希釈する。DMSO の最終濃度が 0.1%となるように、希釈液を水性培地に加える。推奨される各ウェルの最終容量は 100 µL である（アッセイプレートから試験培地を取り除き、被験化学物質を含む試験培地で置換する）。各濃度につき 3 連のウェルを使用する。AR アゴニストアッセイの参照標準（DHT、メスタノロンおよび DEHP）は各アッセイで試験すること。AR アゴニストアッセイでは、10 nM DHT で処理したウェル（PC_{AGO1}）、0.1% DMSO のみで処理したウェル（VC）および 1 mM SDS で処理したウェル（PC_{CT}）を各プレートに含めなければならない（表 E.3）。被験化学物質のプレートデザインの例を表 E.4 に示す。被験化学物質を添加後、アッセイプレートを 37°C±1°C、5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内に 20～24 時間静置する。

表 E.3.参照化学物質のプレート濃度（M）割り付けの例。

	DHT			**メスタノロン**			**DEHP**			**被験化学物質**		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-3}$	→	→
B	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-4}$	→	→
C	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→
D	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→
E	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→
F	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→
G	$1.0x10^{-12}$	→	→	$1.0x10^{-12}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→
H	**VC**	→	→	→	**PC_{AGO1}**	→	→	→	**PC_{CT}**	→	→	→

- VC:媒体対照（0.1% DMSO）
- PC_{AGO1}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
- PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）

©OECD 2020

表 E.4.被験化学物質のプレート濃度（M）割り付けの例。

	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	$1.0x10^{-3}$	→	→	$1.0x10^{-3}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→
B	$1.0x10^{-4}$	→	→	$1.0x10^{-4}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→
C	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→
D	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→
E	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→
F	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→
G	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-12}$	→	→
H	**VC**	→	→	→	**PC_{AGO1}**	→	→	→	**PC_{CT}**	→	→	→

- VC:媒体対照（0.1% DMSO）
- PC_{AGO1}:AR アゴニスト対照（10 nM DHT）
- PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）

AR アゴニストアッセイにおける包括的ラン

26. プレスクリーニングランで AR アゴニストであると判定された被験化学物質については、包括的ランで更に試験しなければならない。プレスクリーニングランで作成した濃度反応曲線から被験化学物質の最高濃度を決定し、DMSO を用いて 1:3 または 1:5 の比で段階的に希釈する（付録 E.1 参照）。DMSO の最終濃度が 0.1%になるようにこれらの希釈液を水性培地に添加し、各濃度を 3 連で試験する。すべての試験は、濃度反応曲線が十分に特徴づけられる濃度で実施すること。これらの条件を達成するために、不溶性の固形物が認められる溶液や細胞株に対して細胞毒性作用を誘発することが判明した濃度は、最終的な分析に含めてはならない。推奨される各ウェルの最終容量は 100 µL である（アッセイプレートから試験培地を取り除き、被験化学物質を含む試験培地で置換する）。包括的ランにおける参照標準および被験化学物質のプレート配置は、プレスクリーニングランと同じである。被験化学物質を添加後、アッセイプレートを 37°C±1°C、5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内に 20～24 時間静置する。

AR アンタゴニストアッセイにおけるプレスクリーニングラン

27. 溶解度試験（上記参照）で決定した最高原液濃度の各被験化学物質を、DMSO で 1:10 の比で段階的に希釈する。DMSO の最終濃度が 0.1%となるように、これらの希釈液を水性培地に加える。推奨される各ウェルの最終容量は 100 µL である（アッセイプレートから試験培地を取り除き、被験化学物質を含む試験培地で置換する）。AR アンタゴニストアッセイの参照標準（ビカルタミド、ビスフェノール A および DEHP）は各アッセイで試験すること。AR アンタゴニストアッセ

©OECD 2020

イでは、AR アゴニスト対照（PC_{AGO2}；800 pM DHT）、AR アンタゴニスト対照（PC_{ANTA}；800 pM DHT および 1 μM ビカルタミド）、および細胞毒性対照（PC_{CT}；800 pM DHT および 1 mM SDS）を調製する（表 E.5）。被験化学物質のプレートデザインを表 E.6 に示す。VC を除き、すべてのウェルに固定濃度のアゴニスト参照化学物質（800 pM DHT）を添加して、アゴニスト応答の減衰を測定する。被験化学物質を添加後、アッセイプレートを 37°C±1°C、5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内に 20～24 時間静置する。

