OECD/OCDE

2015/07/28

試験ガイドライン No.493

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

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 (2015), Test No. 493: Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In Vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2024/10/replaced-and-deleted-test-guidelines-2024/TG-493-detect-chemicals-estrogen--receptor-binding-affinity-2015.pdf.

©OECD(2015)

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

Adopted:
28 July 2015

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

エストロゲン受容体（ER）結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組み換えエストロゲン受容体（hrER）*in vitro* 試験法に関する性能基準準拠試験法ガイドライン

概論

性能基準準拠試験法ガイドライン

1. この性能基準準拠試験法ガイドライン（PBTG）では、エストロゲン受容体結合親和性を有する物質を検出するためのヒト組み換え *in vitro* 試験法（hrER 結合試験）について説明する。この hrER 結合試験は、2 つの機序および機能的に類似したエストロゲン受容体（ERα）結合物質確認試験法からなり、OECD のガイダンス文書（GD）「Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment」（1）に規定されるバリデーションの原則に従った新たな類似試験または改良試験の開発を促進するものである。本 PBTG の基礎を提供する十分に検証された参照試験法（補遺 2 および補遺 3）は次の通り：

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

   同一の有害性エンドポイントに対する類似試験法の開発とバリデーションの一助となる性能基準（PS）（3）があり、現行の PBTG を適時修正して新規類似試験法を PBTG に追加することが可能である。ただし、類似試験法の追加は性能基準を満たすことを検討し合意された後にのみ行われる。本ガイドラインに含まれる試験法は、エストロゲン受容体結合性に関する試験結果に対する各国の要求事項への対応に一律に使用することができ、さらにデータの相互受け入れによる利益が得られる。

© OECD, (2015)

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

PBTG に含まれる試験法の背景と原理

2. OECD では、1998 年に優先的活動項目の一つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のための試験法ガイドラインに関し、既存のものを改訂し、新規に作成し直す作業を開始した。内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質の試験および評価に関する OECD の概念枠組み（Conceptual Framework: CF）は 2012 年に改訂された。当初の CF および改訂された CF は、内分泌かく乱性評価のための標準化された試験法ガイドラインに関するガイダンス文書に補遺として含まれている（4）。CF は 5 つのレベルから構成され、それぞれ異なったレベルの生物学的複雑性に対応している。本 PBTG で説明する ER 結合試験は、「*選択された内分泌機構／経路に関するデータをもたらす in vitro 試験*」が含まれるレベル 2 に当たる。本 PBTG は、ヒトエストロゲンアルファ受容体（ERα）に対するリガンドを確認できるよう設計された *in vitro* 受容体結合試験法に関するものである。

3. *In vitro* での ER 結合試験の生物学的機能との関連性は明確に証明されている。ER 結合試験はエストロゲンホルモン経路のかく乱作用を有する化学物質を確認できるよう設計されており、過去 20 年間に渡って、ER の組織分布の確認および ER アゴニストとアンタゴニストの特定に広く使用されてきた。これらの試験は、エストロゲンシグナル伝達経路の第一段階であり、かつすべての脊椎動物における生殖機能に不可欠である、リガンドと受容体との相互作用を反映するものである。

4. エストロゲンと ER との相互作用はエストロゲン制御遺伝子の転写に影響を与えて非ゲノム効果を誘導し、細胞増殖、正常な胎児発生、および生殖機能に必要なものを含む細胞プロセスの誘導または阻害につながる可能性がある（5）（6）（7）。正常なエストロゲンシステムの混乱は正常な発生（個体発生）、生殖に関する健康および生殖系の完全性に対する有害な作用を引き起こす可能性がある。不適切な ER シグナル伝達により、ホルモン依存性がんや生殖障害、胎児の成長と発達における変化のリスクが上昇するなどの影響が生じ得る（8）。

5. *In vitro* 結合試験は、遺伝子の転写を制御する特異的受容体のリガンド結合部位と物質との直接的な相互作用を基にしている。ヒト組み換えエストロゲンアルファ受容体（hrERα）結合試験の重要点として、被験物質（競合物質）存在下での放射標識リガンド（[^{3}H]-17β-エストラジオール）の ER への結合能を被験物質の濃度を上昇させながら測定することである。ER に対して高い親和性を有する被験物質は、受容体親和性の低い化学物質と比べて、より低濃度で放射標識リガンドと競合する。本試験は 2 つの要素から主に構成されている：一つは受容体とリガンドの相互作用のパラメータをを明らかにする飽和結合実験である。他の一つは、放射標識リガンドと被験物質との ER 結合への競合作用を確認する競合結合実験に基づいた、ER の特異性を実証するための飽和結合実験である。

© OECD, (2015)

6. CERI および FW の結合試験に関するバリデーション試験の結果、各試験の目的に対する妥当性と信頼性が実証されている（2）。

7. 本試験法ガイドラインに使用した用語の定義および略語の説明を補遺 1 に示す。

受容体結合試験の範囲と限界

8. これらの試験法はスクリーニングおよび優先順位付けを目的として提案されているが、この方法により、証拠の重み付けアプローチに使用可能な分子レベルの初期事象（molecular initiation event: MIE）に関する情報も得られる。これらの情報は *in vitro* 系における ERαリガンド結合ドメインへの化学結合に関するものである。したがって、*in vivo* での健全な内分泌システムの複雑なシグナル伝達および制御に直接外挿してはならない。

9. 標的遺伝子の転写を活性化し、最終的に生理的変化を引き起こす一連の分子レベルの初期事象は、天然リガンドである 17β-エストラジオールの結合である（9）。したがって、ERα リガンド結合ドメインへの結合が ER を介した内分泌かく乱（ED）の主要メカニズムの一つと考えられるが、ED が起こるメカニズムは他にもあり、（i）リガンド結合ポケット以外の部位での ERαとの相互作用、（ii）エストロゲンシグナル伝達に関連する他の受容体である ERβおよび G タンパク質共役エストロゲン受容体、その他の受容体および内分泌系内の酵素系との相互作用、（iii）ホルモン合成、（iv）ホルモンの代謝活性化・不活性化、（v）ホルモンの標的組織への分配、（vi）ホルモンの体外への排出などが挙げられる。本 PBTG の試験ではこれらの作用機序についての検討は行わない。

10. 本 PBTG では物質のヒト ERαに対する結合能を取り扱っており、ERαのアゴニストとアンタゴニストの区別はしていない。また、遺伝子転写や生理的変化といったさらに下流の事象については本試験では取り扱わない。本試験法のバリデーションで使用されたのは単一物質のみであり、混合物への応用は検討ていない。しかしながら、理論上は、本試験法は多成分物質および混合物の試験に応用可能である。規制の目的で混合物に関するデータを得ることを意図して本試験法ガイドラインを使用する場合には、目的にかなう十分な結果が得られること、およびその根拠をあらかじめ検討する必要がある。その混合物の試験に関する規制要件がある場合にはこのような検討は不要である。

11. 無細胞レセプター系には内因性の代謝能がなく、代謝酵素系を併用した試験法のバリデーションは行われていない。一方試験デザインに代謝活性を組み入れることは可能と考えられるが、これにはさらなるバリデーション作業が必要となる。

12. 界面活性物質やアッセイ緩衝液の pH を変化させる物質などタンパク質（受容体タンパク質）

© OECD, (2015)

を変性させる可能性のある化学物質は、試験しないか、このような相互作用の起こらない濃度でのみ試験することになるであろう。それ以外の場合、本試験法で試験可能な被験物質の濃度範囲は、アッセイ緩衝液における当該物質の溶解性により制限される。

13. 参照のため、本 PBTG に記載した十分に検証された両試験法で試験を行った 24 物質の試験結果を表 1 に示す。ER 転写活性化に関する *in vitro* 試験や子宮肥大試験などの公表成績（9）（10）（11）（12）（13）（14）（15）に基づくと、これらの物質のうち 17 が ER 結合物質、6 物質が ER 非結合物質に分類される。表 1 に要約したデータに関して、2 つの試験は 10^{-4} M までいずれの物質の分類に関してもほぼ 100%の一致を示し、各物質は ER 結合物質または非結合物質に正しく分類されている。本物質群およびバリデーション試験において ER 結合試験法で試験されたその他の物質に関する補足情報は hrER 結合試験に関する性能基準（3）、補遺 2（表 1、表 2、表 3）に示す。

表 1：FW および CERI の hrER 結合試験による物質の ER 結合剤または非結合剤への分類と予想される反応との比較

	物質名	CAS 番号	予想される反応	FW 試験		CERI 試験		MESH 化学物質クラス	製品クラス
				濃度範囲（M）	分類	濃度範囲（M）	分類		
1	17β-エストラジオール	50-28-2	*結合*	1×10^{-11}-1×10^{-6}	結合物質	1×10^{-11}-1×10^{-6}	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用薬
2	ノルエチノドレル	68-23-5	*結合*	3×10^{-9}-30×10^{-4}	結合物質	3×10^{-9}-30×10^{-4}	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用薬
3	ノルエチンドロン	68-22-4	*結合*	3×10^{-9}-30×10^{-4}	結合物質	3×10^{-9}-30×10^{-4}	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用薬
4	フタル酸ジ-*n*-ブチル	84-74-2	*非結合**	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質*†	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質*†	炭化水素（環式）、エステル	可塑剤、化学中間体
5	DES	56-53-1	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用薬
6	17α-エチニルエストラジオール	57-63-6	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	ステロイド	医薬品、動物用薬
7	Meso-ヘキソエストロール	84-16-2	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用薬
8	ゲニステイン	446-72-0	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（複素環式）、フラボノイド	天然物
9	エクオル	531-95-3	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	植物エストロゲン代謝産物	天然物
10	ブチルパラベン（4-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチル）	94-26-8	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	パラベン	保存剤
11	ノニルフェノール（混合物）	84852-15-3	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	アルキルフェノール	中間化合物

© OECD, (2015)

12	*o, p'*-DDT	789-02-6	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	有機塩素	殺虫剤
13	コルチコステロン	50-22-6	*非結合**	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	ステロイド	天然物
14	ゼアラレノン	17924-92-4	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（ヘテロ環式）ラクトン	天然物
15	タモキシフェン	10540-29-1	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（環基）	医薬品、動物用薬
16	5α-ジヒドロテストステロン	521-18-6	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	非フェノール性ステロイド	天然物
17	ビスフェノール A	80-05-7	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	フェノール	化学中間体
18	4-*n*-ヘプチルフェノール	1987-50-4	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	不定物質 [a]	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	アルキルフェノール	中間体
19	ケポン（クロルデコン）	143-50-0	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	炭化水素（ハロゲン化物）	農薬
20	ベンズアントラセン	56-55-3	*非結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	非結合物質 [b]	1×10^{-10}-1×10^{-3}	非結合物質 [b]	芳香族炭化水素	中間体
21	エンテロラクトン	78473-71-9	*結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	結合物質	植物エストロゲン	天然物
22	プロゲステロン	57-83-0	*非結合**	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	ステロイド	天然物
23	オクチルトリエトキシシラン	2943-75-1	*非結合*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	非結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-3}	非結合物質	シラン	表面改質剤
24	アトラジン	1912-24-9	*非結合**	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	1×10^{-10}-1×10^{-4}	非結合物質	ヘテロ環化合物	除草剤

* 溶解度の限界< 1×10^{-4} M

* フタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）は、先行バリデーション試験中に一部の検査施設において 10^{-3} M で不溶性（濁りなど）を認めたため、非結合物質としての分類および用途は、10^{-4} M までの範囲での試験結果を基とした。

† バリデーション試験においては、フタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）はコード化された被験物質として最大 10^{-3} M で試験した。このような条件下では、最大濃度（10^{-3} M）での放射標識リガンド結合の減少や不明瞭な曲線適合を認めた試験施設もあった。これらのランについて、CERI の試験法を用いた 3/5 の試験施設および FW の試験法を用いた 5/6 の施設では、DBP は「不定」または「結合物質」と分類された（参考文献（2）、セクション IV.B.3a,b および VI.A を参照）。

[a] 分類結果が予想される分類と一致しなかった。4-*n*-ヘプチルフェノールの分類は 3/5 の試験施設で「不定」または「非結合物質」であり、平均して「不定」と分類した。厳密な調査の結果、完全な結合曲線が得られなかった原因は化学物質の溶解限界にあることが分かった。

[b] ベンズアントラセンはバリデーション試験において、当該物質について報告された *in vitro* エストロゲン活性（16）が主としてその代謝活性化に依存することを明らかにした文献（17）（18）に基づき非結合物質（陰性）に再分類された。酵素による物質の代謝活性化は、施設間バリデーション試験で用いられた無細胞の本 hrER 結合試験では予測されない。したがって、FW および CERI の試験条件下で用いた場合、本物質の正しい分類は「非結合物質」となる。

hrER 結合試験法の要素

試験法に必要な要素

14. 本 PBTG は、ER 受容体および受容体に対するリガンドを用いる方法に適用する。リガンドは試験のマーカーやトレーサーとして利用可能であり被験物質の濃度上昇に従って解離する適当な強度のものとする。結合試験には主に、1）飽和結合、および 2）競合結合の 2 つ

© OECD, (2015)

の要素が含まれる。飽和結合試験は受容体標品の特異性と活性を確認するために用い、競合結合実験は被験物質の hrER 結合能を試験するために用いる。

対照物質

15. 同時基準エストロゲンおよび同時対照を提案する根拠を述べる。同時対照（溶剤（溶媒）、陽性対照（ER 結合物質；高親和性、低親和性）、陰性対照（非結合物質））は試験法が当該条件下で有効であることを示す指標となり、実験間での比較における基礎を提供する。またそれらは通常、所定の実験の許容基準の一部である（1）。各ラン 1 つのプレートには、基準エストロゲンおよび対照物質（弱結合物質、非結合物質）の完全な濃度曲線を用いる。その他のプレートには 1）高濃度（放射標識リガンドをほぼ完全に解離させる濃度）と中濃度（IC_{50} 程度）の E_2 および弱結合物質を各 3 連、2）溶媒対照および非特異的結合を各 3 連含める。

標準的品質管理

16. 各試験について記載されたところに従って標準的な品質管理を実施し、受容体の活性、化学物質濃度の正しさ、信頼限界が複数の反復試験を通じて安定な状態に保たれ、かつ試験期間中期待される ER 結合反応を示す性能が保持されていることを確認する。

試験施設の技能証明

17. 本 PBTG の試験法で未知の化学物質を試験するには、各試験施設はあらかじめ、ER 標品の特異性と活性を確認する飽和試験および基準エストロゲンと対照物質（弱結合物質および非結合物質）を用いた競合結合試験を実施し、当該試験法を使用する技能のあることを証明する必要がある。試験施設は、異なる日に実施した実験 3～5 試験より得られた基準エストロゲンおよび対照物質の結果を含む履歴データベースを作成する。これらの実験は当該試験施設の基準エストロゲンおよび履歴対照の基礎となり、将来のランの試験許容性の部分的評価として用いられる。

18. 試験系の反応性は、表 2 に示す技能試験用物質の試験によっても確認される。技能試験用物質の一覧は、ER 結合試験の性能基準（3）に示す参照物質のサブセットである。これらの物質は市販されており、ER 結合活性と広く関連する化学物質類を代表するもので、ER 結合物質（強い結合～弱い結合）および非結合物質（陰性物質）に期待される適当な範囲の強度を示す。各技能試験用物質の試験濃度は、表 2 に示す範囲をカバーする必要がある。各物質について 3 回以上試験を行い、結果が予想される化学的活性と一致していなければならない。試験はそれぞれ独立して（すなわち、新たな受容体希釈液、化学物質、試薬を用いて）、各濃度 3 連で行う。技能は各技能試験用物質を正しく分類（陽性／陰性）する

© OECD, (2015)

ことによって証明されるべきである。技能試験は、試験法を習得する技術者ごとに実施するべきである。

表 2：hrER 競合結合試験に用いる対照物質および習熟度確認物質の一覧 [1]

