

2.1. Animals and housing conditions

CrI:CD(SD) rats (8 weeks old) were purchased from Atsugi Breeding Center, Charles River Laboratories Japan, Inc. (Yokohama, Japan). This strain was chosen because it is most commonly used in toxicity studies, including reproductive and developmental toxicity studies, and historical control data are available. The animals were acclimatized to the laboratory for 13 days and subjected to treatment at 10 weeks of age. They were carefully observed during the acclimation period, and male and female rats found to be in good health were selected for use. In addition, vaginal smears of each female were recorded, and only females showing a 4- to 5-day estrous cycle were used in the experiment. Two days before the initial treatment, the rats were distributed into 4 groups of 12 males and 12 females each by stratified random sampling based on body weight.

Throughout the study, animals were maintained in an air-conditioned room set at $22 \pm 3^\circ\text{C}$, with relative humidity set at $50 \pm 20\%$, a 12-h light/dark cycle, and ventilation with more than 10 air changes/h. A basal diet (CRF-1; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) and tap water were provided *ad libitum*. The rats were housed individually, except for mating and nursing periods. From day 17 of pregnancy to the day of sacrifice, individual dams and/or litters were reared using wood chips as bedding (White Flake; Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan).

2.2. Chemicals and doses

3-Cyanopyridine was obtained from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and kept in a cool, dark place. The 3-cyanopyridine (Lot no. GL01) used in this study was 99.9% pure, and stability during the study was verified by gas chromatography. The test article was dissolved in purified water (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Naruto, Japan), and administered to the animals by gastric intubation. Control rats received the vehicle alone. Dosing solutions were prepared at least once per 8 days and stored at room temperature until dosing, as stability under these conditions has been confirmed for up to 8 days. The concentrations of 3-cyanopyridine in the formulations were confirmed to be 98.1–101.4% of the target by HPLC analysis.

Prior to the present reproductive and developmental toxicity screening study, a repeated dose 28-day oral toxicity study was performed, as mentioned in Section 1. In this repeated dose study, male and female rats were given 3-cyanopyridine by gavage at 5, 30 or 180 mg/kg/day for 28 days. Taking into account the results of this repeated dose study, the dose levels of 3-cyanopyridine in the present study were set as 5, 30 or 180 mg/kg/day. The daily dose volume (5 ml/kg body weight) was calculated according to the latest body weight.

2.3. Study design

Male rats were dosed once daily for 42 days, beginning 14 days before mating and throughout the mating period. Female rats were also dosed once daily from 14 days prior to mating, and throughout the mating and gestation periods, to day 3 of lactation, and so the total administration period was 40–53 days. The day of the first dosing was designated as day 0 of the administration/premating period.

During the first 14-day administration period (premating period), vaginal lavage samples of each female were evaluated daily for estrous cyclicity. After this premating period, female rats were transferred to the home cage of a male in the same group, and cohabited on a 1:1 basis until successful copulation occurred or the

mating period of 2 weeks had elapsed. Estrous cycles of 4–5 days were judged as normal, cycles other than 4–5 days were judged as irregular and, in particular, cycles with more than 7 days diestrus were judged as continuous diestrus. An irregular estrous cycle and a cycle with continuous diestrus were counted as abnormal. The mean estrous cycle of each treatment group was calculated without the data from females with continuous diestrus. During the mating period, vaginal smears were examined daily for the presence of sperm, and the presence of sperm in the vaginal smear and/or a vaginal plug were considered as evidence of successful mating. The day of successful mating was designated as day 0 of pregnancy. The first day when pups are found was made into the day of the initiation of delivery. Pregnant females were allowed to deliver spontaneously and nurse their pups, and the day on which the delivery was completed by 9:00 was designated as day 0 of lactation or postnatal day (PND) 0.

Throughout the study, all parental animals were observed for clinical signs of toxicity at least three times a day. Body weight was recorded on days 0, 1, 4, 6, 9, 13, 20, 27, 34 and 41 of the dosing period, and on the day of necropsy in males, and on days 0, 1, 4, 6, 9 and 13 of the premating period, on days 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17 and 20 of the gestation period and on days 0, 1 and 4 (the day of necropsy) of the lactation period in females. Body weight was additionally recorded on days 20, 27, 34, 41, 48, 50 and 51 (the day of necropsy) in copulation failure females. Food consumption was recorded on the same day as body weights in males and females, except for the mating period and necropsy day.

All surviving male rats were euthanized by exsanguination under ether anesthesia on the day after the last administration. All female rats showing successful reproductive performance were euthanized in a similar way on day 4 of lactation. Females that did not copulate were euthanized on the day after the 51st administration. Females that had not completed parturition were euthanized the day after day 25 of gestation. When total litter loss and abnormal delivery were observed, the dams were euthanized immediately. For all parental animals, the external surfaces were examined. The abdomen and thoracic cavity were opened, and gross internal examination was performed. For females, the numbers of corpora lutea and implantation sites were recorded. The following organs were weighed: liver, kidneys, spleen and adrenal gland in both sexes, the testes and epididymides in males, and ovaries in females.

Histopathological evaluations were performed on the liver in both sexes, on the testes, epididymides, prostate gland, and seminal vesicles with coagulating gland in males, and on the ovaries in females in the control and highest dose groups. In addition, organs with macroscopically abnormal findings were examined histopathologically. Test substance-related histopathological changes were found in the liver, testes and epididymides of the highest dose group in males, and the liver weights in middle and high dose groups in males and in low and middle dose groups in females were higher than in control groups; therefore, those organs of all animals in the low and middle groups were also examined histopathologically. The stages of spermatogenesis in the testes were examined in all male groups. For the histopathological examination, the target organs, except for the testes and epididymides, were fixed in 10% neutral-buffered formalin and the testes and epididymides were fixed with Bouin's solution. Those organs were processed routinely for embedding in paraffin, and sections were prepared for staining with hematoxylin–eosin.

All live and dead pups were counted, sexed and examined grossly on PND 0. Live pups were weighed per sex per litter on PNDs 0, 1 and 4. They were observed daily for clinical signs of toxicity on PNDs 0–4. On PND 4, the pups were euthanized by CO_2 inhalation, and gross internal examinations were performed.