表 E.5.参照標準のプレート濃度（M）割り付けの例

	ビカルタミド			ビスフェノール A			DEHP			被験化学物質 1		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$1.0x10^{-4}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-3}$	→	→
B	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-4}$	→	→
C	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→
D	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→
E	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→
F	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→
G	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→
H	**VC**			**PC_{AGO2}**			**PC_{ANTA}**			**PC_{CT}**		

- VC:媒体対照（0.1% DMSO）
- PC_{AGO2}:AR アンタゴニストアッセイにおける AR アゴニスト対照（800 pM DHT）
- PC_{ANTA}:AR アンタゴニスト対照（1 μM ビカルタミド）
- PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）
- グレーのウェルには 800 pM DHT が含まれている

©OECD 2020

表 E.6.被験化学物質のプレート濃度（M）割り付けの例

	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	$1.0x10^{-3}$	→	→	$1.0x10^{-3}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-3}$	→	→
B	$1.0x10^{-4}$	→	→	$1.0x10^{-4}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-4}$	→	→
C	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-5}$	→	→
D	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-6}$	→	→
E	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-7}$	→	→
F	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→	$1.0x10^{-10}$	→	→	$1.0x10^{-8}$	→	→
G	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→	$1.0x10^{-11}$	→	→	$1.0x10^{-9}$	→	→
H	**VC**			**PC_{AGO2}**			**PC_{ANTA}**			**PC_{CT}**		

- VC:媒体対照（0.1% DMSO）
- PC_{AGO2}:AR アンタゴニストアッセイにおける AR アゴニスト対照（800 pM DHT）
- PC_{ANTA}:AR アンタゴニスト対照（1 μM ビカルタミド）
- PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）
- グレーのウェルには 800 pM DHT が含まれている

AR アンタゴニストアッセイにおける包括的ランおよび特異性対照試験

28. プレスクリーニングランで陽性と判定された AR アンタゴニストを確実に同定するためには、800 pM DHT および 100 nM DHT の両方を用いて包括的ランおよび特異性対照試験を実施しなければならない。これら 2 点の濃度の DHT をアンタゴニストアッセイに含めることにより、「真の」AR アンタゴニストの濃度反応曲線の間にシフトが生じ、これらの化学物質を潜在的な偽陽性と区別できるようになることが期待される。プレスクリーニングランで作成した濃度反応曲線から被験化学物質の最高濃度を決定し、DMSO を用いて 1:3 または 1:5 の比で段階的に希釈する（付録 E.1 参照）。DMSO の最終濃度が 0.1%になるようにこれらの希釈液を水性培地に添加し、各濃度を 3 連で試験する。推奨される各ウェルの最終容量は 100 μL である（アッセイプレートから試験培地を取り除き、被験化学物質を含む試験培地で置換する）。参照標準のプレート配置は、プレスクリーニングランと同じである。被験化学物質のプレート配置は表 E.7 に示す。AR アンタゴニストアッセイでは、AR アゴニスト対照（PC_{AGO2}；800 pM DHT）、AR アンタゴニスト対照（PC_{ANTA}；800 pM DHT および 1 μM ビカルタミド）、および細胞毒性対照（PC_{CT}；800 pM DHT および 1 mM SDS）を調製する。プレート配置を表 E.7 に示す。被験化学物質を添加後、アッセイプレートを 37°C±1°C、5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内に 20～24 時間静置する。

©OECD 2020

表 E.7.被験化学物質のプレート濃度（log M）割り付けの例

被験化学物質 1 **被験化学物質 2**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	−5	→	→	−5	→	→	−4	→	→	−4	→	→
B	−5.7	→	→	−5.7	→	→	−4.7	→	→	−4.7	→	→
C	−6.4	→	→	−6.4	→	→	−5.4	→	→	−5.4	→	→
D	−7.1	→	→	−7.1	→	→	−6.1	→	→	−6.1	→	→
E	−7.8	→	→	−7.8	→	→	−6.8	→	→	−6.8	→	→
F	−8.5	→	→	−8.5	→	→	−7.5	→	→	−7.5	→	→
G	−9.2	→	→	−9.2	→	→	−8.2	→	→	−8.2	→	→
H	**VC**			**PC_{AGO2}**			**PC_{ANTA}**			**PC_{CT}**		