No.	物質名	CAS RN[2]	予想される反応 [3, 4]	試験濃度範囲（M）	MESH 化学物質分類 [5]	製品分類 [6]
対照物質（基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質）						
1	17β-エストラジオール	50-28-2	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	ステロイド	医薬品、動物用品
2	ノルエチノドレル（または）ノルエチンドロン	68-23-5（または）68-22-4	結合	3×10^{-9} - 30×10^{-6}	ステロイド	医薬品、動物用品
3	オクチルトリエトキシシラン	2943-75-1	非結合	1×10^{-10} - 1×10^{-3}	シラン	表面改質剤
習熟度確認物質 [6]						
4	ジエチルスチルベストロール	56-53-1	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用品
5	17α-エチニルエストラジオール	57-63-6	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	ステロイド	医薬品、動物用品
6	*meso*-ヘキセストロール	84-16-2	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	炭化水素（環式）、フェノール	医薬品、動物用品
7	タモキシフェン	10540-29-1	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	炭化水素（環式）	医薬品、動物用品
8	ゲニステイン	446-72-0	結合	1×10^{-10} - 1×10^{-3}	ヘテロ環化合物、フラボノイド	天然物
9	ビスフェノール A	80-05-7	結合	1×10^{-10} - 1×10^{-3}	フェノール	化学中間体
10	ゼアラレノン	17924-92-4	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-3}	ヘテロ環化合物、ラクトン	天然物
11	ブチルパラベン	94-26-8	結合	1×10^{-11} - 1×10^{-3}	カルボン酸、フェノール	保存剤
12	アトラジン	1912-24-9	非結合	1×10^{-11} - 1×10^{-6}	ヘテロ環化合物	除草剤
13	フタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）[7]	84-74-2	非結合 [8]	1×10^{-10} - 1×10^{-4}	炭化水素（環式）、エステル	可塑剤、化学中間体
14	コルチコステロン	50-22-6	非結合	1×10^{-11} - 1×10^{-4}	ステロイド	天然物

[1] 習熟度確認物質が既に市販されていない場合、同様の ER 結合分類、同等の結合性および化学物質クラスの物質を使用してよい。

[2] 略語：CAS RN＝化学情報検索サービス登録番号

[3] CERI および FW の hrER 結合試験に対するバリデーション試験における ERα結合物質または非結合物質としての分類（2）

[4] ER 結合活性は ER 結合および TA 試験法に関する ICCVAM Background Review Document（BRD）（9）、ならびに公表・検討された参照試験から得られた経験データその他の情報（10）（11）（12）（13）（14）（15）に基づく。

[5] 物質は、国際的に認められている標準化分類法である、米国医学図書館作成の医学事項索引見出し集（MeSH）（http://www.nlm.nih.gov/mesh で入手可能）を用いて 1 つ以上の化学物質分類に帰属させた。

[6] 物質は、米国医学図書館作成の有害物質データベース（http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB で入手可能）を用いて 1 つ以上の製品分類に帰属させた。

[7] DBP は対照非結合物質として代替的に用いることができ、最大 10^{-4} M で試験される。

[8] 本物質の溶解限界は 10^{-4} M である。フタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）は、先行バリデーション試験中に一部の検査施設において 10^{-3} M で不溶性（濁りなど）を認めたため、非結合物質としての分類および用途は、10^{-4} M までの範囲での試験結果を基とした。

© OECD, (2015)

被験物質の溶解度試験と濃度範囲調査

19. 予備的試験を実施し、各被験物質の溶解限界を確認するとともに、試験実施時に用いる適切な濃度範囲を特定する。各被験物質の溶解度はまず溶媒で決定し、さらに試験条件下で確認する。試験で用いる終末濃度は 1 mM を超えてはならない。範囲設定試験は溶媒対照と最大許容濃度（溶解限界に基づいて 1 mM またはそれ以下）からの 8 つの対数段階希釈に沿う溶媒対照と、混濁や沈殿の有無を確認する。濃度反応曲線をより明らかにするには、必要に応じて 2 回目、3 回目の試験により濃度を調節する。

テストランの許容基準

20. テストランの許容または破棄は、各実験で用いた基準エストロゲンおよび対照について得られた結果の評価に基づいて行う。まずプレート 1 について、各実験で得られた参照対照の完全な濃度曲線は、CERI および FW の各試験プロトコル（補遺 2、補遺 3）に基づいたカーブフィットパラメータ（IC_{50}、ヒル勾配など）を伴う測定成績ならびに試験施設の履歴対照データと一致しなければならない。、すべての対照物質（基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質）はそれぞれの実験について正しく分類する必要がある。プロトコル次に、以後のすべてのプレートの対照物質について、プレート 1 との一致を見極める。競合結合曲線の頂点を明確に示すには、十分な濃度範囲の被験物質を用いる必要がある。被験物質の各濃度でのレプリケートおよび独立した 3 回のランの間でのばらつきは、合理的で科学的に説明可能なものでなければならない。基準エストロゲンおよび対照物質の履歴データベースの作成と維持により、試験法を継続して実行する能力を証明する必要がある。複数の実験から得られた基準エストロゲンおよび対照弱結合物質の曲線フィットパラメータの平均値に関する標準偏差（SD）や変動係数（CV）は、試験施設内の再現性の指標として用いることができる。各ランの基準プレートおよび各被験物質の結果を検討する際には、専門家の判断を適用する。

上記に加え、許容基準に関する以下の原則を満たさなければならない：

- データが ER 結合性を定量的に評価するのに十分であること
- 試験する濃度は被験物質の溶解度の範囲内であること

データの分析

21. 飽和結合および競合結合のデータに関して規定されるデータの分析手順は、受容体とリガンドとの相互作用を検出するための基本原理に従うものである必要がある。飽和結合のデータは通常、全結合および非特異的結合からなる非線形回帰モデルを用いて解析される。Bmax および Kd の確認の際は、リガンド枯渇（Swillens, 1995（19）など）に対する補正が必要となる可能性がある。競合結合試験のデータは通例に従って、値を変換される（特異

© OECD, (2015)

的結合率や被験物質の濃度（logM）変換など）。適切な非線形曲線フィットソフトウェアを用いて 4 つのパラメータをヒルの式にあてはめ、各被験物質の log（IC_{50}）推定値を求める。初回分析に続いて、作成した競合結合曲線に対する結合データの適合の程度を曲線フィットパラメータおよび視覚的に検討する。場合によっては、最良適合曲線を得るために追加の解析が必要となる可能性がある（曲線の頂点や底値の制約、10%ルールの適用など。補遺 4 および参考文献 2（セクション III.A.2）を参照）。

22. 許容基準（段落 20）に適合することは試験系が適切に作動していることを意味するが、どの試験でも正確なデータが得られるということを保証するものではない。初回試験の正しい結果が再現されることが、正確なデータが得られたことの最良の指標となる。

一般的なデータ解釈の基準

23. 現時点では ER 結合データの解釈に関して普遍的に合意された方法はない。しかし、hrER を介した活性の定性的評価（結合物質、非結合物質など）や定量的評価（logIC_{50}、相対結合親和性（RBA）など）はいずれも経験データおよび科学的に妥当な判断に基づくものでなければならない。

試験報告書

24. 試験報告書には以下の情報を含むこと：

試験法：

- 使用した試験法

対照／参照／被験物質

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

単一成分物質：

- 外観、水溶性、およびその他の関連する物理化学的特性
- IUPAC／CAS 名、CAS 登録番号、SMILES／InChI コード、構造式、純度、該当し実際に可能な場合には不純物の化学的同定などの化学物質識別情報

多成分物質、UVBC、混合物：

- 構成成分の化学物質識別情報（上記参照）、定量的組成率および関連する物理化学的特性による可能な範囲での特性

溶剤／溶媒：

© OECD, (2015)

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

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

試験条件：
- 試験条件下での溶解性の限界
- 結合緩衝液の組成
- 受容体の濃度
- トレーサー（放射標識リガンド）の濃度
- 被験物質の濃度
- 最終試験での溶媒の割合
- 培養の温度と時間
- B／F 分離の方法
- 陽性対照、陰性対照、参照物質
- 試験結果を陽性、陰性または不定と判定する基準

許容性の確認：
- 同時陽性対照、参照物質に関する IC_{50} およびヒル勾配の実測値

結果：
- 生データおよび結合・遊離データ
- 必要に応じて、変性の確認チェック
- 存在する場合、最低有効濃度（LEC）
- 必要に応じて、RBA および／または IC_{50} 値
- 可能な場合、濃度反応関係
- もしあれば、統計解析結果。併せて誤差の測定値および信頼度（SEM、SD、CV または 95%CI など）ならびにこれらの値を算出した方法の説明

結果の考察：
- 10%ルールの適用

結論

© OECD, (2015)

文献

1) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2) OECD (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) OECD (2015), Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) OECD (2012), Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Oganisation for Economic Coopeation and Development, Paris.

5) Cavailles V. (2002), Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

6) Welboren W.J., *et al.* (2009), Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

7) Younes M. and Honma N. (2011), Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

8) Diamanti-Kandarakis et al. (2009), Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

9) ICCVAM (2002), Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

10) ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

11) ICCVAM (2006), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

12) Akahori Y. et al. (2008), Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

13) OECD. (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 67.), Organisation for Economic Coopeation and Development, Paris.

© OECD, (2015)

14) Takeyoshi, M. (2006), Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004), Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008), Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004), Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

18) Santodonato, J. (1997), Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

19) Swillens S (1995), Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

© OECD, (2015)

補遺 1

定義と略語

10%ルール：[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合の割合について、反復試験の平均値が低濃度で認められた平均値よりも 10%以上大きい場合、解析のデータポイントから除外する選択肢（補遺 4 を参照）。

許容基準：実験対照および参照基準の性能に関する最低基準。実験を有効とみなすには、すべての許容基準を満たす必要がある。

正確性（一致度）：試験法で得られた結果と許容された参照値の近接する程度。試験法の性能および関連性の一つの側面の尺度である。「正確性」が、試験法で正しい結果が得られた割合を意味する場合には、互換的に「一致度」が用いられる（1）。

CF：内分泌かく乱物質の試験法と評価に関する OECD の概念枠組み

CV：変動係数

E_2：17β-エストラジオール

ED：内分泌かく乱

hERα：ヒトエストロゲンアルファ受容体

ER：エストロゲン受容体

エストロゲン活性：化学物質がエストロゲン受容体結合において 17β-エストラジオールを模す能力。hERαへの結合は本 PBTG で検出することができる。

IC_{50}：阻害被験物質の 50%効果濃度

ICCVAM：代替試験法の検証に関する省庁間調整委員会

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

© OECD, (2015)

（1）。

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

LEC：最低有効濃度。反応を生じさせる被験物質の最低濃度（同時溶媒対照に対して誘導反応倍率が統計的有意に異なる被験物質の最低濃度）のこと。

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

PBTG：性能に基づく試験法ガイドライン

性能基準：検証済み試験法に基づき、提案された機序および機能的に類似する試験法の比較可能性を評価する基礎となる基準。（1）試験法の不可欠な要素、（2）検証済み試験法の性能が許容可能であることを証明するために使用された化学物質から選択された最小限の参照化学物質の一覧、および（3）最小限の参照化学物質の一覧を用いて評価した場合に、提案された試験法が証明しなければならない検証済み試験法で得られたのと同等レベルの正確性および信頼性（1）が含まれる。

技能試験用物質：標準化された試験法に関する技術的能力を実証するために試験施設が使用することのできる性能基準に含まれる参照物質のサブセット。技能試験用物質の選択基準としては通常、反応の範囲を代表するものであること、市販されていることおよび高品質な参照データがあることなどが挙げられる。

技能：未知の物質を試験する前に実証される、試験法を適切に実施する能力

基準エストロゲン：17β-エストラジオール（E_2、CAS 50-28-2）

参照試験法：本 PBTG の基礎とした試験法

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

妥当性（関連性）：試験結果と対象となる影響との関係、および特定の目的について当該試験が有意義かつ有用であるかについての説明。試験が対象となる生物学的作用を正しく測定または予測できる程度のこと。妥当性は、試験法の正確性（一致度）を考慮に入れる（1）。

© OECD, (2015)

信頼性：同一手順を用いた場合に、施設内および施設間で長期にわたり再現性のある試験法を実施できる程度。施設内および施設間の再現性を計算することにより評価する。

SD：標準偏差

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

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

© OECD, (2015)

補遺 2

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

最初に考慮すべき事項および限界（1 ページの**概論**も参照）

1. 本 *in vitro* エストロゲン受容体（ERα）飽和／競合結合試験法では、バキュロウイルスに感染させた昆虫細胞で作製、単離した完全長ヒト ERα（hrERα）を用いる。Freyberger と Wilson により作成されたプロトコルについて国際的な多試験施設バリデーション試験が行われ（2）、試験法の使用目的に対する妥当性と信頼性が証明されている。

2. 本試験法は完全長 hrERαに結合することのできる物質を同定するためのスクリーニング手順であり、hrERαへの結合における被験物質の 17β-エストラジオールに対する競合能を測定するのに用いられる。定量試験の結果としては、IC_{50}（50%の[^{3}H]-17β-エストラジオールを hrERαから解離させるのに必要な被験物質の濃度）、hrERαに関する被験物質の 17β-エストラジオールに対する相対結合親和性などが含まれる。化学物質のスクリーニングのため、許容可能な定性的試験の結果は、結合曲線に関して示された基準に従って被験物質を hrERα結合物質、非結合物質、または不定に分類されている。

3. 本試験法では放射性リガンドを用いるため、試験施設は放射性物質取扱に関する認可を要する。放射性同位元素および有害化学物質を扱う工程についてはすべて、国の法令で定められた規則および手順に従う必要がある。

4. 本試験法を規制の目的で使用する際には、あらかじめ「**概論**」および「**hrER 結合試験法の要素**」（1～14 ページ）を確認すること。本 TG で用いた定義および略語については補遺 1 で説明する。

試験法の原理（1 ページの**概論**も参照）

5. hrERα結合試験では、放射標識リガンド（[^{3}H]-17β-エストラジオール）の ER 結合能を被験物質（競合物質）の濃度を上昇させながら測定する。ER に対する高い親和性を有する被験物質は、受容体に対する親和性がより低い化学物質よりも低濃度で放射標識リガンドと競合する。

6. 本試験法は、受容体とリガンドとの相互作用パラメータを確認するための飽和結合実験と、

© OECD, (2015)

続いて ER への結合に関する放射標識リガンドと被験物質との競合作用を確認する競合結合実験との 2 つの主要素から構成されている。

7. 飽和結合実験の目的は、競合結合実験のために特定ロットの受容体の結合親和性および標品中の数を確認することである。飽和結合実験では平衡状態において、一定濃度のエストロゲン受容体の天然リガンドへの親和性（解離定数 Kd で表される）および活性化した受容体部位の濃度（Bmax）を測定する。

8. 競合結合実験は、ER への結合において[^{3}H]-17β-エストラジオールと競合する物質の親和性を測定する。親和性は平衡状態で[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合を 50%阻害する被験物質の濃度（「50%阻害濃度」または IC_{50} と言う）により定量化する。これは相対結合親和性（RBA、同じランで別々に測定されるエストラジオールの IC_{50} との比較）を用いて評価することもできる。競合結合実験では、一定濃度において、広範な濃度（8 桁の範囲）の被験物質の存在下で[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を測定する。次に、可能な場合には、一部位での競合的結合物質による放射標識リガンドの解離を表すヒルの式（Hill, 1910）にデータをあてはめる。平衡状態での放射標識エストラジオールの解離の程度に基づき、被験物質を結合物質、非結合物質、または不定に分類する。

手順

hrERαタンパク質の許容される性能の証明

9. 飽和／競合結合試験を日常的に実施する前に、hrERαの新たなバッチごとに、使用する試験施設において正しい性能を発揮することを示す必要がある。性能を証明するには次の 2 段階のプロセスが用いられる。これらのプロセスは以下の通り：

- [^{3}H]-17β-エストラジオール飽和結合試験を実施して hrERαの特異性と飽和を証明する。これらのデータの非線形回帰分析（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）とこれに続く Scatchard プロットにより、[^{3}H]-17β-エストラジオールの hrERα結合親和性（Kd）および hrERαの各バッチの受容体数（Bmax）が実証される。

- 対照物質（基準エストロゲン（17β-エストラジオール）、弱結合物質（ノルエチノドレルやノルエチンドロンなど）、非結合物質（オクチルトリエトキシシラン、OTES））を用いて競合結合試験を実施する。各試験施設は履歴データベースを作成し、基準エストロゲンと弱結合物質の実験間および異なる hrERαバッチ間での IC_{50} その他関連する値の一貫性を記録する。対照物質に関する競合結合曲線のパラメータは、本試験法のバリデーション試験参加施設で得られたデータを用いて求めた 95%信頼区間（表 1 を参照）の