2.4. Data analysis

Parametric data, such as body weight, body weight gain, food consumption, organ weight, the number of germ cells in each spermatogenic stage in the testes, estrous cycle length, the number of corpora lutea, the number of implantations, implantation index, the numbers of pups born, live pups and dead pups on lactation day 0, delivery index, live birth index, sex ratio, gestation length, and the number of live pups and viability index on lactation day 4 were analyzed by Bartlett's test for homogeneity of distribution. When homogeneity was recognized, one-way analysis of variance was performed. If a significant difference was detected, Dunnett's test was conducted for comparisons between control and individual treatment groups. Data without homogeneity or histopathological findings with two grades or more were analyzed using the Kruskal–Wallis rank sum test. If significant differences were found, the Mann–Whitney *U*-test was conducted for comparison between the control and each dosage group. The incidence of abnormal estrous cycle, copulation index, fertility index, live birth index, nursing index on lactation day 4, and histopathological findings with one grade were analyzed using the multi-sample chi-square test. If significant differences were found, the chi-square test or Fisher's exact test was conducted for comparison between the control and each dosage group. Pup data were statistically analyzed using the litter as the experimental unit. The 5% level of probability was used as the criterion for significance.

3. Results

3.1. Parental toxicity

No substance-related clinical signs of toxicity were detected at 5 and 30 mg/kg/day in either sex. Soft feces in two males, swelling of the left hindlimb in one male and salivation in one male were observed at 180 mg/kg/day. Alopecia in one female in the pre-mating and mating periods, and two females in the gestation period, salivation in one female and pale skin in one female in the gestation period were observed at 180 mg/kg/day. At 180 mg/kg/day, moreover, two pregnant females were debilitated, and were found dead on gestation day 21 (prior to the initiation of delivery) and 24 (during delivery), respectively, and two delivering females were euthanized moribund on gestation day 25. One delivered female was euthanized at the end of delivery on gestation day 25 because of complete stillbirth. Three pregnant females, which did not deliver until gestation day 25, were euthanized on gestation day 26. Two delivered females were euthanized because their pups were all dead on PNDs 0 or 1. No substance-related clinical signs of toxicity were detected at 180 mg/kg/day in two females with copulation failures.

Body weight and the gain in each group are shown in Table 1. At 180 mg/kg/day, body weight was significantly reduced on days 4–13 of the dosing period in males. In females, body weight was significantly reduced on days 4–9 of the pre-mating period and on days 5–20 of the gestation period, and body weight gain during the gestation period was significantly decreased at 180 mg/kg/day. The increased body weight values at 30 mg/kg/day were not considered toxicological effects in the present study. Food consumption was significantly decreased on days 1–6 of the administration period at 180 mg/kg/day in males, and on days 4–9 of the pre-mating period and days 5–10 of the gestation period at 180 mg/kg/day in females (data not shown).

At necropsy (data not shown in tables), in males, enlargement of the liver was observed in two animals at 30 mg/kg/day and in 12 animals at 180 mg/kg/day, and a yellowish-white patch/mass in the epididymis was observed in each three animals at 30 and

180 mg/kg/day. Moreover, diverticulum in the ileum in one animal, atrophy in the right testis and epididymis in one animal, and swelling of the left hindlimb in one animal were observed at 180 mg/kg/day. In females, diverticulum in the ileum was observed in one animal at 30 mg/kg/day, and thickening of the wall in the ileum was observed in one animal at 180 mg/kg/day. In one female at 180 mg/kg/day, which died on gestation day 24, a black patch in the mucosa of the stomach and atrophy of the spleen were observed.

Absolute and relative organ weights of scheduled-sacrifice animals in each group are shown in Table 2. Absolute and relative weights of the liver were significantly increased in males at 30 mg/kg/day or more. Absolute and relative weights of the kidney and adrenal gland were significantly increased, and absolute weight of the epididymis was significantly decreased in males at 180 mg/kg/day. Absolute testis weight was decreased 8% from control at 180 mg/kg/day, but insignificantly. In females at 180 mg/kg/day, the organ weights were not statistically analyzed because ten died or were euthanized in the gestation or lactation periods. Relative weights of the liver were significantly increased in females at 5 and 30 mg/kg/day, and absolute weight of the liver was significantly increased in females at 30 mg/kg/day.

Histopathological findings are shown in Table 3. The incidence of centrilobular hepatocyte hypertrophy in the liver was significantly increased in males at 30 mg/kg/day or more. Incidences of Sertoli cell vacuolation, spermatid necrosis and spermatid decrease in the testis, and incidences of spermatozoa decrease and lumen cell debris in the epididymis were significantly increased in males at 180 mg/kg/day. In females, in the liver, centrilobular hepatocyte hypertrophy, extramedullary hematopoiesis, periportal fatty change and focal necrosis were observed at 180 mg/kg/day. Values at 180 mg/kg/day in females were excluded from statistical evaluation because no animal survived at terminal euthanasia. The incidence of centrilobular hepatocyte hypertrophy in the liver was significantly increased in females at 30 mg/kg/day.

3.2. Stages of spermatogenesis in the testis

The number of Sertoli cells and the number of germ cells per Sertoli cell in each stage of spermatogenesis in the testes are shown in Table 4. The number of pachytene spermatocytes and the number of round spermatids were significantly decreased at 180 mg/kg/day in stages I–VI. In stages VII–VIII, the number of preleptotene spermatocytes was significantly decreased at 30 mg/kg/day or more, and the number of pachytene spermatocytes and the number of round spermatids were significantly decreased at 180 mg/kg/day. The number of spermatogonia, the number of zygotene/pachytene spermatocytes and the number of pachytene/diplotene spermatocytes were significantly decreased at 180 mg/kg/day in stages XII–XIV.

3.3. Reproductive findings

The reproductive findings are shown in Tables 5 and 6. Reproduction performance of parental rats, delivery and nursing were not significantly different between the control and 5 or 30 mg/kg/day groups. Continuous diestrus was observed in one female each at 5 and 30 mg/kg/day and in two females at 180 mg/kg/day, and an irregular estrous cycle was observed in one female at 30 mg/kg/day and in seven females at 180 mg/kg/day. At 180 mg/kg/day, the mean estrous cycle was significantly prolonged, the incidence of abnormal estrous cycle was 66.7%, the initiation of delivery was significantly delayed, and the gestation index was significantly decreased. Two pairs at 180 mg/kg/day did not copulate. Although additional mating was carried out with males that already succeeded in copulating with other females, copulation with these two

Table 1
Body weight of male and female rats given 3-cyanopyridine by gavage.