- VC:媒体対照（DMSO）
- PC_{AGO2}: AR アゴニスト対照（800 pM DHT）
- PC_{ANTA}:AR アンタゴニスト対照（1 µM ビカルタミド）
- PC_{CT}:細胞毒性対照（1 mM SDS）
- グレーのウェルに 800 pM DHT を添加する
- 濃いグレーのウェルに 100 nM DHT を添加する

エンドポイントの測定

29. AR 応答については Steady-Glo Luciferase assay system（Promega、E2510 または同等のもの）を、細胞毒性については生細胞プロテアーゼ検出システム（Cell Titer-Fluor™ Cell viability assay、Promega、G6080 または同等のもの）を用いてエンドポイントを測定する。細胞生存率およびルシフェラーゼ活性の測定は同一のプレートで行う。

30. 細胞生存率アッセイについて:

- 製造業者の指示に従って、細胞生存率（CellTiter-Fluor™）試薬を調製する。
- 20 µL/ウェルの細胞生存率アッセイ試薬を、被験化学物質を添加した培地が入ったアッセイウェルに直接加える。
- アッセイプレートを軌道シェーカーで短時間混合する。
- アッセイプレートを 37°C ±1°C、5% ±0.5% CO_2 インキュベーター内で 1～3 時間培養する。
- インキュベーターからプレートを取り出し、蛍光光度計（380～400 nm Ex/505 nm Em）を用いて細胞毒性を測定する。

31. ルシフェラーゼアッセイについて

©OECD 2020

- 製造業者の指示に従って、ルシフェラーゼアッセイ（Steady-Glo）試薬を調製する。
- 細胞生存率アッセイ後に、50 µL/ウェルのルシフェラーゼアッセイ試薬をアッセイウェルに直接加える。
- アッセイプレートの上部をアルミホイルで覆い遮光し、室温で 5〜10 分間静置する。
- 発光測定装置を用いてルシフェラーゼ活性を測定する。

データの分析

細胞毒性

32. 蛍光光度計で測定した RFU 単位の細胞毒性を記録し、次のように変換する。

- AR アゴニストおよび AR アンタゴニスト対照の平均値（AR アゴニストアッセイ：10 nM DHT、AR アンタゴニストアッセイ：800 pM DHT）を 100%とする。
- 細胞毒性対照の平均値（AR アゴニストアッセイ：1 mM SDS、AR アンタゴニストアッセイ：800 pM DHT および 1 mM SDS）を 0%とする

33. 細胞生存率試験の結果、ある濃度の被験化学物質が細胞生存率を 20%以上低下させた場合、当該濃度は細胞毒性があると判断する。細胞毒性があると考えられるすべての濃度を評価から除外すること

34. 細胞生存率アッセイにおける RFU 単位からのデータ変換は以下のとおりである。

$$\text{細胞生存率（\%）} = \frac{\text{被験化学物質の平均 RFU - } PC_{CT} \text{ の平均 RFU}}{\text{PC の平均 RFU - } PC_{CT} \text{ の平均 RFU}} \times 100$$

▪ RFU：相対蛍光単位

ルシフェラーゼ活性

35. 照度計より得られた RLU 単位の発光シグナルデータを記録し、次のように変換する。

- AR アゴニストおよび AR アンタゴニスト対照の平均値（AR アゴニストアッセイ：10 nM DHT、AR アンタゴニストアッセイ：800 pM DHT）を 100%とする。
- 媒体対照（0.1% DMSO）の平均値を 0%とする

36. アゴニストおよびアンタゴニストアッセイにおける RLU 単位からのデータ変換は以下のとおりである。

$$\text{RTA（\%）} = \frac{\text{被験化学物質の平均 RLU - VC の平均 RLU}}{\text{PC の平均 RLU - VC の平均 RLU}} \times 100$$