© OECD, (2015)

範囲内になければならない（2）。

表 1. 基準エストロゲンおよび弱結合物質に関して定められた性能基準、FW hrER 結合試験

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

[a] *バリデーション試験（参考文献 2 の補遺 N を参照）で 4 試験施設で実施された基準ランに関する曲線フィットパラメータ推定値（4 パラメータヒル式）を用いて平均（n）±標準偏差（SD）を算出した。*

[b] *許容基準の指針として 95%信頼区間を提示する。*

[c] *バリデーション試験中のサブタスク 4 に関してはノルエチンドロンの試験は任意であった（参考文献 2、サブタスク 4 を参照）。したがって、平均±SD（n）は 2 つの試験施設で行われた基準ランの曲線フィットパラメータ推定値（4 パラメータヒル式）を用いて算出した。*

IC_{50} の範囲は、各試験施設内で使用する受容体標品の Kd および放射標識リガンドの濃度に左右される。試験法の実施に用いた条件によって IC_{50} の範囲を適切に調整することは許容される。

試験施設の技能証明

10. 本試験法ガイドラインの「**hrER 結合試験法の要素**」における段落 17、18 および表 2 を参照。各試験（飽和／競合結合）は、異なる日の独立した 3 回のラン（新たな受容体希釈液、化学物質、試薬を用いる）からなり、各ランはレプリケートを 3 つ含む必要がある。

© OECD, (2015)

受容体（hrERα）濃度の決定

11. 活性化した受容体の濃度はロットおよび保存条件によってわずかに異なる。このため、供給者より受領した活性受容体の濃度を決定する必要がある。これにより、実験時に適切な濃度の活性受容体が得られる。

12. 競合結合に相当する条件（1 nM [^{3}H]-エストラジオール）の下、名目上の濃度が 0.25、0.5、0.75、1 nM の受容体を 1 μM の非標識エストラジオール非存在下（全結合量）および存在下（非特異的結合量）で温置する。特異的結合量を全結合量と非特異的結合量の差として算出し、名目上の受容体濃度に対してプロットする。添加した放射標識リガンドの 20%に相当する特異的結合量を示す受容体濃度は対応する名目上の受容体濃度と相関しており、飽和／競合結合実験にはこの受容体濃度を用いる。この条件に合致する hrER の終濃度は 0.5 nM であることが多い。

13. 20%という基準値を繰り返し満たせなければ、実験装置に誤りがないかを確認する。20%の基準を達成できなかった場合、当該組み換え受容体バッチには活性受容体がほんのわずかしか含まれていない可能性があり、別の受容体バッチの使用を検討すべきである。

飽和試験

14. 次の3つの条件で8段階の濃度の[^{3}H]-17β-エストラジオールを3連で評価する（表2を参照）:
    a. 非標識 17β-エストラジオール非存在、ER 存在下。[^{3}H]-17β-エストラジオールのみを含むウェルの放射活性量を測定することにより全結合量を確認する。
    b. 放射標識 17β-エストラジオールの 1000 倍過剰濃度の非標識 17β-エストラジオール、および ER の存在下。本条件は、活性結合部位を非標識 17β-エストラジオールで飽和し、当該ウェルの放射活性量を測定することで、非特異的結合量を確認することを意図している。非標識エストラジオールが結合可能な受容体の全特異的部位に結合するほどの高濃度であるため、受容体に結合することのできる残りの放射標識エストラジオールはいずれも非特異的部位に結合していると考えられる。
    c. 非標識 17β-エストラジオールおよび ER の非存在下（全放射活性量の測定）

[^{3}H]-17β-エストラジオール溶液および非標識 17β-エストラジオール溶液の調製

15. [^{3}H]-17β-エストラジオール希釈液は、最初は 0.12 ～12 nM の濃度になるよう、12 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール原液にアッセイ緩衝液を加えて調製する。96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験のウェルにこれらの溶液 40 μL を加えると（最終容量は 160 μL）、0.03～3.0 nM の最終試験濃度が得られる。アッセイ緩衝液、[^{3}H]-17β-エストラジオール原液および希釈液の調製と濃度の決定については、FW プロトコル（2）に詳述されている。

© OECD, (2015)

16. 17β-エストラジオールのエタノール溶液の希釈液は、最初 0.06 ～6 μM の 8 段階の濃度が得られるようアッセイ緩衝液を加えて調製する。96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験ウェルにこれらの溶液 80 μL を加えると（最終容量は 160 μL）、0.03～3 μM の最終試験濃度が得られる。個々の非特異的結合試験ウェルにおける非標識 17β-エストラジオールの終濃度は[^{3}H]-17β-エストラジオールの濃度の 1000 倍とする。非標識 17β-エストラジオール希釈液の調製については、FW プロトコル（2）に詳述されている。

17. 20±5%の特異的結合を示す名目上の受容体濃度を用いる（段落 12～13 を参照）。hrERα溶液は使用直前に調製する。

18. 表 2 に示すように、各濃度 3 つのレプリケートを含む 96 ウェルマイクロタイタープレートを用意する。[^{3}H]-17β-エストラジオール、非標識 17β-エストラジオール、緩衝液および受容体の濃度と容量のプレート配置例を別添 2 に示す。

表 2：飽和結合試験のマイクロタイタープレートの配置

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***	
A	0.03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.10 nM [^{3}H] E_2 + ER			全結合（溶剤）
B	0.30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1.0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3.0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0.03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.03 μM E_2			0.06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.06 μM E_2			0.08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.08 μM E_2			0.10 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.10 μM E_2			非特異的結合
E	0.30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.30 μM E_2			0.60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.60 μM E_2			1.0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1.0 μM E_2			3.0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3.0 μM E_2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E_2：[^{3}H]-17β-エストラジオール
ER：エストロゲン受容体
E_2：非標識 17β-エストラジオール

19. アッセイマイクロタイタープレートは 2～8°C で 16～20 時間培養し、培養期間中はローテーターに置いておく。

hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールの測定

20. 各ウェルに冷却した DCC 懸濁液 80 μL を加えてマイクロタイタープレートを 10 分間振とうし、その後約 2500 RPM で 10 分間遠心することにより、遊離の[^{3}H]-17β-エストラジオールから hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを分離させる。本工程中に結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールが hrERαから解離するのを最小限にするためには、緩衝液および

© OECD, (2015)

試験ウェルを 2～8°C に保ち、各手順を速やかに実施することが非常に重要である。プレートを効率的かつ速やかに処理するにはマイクロタイタープレート用の振とう機が必要である。

21. 次に、DCC に触れることによるウェルの汚染を避けるため細心の注意を払って、hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを含む上澄み液 50 µL を採り、2 枚目のマイクロタイタープレートに入れる。

22. 核放出の運動エネルギーを光エネルギーに変換することのできるシンチレーション液 200 µL を各ウェル（A1～B12 および D1～E12）に添加する。G1～H12（全 dpms）のウェルは[^{3}H]-17β-エストラジオール（40 µL）の段階希釈液を示し、この段階希釈液は表 3 の通りウェル内のシンチレーション液に直接加える。すなわち、これらのウェルにはシンチレーション液 200 µL および[^{3}H]-17β-エストラジオールの適切な希釈液のみが含まれる。これらのウェルを測定することにより、全結合および非特異的結合の各ウェルセットに dpm 値としてどれだけの量の[^{3}H]-17β-エストラジオールが添加されたかが明らかとなる。

表 3：飽和結合試験のマイクロタイタープレートの配置、放射活性量測定

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***	
A	0.03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.10 nM [^{3}H] E_2 + ER			全結合（溶媒）
B	0.30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1.0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3.0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0.03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.03 µM E_2			0.06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.06 µM E_2			0.08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.08 µM E_2			0.10 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.10 µM E_2			非特異的結合
E	0.30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.30 µM E_2			0.60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0.60 µM E_2			1.0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 1.0 µM E_2			3.0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3.0 µM E_2			
F													
G	0.03 nM [^{3}H] E_2（全 dpms）			0.06 nM [^{3}H] E_2			0.08 nM [^{3}H] E_2			0.10 nM [^{3}H] E_2			全 dpms*
H	0.30 nM [^{3}H] E_2			0.60 nM [^{3}H] E_2			1.0 nM [^{3}H] E_2			3.0 nM [^{3}H] E_2			

[^{3}H] E_2：[^{3}H]-17β-エストラジオール
ER：エストロゲン受容体
E_2：非標識 17β-エストラジオール
dpms：壊変毎分
* ここでの[^{3}H]で標識したエストラジオールの放射性段階希釈液は、G1～H12 のウェル内のシンチレーション液 200 µL に直接添加する。

23. 測定は 2 時間以上置いてから開始し、各ウェルの計数時間は 40 分間とする。クエンチ補正を用いて dpm／ウェルを測定するため、マイクロタイタープレート用シンチレーションカウンターを用いる。マイクロタイタープレート用シンチレーションカウンターが使用できない場合には、代わりに従来のカウンターで試料を測定してもよい。このような状況下では係数時間の短縮が考慮される。

© OECD, (2015)

競合結合試験

24. 競合結合試験では、異なる濃度の被験物質の存在下で単一濃度の[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を測定する。1回のランにおいて各濃度3つのレプリケートを同時に用いる。さらに、各被験物質について時期を変えて3回のランを実施する。試験は1枚以上の96ウェルマイクロタイタープレートに配置する。

対照

25. 試験を実施する際は、各実験に同時溶媒および対照（基準エストロゲン、弱結合物質、非結合物質）を含める。各ラン 1 つのプレートには、基準エストロゲンおよび対照物質（弱結合物質、非結合物質）の完全な濃度曲線を用いる。その他のプレートには（i）高濃度（最大解離濃度）と中濃度（IC_{50}程度）のE_2および弱結合物質を各3連、（ii）溶媒対照および非特異的結合を各3連以上含める。アッセイ緩衝液、対照、[^{3}H]-17β-エストラジオール、hrERαおよび被験物質溶液の調製手順については参考文献2（補遺K、FW試験プロトコルを参照）で説明されている。

－溶媒対照：

26. 溶媒対照は、溶媒が試験系と相互作用しないことを示すとともに、全結合（TB）を測定するものである。望ましい溶媒としてエタノールが挙げられる。高濃度の被験物質がエタノールに溶解できない場合には、代わりにDMSOを用いてもよい。エタノールやDMSOを用いる場合、試験ウェル内の終濃度は1.5%とし、2%を超えてはならない。

－緩衝液対照：

27. 緩衝液対照（BC）には、溶媒および被験物質を除く、試験のすべての成分を含める。緩衝液対照に関する結果を溶媒対照と比較し、使用する溶媒が試験系に影響を及ぼさないことを検証する。

－強い結合物質（基準エストロゲン）

28. 17β-エストラジオール（CAS 50-28-2）は内因性リガンドで、ERのアルファサブタイプに高い親和性で結合する。それぞれのhrERα競合結合試験に関して非標識17β-エストラジオールを用いた検量線を作成し、同一試験施設で時間をかけて試験を行う場合に変動を評価できるようにする。非標識17β-エストラジオールのエタノール溶液を8種類調製する。試験ウェル内の濃度は100 nM～10 pM（-7[logM]～-11[logM]）の範囲とし、-7[logM]、-8[logM]、-8.5[logM]、-9[logM]、-9.5[logM]、-10[logM]、-11[logM]に設定する。最大濃度（1 μM）の

© OECD, (2015)

非標識 17β-エストラジオールは非特異的結合の指標にもなる。この最大濃度も検量線の一部ではあるが、表 4 では「NSB」と表示し区別している。

－弱結合物質

29. 各実験の感度を証明するとともに、時間をかけて試験を行う場合に変動を評価できるよう、弱結合物質（ノルエチノドレル（CAS 68-23-5）またはノルエチンドロン（CAS 68-22-4））を試験に含める。弱結合物質のエタノール溶液を 8 種類調製する。試験ウェル内の濃度は 3 nM～30 μM（-8.5[logM]～-4.5[logM]）の範囲とし、-4.5[logM]、-5[logM]、-5.5[logM]、-6[logM]、-6.5[logM]、-7[logM]、-7.5[logM]、-8.5[logM]に設定する。

－非結合物質

30. オクチルトリエトキシシラン（OTES、CAS 2943-75-1）を陰性対照（非結合物質）として用いる。陰性対照は、試験ランが hrERαに結合しない被験物質を検出することを保証するものである。非結合剤のエタノール溶液を 8 種類調製し、試験ウェル内の濃度は対数増分で 0.1 nM～1000 μM（-10[logM]～-3[logM]）の範囲とする。対照非結合剤として代わりにフタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP）を使用することもできる。DBP の最大溶解度は-4[logM]であることが分かっている。

hrERα濃度

31. 1 nM の放射標識リガンドが 20±5%の特異的結合を示す受容体量を用いる（補遺 2 の段落 12～13 を参照）。hrERα溶液は使用直前に調製する。

[^{3}H]-17β-エストラジオール

32. 試験ウェル内の[^{3}H]-17β-エストラジオールの濃度は 1.0 nM とする。

被験物質

33. 第一に溶解性試験を実施し、各被験物質の溶解限界を確認するとともに、試験プロトコル実施時に用いる適切な濃度範囲を特定する。各被験物質の溶解限界はまず溶媒で決定し、さらに試験条件下で確認する。試験で用いる終濃度は 1 mM を超えてはならない。範囲設定試験は溶媒対照と最大許容濃度（1 mM 以下など、溶解限界に基づく）からの 8 つの対数段階希釈からなり、混濁や沈殿の有無を確認する（段落 35 も参照）。先の範囲設定試験で規定された通りに 8 種類の対数濃度を配置した曲線を用いて、被験物質の試験を行う。濃度反応曲線をより明らかにするには、必要に応じて 2 回目、3 回目の試験における濃度を調節

© OECD, (2015)

する。

34. 適切な溶媒を用いて被験物質の希釈液を調製する（補遺 2 の段落 26 を参照）。被験物質の最大濃度がエタノール、DMSO のいずれにも溶解せず、かつ溶媒をさらに追加することで最終のチューブ内の溶媒濃度が許容限界を超える場合には、最大濃度を一段階低い濃度に下げてもよい。この場合、一連の濃度範囲の下限にもう一つ濃度を加えてもよいが、その他の濃度は変えてはならない。

35. 被験物質溶液を試験ウェルに添加すると被験物質が沈殿する可能性があるため、添加時は注意深く監視する。沈殿物を含むウェルのデータは曲線フィッティングから除外するとともに、データを除外した理由を記述する。

36. 被験物質の log（IC_{50}）が得られる既存の情報が他の資料にある場合、希釈液を幾何級数的（予測される log（IC_{50}）の周辺では 0.5 対数単位）に設定するのが妥当であろう。結合曲線の特性が十分に示されるよう、「頂点」と「底値」を含めた最終的な結果は log（IC_{50}）の両側に十分な濃度の広がりを示すものである必要がある。

試験プレートの構成

37. 溶媒対照、非特異的結合（NSB）の指標にもなる基準エストロゲンの最大濃度および緩衝液対照については 6 連でのコード化した培養、8 濃度の非結合対照（オクチルトリエトキシシラン）、最大濃度の下の 7 濃度の基準エストロゲン、8 濃度の弱結合物質、および 8 濃度の各被験物質（TC）については各々3 連でのコード化した培養を考慮し、標識したマイクロタイタープレートを用意する。基準エストロゲンおよび対照に関する完全な濃度曲線のためのプレート配置図の例を下表 4 に示す。被験物質には追加のマイクロタイタープレートを用い、プレート対照（すなわち 1）高濃度（最大解離濃度）と中濃度（IC_{50} 程度）の E_2 および弱結合物質を 3 連 ; 2）溶媒対照および非特異的結合を各 6 連）を含む必要がある（表 5）。3 種類の未知の被験物質を用いた競合結合試験用マイクロタイタープレートの配置ワークシート例を補遺 2 別添 3 に示す。表 4 および表 5 に示す濃度は、試験の終濃度である。E_2 の最大濃度は 1×10^{-7} M とし、弱結合剤については、プレート 1 で用いた当該物質の最大濃度を用いる。IC_{50} は試験施設の履歴対照データベースに基づき当該試験施設で決定しなければならないが、バリデーション試験で認められた値（表 1 を参照）に類似した値となることが予想される。