Dose (mg/kg/day)	No. of males	Day 0	Day 1	Day 4	Day 6	Day 9	Day 13	Day 20	Day 27	Day 34	Day 41	Gain	
Body weight during administration (g)													
0	12	375.8 ± 18.4	378.3 ± 17.4	391.9 ± 20.4	399.0 ± 22.3	409.2 ± 24.4	421.5 ± 26.4	438.6 ± 23.6	458.6 ± 27.4	476.8 ± 29.8	491.2 ± 32.2	115.3 ± 19.4	
5	12	375.9 ± 15.4	379.9 ± 16.4	393.7 ± 19.4	401.6 ± 20.7	413.7 ± 22.0	429.2 ± 24.8	450.9 ± 25.7	471.4 ± 29.8	494.3 ± 32.2	511.2 ± 33.8	135.3 ± 22.2	
30	12	375.2 ± 15.2	377.6 ± 14.1	394.3 ± 15.5	402.9 ± 16.7	417.5 ± 17.3	433.3 ± 19.8	456.8 ± 20.4	481.2 ± 23.8	504.8 ± 27.6	524.7 ± 26.8*	149.5 ± 19.2**	
180	12	374.3 ± 13.8	369.2 ± 11.0	328.3 ± 14.4**	333.6 ± 18.9**	362.9 ± 14.3**	385.4 ± 11.7**	414.5 ± 29.5	438.8 ± 26.1	462.8 ± 33.3	477.7 ± 37.3	103.4 ± 36.2	
Dose (mg/kg/day)	No. of females	Day 0	Day 1	Day 4	Day 6	Day 9	Day 13	Gain					
Body weight during pre-mating (g)													
0	12	256.3 ± 12.4	254.0 ± 11.9	263.6 ± 12.6	266.5 ± 16.1	273.2 ± 16.7	282.3 ± 15.8	25.9 ± 10.0					
5	12	252.8 ± 12.5	255.3 ± 12.7	261.9 ± 14.3	267.3 ± 13.4	273.8 ± 15.9	280.1 ± 15.9	27.3 ± 11.3					
30	12	250.5 ± 10.8	254.8 ± 11.7	260.1 ± 13.4	268.0 ± 14.4	274.6 ± 15.8	279.6 ± 16.1	29.1 ± 8.1					
180	12	248.2 ± 16.0	248.0 ± 14.7	234.1 ± 18.6**	233.7 ± 25.5**	247.6 ± 21.6**	271.3 ± 15.7	23.1 ± 14.2					
Dose (mg/kg/day)	No. of females	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10	Day 14	Day 17	Day 20	Gain		
Body weight during gestation (g)													
0	12	289.7 ± 18.2	296.2 ± 17.4	311.3 ± 17.9	320.9 ± 18.0	331.8 ± 20.0	348.9 ± 19.4	371.6 ± 21.3	402.7 ± 21.2	448.3 ± 24.4	158.6 ± 21.8		
5	12	291.5 ± 18.6	297.6 ± 16.7	314.8 ± 18.7	324.5 ± 19.6	333.1 ± 20.6	348.9 ± 21.2	372.7 ± 23.9	402.8 ± 26.1	454.3 ± 30.4	162.8 ± 23.0		
30	12	289.3 ± 18.9	295.9 ± 19.3	311.3 ± 19.7	321.3 ± 19.9	329.1 ± 19.7	345.7 ± 22.2	368.2 ± 24.0	396.7 ± 24.2	447.9 ± 29.1	158.6 ± 17.0		
180	10	275.1 ± 18.1	280.3 ± 21.0	293.9 ± 21.8	300.2 ± 21.5*	306.2 ± 20.6*	316.2 ± 19.3**	337.0 ± 25.2**	357.0 ± 23.8**	371.4 ± 34.1**	96.3 ± 29.3**		
Dose (mg/kg/day)	No. of females	Day 0	Day 1	Day 4	Gain								
Body weight during lactation (g)													
0	12	347.8 ± 26.3	354.1 ± 25.8	366.8 ± 21.6	19.1 ± 12.5								
5	12	343.8 ± 29.6	347.8 ± 30.0	366.7 ± 28.2	22.8 ± 6.1								
30	12	335.8 ± 27.9	345.0 ± 28.9	365.2 ± 22.7	29.4 ± 7.6*								
180	2	297.5 ± 7.8	-	-	-								

Values are given as the mean ± S.D. (-) Blank.

Body weights on day 0 of the lactation period in the 180 mg/kg/day group are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

* Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

** Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

Table 2
Organ weight of male and female rats given 3-cyanopyridine by gavage.

Dose (mg/kg/day)	No. of males	Body weight	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epididymis (g)
0	12	493.9 ± 32.8	15.987 ± 1.453 (3.240 ± 0.248)	3.297 ± 0.240 (0.670 ± 0.049)	0.812 ± 0.115 (0.164 ± 0.018)	57.8 ± 7.7 (11.765 ± 1.800)	3.338 ± 0.183 (0.678 ± 0.062)	1.353 ± 0.087 (0.275 ± 0.024)
5	12	514.8 ± 32.4	16.822 ± 1.354 (3.272 ± 0.223)	3.206 ± 0.240 (0.625 ± 0.043)	0.840 ± 0.154 (0.163 ± 0.026)	57.3 ± 8.5 (11.162 ± 1.750)	3.338 ± 0.243 (0.650 ± 0.060)	1.388 ± 0.089 (0.269 ± 0.025)
30	12	527.7 ± 26.7	19.979 ± 1.941** (3.781 ± 0.216**)	3.563 ± 0.433 (0.673 ± 0.059)	0.843 ± 0.148 (0.159 ± 0.024)	57.9 ± 9.7 (10.951 ± 1.577)	3.240 ± 0.253 (0.615 ± 0.041)	1.323 ± 0.132 (0.250 ± 0.020)
180	12	481.3 ± 35.8	24.007 ± 1.599* (5.002 ± 0.327**)	3.940 ± 0.302* (0.821 ± 0.045**)	0.743 ± 0.097 (0.153 ± 0.021)	74.5 ± 13.1* (15.583 ± 3.145**)	3.068 ± 0.387 (0.642 ± 0.088)	1.228 ± 0.205* (0.256 ± 0.037)
Dose (mg/kg/day)	No. of females	Body weight	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal (mg)	Ovary (mg)	
0	12	366.8 ± 21.6	13.374 ± 1.001 (3.650 ± 0.243)	2.118 ± 0.243 (0.578 ± 0.058)	0.787 ± 0.195 (0.215 ± 0.049)	81.3 ± 10.3 (22.202 ± 3.007)	118.0 ± 9.3 (32.183 ± 1.951)	
5	12	366.7 ± 28.2	14.195 ± 1.369 (3.872 ± 0.200*)	2.223 ± 0.134 (0.608 ± 0.043)	0.854 ± 0.213 (0.234 ± 0.061)	78.8 ± 6.4 (21.578 ± 2.276)	121.0 ± 8.7 (33.117 ± 2.853)	
30	12	365.2 ± 22.7	15.220 ± 0.953** (4.178 ± 0.253**)	2.203 ± 0.158 (0.603 ± 0.047)	0.857 ± 0.088 (0.235 ± 0.026)	77.3 ± 8.0 (21.177 ± 2.095)	121.1 ± 15.0 (33.185 ± 3.857)	
180	0	-	-	-	-	-	-	

Values are given as the mean ± S.D. Values in parentheses are relative organ weights (g or mg/100 g body weight).

* Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

** Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

females was not observed. These two unsuccessfully mated females (the length of the estrous cycle of one was 5.0 days and that of the other was not calculated due to continuous diestrus) were alive and were euthanized on the next day of administration, day 51. The other ten females at 180 mg/kg/day, which had succeeded in copulation, became pregnant, and the fertility index was not significantly different between the control and 180 mg/kg/day groups. At 180 mg/kg/day, one pregnant female was found dead on gestation day 21 prior to the initiation of delivery, one pregnant female became exhausted in the middle of delivery on gestation day 23, equal to the day of the initiation of delivery, and was found dead the next day, and two pregnant females became exhausted in the middle of delivery on gestation day 25, equal to the day of the initiation of delivery, and were euthanized because of difficult delivery. For these four pregnant females, dead fetuses were observed in their uterus at necropsy. One pregnant female was successfully delivered on gestation day 25 but all her pups were stillborn. Three pregnant females had not delivered by gestation day 25, were euthanized on gestation day 26, and dead fetuses were observed in their uterus at necropsy. There were no abnormal findings in the nursing period for two pregnant females successfully delivered on gestation day 23 or 24, and these females were euthanized because their newborn pups all died on lactation day 0 or 1. Because of insufficient sample numbers due to such abnormal delivery or pup death, the gestation length, delivery index, nursing index, and litter data on the lactation days 0 and 4 were excluded from statistical evaluation in the 180 mg/kg/day group.

3.4. Developmental findings

The developmental findings are shown in Tables 6 and 7. At 180 mg/kg/day, the numbers of corpora lutea and implantations were significantly decreased. The numbers of dead or missing pups between PNDs 0 and 4 were one male and one female in controls, four males and one female at 5 mg/kg/day, two males and four females at 30 mg/kg/day, and 19 males and 11 females at 180 mg/kg/day, including pups born by abnormal delivery. For live pups on PND 4, trauma or a scab on the tip of the tail/loss of tail was observed in one female in controls. Regarding general appearances, there were no abnormal findings at 5 and 30 mg/kg/day. At 180 mg/kg/day, general edema was observed in all pups, four males and three females, alive on PND 0. There were no significant differences in the sex ratio of live pups, the viability index on PND 4, and the body weight of male and female pups on PNDs 0 and 4 between the control group and the treated group at 5 or 30 mg/kg/day.

At necropsy of dead pups between PNDs 0 and 4, there were no abnormal findings at 0, 5 and 30 mg/kg/day. At 180 mg/kg/day, general edema in 16 males and 11 females, ascites of the abdominal cavity in seven males and four females, hydrothorax of the thoracic cavity in two males, omphalocele in one female, and pale discoloration of the lung and heart and grayish-green discoloration and deformity of the liver in one male were observed. At necropsy of live pups on PND 4, yellowish-brown discoloration of the liver in one female and a grayish-green patch on the lateral left lobe of the liver and loss of the tail in one female in controls, small kidneys with dark red discoloration in one male, and dilatation of the renal pelvis in the kidneys in one female at 5 mg/kg/day were observed. These findings of live pups on PND 4 at 5 mg/kg/day were toxicologically insignificant because there were no abnormal findings in the 30 mg/kg/day group at necropsy of live pups on PND 4.

4. Discussion

The current study was conducted to examine the possible effects of 3-cyanopyridine on reproduction and development in rats. The

Table 3
Histopathological findings of male and female rats given 3-cyanopyridine by gavage.

	Grade	Dose (mg/kg/day)			
		0	5	30	180
Number of <u>males</u> examined		12	12	12	12
Liver: Hypertrophy, hepatocytes, centrilobular	+	0	0	7 *	0
	++	0	0	0	12]**
Fatty change, centrilobular	+	0	0	0	2
Microgranuloma	+	2	2	1	1
Testis: Vacuolation, Sertoli cell	+	0	0	0	10]
	++	0	0	0	1]**
Necrosis, spermatid	+	0	0	1	11]**
Decrease, spermatid	+	0	0	0	9**
Appearance, multinucleated giant cells	+	0	0	0	3
Atrophy, seminiferous tubule	+	0	0	4	0
	+++	0	0	0	1
Edema, interstitium	+	0	0	0	1
Epididymis: Decrease, spermatozoa	+	0	0	1	7
	++	0	0	0	1]**
	+++	0	0	0	1]
Cell debris, lumen	+	0	0	4	9]**
	++	0	0	0	2]**
Spermatic granuloma	+	0	1	3	2
	++	0	0	0	1
Cellular infiltration, inflammatory cells, interstitium	+	0	0	0	1
Edema, interstitium	+	0	0	0	1
Atrophy, epithelium, ductus epididymis	+	0	0	0	1
Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cells	+	4	-	-	1
	++	2	-	-	0
Ileum: Diverticulum	+	-	-	-	1 (1)
Hind limb: Callus formation	++	-	-	-	1 (1)
Proliferation, osteoclasts, bone marrow	+	-	-	-	1 (1)
Granulation, articular capsule	+	-	-	-	1 (1)
Cellular infiltration, inflammatory cells, subcutis	++	-	-	-	1 (1)
Edema, subcutis	+++	-	-	-	1 (1)

	Grade	Dose (mg/kg/day)			
		0	5	30	180
Number of <u>females</u> examined		12	12	12	12
Liver: Hypertrophy, hepatocytes, centrilobular	+	0	0	5 *	5
	++	0	0	0	6
Extramedullary hematopoiesis	+	0	0	0	2
Fatty change, periportal	+	0	0	0	2
Necrosis, focal	+	0	1	0	1
Microgranuloma	+	0	0	1	0
Forestomach: Erosion	+	-	-	-	1 (1)
Cellular infiltration, inflammatory cell, submucosa	+	-	-	-	1 (1)
Edema, submucosa	++	-	-	-	1 (1)
Glandular stomach: Erosion	+	-	-	-	1 (1)
Ileum: Diverticulum	+	-	-	1 (1)	0 (1)
Cellular infiltration, inflammatory cells, lamina propria and submucosa	++	-	-	0 (1)	1 (1)
Spleen: Atrophy white pulp	++	-	-	-	1 (1)
Skin: Atrophy, hair follicle	+	1 (1)	-	-	1 (1)

Values are the number of animals with findings. Values in parentheses are the number of animals examined. -: Blank.