▪ RLU：相対発光量・RTA：相対的転写活性

パラメータの算出

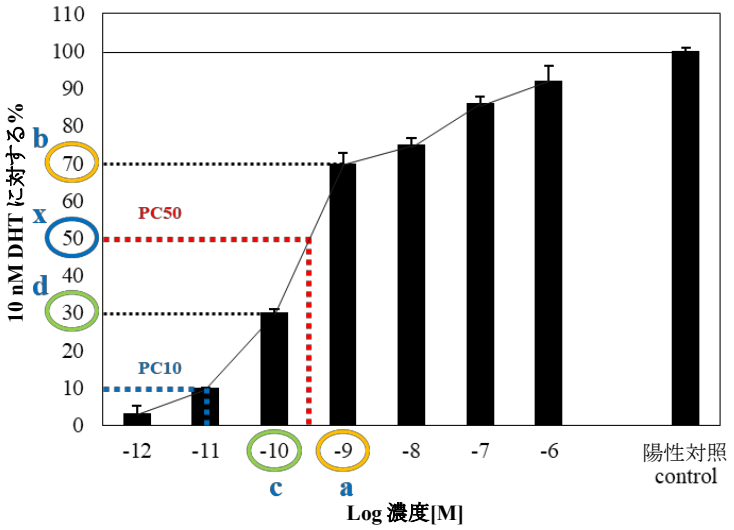
37. AR アゴニストアッセイでは、陽性の被験化学物質について、陽性対照の

©OECD 2020

10%の効果（log PC_{10}）に相当する効果を引き起こす濃度、および適切な場合には、陽性対照の 50%の効果（log PC_{50}）に相当する効果を引き起こす濃度を提示しなければならない。log PC_x 値の説明（「x」は選択した応答、例えば PC_{AGO1} と比較して 10%または 50%の誘導能）を図 E.2 に示す。log PC_{10} 値および log PC_{50} 値は、PC_{AGO1}（10 nM DHT）による転写活性の 10%または 50%誘導のいずれかを誘発すると推定される被験化学物質の濃度と定義できる。各 log PC_x 値は、転写活性の 2 つの変数データポイントを用いた単純な線形回帰により算出することができる。log PC_x 値のすぐ上とすぐ下のデータ点の座標を、それぞれ（a, b）および（c, d）とした場合、log PC_x 値は下の式を用いて計算できる。log[PC_{50}]の算出方法を図 E.2 に示す。

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

図 E.2.log PC_x 値算出の概略図



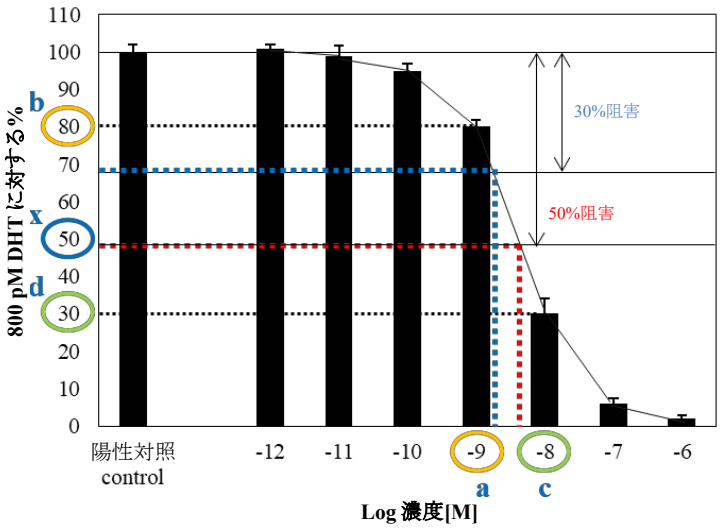
▪ AR アゴニストアッセイでは、PC_{AGO1}（10 nM DHT）が各アッセイプレートに含まれる。

38. AR アンタゴニストアッセイの場合、陽性被験化学物質について、800 pM DHT で誘導される転写活性の 30%阻害を示す濃度（log IC_{30}）、および適切な場合は 800 pM DHT の活性の 50%阻害を示す濃度（log IC_{50}）を提示する。log IC_x 値の説明（「x」は選択した応答、例えば PC_{AGO2} と比較して 30%または 50%阻害）を図 E.3 に示す。log IC_{50} 値および log IC_{30} 値は、800 pM DHT による転写活性の 50%または 30%阻害のいずれかを誘発すると推定される被験化学物質の濃度と定義できる。各 log IC_x 値は、転写活性の 2 つの変数データポイントを用いた単純な線形回帰により算出することができる。log IC_x 値のすぐ上とすぐ下のデータ点の座標を、それぞれ（c, d）および（a, b）とした場合、log IC_x 値は下の式を用いて計算できる。log[IC_{50}]の計算の概要を図 E.3 に示す。

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

©OECD 2020

図 E.3.log IC_x 値算出の概略図



▪ AR アンタゴニストアッセイでは、PC_{AGO2} （800 pM DHT）が各アッセイプレートに含まれる。

39. 特異性対照試験の場合、2 つの濃度の DHT による反応を区別するために、800 pM DHT を使用した時の濃度 c における相対誘導能を Y_C とし、100 nM DHT を使用した時の濃度 c における相対誘導能を S_C とする。Y_C または S_C の RLU からのデータ変換は以下のとおりである。

$$Y_C \text{ または } S_C \text{（\%）} = \frac{\text{被験化学物質の平均 RLU - VC の平均 RLU}}{PC_{AGO2} \text{の平均 RLU - VC の平均 RLU}} \times 100$$