© OECD, (2015)

表 4：競合結合試験のマイクロタイタープレートの配置、基準エストロゲンおよび対照の完全な濃度曲線（プレート 1）

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB（溶媒のみ）			TB（溶媒のみ）			NSB			NSB		
B	E_2（1×10^{-7}）			E_2（1×10^{-8}）			E_2（$1\times10^{-8.5}$）			E_2（1×10^{-9}）		
C	E_2（$1\times10^{-9.5}$）			E_2（1×10^{-10}）			E_2（1×10^{-11}）			ブランク*		
D	NE（$1\times10^{-4.5}$）			NE（1×10^{-5}）			NE（$1\times10^{-5.5}$）			NE（1×10^{-6}）		
E	NE（$1\times10^{-6.5}$）			NE（1×10^{-7}）			NE（$1\times10^{-7.5}$）			NE（$1\times10^{-8.5}$）		
F	OTES（1×10^{-3}）			OTES（1×10^{-4}）			OTES（1×10^{-5}）			OTES（1×10^{-6}）		
G	OTES（1×10^{-7}）			OTES（1×10^{-8}）			OTES（1×10^{-9}）			OTES（1×10^{-10}）		
H	ブランク（放射活性量用）**			ブランク（放射活性量用）**			緩衝液対照			緩衝液対照		

本例では、弱結合物質はノルエチノドレル（NE）とした。
*真のブランク。使用していないウェル。
**培養中は使用しないが、添加された全放射活性量の確認のために使用。

表 5：競合結合試験のマイクロタイタープレートの配置、被験物質およびプレート対照の完全な濃度曲線

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB（溶媒のみ）			TB（溶媒のみ）			NSB			NSB		
B	TC1（1×10^{-3}）			TC1（1×10^{-4}）			TC1（1×10^{-5}）			TC1（1×10^{-6}）		
C	TC1（1×10^{-7}）			TC1（1×10^{-8}）			TC1（1×10^{-9}）			TC1（1×10^{-10}）		
D	TC2（1×10^{-3}）			TC2（1×10^{-4}）			TC2（1×10^{-5}）			TC2（1×10^{-6}）		
E	TC2（1×10^{-7}）			TC2（1×10^{-8}）			TC2（1×10^{-9}）			TC2（1×10^{-10}）		
F	TC3（1×10^{-3}）			TC3（1×10^{-4}）			TC3（1×10^{-5}）			TC3（1×10^{-6}）		
G	TC3（1×10^{-7}）			TC3（1×10^{-8}）			TC3（1×10^{-9}）			TC3（1×10^{-10}）		
H	NE（IC_{50}）			NE（$1\times10^{-4.5}$）			E_2（IC_{50}）			E_2（1×10^{-7}）		

本例では、弱結合物質はノルエチノドレル（NE）とした。

© OECD, (2015)

競合結合試験の完了

38. 表 6 に示す通り、溶媒対照、緩衝液対照、基準エストロゲン、弱結合剤、非結合剤およびアッセイ緩衝液で調製した被験物質 80 µL をウェルに添加する。次に、4 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール溶液 40 µL を各ウェルに添加する。2～8°C で 10～15 分ゆっくりと回転させた後、hrERα溶液 40 µL を添加する。アッセイマイクロタイタープレートを 2～8°C で 16～20 時間培養し、培養期間中はローテーターに置いておく。

表 6：hrER 競合結合試験の試験成分の容量、マイクロタイタープレート

容量（µL）	*成分*
80	非標識 17β-エストラジオール、ノルエチノドレル、OTES、被験物質、溶媒または緩衝液
40	4 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール溶液
40	求められた濃度の hrERα溶液
160	***各試験ウェルの合計容量***

39. 次に、飽和結合試験の段落 20～23 に記載の通り、各ウェルに冷却した DCC 懸濁液 80 µL を加えて遊離の[^{3}H]-17β-エストラジオールから hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを分離させた後、hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを定量する。

40. H1～6 のウェル（表 4 で「ブランク（放射活性量用）」と示す）は[^{3}H]で標識したエストラジオール 40 µL の dpms を表す。40 µL のアリコートを H1～6 のウェル内のシンチレーション液に直接添加する。

許容基準

飽和結合試験

41. 特異的結合曲線は[^{3}H]-17β-エストラジオールの濃度上昇に伴いプラトーに達し、hrERαのリガンドによる飽和を示す。

42. 1 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合量は、各ランで添加した全放射活性量の測定値平均の 15～25%の許容範囲内でなければならない。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが絶えず範囲外であったり特定のランで著しく範囲を逸脱したりする場合には、タンパク質濃度を調節して再度飽和試験を実施する。

© OECD, (2015)

43. データからは線形の Scatchard プロットが得られる。

44. 非特異的結合は過剰であってはならない。非特異的結合量は通常、全結合の 35%未満とする。ただし最低濃度の放射標識 17β-エストラジオールの試験において極めて低い dpm を測定する場合には、非特異的結合量の割合が時にこの範囲を超える可能性がある。

競合結合試験

45. 非標識 17β-エストラジオールの濃度上昇に伴い、一部位競合結合の様式に従って[^{3}H]-17β-エストラジオールが受容体から解離する。

46. 基準エストロゲン（17β-エストラジオール）の IC_{50} は、[^{3}H]-17β-エストラジオールのモル濃度に飽和結合試験で得られた Kd を加えた値とほぼ同等となる。

47. 各ウェルに添加した全放射活性量の平均測定濃度が複数のランに渡って 1 nM であった場合、全特異的結合量は一貫して 20±5%の許容範囲内になければならない。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランで絶えず範囲外であったり特定のランで著しく範囲を逸脱したりする場合には、タンパク質濃度を調節する。

48. 溶媒によって試験の感度や再現性が変化してはならない。溶媒対照（TB ウェル）の結果を緩衝液対照と比較して、使用した溶媒が試験系に影響を与えないことを検証する。試験に溶媒の影響がない場合、TB および緩衝液対照の結果は同等となる。

49. 非結合物質を 10^{-3} M（OTES）または 10^{-4} M（DBP）までの濃度範囲で試験した場合、[^{3}H]-17β-エストラジオールの hrERαからの解離は 25%を超えてはならない。

50. 基準エストロゲンおよび 2 種の弱結合物質（ノルエチノドレル、ノルエチンドロン）について、FW の hrER 結合試験（参考文献 2 の別添 N）のバリデーション試験で得たデータを用いて性能基準が作成された。バリデーション試験に参加した試験施設で実行された全基準ランの平均（n）+/- SD について、95%信頼区間が提供されている。95%信頼区間は、基準エストロゲンおよび弱結合物質の曲線フィットパラメータ（頂点、底値、ヒル勾配、$logIC_{50}$）、ならびに弱結合物質の基準エストロゲンに対する log_{10}RBA について算出され、陽性対照の性能基準として提供されている。性能基準として用いることができる曲線フィットパラメータの期待される範囲を表 1 に示す。実際には、IC_{50} の範囲は受容体標品の Kd およびリガンド濃度によってわずかに変化する可能性がある。

51. 現在被験物質となり得る物質は広範囲にわたり、潜在的な親和性や結果（完全曲線、部分

© OECD, (2015)

曲線、曲線不適合など）も様々であることから、被験物質の曲線フィットパラメータに関する性能基準は作成されなかった。一方、各ランから得られた被験物質の結果を検討する際には、専門家の判断を適用すべきである。競合結合曲線の頂点（例、90～100%の結合）を明確に示すには、十分な濃度範囲の被験物質を用いる必要がある。被験物質の各濃度でのレプリケートおよび独立した 3 回のランにおけるばらつきは、合理的かつ科学的に妥当なものでなければならない。被験物質の各ランにおける対照は、本 FW 試験について報告された性能評価基準に達しており、かつ個々の試験施設の履歴対照データと一致している必要がある。

データの分析

飽和結合試験

52. 全結合と非特異的結合の両方を測定する。これらの値を用いて全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより、平衡状態における[^{3}H]-17β-エストラジオール濃度上昇時の特異的結合量が算出される。[^{3}H]-17β-エストラジオール濃度に対する特異的結合量を示したグラフは、[^{3}H]-17β-エストラジオールによる hrERαの飽和を示す最大特異的結合量でプラトーに達する。さらにデータ分析により単一の高親和性結合部位への[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を実証し、非特異的結合、全結合および特異的結合を飽和結合曲線上に示す。これらのデータの詳細な解析には非線形回帰分析（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）を用い、最終的なデータは Scatchard プロットとして示す。

53. 別の手法を用いることが正当化される場合を除き、非特異的結合を線形と仮定したデータ分析により、全結合データのみから Bmax および Kd を求める。また正当化する理由がない限り、最良適合を求める場合にはロバスト回帰を用い、ロバスト回帰に選択した方法は付記する必要がある。飽和結合データから Bmax と Kd を求める際には必ず、リガンド枯渇に対する補正（Swillens 1995 の手法を用いるなど）を常に行う必要がある。

競合結合試験

54. 競合結合曲線は、競合物質の濃度（log10 単位）に対する[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合量としてプロットする。[^{3}H]-17β-エストラジオールの全特異的結合を 50%阻害する被験物質の濃度が IC_{50} 値である。

55. 適切な非線形曲線フィットソフトウェア（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）を用いて 4 つのパラメータをヒルの式にあてはめ、陽性対照（基準エストロゲン、弱結合物質など）の log（IC_{50}）推定値を求める。これらの曲線のあてはめにおいては、頂点、底

© OECD, (2015)

値、勾配および log（IC_{50}）には通常制約をつけない。正当化する理由がない限り、最良適合を求める場合にはロバスト回帰を用いる。リガンドの枯渇に対する補正は用いない。初回分析に続き、各結合曲線がモデルへ適切にフィットするよう検討を行う。弱結合物質の相対結合親和性（RBA）は 17β-エストラジオールの log（IC_{50}）に対する当該物質の log（IC_{50}）の割合（%）として算出される。陽性対照および非結合物質対照から得られた結果は、本補遺 2 の段落 45～50 に示す試験法性能評価基準を用いて評価する。

56. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されていることを保証するため、すべての被験物質のデータを段階的アプローチにより分析する。被験物質の各ランにはまず、基準エストロゲンおよび弱結合物質対照に用いたのと同一の標準化されたデータ分析（上記段落 55 を参照）を行うことが推奨される。この分析が完了すれば、曲線フィットパラメータの技術的検討を行うとともに、各ランについて作成した競合結合曲線に対するデータの適合の程度を視覚的に検討する。技術的検討においては、特異的に結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールの割合の濃度依存的低下、各濃度での技術的繰り返しにおけるばらつきの少なさ、および 3 回のランのあいだにおける曲線フィットパラメータの一貫性が認められると、試験およびデータ分析が適切に行われたことの良い指標となる。

データの解釈

57. すべての許容基準が満たされた場合、結合曲線に適合させることができ、反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 50%未満であれば、被験物質を hrERαに対する結合剤と判定する（図 1）。

58. すべての許容基準が満たされた場合、以下いずれかに該当すれば、被験物質を hrERαに対する非結合物質と判定する：
- 結合曲線に適合させることができ、適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%を超える。または、
- 結合曲線に適合させることができず、データ内の濃度群における結合割合の非平滑化平均の最低値が 75%を超える。

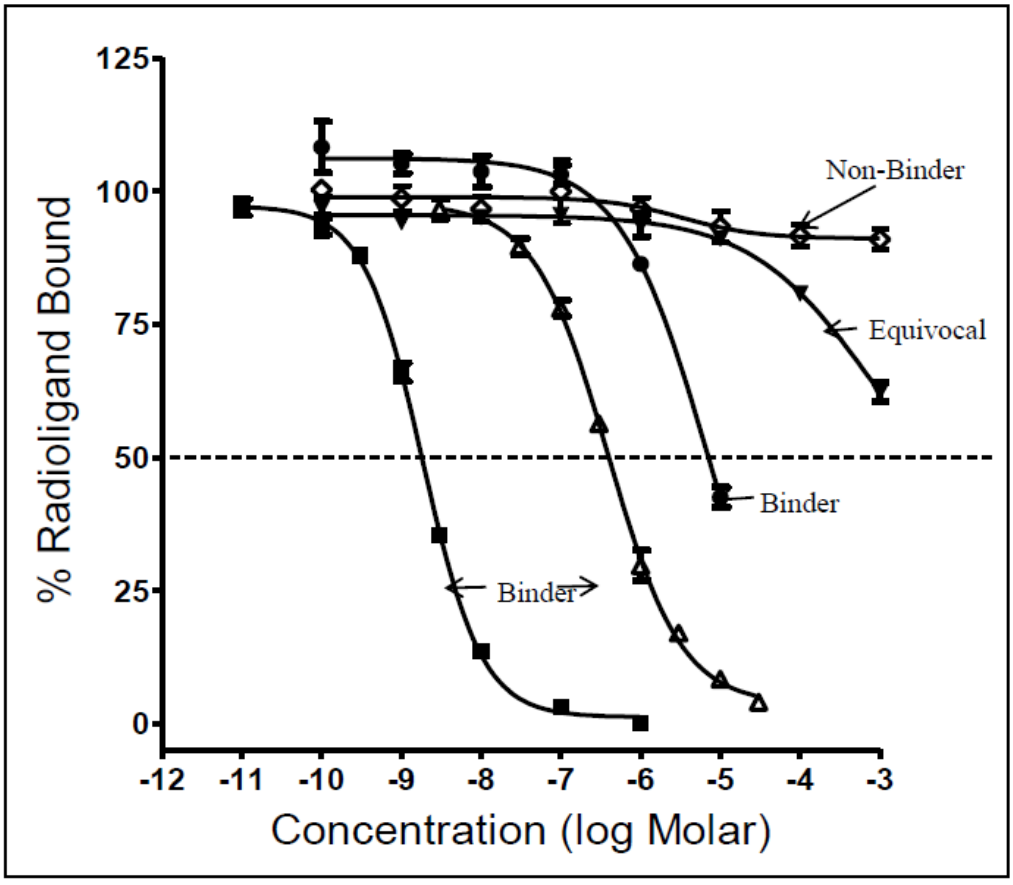
59. 上記の条件のいずれにも合致しない場合（適合させた反応曲線上の最小値が 76～51%のあいだにある場合など）は、被験物質は不定と判定する。

© OECD, (2015)

表 7. 被験物質の競合結合曲線に基づく分類の基準

分類	基準
結合物質 [a]	結合曲線に適合させることができる。 • **反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 50%未満である。**
非結合物質 [b]	結合曲線に適合させることができる場合、 • **適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%を超える。** 結合曲線に適合させることができない場合、 • **データ内の濃度群における結合割合の非平滑化平均の最低値が 75%を超える。**
不定 [c]	結合物質、非結合物質のいずれでもない検証可能なラン （適合させた反応曲線上の最小値が 76～51%のあいだにある場合など）

図 1. 競合結合曲線を用いた被験物質の分類例



60. 表 8 に示す通り、各ランに数値を割り当てて全ランの平均値を出すことにより、ある被験物質に関して試験施設内で実施された複数のランを統合する。試験施設ごとに統合したランの結果は、各被験物質の予想される分類と比較する。

© OECD, (2015)

表 8. 試験施設内の複数のランを用いた被験物質の分類法

各ランへの数値の割り当て：	
分類	**数値**
結合物質	2
不定	1
非結合物質	0
全ランの平均数値の分類：	
分類	**数値**
結合物質	平均値≥ 1.5
不定	0.5 ≤平均値< 1.5
非結合物質	平均値< 0.5

試験報告書

61. 本テストガイドラインの「**hrER 結合試験法の要素**」の段落 24 を参照。

© OECD, (2015)

別添 1：用語一覧

[^{3}H]E_2：トリチウムで放射標識した 17β-エストラジオール

DCC：デキストラン被覆活性炭

E_2：非標識 17β-エストラジオール（不活性）

アッセイ緩衝液：10 mM Tris、10 mg/mL ウシ血清アルブミン、2 mM DTT、10%グリセロール、0.2 mM ロイペプチン、pH 7.5

hrERα：ヒト組み換えエストロゲンアルファ受容体（リガンド結合ドメイン）

レプリケート: 同一成分を同一濃度で含む複数ウェルの 1 つで、1 回のランで同時に試験される。本プロトコルでは、被験物質の各濃度は 3 連で試験する。すなわち、被験物質の各濃度について同時に試験される 3 つのレプリケートが存在する。