Grade: +, slight change; ++, moderate change; +++, severe change.

*Significantly different from the control group ($P < 0.05$). **Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

Values of females in the 180 mg/kg/day group are excluded from statistical evaluation.

Values are the number of animals with findings. Values in parentheses are the number of animals examined. (-) Blank. Grade: (+) slight change; (++) moderate change; (+++) severe change. Values of females in the 180 mg/kg/day group are excluded from statistical evaluation.

*Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

**Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

Table 4
Stages of spermatogenesis of male rats given 3-cyanopyridine by gavage.

Dose (mg/kg/day)	Number of animals	Number of SC	Number of spermatogonia/SC	Number of pachytene spermatocytes/SC	Number of round spermatids/SC	
Stage I–VI						
0	12	22.50 ± 1.55	0.874 ± 0.139	2.393 ± 0.248	6.151 ± 0.493	
5	12	22.15 ± 1.69	0.874 ± 0.200	2.299 ± 0.183	6.309 ± 0.352	
30	12	22.25 ± 1.80	0.838 ± 0.214	2.214 ± 0.191	5.958 ± 0.614	
180	12	21.47 ± 1.83	0.773 ± 0.253	2.113 ± 0.176**	5.173 ± 0.840**	
Dose (mg/kg/day)	Number of animals	Number of SC	Number of spermatogonia/SC	Number of preleptotene spermatocytes/SC	Number of pachytene spermatocytes/SC	Number of round spermatids/SC
Stage VII–VIII						
0	12	21.27 ± 1.33	0.092 ± 0.016	2.041 ± 0.209	2.818 ± 0.317	6.143 ± 0.454
5	12	21.30 ± 1.61	0.083 ± 0.021	2.007 ± 0.222	2.794 ± 0.256	6.344 ± 0.408
30	12	21.17 ± 1.43	0.091 ± 0.028	1.819 ± 0.210*	2.666 ± 0.206	5.880 ± 0.549
180	12	21.37 ± 1.87	0.067 ± 0.037	1.668 ± 0.213**	2.330 ± 0.265**	4.693 ± 0.742**
Dose (mg/kg/day)	Number of animals	Number of SC	Number of spermatogonia/SC	Number of leptotene spermatocytes/SC	Number of pachytene spermatocytes/SC	
Stage IX–XI						
0	12	23.47 ± 1.80	0.172 ± 0.050	2.173 ± 0.235	2.793 ± 0.254	
5	12	22.18 ± 1.49	0.207 ± 0.073	2.342 ± 0.239	2.777 ± 0.234	
30	12	22.77 ± 2.47	0.166 ± 0.032	1.987 ± 0.202	2.613 ± 0.252	
180	12	21.55 ± 1.88	0.140 ± 0.036	1.994 ± 0.251	2.587 ± 0.310	
Dose (mg/kg/day)	Number of animals	Number of SC	Number of spermatogonia/SC	Number of spermatocytes 1/SC	Number of spermatocytes 2/SC	
Stage XII–XIV						
0	12	22.97 ± 1.20	0.202 ± 0.046	2.432 ± 0.151	3.006 ± 0.197	
5	12	23.05 ± 1.13	0.188 ± 0.052	2.314 ± 0.138	3.015 ± 0.172	
30	12	21.83 ± 1.87	0.180 ± 0.042	2.309 ± 0.181	2.940 ± 0.162	
180	12	22.72 ± 2.04	0.141 ± 0.047**	2.032 ± 0.213**	2.641 ± 0.332**	

SC: Sertoli cell. Spermatocytes 1: zygotene or pachytene spermatocytes. Spermatocytes 2: pachytene or diplotene spermatocytes. Values are given as the mean ± S.D.

* Significantly different from the 0 mg/kg group at $P < 0.05$.

** Significantly different from the 0 mg/kg group at $P < 0.01$.

dosage of 3-cyanopyridine used in this study was sufficiently high to be expected to induce general toxic effects in parental animals. As expected, many general toxic effects were observed. The following results suggest that the liver is a sensitive target organ. The

weights of the liver were increased in males at 30 mg/kg/day or more and in females at 5 and 30 mg/kg/day, and the incidence of centrilobular hepatocyte hypertrophy in the liver was increased in both sexes at 30 mg/kg/day or more. These findings in the liver were

Table 5
Reproductive findings in rats given 3-cyanopyridine by gavage.

	Dose (mg/kg/day)			
	0	5	30	180
No. of pairs	12	12	12	12
Estrous cycles (day) ^a	4.03 ± 0.09	4.00 ± 0.00	4.09 ± 0.22	5.17 ± 0.48**
Abnormal estrous cycle ^b	0.0	8.3	16.7	66.7**
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	10
Copulation index (male/female) ^c	100/100	100/100	100/100	83.3/83.3
Fertility index ^d	100	100	100	100
Gestation index ^e	100	100	100	22.2 (9) ^g **
Initiation of delivery (date) ^a	21.7 ± 0.5	21.8 ± 0.5	21.5 ± 0.5	24.0 ± 0.9 (6) ^h **
No. of females completing the delivery	12	12	12	3
Gestation length (day) ^a	22.3 ± 0.5	22.1 ± 0.3	22.4 ± 0.5	[23.5 ± 0.7]
No. of dams delivering live pups	12	12	12	2
Nursing index ^f	100	100	100	[0]

Values in brackets are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers.

^a Values are given as the mean ± S.D.

^b Abnormal estrous cycle (%) = no. of females with abnormal estrous cycle/no. of females with normal estrous cycle × 100.

^c Copulation index (%) = no. of copulated rats/no. of pairs × 100.

^d Fertility index (%) = no. of pregnant females/no. of pairs with successful copulation × 100.

^e Gestation index (%) = no. of dams with live pups/no. of pregnant females × 100.

^f Nursing index = no. of females nursing live pups on lactation day 4/no. of females with live pups delivery × 100.

^g No. of animals was 9 because one pregnant female was found dead on gestation day 21 before delivery.

^h No. of animals was 6 because one was found dead on gestation day 21 before delivery and three had not delivered by gestation day 25 in 10 pregnant females.

** Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

Table 6
Pregnancy and litter data of rats given 3-cyanopyridine by gavage.