40. 被験化学物質が真の（競合的）AR アンタゴニストであるか判断するために、標準応答の相対誘導能 Y_C と特異性応答の相対誘導能 S_C の間の決定係数の二乗 R^2 を算出した。R^2 が 0.9 未満の場合、この被験化学物質を真の AR アンタゴニストと判定した。真の AR アンタゴニストを識別するための R^2 の式は、バリデーション報告書に記載されている(6)。この基準は 100%確実とはみなされないため、（AR-CALUX®バリデーション試験報告書に示されているように）いくつかの注意を払う必要がある。曲線の形状や外れ値の影響を受ける可能性がある。専門家の判断が必要な場合がある。

41. 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、アゴニストおよびアンタゴニストアッセイにおいてデータを解釈する際には考慮に入れる必要がある。従って、AR 介在性の転写活性と細胞毒性は同じアッセイプレートで同時に評価すべきである。細胞毒性試験の結果、被験化学物質のある濃度において細胞生存率が 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。

©OECD 2020

データ判定基準

42. データの判定および、細胞毒性を伴わない状態における被験化学物質が陽性であるか陰性であるかの判断を表 E.8 に示す。

43. 化学物質を AR アゴニストとして分類するには、log PC_{10} を決定することができる陽性のプレスクリーニングランに続いて、2 回の包括的ランで一致する結果が得られるか、一致しない場合は 3 回目の包括的ランを行う必要がある。プレスクリーニングランが陰性の場合、（2 回目の）フォローアップのプレスクリーニングランで結果を確認する。1 回目のプレスクリーニングランが陰性で 2 回目のプレスクリーニングランが陽性であった場合、3 回目のプレスクリーニングランを追加で実施する。AR アンタゴニストの場合、log IC_{30} はプレスクリーニングランで算出し、特異性対照試験と共に少なくとも 2 回（最大 3 回）の（細胞毒性を伴わない）包括的ランで確認する。特異性対照における被験化学物質の R^2 が 0.9 未満である場合、被験化学物質は真の AR アンタゴニストとみなすことができるが、これには追加の専門家の判断が必要な場合がある（段落 40 参照）。AR アンタゴニストではない化学物質は、少なくとも 2 回のプレスクリーニングランにおける陰性の結果（かつ陽性結果が無い）に基づいて分類する（表 E.8）。

表 E.8.陽性および陰性の判定基準

AR アゴニストアッセイ	**陽性**	得られた RPC_{max} が陽性対照の応答の 10%と同等またはこれを超える場合。
	陰性	それ以外のすべての場合。
AR アンタゴニストアッセイ	**陽性**	被験化学物質が以下を満たす場合：i）細胞毒性を伴わずに被験化学物質の log IC_{30} が算出され、ii）特異性対照試験において、R^2 が 0.9 未満である。
	陰性	それ以外のすべての場合。

▪ すべての結果で細胞毒性を伴わない。

©OECD 2020

参考文献

1. Kim H.J., Park Y.I., Dong M.S. (2006) Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicology In Vitro* 20, 1159–1167.

2. Sun S, Park E.J, Choi Y.H., Lee H.S., Ahn B.Y. and Dong M.S. 2016. Development and prevalidation of an in vitro transactivation assay for detection of (anti)androgenic potential compounds using 22Rv1/ MMTV cells. *Reproductive Toxicology* 60, 156–166.

3. Yen P.M., Liu Y., Palvimo J.J., Trifiro M., Whang J., Pinsky L., Janne O.A. and Chin W.W. 1997. Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen- glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. *Moleculard Endocrinology* 11, 162-171.

4. Zwart, N., Andringa, D., de Leeuw, W.J., Kojima, H., Iida, M., Houtman, C. 2017. Improved androgen specificity of AR-Ecoscreen by CRISPR based glucocorticoid receptor knockout. *Toxicology in Vitro* 45, 1-9.

5. Lee H.S., Lee S.H. and Park Y.H. 2019. Enhancement of androgen transcriptional activation assay based on genome edited glucocorticoid knock out human prostate cancer cell line. *Environmental Research* 171, 437-443.