ラン：被験物質の hrERαへの結合を特徴づけるのに必要なすべての情報（すなわち、様々な被験物質濃度での試験ウェルに添加された[^{3}H]-17β-エストラジオールの全量、[^{3}H]-17β-エストラジオールの hrERαに対する最大結合、非特異的結合、および全結合）を提供する同時に実行されるマイクロタイタープレート試験ウェルの一式。1 つのランは各濃度 1 つの試験ウェル（レプリケート）で構成される場合もあるが、本プロトコルでは 3 連での試験を求めているため、1 つのランは各濃度 3 つの試験ウェルからなる。さらに本プロトコルでは、化学物質ごとに 3 回の独立した（時期の異なる）ランを必要とする。

© OECD, (2015)

別添 2：

3 連ウェルを用いた典型的な[^{3}H]-17β-エストラジオール飽和試験

3連ウェルを用いた典型的な[^{3}H]-17β-エストラジオール飽和試験											
配置	連数	ウェルの種類記号	放射性E_2初期濃度（nM）	放射性E_2量（μL）	放射性E_2終濃度（nM）	非放射性E_2初期濃度（nM）	非放射性E_2量（μL）	非放射性E_2終濃度（nM）	緩衝液量（μL）	受容体量（μL）	ウェル内の総量
A1	1	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B9	3	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D2	2	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D3	3	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D4	1	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D5	2	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D6	3	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D7	1	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D8	2	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D9	3	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D10	1	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D11	2	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D12	3	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160

© OECD, (2015)

3連ウェルを用いた典型的な[^{3}H]-17β-エストラジオール飽和試験											
配置	連数	ウェルの種類記号	放射性E_2初期濃度（nM）	放射性E_2量（μL）	放射性E_2終濃度（nM）	非放射性E_2初期濃度（nM）	非放射性E_2量（μL）	非放射性E_2終濃度（nM）	緩衝液量（μL）	受容体量（μL）	ウェル内の総量
E1	1	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E2	2	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E3	3	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E4	1	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E5	2	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E6	3	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E7	1	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Hot	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Hot	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Hot	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Hot	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Hot	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Hot	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Hot	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Hot	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40

培養時は「hot」ウェルは空であることに留意。シンチレーションの計数のためにのみ 40 μL を添加する。

© OECD, (2015)

別添 3：競合結合試験のウェルの配置

プレート	配置	連数	ウェルの種類	ウェルの記号	濃度記号	競合物質の初期濃度（M）	hrER原液（µL）	緩衝液量（µL）	トレーサー（放射性E_2）量（µL）	希釈プレートからの量（µL）	最終量（µL）	競合物質の終濃度（M）
S	A1	1	total binding	TB	TB1	-	40	-	40	80	160	-
S	A2	2	total binding	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
S	A3	3	total binding	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
S	A4	1	total binding	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
S	A5	2	total binding	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
S	A6	3	total binding	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
S	A7	1	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	cold E2 (high)	NSB	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	cold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	cold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	cold E2	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	cold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	cold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	cold E2	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	cold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	cold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	cold E2	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	cold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	cold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	cold E2	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	cold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	cold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	cold E2	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	cold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	cold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	cold E2	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	cold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	cold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	cold E2	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blank	blank	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	blank	blank	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	blank	blank	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	norethynodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	norethynodrel	NE	WP2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	norethynodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	norethynodrel	NE	WP4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06

© OECD, (2015)

競合結合試験のウェルの配置

プレート	配置	連数	ウェルの種類	ウェルの記号	濃度記号	競合物質の初期濃度（M）	hrER原液（μL）	緩衝液量（μL）	トレーサー（放射性E_2）量（μL）	希釈プレートからの量（μL）	最終量（μL）	競合物質の終濃度（M）
S	E1	1	norethynodrel	NE	WP5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	norethynodrel	NE	WP5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	norethynodrel	NE	WP5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	D7	1	norethynodrel	NE	WP7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	norethynodrel	NE	WP7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	norethynodrel	NE	WP7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	norethynodrel	NE	WP8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	norethynodrel	NE	WP8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	norethynodrel	NE	WP8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	H1	1	hot	H	H1	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	2	hot	H	H2	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	3	hot	H	H3	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	hot	H	H4	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	2	hot	H	H5	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	3	hot	H	H6	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	buffer control	BC	BC1	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	2	buffer control	BC	BC2	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	3	buffer control	BC	BC3	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	buffer control	BC	BC4	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	2	buffer control	BC	BC5	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	3	buffer control	..BC	BC6	-	40	80	40	-	160	-

培養時は「hot」ウェルは空であることに留意。シンチレーションの計数のためにのみ40 μLを添加する。

© OECD, (2015)

競合結合試験のウェルの配置

プレート	配置	連数	ウェルの種類	ウェルの記号	濃度記号	競合物質の初期濃度（M）	hrER原液（µL）	緩衝液量（µL）	トレーサー（放射性E_2）量（µL）	希釈プレートからの量（µL）	最終量（µL）	競合物質の終濃度（M）
P1	A1	1	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	total binding	TB	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	cold E2 (high)	NSB	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Test Chemical 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Test Chemical 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Test Chemical 1	TC1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Test Chemical 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Test Chemical 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Test Chemical 1	TC1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Test Chemical 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Test Chemical 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Test Chemical 1	TC1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Test Chemical 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Test Chemical 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Test Chemical 1	TC1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	C1	1	Test Chemical 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Test Chemical 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Test Chemical 1	TC1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Test Chemical 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Test Chemical 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Test Chemical 1	TC1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Test Chemical 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Test Chemical 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Test Chemical 1	TC1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Test Chemical 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Test Chemical 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Test Chemical 1	TC1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Test Chemical 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Test Chemical 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Test Chemical 2	TC2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Test Chemical 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Test Chemical 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Test Chemical 2	TC2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Test Chemical 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Test Chemical 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Test Chemical 2	TC2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Test Chemical 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Test Chemical 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Test Chemical 2	TC2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	E1	1	Test Chemical 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Test Chemical 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Test Chemical 2	TC2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07

© OECD, (2015)

競合結合試験のウェルの配置

プレート	配置	連数	ウェルの種類	ウェルの記号	濃度記号	競合物質の初期濃度（M）	hrER原液（μL）	緩衝液量（μL）	トレーサー（放射性E_2）量（μL）	希釈プレートからの量（μL）	最終量（μL）	競合物質の終濃度（M）
P1	E41		Test Chemical 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E52		Test Chemical 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E63		Test Chemical 2	TC2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E71		Test Chemical 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E82		Test Chemical 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E93		Test Chemical 2	TC2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Test Chemical 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Test Chemical 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Test Chemical 2	TC2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F11		Test Chemical 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F22		Test Chemical 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F33		Test Chemical 3	TC3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F41		Test Chemical 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F52		Test Chemical 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F63		Test Chemical 3	TC3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F71		Test Chemical 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F82		Test Chemical 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F93		Test Chemical 3	TC3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Test Chemical 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Test Chemical 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Test Chemical 3	TC3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	G1	1	Test Chemical 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Test Chemical 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Test Chemical 3	TC3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Test Chemical 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Test Chemical 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Test Chemical 3	TC3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Test Chemical 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Test Chemical 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Test Chemical 3	TC3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Test Chemical 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Test Chemical 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Test Chemical 3	TC3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	norethynodrel	NE	IC50		40	0	40	80	160	
P1	H2	2	norethynodrel	NE	IC50		40	0	40	80	160	
P1	H3	3	norethynodrel	NE	IC50		40	0	40	80	160	
P1	H4	1	norethynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H5	2	norethynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H6	3	norethynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H7	1	cold E2 S IC50		40	0	40	80	160			
P1	H8	2	cold E2 S IC50		40	0	40	80	160			
P1	H9	3	cold E2 S IC50		40	0	40	80	160			
P1	H10	1	cold E2 S 1.00E-7.		40	0	40	80	160			
P1	H11	2	cold E2 S 1.00E-7		40	0	40	80	160			
P1	H12	3	cold E2 S 1.00E-7		40	0	40	80	160			

© OECD, (2015)

補遺 3

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

最初に考慮すべき事項および限界（1 ページの**概論**も参照）

1. 本 *in vitro* エストロゲン受容体（ERα）飽和／競合結合試験法では、ヒト ERα（hrERα）のリガンド結合ドメイン（LBD）を用いる。このタンパク構築物は日本の化学物質評価研究機構（CERI）によって作製されたもので、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質として存在し、*E. coli* で発現させる。CERI プロトコルについて複数の試験施設で国際的なバリデーション試験が行われ（2）、試験法の使用目的に対する関連性と信頼性が証明されている。

2. 本試験法は hrERαに結合する可能性のある物質を同定するためのスクリーニング手順であり、hrERα-LBD への結合における被験物質の 17β-エストラジオールに対する競合能を測定するのに用いられる。定量試験の結果には、IC_{50}（50%の[^{3}H]-17β-エストラジオールを hrERαから解離させるのに必要な被験物質の濃度）および hrERαに関する被験物質の 17β-エストラジオールに対する相対結合親和性などが含まれる。化学物質のスクリーニングのため、許容可能な定性的試験の結果では、結合曲線に関して示された基準に従って被験物質を hrERα結合物質、非結合物質、または equivocal に分類する場合がある。

3. 本試験法では放射性リガンドを用いるため、試験施設は放射性物質に関する認可を要する。放射性同位元素および有害化学物質を扱う工程についてはすべて、国の法令で定められた規則および手順に従う必要がある。

4. 本試験法を規制の目的で使用する際には、あらかじめ「**概論**」および「**hrER 結合試験法の要素**」（1～14 ページ）を確認すること。本 TG で用いた定義および略語については補遺 1 で説明する。

試験法の原理（1 ページの**概論**も参照）

5. hrERα結合試験では、被験物質（競合物質）存在下での放射標識リガンド（[^{3}H]-17β-エストラジオール）の ER 結合能を被験物質の濃度を上昇させながら測定する。ER に対する高い親和性を有する被験物質は、受容体に対する親和性がより低い化学物質よりも低濃度で放射標識リガンドと競合する。

6. 本試験法は、受容体とリガンドとの相互作用パラメータを確認するための飽和結合実験と、

© OECD, (2015)

続いて ER への結合に関する放射標識リガンドと被験物質との競合作用を確認する競合結合実験との 2 つの要素から主に構成されている。

7. 飽和結合実験の目的は、競合結合実験のために特定ロットの受容体の結合親和性および標品中の数を明らかにすることである。飽和結合実験では平衡状態において、一定濃度のエストロゲン受容体の天然リガンドへの親和性（解離定数 Kd で表される）および活性化した受容体部位の濃度（Bmax）を測定する。

8. 競合結合実験は、ER への結合において[^{3}H]-17β-エストラジオールと競合する物質の親和性を測定する。親和性は、平衡状態で[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合を 50%阻害する被験物質の濃度（「50%阻害濃度」または IC_{50} と言う）により定量化する。これは相対結合親和性（RBA、同じランで別々に測定されるエストラジオールの IC_{50} との比較）を用いて評価することもできる。競合結合実験では、一定濃度において、広範な濃度（8 桁の範囲）の被験物質の存在下で[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を測定する。次に、可能な場合には、一部位での競合的結合物質による放射標識リガンドの解離を表すヒルの式（Hill, 1910）にデータをあてはめる。平衡状態での放射標識エストラジオールの解離の程度に基づき、被験物質を結合物質、非結合物質、または不定に分類する。

手順

hrERαタンパク質の許容される性能の証明

9. 飽和／競合結合試験を日常的に実施する前には、hrERαについて、使用する試験施設において正しい性能を発揮することを新たなバッチごとに示す必要がある。性能を証明するには次の 2 段階のプロセスが用いられる。これらのプロセスは以下の通り：

- [^{3}H]-17β-エストラジオール飽和結合試験を実施して hrERαの特異性と飽和を証明する。これらのデータの非線形回帰分析（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）とこれに続く Scatchard プロットにより、[^{3}H]-17β-エストラジオールの hrERα結合親和性（Kd）および hrERαの各バッチの受容体数（Bmax）が実証される。

- 対照物質（基準エストロゲン（17β-エストラジオール）、弱結合物質（ノルエチノドレルやノルエチンドロンなど）、非結合物質（オクチルトリエトキシシラン、OTES））を用いて競合結合試験を実施する。各試験施設は履歴データベースを作成し、基準エストロゲンと弱結合物質の実験間および異なる hrERαバッチ間での IC_{50} その他関連する値の一貫性を記録する。さらに、対照物質に関する競合結合曲線のパラメータは、本試験法のバリデーション試験参加施設で得られたデータを用いて求めた 95%信頼区間（表 1 を

© OECD, (2015)

参照）の範囲内になければならない（2）。

表 1. 基準エストロゲンおよび弱結合物質に関して定められた性能基準、CERI hrER 結合試験

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

[a] *バリデーション試験（参考文献 2 の補遺 N を参照）で 4 つの試験施設で実施された基準ランに関する曲線フィットパラメータ推定値（ヒルの式のパラメータ 4 つ）を用いて、平均±標準偏差（SD）およびサンプルサイズ（n）を算出した。*

[b] *許容基準の指針として 95%信頼区間を提供する。*

[c] *バリデーション試験中のサブタスク 4 に関してはノルエチンドロンの試験は任意であった（参考文献 2、サブタスク 4 を参照）。したがって、平均値±SD（n）は 2 つの試験施設で行われた基準ランの曲線フィットパラメータ推定値（ヒルの式のパラメータ 4 つ）を用いて算出した。*

IC_{50} の範囲は、各試験施設内で使用する受容体標品の Kd および放射標識リガンドの濃度に左右される。試験法の実施に用いた条件によって IC_{50} の範囲を適切に調整することは許容される。

試験施設の技能証明

10. 本試験ガイドラインの「**hrER 結合試験法の要素**」における段落 17、18 および表 2 を参照。各試験（飽和／競合結合）は、異なる日の独立した 3 回のラン（新たな受容体希釈液、化学物質、試薬を用いる）からなり、各ランにはレプリケートを 3 つ含む必要がある。

© OECD, (2015)

受容体（hrERα）濃度の決定

11. 活性化した受容体の濃度はロットおよび保存条件によってわずかに異なる。このため、供給者より受領した活性受容体の濃度を決定する必要がある。これにより、実験時に適切な濃度の活性受容体が得られる。

12. 競合結合に相当する条件（0.5 nM [^{3}H]-エストラジオール）の下、名目上の濃度が 0.1、0.2、0.4、0.6 nM の受容体を 1 μM の非標識エストラジオール非存在下（全結合量）および存在下（非特異的結合量）で培養する。特異的結合量を全結合量と非特異的結合量の差として算出し、名目上の受容体濃度に対してプロットする。添加した放射標識リガンドの 40%に相当する特異的結合量を示す受容体濃度は対応する名目上の受容体濃度と相関しており、飽和／競合結合実験にはこの受容体濃度を用いる。この条件に合致する hrER の終濃度は 0.2 nM であることが多い。

13. 40%という基準値を繰り返し満たせなければ、実験装置に誤りがないか確認する。40%の基準を達成できなかった場合、当該組み換えロットには活性受容体がほんのわずかしか含まれていない可能性があり、別の受容体ロットの使用を検討すべきである。

飽和試験

14. 次の 3 つの条件で 8 段階の濃度の[^{3}H]-17β-エストラジオールを 3 連で評価する（表 2 参照）:
    a. 非標識 17β-エストラジオール非存在、ER 存在下。[^{3}H]-17β-エストラジオールのみを含むウェルの放射活性量を測定することにより全結合量を確認する。
    b. 放射標識 17β-エストラジオールの 2000 倍過剰濃度の非標識 17β-エストラジオール、および ER の存在下。本条件は、活性結合部位を非標識 17β-エストラジオールで飽和し、当該ウェルの放射活性量を測定することで、非特異的結合量を確認することを意図している。非標識エストラジオールが結合可能な受容体の全特異的部位に結合するほどの高濃度であるため、受容体に結合することのできる残りの放射標識エストラジオールはいずれも非特異的部位に結合していると考えられる。
    c. 非標識 17β-エストラジオールおよび ER の非存在下（全放射活性量の測定）