	Dose (mg/kg/day)			
	0	5	30	180
No. of pregnant females	12	12	12	10
No. of corpora lutea ^a	16.2 ± 2.0	16.2 ± 2.0	15.7 ± 2.0	11.9 ± 3.8**
Implantation index ^{a,b}	93.6 ± 16.8	98.8 ± 2.7	99.2 ± 2.9	93.4 ± 11.7
No. of implantation sites ^a	15.3 ± 3.6	16.0 ± 2.2	15.6 ± 2.3	11.4 ± 4.0 ^c
No. of litters (=no. of females completing the delivery)	12	12	12	3
Delivery index ^{a,c}	91.1 ± 6.0	94.2 ± 7.9	95.5 ± 5.1	57.4 ± 37.8 (3)
Total no. of pups born ^a	13.9 ± 3.4	15.1 ± 2.5	14.9 ± 2.4	7.7 ± 5.8 (3)
Live birth index ^{a,d}	98.8 ± 2.7	97.1 ± 4.4	97.8 ± 4.3	60.6 ± 53.3 (3)
No. of live pups on PND 0 ^a	13.8 ± 3.4	14.7 ± 2.6	14.6 ± 2.4	3.3 ± 4.9 (3)
No. of dead pups on PND 0 ^a	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.7	4.3 ± 5.9 (3)
Sex ratio of live pups ^e	0.494 ± 0.098	0.438 ± 0.119	0.521 ± 0.174	0.720 ± 0.396 (2)
Viability index on PND 4 ^{a,f}	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.0 ± 2.4	0.0 ± 0.0 (2)
No. of live pups on PND 4 ^a	13.8 ± 3.4	14.7 ± 2.6	14.4 ± 2.3	0.0 ± 0.0 (2)
Body weight of live pups on PND 0 (g) ^a				
Male	6.84 ± 0.34	6.73 ± 0.49	6.89 ± 0.68	6.85 ± 0.21 (2)
Female	6.53 ± 0.37	6.43 ± 0.51	6.47 ± 0.71	6.70 (1)
Body weight of live pups on PND 1 (g) ^a				
Male	7.67 ± 0.52	7.38 ± 0.66	7.54 ± 0.90	– (0)
Female	7.29 ± 0.52	7.03 ± 0.65	7.12 ± 0.86	– (0)
Body weight of live pups on PND 4 (g) ^a				
Male	11.50 ± 1.29	10.69 ± 1.06	10.98 ± 1.47	– (0)
Female	10.87 ± 1.36	10.19 ± 0.97	10.30 ± 1.36	– (0)

Values in parentheses are the number of animals examined. Values in the 180 mg/kg/day group except for no. of corpora lutea, implantation index and no. of implantation sites are excluded from statistical evaluation because of insufficient sample numbers. (–) Blank.

^a Values are given as the mean ± S.D.

^b Implantation index (%) = no. of implantation sites/no. of corpora lutea × 100.

^c Delivery index (%) = total no. of pups born/no. of implantation sites × 100.

^d Live birth index (%) = no. of live pups on PND 0/total no. of pups born × 100.

^e Sex ratio of live pups = no. of live males/total no. of live pups.

^f Viability index on PND 4 (%) = no. of live pups on PND 4/no. of live pups on PND 0 × 100.

^{*} Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

^{**} Significantly different from the control group ($P < 0.01$).

Table 7
Gross findings of pups in rats given 3-cyanopyridine by gavage.

Dose (mg/kg/day)	Male pups				Female pups			
	0	5	30	180	0	5	30	180
Findings of dead pups during lactation days 0–4								
Number of pups examined	1	4	2	19 ^{a,b}	1	1	3	11 ^c
No abnormal findings	1	4	2	3	1	1	3	0
Organ: findings								
External: generalized edema	0	0	0	16	0	0	0	11
omphalocele	0	0	0	0	0	0	0	1
Thoracic cavity: hydrothorax	0	0	0	2	0	0	0	0
Lung: pale discoloration	0	0	0	1	0	0	0	0
Heart: pale discoloration	0	0	0	1	0	0	0	0
Abdominal cavity: ascites	0	0	0	7	0	0	0	4 [*]
Liver: grayish green discoloration	0	0	0	1	0	0	0	0
deformity	0	0	0	1	0	0	0	0
Findings of pups euthanized on lactation day 4								
Number of pups examined	83	77	91	0	82	99	82	0
No abnormal findings	83	76	91	–	80	98	82	–
Organ: findings								
Liver: yellowish brown discoloration	0	0	0	–	1	0	0	–
grayish green patch, lateral left lobe	0	0	0	–	1	0	0	–
Kidney: dilatation, renal pelvis	0	0	0	–	0	1	0	–
small	0	1	0	–	0	0	0	–
dark red discoloration	0	1	0	–	0	0	0	–
Tail: lost	0	0	0	–	1	0	0	–

Values are the number of pups with findings. (–) Blank.

^a Including one pup whose sex was not distinguished because of maternal cannibalism.

^b Including 4 pups from dams which were found dead or were euthanized during delivery.

^c Including 3 pups from dams which were found dead or were euthanized during delivery.

considered to be an adaptive change as a result of 3-cyanopyridine treatment because of no other pathological changes in the liver, and consistent with the previous 28-day study [10]. Changes in organ weight were also observed in the kidney and adrenal gland. The weights of the kidney and adrenal gland were increased in males at 180 mg/kg/day, and these findings were also consistent with the 28-day study [10], in which increased weights of the kidney and adrenal gland were observed in males at 180 mg/kg/day, and increased weight of the kidney and a tendency toward an increased weight of the adrenal gland were observed in females at 30 and/or 180 mg/kg/day.

The following findings were considered to be secondary effects of hemolytic anemia or inflammation caused by 3-cyanopyridine. Extramedullary hematopoiesis in the liver of two females was observed at 180 mg/kg/day although there was no statistical significance. Extramedullary hematopoiesis in the liver is known as one of the reactions against anemia [14]. In the 28-day study [10], hemolytic anemia-related findings, including decreased red blood cell counts, increased reticulocytes, and hemosiderin deposit of red pulp and extramedullary hematopoiesis in the spleen, were observed in both sexes at 180 mg/kg/day; therefore, hemolytic anemia could have occurred at 180 mg/kg/day also in the current study. Slight or moderate spermatic granuloma in the epididymis was observed at 5 mg/kg/day or more, although there was no statistical significance. Spermatic granuloma can arise as an inflammatory response [15]. Increased adrenal weight observed at 180 mg/kg/day may also be a reaction to inflammation. In the 28-day study [10], possible inflammatory responses were observed at 180 mg/kg/day, as follows: increased white blood cell counts, increased neutrophils, neutrophil cellular infiltration in the kidney pelvis, bladder inflammation, increased adrenal weight, and slight hypertrophy of the zona fasciculata in the adrenal cortex.