6. Validation Study Report of 22Rv1/MMTV_GR-KO ARTA assay. (2019). Available at (http://www.nifds.go.kr/brd/m_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1)

7. OECD (2012) Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. No. 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

8. OECD (2005) Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. No. 34. ENV/JM/MONO(2005)14.

9. OECD (2016) OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonistic Activity of Chemicals.

10. Validation report of the 22Rv1/MMTV_GR-KO AR TA assay: An *in vitro* assay for identifying human androgen receptor agonists and antagonists.

11. ATCC 22Rv1 culture method. Available at (https://www.atcc.org/products/all/CRL-2505.aspx#culturemethod)

12. 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, 769–771.

13. OECD (2018) Guidance document on good in vitro method practices (GIVIMP). OECD series on Testing and Assessment. No. 286. OECD Publishing Paris.

©OECD 2020

付録 E.1

1. 包括的ランにおける最高濃度の決定法

2. プレスクリーニングランで被験化学物質が陽性と判定された場合、包括的ランを実施して被験化学物質の作用の程度を正確に測定する。AR アゴニスト活性において陽性に分類されるすべての被験化学物質は、ベースラインと正の傾きからなる濃度反応曲線を有する必要がある。AR アンタゴニスト活性において陽性に分類されるすべての被験化学物質は、ベースラインと負の傾きからなる濃度反応曲線を有する必要がある。可能であれば、各陽性判定ごとに PC_{10}、PC_{50}、IC_{30} および IC_{50} 値を算出する。包括的 AR アゴニスト/アンタゴニストアッセイは、各濃度を 96 ウェルプレートの 3 連ウェルで試験した 7 点の一連の希釈液（1:3 または 1:5 の段階希釈）で構成される。包括的ランの開始濃度を決定するには、以下の基準を使用する。

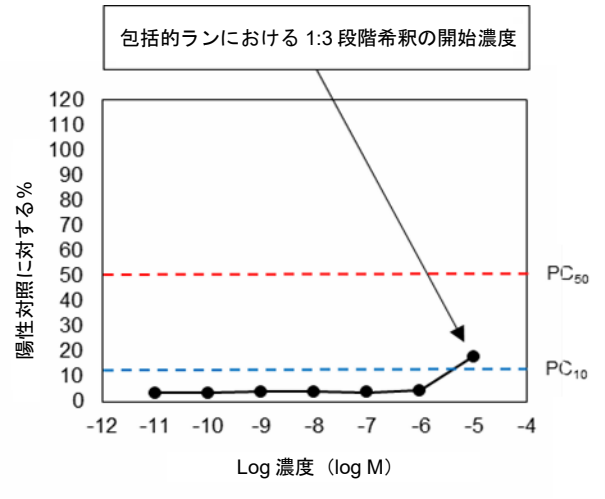
- プレスクリーニングランの結果から、被験化学物質が AR アゴニストアッセイにおいて PC_{10} 値のみで陽性であることが示唆された場合（細胞毒性を伴わずに陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点が、1 つだけである場合）、包括的ランは、最大曝露濃度から開始して 7 点の濃度の 1:3 段階希釈液を用いて実施する（例 1 参照）。

- プレスクリーニングランの結果から、被験物質が AR アゴニストアッセイにおいて PC_{10} 値のみで陽性であることが示唆された場合（細胞毒性を伴わずに陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点が、複数ある場合）、包括的ランは、最大曝露濃度から開始して 7 点の濃度の 1:5 段階希釈液を用いて実施する（例 2 参照）。

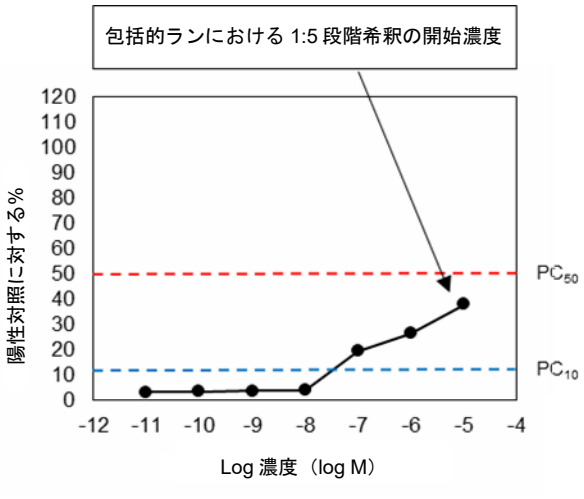
- プレスクリーニングランの結果から、被験物質が AR アゴニストアッセイにおいて PC_{10} および PC_{50} 値で陽性であることが示唆された場合（すなわち、細胞毒性を伴わずに陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点がある場合）、包括的ランで使用する 7 点の濃度の段階希釈液の開始濃度は、プレスクリーニングランにおける最高レベルの応答を示す濃度の 10 倍とする（例 3 参照）。