[^{3}H]-17β-エストラジオール溶液、非標識 17β-エストラジオール溶液および hrERαの調製

1 μM の[^{3}H]-17β-エストラジオール原液に室温で DMSO（200 nM に調製）とアッセイ緩衝液（40 nM に調製）を加えて 40 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール DMSO 溶液を調製する。この 40 nM 溶液を用いて室温でアッセイ緩衝液を加え、0.313 ～40 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール希釈液（表 2 のレーン 12 に示す）を調製する。

© OECD, (2015)

15. 96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験ウェルにこれらの溶液 10 µL を加えると、0.0313～4.0 nM の最終試験濃度が得られる（表 2 および表 3 を参照）。アッセイ緩衝液の調製、特異的活性に基づく[^{3}H]-17β-エストラジオール原液の計算、希釈液の調製、および濃度の決定については、CERI プロトコル（2）で詳述されている。

16. 非標識 17β-エストラジオール溶液の希釈液は、最初 0.625 ～80 µM の 8 段階の濃度が得られるよう、1 nM の 17β-エストラジオール原液にアッセイ緩衝液を加えて調製する。非特異的結合を測定するための 96 ウェルマイクロタイタープレートの各試験ウェルにこれらの溶液 10 µL を加えると、0.0625～8 µM の最終試験濃度が得られる（表 2 および表 3 を参照）。非標識 17β-エストラジオール希釈液の調製については、CERI プロトコル（2）で詳述されている。

17. 40±10%の特異的結合を示す受容体濃度を用いる（段落 12～13 を参照）。hrERα溶液は氷冷したアッセイ緩衝液を用いて使用直前、すなわち全結合、非特異的結合および放射性リガンド単独のすべてのウェルの準備が完了してから、調製する。

18. 表 2 に示すように、[^{3}H]-17β-エストラジオールの各濃度 3 つのレプリケートを含む 96 ウェルマイクロタイタープレートを用意する。[^{3}H]-17β-エストラジオール、非標識 17β-エストラジオール、緩衝液および受容体の量の割り当てを表 3 に示す。

表 2：飽和結合試験のマイクロタイタープレートの配置

	*1**	*2**	*3**	*4**	*5**	*6**	*7**	*8**	*9**	*10*	*11***	*12***
	TB 測定用			**NSB 測定用**			**放射性リガンド単独の測定用**				**カラム 4～6 用の非標識 E_2 希釈液**	**カラム 1～9 用の [^{3}H]E_2 希釈液**
A	0.0313 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.0313 nM [^{3}H] E_2 + 0.0625 µM E_2 + ER			0.0313 nM				0.625 µM	0.313 nM
B	0.0625 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.0625 nM [^{3}H] E_2 + 0.125 µM E_2 + ER			0.0625 nM				1.25 µM	0.625 nM
C	0.125 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.125 nM [^{3}H] E_2 + 0.25 µM E_2 + ER			0.125 nM				2.5 µM	1.25 nM
D	0.250 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.250 nM [^{3}H] E_2 + 0.5 µM E_2 + ER			0.250 nM				5 µM	2.5 nM
E	0.50 nM [^{3}H] E_2 + ER			0.50 nM [^{3}H] E_2 + 1 µM E_2 + ER			0.50 nM				10 µM	5 nM
F	1.00 nM [^{3}H] E_2 + ER			1.00 nM [^{3}H] E_2 + 2 µM E_2 + ER			1.00 nM				20 µM	10 nM
G	2.00 nM [^{3}H] E_2 + ER			2.00 nM [^{3}H] E_2 + 4 µM E_2 + ER			2.00 nM				40 µM	20 nM
H	4.00 nM [^{3}H] E_2 + ER			4.00 nM [^{3}H] E_2 + 8 µM E_2 + ER			4.00 nM				80 µM	40 nM

TB：全結合
NSB：非特異的結合
[^{3}H] E_2：[^{3}H]-17β-エストラジオール
E_2：非標識 17β-エストラジオール
**各ウェルでの終濃度を示す。*
***非標識 E_2 および[^{3}H] E_2 の希釈液は別のプレートに調製してもよい。*

© OECD, (2015)

表 3. 飽和結合試験のマイクロタイタープレートの試薬量

レーン番号		*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7**	*8**	*9**
調製段階		*TB ウェル*			*NSB ウェル*			*放射性リガンド単独*		
上記反応ウェルの成分量添加順	緩衝液	60 µL			50 µL			90 µL		
	表 2 レーン 11 の非標識 E_2	-			10 µL			-		
	表 2 レーン 12 の $[^3H]E_2$	10 µL			10 µL			10 µL		
	hrERα	30 µL			30 µL			-		
全反応量		100 µL			100 µL			100 µL		
培養		**2 時間培養後**						調製後すぐに放射活性量を定量。培養はしない。		
0.4%DCC での処理		**あり**			**あり**			**なし**		
0.4%DCC の量		100 µL			100 µL			-		
濾過		あり			あり			なし		
DPMS の測定										
シンチレーションカクテルに添加される量		100 µL**			100 µL**			50 µL		

* *dpms の測定にマイクロプレート用液体シンチレーションカウンター（LSC）を使用する場合、放射性リガンド単独を TB および NSB のウェルと同一の試験プレートに調製するのは適切でない。放射性リガンド単独は別のプレートに調製する。*

** *DCC の分離に遠心分離機を用いる場合、DCC の混入を避けるため、上澄み液 50 µL を測定する。*

19. 全結合、非特異的結合測定用のアッセイマイクロタイタープレートは室温（22～28°C）で 2 時間培養する。

hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールの測定

20. 2 時間培養した後、ウェルに冷却した 0.4%DCC 懸濁液 100 µL を加えて遊離の[^{3}H]-17β-エストラジオールから hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを分離させる。次にプレートを 10 分間氷上に置き、マイクロタイタープレート用フィルターへの移動により反応混合物と DCC 懸濁液を濾過して DCC を除去する。濾液 100 µL を LSC 用バイアル内のシンチレーション液に添加し、液体シンチレーション計数によりバイアルごとの壊変毎分（dpms）を測定する。

21. マイクロプレート用フィルターがない場合には、代わりに遠心分離で DCC を除去してもよい。次に、DCC に触れることによるウェルの汚染を避けるため細心の注意を払って、hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを含む上澄み液 50 µL を採り、シンチレーション計数に用いる。

22. 試験ウェルに添加した[^{3}H]-17β-エストラジオールの dpm の測定には放射性リガンド単独条

© OECD, (2015)

件を用い、放射活性量は調製後すぐに定量する。これらのウェルは培養および DCC 懸濁液による処理を行わず、その成分はシンチレーション液に直接加える。この測定により、全結合および非特異的結合の各ウェルセットに dpm 値としてどれだけの量の[^{3}H]-17β-エストラジオールが添加されたかが明らかとなる。

競合結合試験

23. 競合結合試験では、異なる濃度の被験物質の存在下で単一濃度の[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を測定する。1 回のランにおいて各濃度 3 つのレプリケートを同時に用いる。さらに、各被験物質について時期を変えて 3 回のランを実施する。試験は 1 枚以上の 96 ウェルマイクロタイタープレートに配置する。

対照

24. 試験を実施する際は、各実験に同時溶媒および対照（基準エストロゲン、弱結合剤、非結合剤）を含める。各ラン 1 つのプレートには、基準エストロゲンおよび対照物質（弱結合剤、非結合剤）の完全な濃度曲線を用いる。その他のプレートには（i）高濃度（最大解離、すなわち放射標識リガンドがほぼ完全に解離する濃度）と中濃度（IC_{50} 程度）の E_2 および弱結合剤を各 3 連、（ii）溶媒対照および非特異的結合を各 3 連含める。アッセイ緩衝液、[^{3}H]-17β-エストラジオール、hrERαおよび被験物質溶液の調製手順については CERI プロトコル（2）で詳述されている。

－溶媒対照：

25. 溶媒対照は、溶媒が試験系と相互作用しないことを示すとともに、全結合（TB）を測定するものである。望ましい溶媒として DMSO が挙げられる。高濃度の被験物質が DMSO に溶解できない場合には、代わりにエタノールを用いてもよい。試験ウェルでの DMSO の終濃度は 2.05%とし、被験物質の溶解度が低い場合には 2.5%まで上げてもよい。ただし溶媒濃度が高くなると試験と干渉するため、2.5%を超える濃度の DMSO は用いてはならない。DMSO に溶解しないがエタノールには溶解する被験物質の場合、最大 2%のエタノールであれば干渉なく試験に使用することができる。

－緩衝液対照：

26. 緩衝液対照（BC）には、溶媒および被験物質を除く、試験のすべての成分を含める。緩衝液対照に関する結果を溶媒対照と比較し、使用する溶媒が試験系に影響を及ぼさないことを検証する。

© OECD, (2015)

－強い結合物質（基準エストロゲン）

27. 17β-エストラジオール（CAS 50-28-2）は内因性リガンドで、ER のアルファサブタイプに高い親和性で結合する。それぞれの hrERα競合結合試験に関して非標識 17β-エストラジオールを用いた検量線を作成し、同一試験施設で時間をおいて試験を行う場合に変動を評価できるようにする。DMSO およびアッセイ緩衝液で非標識 17β-エストラジオール溶液 8 種類を調製し、検量線に用いる試験ウェル内の終濃度を 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、$10^{-8.5}$、10^{-9}、$10^{-9.5}$、10^{-10}、10^{-11} M に設定する。最大濃度（1 μM）の非標識 17β-エストラジオールは非特異的結合の指標となる。この最大濃度も検量線の一部ではあるが、表 4 では「NSB、非特異的結合」と表示し区別している。

－弱結合剤

28. 各実験の感度を証明するとともに、時間をおいて試験を行う場合に変動を評価できるよう、弱結合剤（ノルエチノドレル（CAS 68-23-5）またはノルエチンドロン（CAS 68-22-4））を試験に含める。DMSO およびアッセイ緩衝液で弱結合剤の溶液 8 種類を調製し、試験ウェル内の終濃度を $10^{-4.5}$、$10^{-5.5}$、10^{-6}、$10^{-6.5}$、10^{-7}、$10^{-7.5}$、10^{-8}、10^{-9} M とする。

－非結合剤

29. オクチルトリエトキシシラン（OTES、CAS 2943-75-1）を陰性対照（非結合剤）として用いる。陰性対照は、試験ランが hrERαに結合しない被験物質を検出することを保証するものである。DMSO およびアッセイ緩衝液で非結合剤の溶液 8 種類を調製し、試験ウェル内の終濃度は 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10} M とする。非結合剤として代わりにフタル酸ジ-*n*-ブチル（DBP、CAS 84-72-2）を使用してもよいが、試験できるのは最大 10^{-4} M までである。試験での DBP の最大溶解度は 10^{-4} M であることが分かっている。

hrERα濃度

30. 40±10%の特異的結合を示す受容体量を用いる（補遺 3 の段落 12～13 を参照）。hrERα溶液は、機能的 hrERαを氷冷した緩衝液で希釈することにより使用直前に調製する。

[^{3}H]-17β-エストラジオール

31. 試験ウェル内の[^{3}H]-17β-エストラジオールの終濃度は 0.5 nM とする。

© OECD, (2015)

被験物質

32. 第一に溶解性試験を実施し、各被験物質の溶解限界を確認するとともに、試験プロトコル実施時に用いる適切な濃度範囲を特定する。各被験物質の溶解限界はまず溶媒で決定し、さらに試験条件下で確認する。試験で用いる終濃度は 1 mM を超えてはならない。範囲設定試験には溶媒対照に加えて最大許容濃度（1 mM またはそれ以下、溶解限界に基づく）からの 8 つの対数段階希釈を含み、混濁や沈殿の有無を確認する（補遺 3 の段落 35 も参照）。試験する濃度範囲が決まれば、先の範囲設定試験で規定された通り適切に設定された 8 種類の対数濃度を用いて、被験物質の試験を行う。濃度反応曲線をより明らかにするには、必要に応じて 2 回目、3 回目の試験における濃度を調節する。

33. 適切な溶媒を用いて被験物質の希釈液を調製する（補遺 3 の段落 25 を参照）。被験物質の最大濃度が DMSO、エタノールのいずれにも溶解せず、かつ溶媒をさらに追加することで最終のチューブ内の溶媒濃度が許容限界を超える場合には、最大濃度を一段階低い濃度に下げてもよい。この場合、一連の濃度範囲の下限にもう一つ濃度を加えてもよいが、その他の濃度は変えてはならない。

34. 被験物質溶液を試験ウェルに添加すると被験物質が沈殿する可能性があるため、添加時は注意深く監視する。沈殿物を含むウェルのデータは曲線フィッティングから除外するとともに、データを除外した理由を記述する。

35. 被験物質の log（IC_{50}）が得られる情報が他の資料に既に存在している場合、予測される log（IC_{50}）のより周辺付近に幾何級数的（0.5 対数単位）に希釈液を設定するのが妥当であろう。結合曲線の特性が十分に示されるよう、「頂点」と「底値」を含めた最終的な結果は log（IC_{50}）の両側に十分な濃度の広がりを示すものである必要がある。

試験プレートの構成

36. 溶媒対照、非特異的結合（NSB）の指標にもなる基準エストロゲン（E_2）の最大濃度および緩衝液対照、8 濃度の非結合対照（オクチルトリエトキシシラン）、最大濃度より低い 7 濃度の基準エストロゲン（E_2）、8 濃度の弱結合物質（ノルエチノドレルまたはノルエチンドロン）、および 8 濃度の各被験物質（TC）について 6 連での培養を用いて、標識したマイクロタイタープレートを用意する。基準エストロゲンおよび対照に関する完全な濃度曲線のプレート配置図の例を以下表 4 に示す。被験物質には追加のマイクロタイタープレートを用い、プレート対照（（i）高濃度（最大解離濃度）と中濃度（IC_{50} 程度）の E_2 および弱結合物質を 3 連；（ii）溶媒対照（全結合として）および非特異的結合を各 6 連）を含む必要がある（表 5）。3 種類の未知の被験物質を用いた競合結合試験用マイクロタイタープレートの配置ワークシート例を補遺 3 別添 3 に示す。ワークシートおよび表 4、表 5 に記載し

© OECD, (2015)

た濃度は、各試験ウェルで用いる終濃度を示す。E_2 の最大濃度は 1×10^{-7} M とし、弱結合剤については、プレート 1 で用いた当該物質の最大濃度を用いる。IC_{50} は試験施設の履歴対照データベースに基づき当該試験施設で決定しなければならないが、バリデーション試験で認められた値（表 1 参照）に類似した値となることが予想される。

表 4：競合結合試験のマイクロタイタープレートの配置 [1, 2]、基準エストロゲンおよび対照の完全な濃度曲線（プレート 1）

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	緩衝液対照および陽性対照（E_2）			弱陽性（ノルエチノドレル）			陰性対照（OTES）			TB および NSB		
A	ブランク*			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB（溶媒対照）（2.05%DMSO		
B	E_2（1×10^{-11} M）			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E_2（1×10^{-10} M）			$1\times10^{-7.5}$ M			1×10^{-8} M			NSB（10^{-6} M E_2）		
D	E_2（$1\times10^{-9.5}$ M）			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E_2（1×10^{-9} M）			$1\times10^{-6.5}$ M			1×10^{-6} M			緩衝液対照		
F	E_2（$1\times10^{-8.5}$ M）			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E_2（1×10^{-8} M）			$1\times10^{-5.5}$ M			1×10^{-4} M			ブランク（放射活性量用）**		
H	E_2（1×10^{-7} M）			$1\times10^{-4.5}$ M			1×10^{-3} M					

[1] 各実験で実行される基準マイクロタイタープレートのサンプル設定。

[2] 本マイクロタイタープレートは、これまでのセクションで基準について述べた希釈プレートで調製した希釈液を用いて作成することに留意する。
本例では、弱結合剤はノルエチノドレル（NE）とした。