In the current study, the emaciation of pregnant females was marked at 180 mg/kg/day, and the hard or abnormal labor in pregnant females at that dose was considered to be due to aggravation of the general condition. General edema in almost all pups and ascites of the abdominal cavity and hydrothorax of thoracic cavity in some pups were observed at 180 mg/kg/day at necropsy of stillborn and dead pups, and these findings were considered to be due to circulatory problems associated with such a difficult delivery. As for fetuses, dead, mainly macerated, fetuses were observed in the uterus at necropsy for all pregnant females that did not deliver pups in the 180 mg/kg/day treatment group. The intrinsic tendency of anemia in pregnant females [16] may be enhanced by 3-cyanopyridine treatment at 180 mg/kg/day. However, there were only two cases of extramedullary hematopoiesis in the liver in the females at 180 mg/kg/day, and no other direct evidence of anemia in the current study. Besides maternal anemia, there must be the other unknown mechanism for fetal toxicity.

The following findings were not considered 3-cyanopyridine-treated effects. For parental toxicity, alopecia in females observed at 180 mg/kg/day was also observed in the female control group, at necropsy, the swelling of the left hindlimb in one male observed at 180 mg/kg/day was due to bone fracture or dislocation, and changes in the ileum were only few. In developmental findings, the number of dead or missing pups between PNDs 0 and 4 observed at 5 or 30 mg/kg/day was not significantly different from that of the control group. At necropsy of stillborn or dead pups, omphalocele in one female pup and pale discoloration of the lung and heart and grayish-green discoloration and deformity of the liver in one male pup were also observed at 180 mg/kg/day; however, these were observed in only one male and female pup and were considered spontaneous.

Regarding the female reproductive system in the current study, a prolonged estrous cycle, decreased numbers of corpora

lutea and implantations and two unsuccessfully mated females were observed at 180 mg/kg/day, and there were no toxicological necropsy findings in the ovary at 180 mg/kg/day. Also in the 28-day study [10], there were no changes in the ovary weight and no histopathological findings in the ovary. The decreased number of corpora lutea suggested that dosing with 3-cyanopyridine affects ovulation. The decreased number of implantations was reflected by a decreased number of corpora lutea because there were no changes in the implantation index and fertility index at 180 mg/kg/day. The female reproductive function is regulated by the hypothalamic-pituitary-ovary axis, and female reproductive toxicity is generally caused indirectly by an imbalance of the hypothalamic-pituitary-ovary axis [17]. In the current study, the effects on the estrous cycle, corpora lutea, implantations and mating at 180 mg/kg/day may have been caused indirectly by an imbalance of the hypothalamic-pituitary-ovary axis.

Regarding the male reproductive organs, Sertoli cell vacuolation and spermatid necrosis/decrease in the testis, and spermatozoa decrease and lumen cell debris in the epididymis were observed at 180 mg/kg/day. These findings were considered to be caused by 3-cyanopyridine treatment, although decreased spermatozoa and lumen cell debris in the epididymis were associated with changes in the testis. These histopathological findings were consistent with the 28-day study [10]. The findings in the stages of spermatogenesis observed at 30 mg/kg/day or more were also considered to be caused by 3-cyanopyridine treatment. For the number of germ cells at every stage of spermatogenesis, reduction or a decreasing trend was observed at 180 mg/kg/day, and therefore, cell- and stage-specific influences on germ cells were not observed. Superficially regarded, these testicular toxicity in the current study was not caused indirectly by endocrine disruption because the changes in spermatogenesis associated with endocrine disruption are often subtle, cell- and stage-specific [18], and was caused directly by 3-cyanopyridine treatment because Sertoli cell or germ cell injury of the testis would be induced by direct action on the germinal epithelium [17]. On the other hand, the testicular toxicity by dosing with 3-cyanopyridine may also be caused indirectly via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, the same as for possible female reproductive toxicity. Further studies are needed to clarify the mechanism of 3-cyanopyridine-induced testicular toxicity. Despite such histopathological changes in the testes with decreased spermatozoa in the epididymides, no effects of 3-cyanopyridine on male reproductive ability, *i.e.* the fertility index, were observed at any doses in the current study; then, the testicular toxicity in the current study is dealt with as general toxicity. This would be because mating was performed after 14 days of dosing in this screening test before effects on germ cells could arise. In addition, rodent males produce sperm in numbers that greatly exceed the minimum requirements for fertility, particularly as evaluated in reproductive studies that allow multiple mating [19].

In conclusion, the results of the current study provide a more comprehensive toxicity profile of 3-cyanopyridine than has been previously reported. The NOAEL for reproductive/developmental toxicity was concluded to be 30 mg/kg/day mainly based on prolonged estrous cycle, delayed initiation of delivery, decreased gestation index, and decreased number of corpora lutea observed at 180 mg/kg/day, while the weight of the liver was slightly increased in females at 5 mg/kg/day and was increased in both sexes at 30 mg/kg/day for general toxicity.

Acknowledgement

This study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- [1] 14504 Chemical Commodities. Tokyo: The Chemical Daily Co., Ltd.; 2004.
- [2] METI (Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan). Research results on the actual production and import volume of chemicals in 2011 [in Japanese]. Available at: http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/release/h22/2kan-shusei.pdf [accessed in March 2012].
- [3] HSDB (Hazardous Substances Data Bank). 3-Pyridinecarbonitrile CAS 100-54-9. Available at: <http://toxnet.nlm.nih.gov/> [accessed in March 2012].
- [4] Degussa AG. Unpublished report. Degussa AG-US-IT-Nr: 74-0005-DKT. In: IUCLID Dataset; 2000.
- [5] European Commission. 100-54-9. IUCLID Dataset; 2000.
- [6] Majka J, Knobloch K, Szendzikowski S. Evaluation of acute toxic effect of 3-cyanopyridine. *Medycyna Pracy* 1979;30:109–13 [in Polish].
- [7] Schafer EW, Bowles WA. Acute oral toxicity and repellency of 933 chemicals to house and deer mice. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 1985;14:111–29.
- [8] Degussa AG. Unpublished report. Degussa AG-US-IT-Nr: 85-0067-DKT. In: IUCLID Dataset; 2000.
- [9] Degussa AG. Unpublished report. Degussa AG-US-IT-Nr: 85-0066-DKT. In: IUCLID Dataset; 2000.
- [10] MHLW (Ministry of Health, Labour, Welfare, Japan). 3-Cyanopyridine [in Japanese]. Available at: Japan Existing Chemical Data Base (JECDB), <http://dra4.nihs.go.jp/mhlw.data/jsp/SearchPageENG.jsp>. Abstract is in English.
- [11] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guideline 421, Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test [adopted on July 27, 1995]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, section 5.
- [12] MOE, METI, MHLW. Standard concerning testing laboratories implementing tests for new chemical substances etc. Joint notification by director generals of Environmental Policy Bureau, Japan, Ministry of the Environment (MOE) (Kanpokiatsu No. 031121004) and Manufacturing Industries Bureau, Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) (Seikyokuhatsu No. 3), dated November 17, 2003 and by director general of Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) (Yakusyokuhatsu No. 1121003), dated November 21; 2003.
- [13] MOE, METI, MHLW. Partial amendments of the standard concerning testing laboratories implementing tests for new chemical substances etc. Joint notification by director generals of Environmental Policy Bureau, Japan, Ministry of the Environment (MOE) (Kanpokiatsu No. 080704001) and Manufacturing Industries Bureau, Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) (Seikyokuhatsu No. 2), dated June 30, 2008 and by director general of Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) (Yakusyokuhatsu No. 0704001), dated July 4; 2008.
- [14] Harada T, Malta K. Liver and gallbladder [Chapter 5]. In: Maekawa, et al., editors. *Textbook of toxicologic histopathology* [in Japanese]. Tokyo: The Japanese Society of Toxicologic Pathology; 2000. p. 179–213.
- [15] Kandori H, Chatani F, Miyajima H. Male reproductive organs. The Japanese society of toxicologic pathology. In: *Toxicologic Histopathology* [in Japanese]. Tokyo: International Press Editing Centre Incorporation; 2000. p. 283–314.
- [16] Kawada K. Experimental studies on iron deficiency anemia in pregnant rat and its feto-maternal influence. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica* 1982;34:75–82.
- [17] Kihara T, Tanimura T. 6.5 reproductive/developmental toxicity. In: Ohno Y, et al., editors. *Toxicology* [new edition]. Tokyo: Asakura Publishing; 2009. p. 182–201.
- [18] Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical Record* 1977;187:347–65.
- [19] Parker RM. *Testing for reproductive toxicity*. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2006.