- プレスクリーニングランの結果から、被験物質が AR アゴニストアッセイにおいて PC_{50} 値のみで陽性である（または PC_{50} 値が算出できないが最大活性が 10%以上である）ことが示唆された場合（すなわち、細胞毒性を伴わずに被験化学物質の濃度曲線上のすべての点が陽性の判定基準を超える場合）、包括的ランで使用する 7 点の濃度の段階希釈液の開始濃度は、プレスクリーニングランにおける最高レベルの応答を示す濃度の 10 倍とする（例 4 参照）。

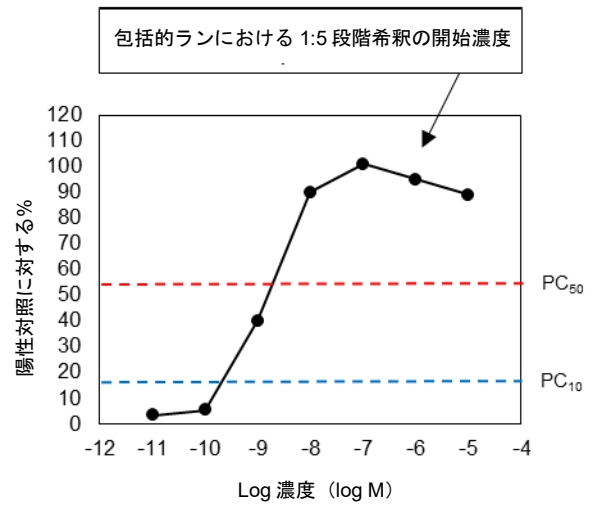
©OECD 2020



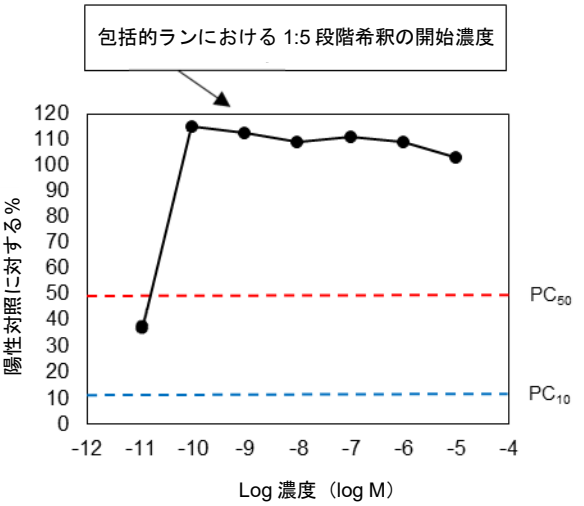
例 1



例 2



例 3



例 4

- プレスクリーニングランの結果から、被験化学物質が AR アンタゴニストアッセイにおける IC_{30} 値のみで陽性であることが示唆された場合（細胞毒性を伴わずに応答が陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点が 1 つだけである場合）、包括的試験は、最大曝露濃度から開始して 7 点の濃度の 1:3 段階希釈液を用いて実施する（例 5 参照）。

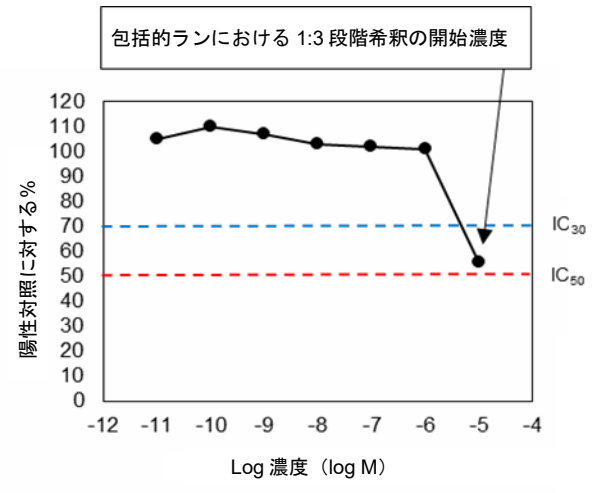
- プレスクリーニングランの結果から、被験化学物質が AR アンタゴニストアッセイにおける IC_{30} 値のみで陽性であることが示唆された場合（細胞毒性を伴わずに応答が陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点がある場合）、包括的試験は、最大曝露濃度から開始して 7 点の濃度の 1:5 段階希釈液を用いて実施する（例 6 参照）。