* *真のブランク。使用していないウェル。*

** *培養中は使用しないが、添加された全放射活性量の確認のために使用。*

表 5：競合結合試験のマイクロタイタープレートの配置、被験物質（TC）およびプレート対照用の追加プレート

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	被験物質-1（TC-1）			**被験物質-2（TC-2）**			**被験物質-3（TC-3）**			**対照**		
A	TC-1（1×10^{-10} M）			TC-2（1×10^{-10} M）			TC-3（1×10^{-10} M）			E_2（1×10^{-7} M）		
B	TC-1（1×10^{-9} M）			TC-2（1×10^{-9} M）			TC-3（1×10^{-9} M）			E_2（IC_{50}）		
C	TC-1（1×10^{-8} M）			TC-2（1×10^{-8} M）			TC-3（1×10^{-8} M）			NE（$1\times10^{-4.5}$ M）		
D	TC-1（1×10^{-7} M）			TC-2（1×10^{-7} M）			TC-3（1×10^{-7} M）			NE（IC_{50}）		
E	TC-1（1×10^{-6} M）			TC-2（1×10^{-6} M）			TC-3（1×10^{-6} M）			NSB（10^{-6} M E_2）		
F	TC-1（1×10^{-5} M）			TC-2（1×10^{-5} M）			TC-3（1×10^{-5} M）					
G	TC-1（1×10^{-4} M）			TC-2（1×10^{-4} M）			TC-3（1×10^{-4} M）			TB（溶媒対照）		
H	TC-1（1×10^{-3} M）			TC-2（1×10^{-3} M）			TC-3（1×10^{-3} M）					

本例では、弱結合物質はノルエチノドレル（NE）とした。

競合結合試験の完了

© OECD, (2015)

37. 表 6 に示す通り、全結合およびブランク（放射活性量用）以外の各ウェルにアッセイ緩衝液 50 µL を加え、溶媒対照、基準エストロゲン（E_2）、弱結合剤、非結合剤および被験物質それぞれ 10 µL、5 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオール溶液 10 µL と混合する。次に氷冷した受容体溶液 30 µL を各プレートに添加して静かに混合する。最後に添加する試薬は hrERα溶液でなければならない。アッセイマイクロタイタープレートを室温（22～28°C）で 2 時間培養する。

表 6：hrER 競合結合試験の試験成分の量、マイクロタイタープレート

レーン番号調製段階		TB ウェル以外	TB ウェル	ブランク（放射活性量用）
上記反応ウェルの成分容量および添加順	室温のアッセイ緩衝液	50 µL	60 µL	90 µL
	非標識 E_2、弱結合物質、非結合物質、溶媒、被験物質*	10 µL	-	-
	終濃度が 0.5 nM となる[^{3}H]-17β-エストラジオール（5 nM）	10 µL	10 µL	10 µL
	求められた濃度の rERα（段落 12～13 を参照）	30 µL	30 µL	-
各試験ウェルの全容量		100 µL	100 µL	100 µL

* 終濃度が許容可能な溶媒濃度になるよう適切に調製したもの。

38. 次に、補遺 3 の段落 21～23 で飽和結合試験について記載の通り、各ウェルに氷冷した DCC 懸濁液 100 µL を加えて遊離の[^{3}H]-17β-エストラジオールから hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを分離させた後、hrERαに結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールを定量する。

39. G10～12 および H10～12 のウェル（表 4 で「ブランク（放射活性量用）」と示す）は[^{3}H]で標識したエストラジオール 10 µL の dpms を表す。10 µL のアリコートをシンチレーション液に直接添加する。

許容基準

飽和結合試験

40. 特異的結合曲線は[^{3}H]-17β-エストラジオールの濃度上昇に伴いプラトーに達し、hrERαのリガンドによる飽和を示す。

41. 0.5 nM の[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合量は、各ランで添加した全放射活性量の測定値平均の 30～50%の許容範囲内でなければならない。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランが絶えずこの範囲外であったり特定のランで著しく範囲

© OECD, (2015)

を逸脱したりする場合には、タンパク質濃度を調節して再度飽和試験を実施する。

42. データからは線形の Scatchard プロットが得られる。

43 非特異的結合は過剰であってはならない。非特異的結合量は通常、全結合の 35%未満とする。ただし最低濃度の放射標識 17β-エストラジオールの試験において極めて低い dpm を測定する場合には、非特異的結合量の割合が時にこの範囲を超える可能性がある。

競合結合試験

44. 非標識 17β-エストラジオールの濃度上昇に伴い、一部位競合結合の様式に従って[^{3}H]-17β-エストラジオールが受容体から解離する。

45. 基準エストロゲン（17β-エストラジオール）の IC_{50} は、[^{3}H]-17β-エストラジオールのモル濃度に飽和結合試験で得られた Kd を加えた値とほぼ同等となる。

46. 各ウェルに添加した全放射活性量の平均測定濃度が複数のランに渡って 0.5 nM であった場合、全特異的結合量は一貫して 40±10%の許容範囲内になければならない。この範囲からのわずかな偶発的逸脱は許容されるが、複数のランで絶えずこの範囲外であったり特定のランで著しく範囲を逸脱したりする場合には、タンパク質濃度を調節する。

47. 溶媒によって試験の感度や再現性が変化してはならない。溶媒対照（TB ウェル）の結果を緩衝液対照と比較して、使用した溶媒が試験系に影響を与えないことを検証する。試験に溶媒の影響がない場合、TB および緩衝液対照の結果は同等となる。

48. 非結合物質を 10^{-3} M（OTES）または 10^{-4} M（DBP）までの濃度範囲で試験した場合、[^{3}H]-17β-エストラジオールの hrERαからの解離は 25%を超えてはならない。

49. 基準エストロゲンおよび 2 種の弱結合物質（ノルエチノドレル、ノルエチンドロン）について、CERI の hrER 結合試験（参考文献 2 の別添 N）のバリデーション試験で得たデータを用いて性能基準が作成された。バリデーション試験に参加した試験施設 4 施設で実行された全基準ランの平均±SD（n）について、95%信頼区間が提供されている。95%信頼区間は、基準エストロゲンおよび弱結合物質の曲線フィットパラメータ（頂点、底値、ヒル勾配、$logIC_{50}$）、ならびに弱結合物質の基準エストロゲンに対する log_{10}RBA について算出された。性能基準として用いることのできる曲線フィットパラメータの期待される範囲を表 1 に示す。実際には、IC_{50} の範囲は実験的に導出した受容体標品の Kd および試験法で使用したリガンド濃度によってわずかに変化する可能性がある。

© OECD, (2015)

50. 現在被験物質となり得る物質は広範囲にわたり、潜在的な親和性や結果（完全曲線、部分曲線、曲線不適合など）も様々であることから、被験物質の曲線フィットパラメータに関する性能基準は作成されなかった。一方、各ランから得られた被験物質の結果を検討する際には、専門家の判断を適用すべきである。競合結合曲線の頂点（例、90～100%の結合）を明確に示すには、十分な濃度範囲の被験物質を用いる必要がある。被験物質の各濃度でのレプリケートおよび独立した 3 回のランにおけるばらつきは、合理的かつ科学的に妥当なものでなければならない。被験物質の各ランにおける対照は、本 CERI 試験について報告された性能評価基準に達しており、かつ個々の試験施設の履歴対照データと一致している必要がある。

データの分析

飽和結合試験

51. 全結合と非特異的結合の両方を測定する。これらの値を用いて全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより、平衡状態における[^{3}H]-17β-エストラジオール濃度上昇時の特異的結合量が算出される。[^{3}H]-17β-エストラジオール濃度に対する特異的結合量を示したグラフは、[^{3}H]-17β-エストラジオールによる hrERαの飽和を示す最大特異的結合量でプラトーに達する。さらにデータ分析により単一の高親和性結合部位への[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を実証し、非特異的結合、全結合および特異的結合を飽和結合曲線上に示す。これらのデータの詳細な解析には非線形回帰分析（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）を用い、最終的なデータは Scatchard プロットとして示す。

52. 別の手法を用いることが正当化される場合を除き、非特異的結合を線形と仮定したデータ分析により、全結合データのみから Bmax および Kd を求める。また正当化する理由がない限り、最良適合を求める場合にはロバスト回帰を用い、ロバスト回帰に選択した方法は付記する必要がある。飽和結合データから Bmax と Kd を求める際には必ず、リガンド枯渇に対する補正（Swillens 1995 の手法を用いるなど）を行う。

競合結合試験

53. 競合結合曲線は、競合物質の濃度（log10 単位）に対する[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合量としてプロットする。[^{3}H]-17β-エストラジオールの全特異的結合を 50%阻害する被験物質の濃度が IC_{50} 値である。

54. 適切な非線形曲線フィットソフトウェア（BioSoft；McPherson, 1985；Motulsky, 1995 など）を用いて 4 つのパラメータをヒルの式にあてはめ、陽性対照（基準エストロゲン、弱結合

© OECD, (2015)

物質など）の log（IC_{50}）推定値を求める。これらの曲線のあてはめにおいては、top、bottom、勾配および log（IC_{50}）には通常制約をつけない。正当化する理由がない限り、最良適合を求める場合にはロバスト回帰を用いる。リガンドの枯渇に対する補正は用いない。初回分析に続き、各結合曲線がモデルへ適切にフィットするよう検討を行う。弱結合物質の相対結合親和性（RBA）は 17β-エストラジオールの log（IC_{50}）に対する当該物質の log（IC_{50}）の割合（%）として算出される。陽性対照および非結合物質対照から得られた結果は、本補遺 3 の段落 44～49 に示す試験法性能評価基準を用いて評価する。

55. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されていることを保証するため、すべての被験物質のデータを段階的アプローチにより分析する。被験物質の各ランにはまず、基準エストロゲンおよび弱結合剤対照に用いたのと同一の標準化されたデータ分析（本補遺 3 の段落 54 を参照）を行うことが推奨される。この分析が完了すれば、曲線フィットパラメータの技術的検討を行うとともに、各ランについて作成した競合結合曲線に対するデータの適合の程度を視覚的に検討する。技術的検討においては、特異的に結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールの割合の濃度依存的低下、各濃度での技術的繰り返しにおけるばらつきの少なさ、および 3 回のランのあいだにおける曲線フィットパラメータの一貫性が認められると、試験およびデータ分析が適切に行われたことの良い指標となる。

データの解釈

56. すべての許容基準が満たされた場合、結合曲線に適合させることができ、反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 50%未満であれば、被験物質を hrERαに対する結合物質と判定する（図 1）。

57. すべての許容基準が満たされた場合、以下いずれかに該当すれば、被験物質を hrERαに対する非結合物質と判定する：
- 結合曲線に適合させることができ、適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%を超える。または、
- 結合曲線に適合させることができず、データ内の濃度群における結合割合の非平滑化平均の最低値が 75%を超える。

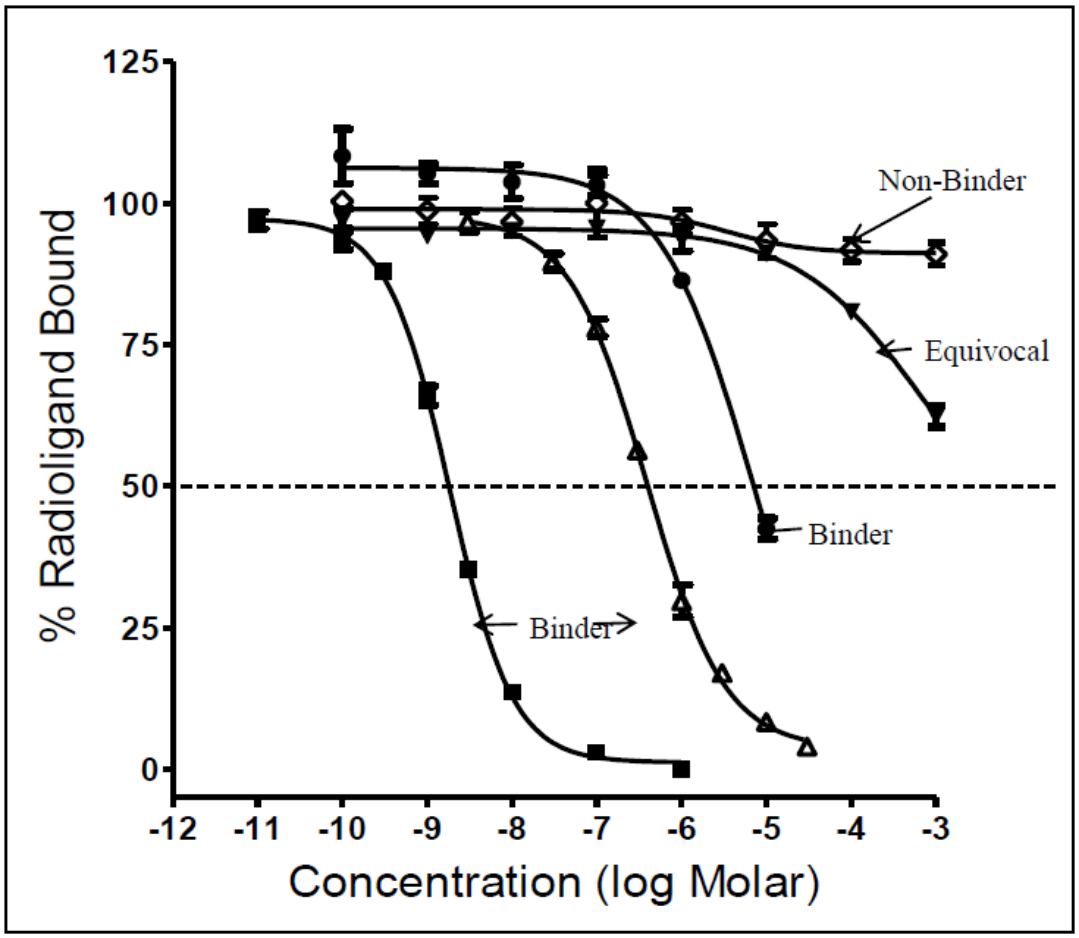
58. 上記の条件のいずれにも合致しない場合（適合させた反応曲線上の最小値が 76～51%のあいだにある場合など）は、被験物質は equivocal と判定する。

© OECD, (2015)

表 7.　被験物質の競合結合曲線に基づく分類の基準

分類	基準
結合物質 [a]	結合曲線に適合させることができる。 • **反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 50%未満である。**
非結合物質 [b]	結合曲線に適合させることができる場合、 • **適合させた反応曲線上のデータ範囲内の最小値が 75%を超える。** 結合曲線に適合させることができない場合、 • **データ内の濃度群における結合割合の非平滑化平均の最低値が 75%を超える。**
不定 [c]	結合物質、非結合物質のいずれでもない検証可能なラン （適合させた反応曲線上の最小値が 76～51%のあいだにある場合など）

図 1.　競合結合曲線を用いた被験物質の分類例



© OECD, (2015)

59. 表 8 に示す通り、各ランに数値を割り当てて全ランの平均値を出すことにより、ある被験物質に関して試験施設内で実施された複数のランを統合する。試験施設ごとに統合したランの結果は、各被験物質の予想される分類と比較する。

表 8. 試験施設内の複数のランを用いた被験物質の分類法

各ランへの数値の割り当て：	
分類	**数値**
結合物質	2
不定	1
非結合物質	0
全ランの平均数値の分類：	
分類	**数値**
結合物質	平均値≥ 1.5
不定	0.5 ≤平均値< 1.5
非結合物質	平均値< 0.5

試験報告書

60. 本テストガイドラインの「**hrER 結合試験法の要素**」の段落 24 を参照。

© OECD, (2015)

別添 **1**：**用語一覧**

[^{3}H]E_2：トリチウムで放射標識した 17β-エストラジオール

DCC：デキストラン被覆活性炭

E_2：非標識 17β-エストラジオール（不活性）

アッセイ緩衝液：1 mM EDTA、1mM EGTA、1 mM $NaVO_3$、10%グリセロール、0.2 mM ロイペプチン、1 mM ジチオスレイトール、10 mg/mL ウシ血清アルブミンを含む 10 mM Tris-HCl、pH 7.4

hrERα：ヒト組み換えエストロゲンアルファ受容体（リガンド結合ドメイン）

レプリケート: 同一成分を同一濃度で含む複数ウェルの 1 つで、1 回のランで同時に試験される。本プロトコルでは、被験物質の各濃度は 3 連で試験する。すなわち、被験物質の各濃度について同時に試験される 3 つのレプリケートが存在する。

ラン：被験物質の hrERαへの結合を特徴づけるのに必要なすべての情報（すなわち、様々な被験物質濃度での試験ウェルに添加された[3H]-17β-エストラジオールの全量、[3H]-17β-エストラジオールの hrERαに対する最大結合、非特異的結合、および全結合）を提供する同時に実行されるマイクロタイタープレート試験ウェルの一式。1 つのランは各濃度 1 つの試験ウェル（レプリケート）で構成される場合もあるが、本プロトコルでは 3 連での試験を求めているため、1 つのランは各濃度 3 つの試験ウェルからなる。さらに本プロトコルでは、化学物質ごとに 3 回の独立した（時期の異なる）ランを必要とする。

© OECD, (2015)

別添２
完全結合試験ウェルレイアウト

Appendix 2
Competitive Binding Assay Well Layout

Plate	Position	Replicate	Well type	Well Code	Concentration Code	Competitor Initial Concentration (M)	hrER stock (uL)	Buffer Volume (uL)	Tracer (Hot E2) Volume (uL)	Volume from dilution plate(uL)	Final Volume (ul)	Competitor Final Concentration (M)
S	A1	1	Blank	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blank	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blank	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	cold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	cold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	cold E2	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	cold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	cold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	cold E2	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	cold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	cold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	cold E2	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	cold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	cold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	cold E2	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	cold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	cold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	cold E2	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	cold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	cold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	cold E2	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	cold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	cold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	cold E2	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	norethynodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	norethynodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	norethynodrel	NE	WP3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	norethynodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	norethynodrel	NE	WP5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	norethynodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	norethynodrel	NE	WP7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

© OECD, (2015)

Competitive Binding Assay Well Layout

	Plate	Position	Replicate	Well type	Well Code	Concentration Code	Competitor Initial Concentration (M)	hrER stock (uL)	Buffer Volume (uL)	Tracer (Hot E2) Volume	Volume from Dilution plate(uL)		Final Volume (ul)	Competitor Final Concentration (M)
$	H4		1	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05	
$	H5		2	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05	
$	H6		3	norethynodrel	NE	WP8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05	
$	A7		1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10	
$	A8		2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10	
$	A9		3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10	
$	B7		1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09	
$	B8		2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09	
$	B9		3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09	
$	C7		1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08	
$	C8		2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08	
$	C9		3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08	
$	D7		1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07	
$	D8		2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07	
$	D9		3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07	
$	E7		1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	E8		2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	E9		3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	F7		1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05	
$	F8		2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05	
$	F9		3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05	
$	G7		1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04	
$	G8		2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04	
$	G9		3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04	
$	H7		1	OTES	N	OTES8DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03	
$	H8		2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03	
$	H9		3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03	
$	A10		1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-	
$	A11		2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-	
$	A12		3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-	
$	B10		4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-	
$	B11		5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-	
$	B12		6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-	
$	C10		1	cold E2 (high)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	C11		2	cold E2 (high)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	C12		3	cold E2 (high)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	D10		4	cold E2 (high)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	D11		5	cold E2 (high)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	D12		6	cold E2 (high)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06	
$	E10	1		Buffer control	BC	BC1	-	-	100	-	-	100	-	
$	E11	2		Buffer control	BC	BC2	-	-	100	-	-	100	-	
$	E12	3		Buffer control	BC	BC3	-	-	100	-	-	100	-	
$	F10	4		Buffer control	BC	BC4	-	-	100	-	-	100	-	
$	F11	5		Buffer control	BC	BC5	-	-	100	-	-	100	-	
$	F12	6		Buffer control	BC	BC6	-	-	100	-	-	100	-	
$	G10*	1		Blank (for hot)	Hot	H1	-	90	-	10	-	100	-	

© OECD, (2015)

S	G11*	2	Blank (for hot)	Hot	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blank (for hot)	Hot	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blank (for hot)	Hot	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blank (for hot)	Hot	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blank (for hot)	Hot	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Note that the "hot" wells are empty during incubation. The 10 µl are added only for scintillation counting.

Competitive Binding Assay Well Layout

Plate	Position	Replicate	Well type	Well Code	Concentration Code	Competitor Initial Concentration (M)	hrER stock (uL)	Buffer Volume (uL)	Tracer (Hot E2) Volume (uL)	Volume from dilution plate(uL)	Final Volume (ul)	Competitor Final Concentration (M)
P1	A1	1	Unknown 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Unknown 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Unknown 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Unknown 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Unknown 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Unknown 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Unknown 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Unknown 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Unknown 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Unknown 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Unknown 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Unknown 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Unknown 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Unknown 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Unknown 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Unknown 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Unknown 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Unknown 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Unknown 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Unknown 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Unknown 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Unknown 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Unknown 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	Unknown 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Unknown 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Unknown 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Unknown 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Unknown 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Unknown 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Unknown 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Unknown 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Unknown 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Unknown 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Unknown 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Unknown 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Unknown 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Unknown 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Unknown 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Unknown 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

© OECD, (2015)

P1	F4	1	Unknown 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Unknown 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Unknown 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Unknown 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Unknown 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Unknown 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Unknown 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Unknown 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Unknown 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Unknown 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Unknown 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Unknown 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Unknown 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Unknown 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Unknown 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Unknown 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Unknown 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Unknown 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Unknown 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Unknown 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Unknown 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Unknown 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Unknown 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Unknown 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Unknown 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Unknown 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Unknown 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Unknown 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Unknown 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Unknown 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Unknown 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Unknown 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Unknown 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Control E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Control E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Control E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Control E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B11	2	Control E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	Control E2 (IC_{50})	S	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	Control NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Control NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Control NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Control NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	Control NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	Control NE (IC_{50})	S	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	cold E2 (high)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	cold E2 (high)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	cold E2 (high)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	cold E2 (high)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

© OECD, (2015)

P1	F11	5	cold E2 (high)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	cold E2 (high)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	total binding	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	total binding	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	total binding	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	total binding	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	total binding	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	total binding	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

© OECD, (2015)

補遺 4

hrER 競合結合試験のデータ分析で考慮すべき事項

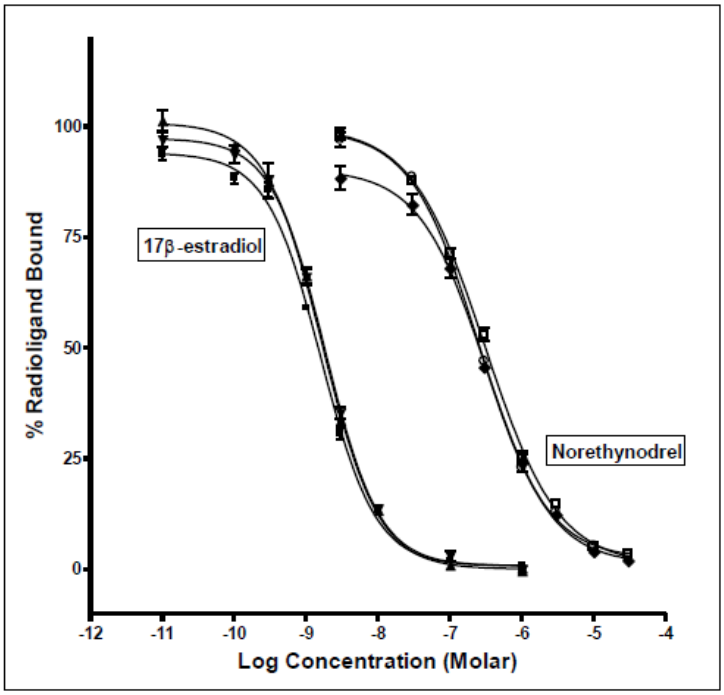
1. hrERα競合結合試験では、異なる濃度の被験物質の存在下で単一濃度の[^{3}H]-17β-エストラジオールの結合を測定する。競合結合曲線は、競合物質の濃度（log10 単位）に対する[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合量としてプロットする。[^{3}H]-17β-エストラジオールの全特異的結合を 50%阻害する被験物質の濃度が IC_{50} 値である。

基準エストロゲンおよび弱結合剤のデータ分析（1）

2. 基準ランのデータは、詳細な分析のため[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合の割合（%）および対照物質の log 濃度に変換される。4 つのパラメータをヒルの式にあてはめる適切な非線形曲線フィットソフトウェア（BioSoft; GraphPad Prism など）を用いて、陽性対照（基準エストロゲン、弱結合剤など）の log（IC_{50}）推定値を求める（2）。これらの曲線のあてはめにおいては、top、bottom、勾配および log（IC_{50}）には通常制約をつけなくてよい。正当化する理由がない限り、最良適合を求める場合にはロバスト回帰を用い、ロバスト回帰に選択した方法は付記する必要がある。FW や CERI の hrER 試験法ではリガンド枯渇に対する補正は必要なかったが、必要に応じて検討してもよい。初回分析に続き、各結合曲線がモデルへ適切にフィットするよう検討を行う。弱結合剤の相対結合親和性（RBA）は 17β-エストラジオールの log（IC_{50}）に対する当該物質の log（IC_{50}）の割合（%）として算出される。陽性対照および非結合剤対照から得られた結果は、PBTG（段落 20）、補遺 2（FW 試験、段落 41～51）、補遺 3（CERI 試験、段落 41～51）に記載する試験法性能評価基準および許容基準を用いて評価する。基準エストロゲンおよび弱結合剤の 3 ランの例を図 1 に示す。

© OECD, (2015)

図 1. 基準エストロゲンおよび対照弱結合剤の競合結合曲線の例



被験物質のデータ分析

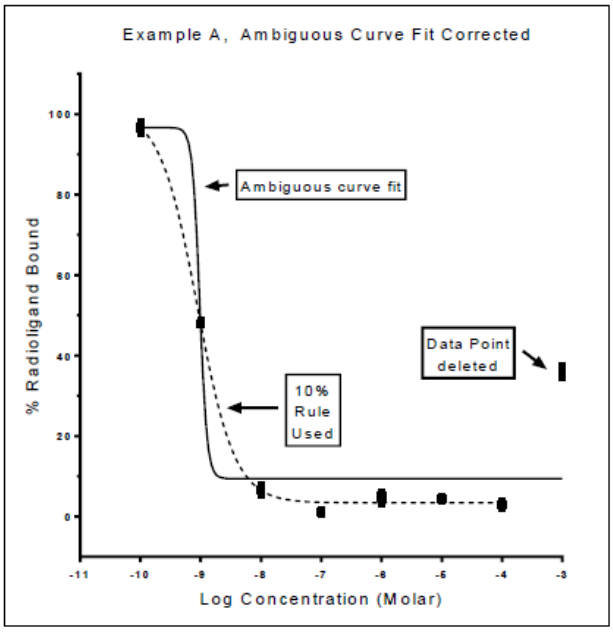
3. データが適切に分析され、かつ各競合結合曲線が正しく分類されていることを保証するため、すべての被験物質のデータを段階的アプローチにより分析する。被験物質の各ランにはまず、基準エストロゲンおよび弱結合剤対照に用いたのと同一の標準化されたデータ分析を行う。この分析が完了すれば、曲線フィットパラメータの技術的検討を行うとともに、各ランについて作成した競合結合曲線に対するデータの適合の程度を視覚的に検討する。技術的検討においては、特異的に結合した[^{3}H]-17β-エストラジオールの割合の濃度依存的低下、各濃度での技術的繰り返しにおけるばらつきの少なさ、および 3 回のランのあいだにおける曲線フィットパラメータの一貫性が認められると、試験およびデータ分析が適切に行われたことの良い指標となる。被験物質の各ランから得られた結果を検討する際には専門家の判断を適用し、被験物質の結合剤または非結合剤への分類に用いたデータは科学的に妥当なものでなければならない。

4. 場合によっては、hrER 結合データを適切に分析、解釈するには一層の注意が必要なデータ例もある。先の研究で、化学物質を最大濃度で試験した場合に特異的結合の割合が上昇することで競合的受容体結合データの分析と解釈が難しくなるケースが示されている（図 2）。これは多くの競合的受容体結合試験プロトコルを用いる際に遭遇するよく知られた問題である（3）。これらのケースでは、低濃度では濃度依存的反応が認められるが、被験物質濃度が溶解限界に近づくにつれ[^{3}H]-17β-エストラジオールの解離による低下が認められなくなる。このような場合、高濃度のデータより、試験の生物学的限界に達したことが分かる。

© OECD, (2015)

例えばこの現象には化学物質の高濃度での不溶性や沈殿が関連していることが多く、被験物質最大濃度での分離手順においてデキストラン被覆活性炭の遊離放射標識リガンド補足能を超えたことを反映したものである場合もある。競合結合データをシグモイド曲線に適合させる際にこのようなデータポイントを含めたままにすると、被験物質の ER 結合性を誤って判定してしまう可能性もある（図 2）。誤判定を避けるため、FW および CERI の hrER 結合試験プロトコルには[^{3}H]-17β-エストラジオールの特異的結合の割合について、反復試験の平均値が低濃度で認められた平均値よりも 10%以上大きい場合、解析のデータポイントから除外する選択肢（一般に 10%ルールと言う）が含まれている。本ルールは 1 つの曲線につき 1 度のみ適用可能であり、曲線を正しく分類できるよう 6 種類以上の濃度に関するデータが残っていなければならない。

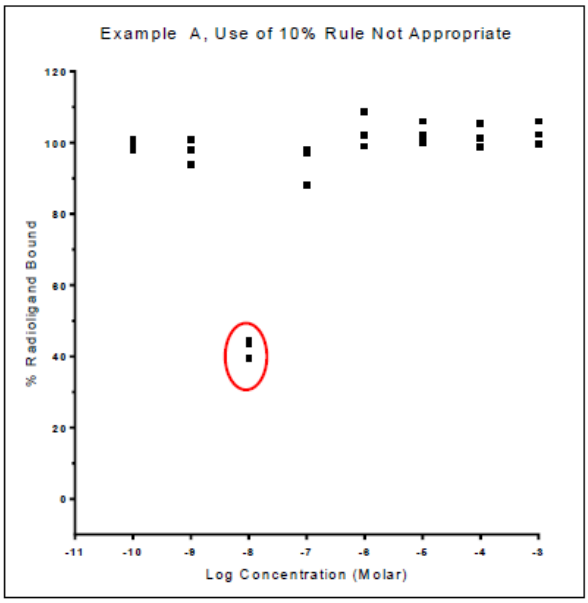
図 2.　10%ルール適用・不適用時の競合結合曲線の例

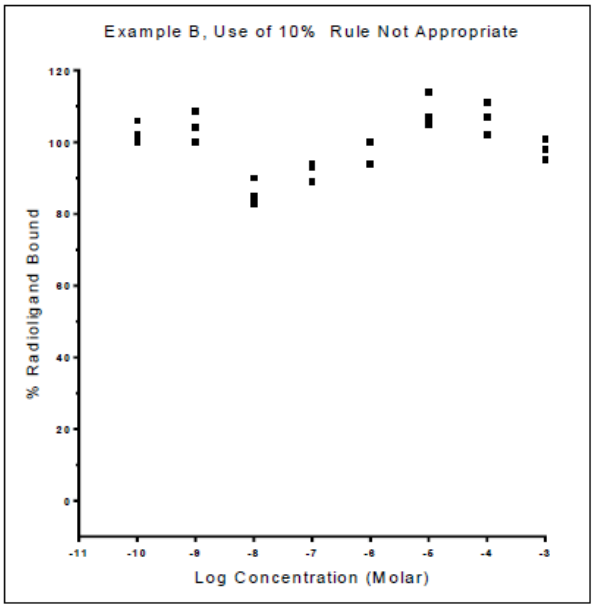


5.　曲線を補正するための 10%ルールの適用については慎重に検討し、hrER 結合剤である可能性が濃厚である場合のために保留しておく。FW の hrER 結合試験のバリデーション試験のため実験を行う時には、10%ルールにより意図せず思いがけない結果が得られることがある。受容体と相互作用しない化学物質（真の非結合剤）は、試験濃度範囲に渡って、100%の放射標識リガンド結合周辺で 10%を超えるばらつきを示すことが多い。最低値が低濃度で認められた場合、10%ルールを用いると、これより高い濃度で得られたデータはたとえ当該化学物質が非結合剤であることを示すのに有用なデータであったとしてもすべて削除されてしまいかねない。10%ルールの適用が不適切な例を図 3 に示す。

© OECD, (2015)

図 3. 10%ルールの適用が適切でない競合結合曲線の例





© OECD, (2015)

References

1. OECD (2015), *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

2. Motulsky H. and Christopoulos A. (2003), *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

3. Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006), *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

© OECD, (2015)