©OECD 2020

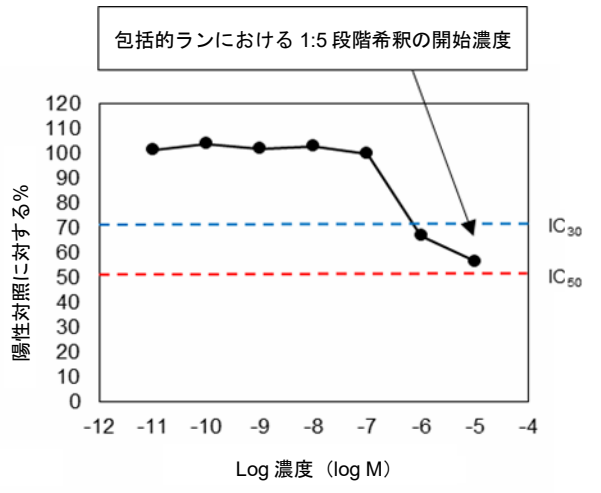
- プレスクリーニングランの結果から、被験物質が AR アンタゴニストアッセイにおける IC_{30} および IC_{50} 値で陽性であることが示唆された場合（すなわち、細胞毒性を伴わずに応答が陽性の判定基準を超える被験化学物質の濃度曲線上の点がある場合）、包括的試験で使用する 7 点の濃度の段階希釈液の開始濃度は、プレスクリーニングランにおける最高レベルの応答を示す濃度とする（例 7 参照）。

- プレスクリーニングランの結果から、被験物質が AR アンタゴニストアッセイにおける IC_{50} 値のみで陽性であることが示唆された（または、IC_{50} 値が算出できない）場合（すなわち、細胞毒性を伴わずに被験化学物質の濃度曲線上のすべての点が陽性の判定基準を超える場合）、包括的試験で使用する 7 点の濃度の段階希釈液の開始濃度は、プレスクリーニングランにおける最高レベルの応答を示す濃度とする（例 8 参照）。

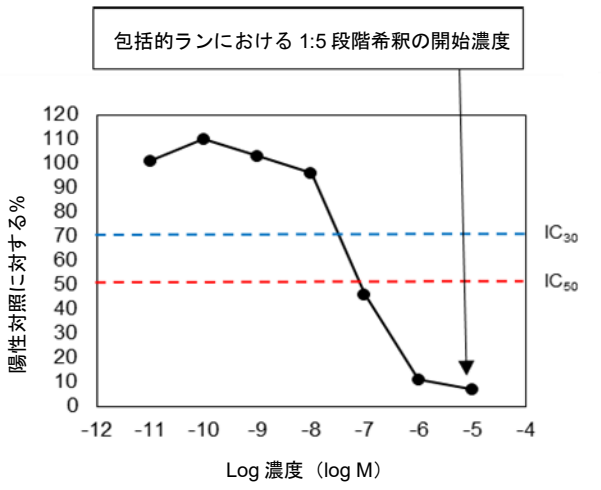
-



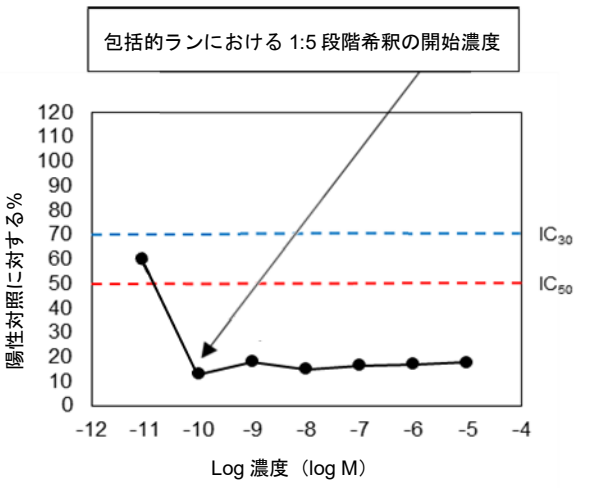
例 5



例 6



例 7



例 8

©OECD 2020