表2 蓄積度の確認に用いる化学物質

Chemical Name	CAS No.	陽性・陰性の分類	PC10 (M)	PC50 (M)	試験濃度範囲
Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$<1.00 \times 10^{-11}$	2.04×10^{-11}	$10^{-14} \sim 10^{-8}$
17 α -Estradiol	57-91-0	POS	4.27×10^{-11}	6.44×10^{-10}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$<1.00 \times 10^{-11}$	2.75×10^{-11}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
4-tert-Octylphenol	140-66-9	POS	1.85×10^{-9}	7.37×10^{-8}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Genistein	446-72-0	POS	2.24×10^{-9}	2.45×10^{-8}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Bisphenol A	80-05-7	POS	2.02×10^{-8}	2.94×10^{-7}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Kaempferol	520-18-3	POS	1.36×10^{-7}	1.21×10^{-6}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	POS	1.14×10^{-6}	4.11×10^{-6}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
p,p'-Methoxychlor	72-43-5	POS	1.23×10^{-6}	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Ethyl paraben	120-47-8	POS	5.00×10^{-6}	-	$10^{-10} \sim 10^{-4}$
Atrazine	1912-24-9	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-6}$
Spirolactone	52-01-7	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-6}$
Ketoconazole	65277-42-1	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$
Reserpine	50-55-5	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$

【参考文献】

- 1) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG 455) Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists (2012)
- 2) V. Cavaillès, *Climacteric*, 5 (2), 20-6 (2002)
- 3) W. J. Welboren *et al.*, *Endocr. Relat. Cancer*, 16 (4), 1073-89 (2009)
- 4) M. Younes and N. Honma, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135 (1), 63-6 (2011)
- 5) ICCVAM (2011), ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- 6) P. Pujol *et al.*, *Cancer Res.*, 58 (23), 5367-73 (1998)
- 7) J. M. Rogers and M. S. Denison, *Journal of Basic and Applied Research*, 13 (1), 67-82 (2000)
- 8) M. Takeyoshi, 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 (2006)
- 9) *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_37465_1916638_1_1_1_37465,00.html (2005)

(内分泌攪乱物質スクリーニング)

第18章 BG1Luc細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法

(OECD TG 457)

小野 敦
(Atsushi Ono)

1 はじめに

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詳細試験のテストガイドラインの整備を開始し、スクリーニングから確定試験までに有用と考えられる試験法を5レベルからなる「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概念枠組み」として整理し、各レベルにおける試験法のガイドラインの整備を進めている¹⁾。

本試験法は、エストロゲン受容体(ER)を介する下流遺伝子転写活性への化学物質の影響を評価する転写活性化試験法(Transactivation(TA)試験)であり、OECD概念枠組みレベル2の「機構に関する情報をもたらす*in vitro*試験」に相当する。

ERは、遺伝子転写因子であり、エストロゲンとの相互作用により下流遺伝子転写を介して細胞増殖、胎児の発達、恒常性維持などにおける細胞機能を制御している。正常なエストロゲン作用のかく乱は、様々な健康影響を引き起こす可能性がある。TA試験は、レポーター遺伝子試験とも呼ばれ、化学物質のホルモン受容体への結合を介した転写活性化能を測定する方法であり、化学物質を暴露してレポータータンパク質の発現量から転写活性化率を評価する²⁾。

本試験では、ヒト卵巣腺癌細胞由来BG-1細胞を宿主細胞として、4回繰り返しエストロゲン応答配列下流にマウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター(MMTV)を繋いだホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを安定形質転換したBG1Luc4E2細胞をレポーター細胞として用い、内因性ERによるレポーター遺伝子の発現を検出する。BG1Luc4E2細胞は、エストロゲン以外のステロイドや非ステロイドホルモンとの交差反応性はほとんど無いことが示されている³⁾。

脊椎動物では、少なくともER α とER β の2種の主要なサブタイプが知られている。ER α とER β は異なる遺伝子にコードされており、組織分布や生物学的機能やリガンド特異性に差がある⁴⁻⁷⁾。古典的なエストロゲンの作用は、主にER α を介していることからER TA試験の多くは、ER α を介した作用のみを検出するよう設計されている⁸⁾。BG1細胞は、ER α とともに発現量は少な

いものの ER β を内因性に発現しており⁹⁾、本試験系では ER α 、ER β いずれを介した作用であっても検出可能である。

BG1Luc4E2 細胞を用いた ER アゴニストおよびアンタゴニスト検出のためのプロトコルは、ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が中心となり、ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) および日本動物実験代替評価センター (JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の協力により、日米欧 3 試験施設が参加したバリデーション試験の結果をもとに、第 3 者公開評価会議による評価を受けて最終化された¹⁰⁾。第 3 者評価結果および最終プロトコルを基に ICCVAM より OECD ガイドラインが提案され、2012 年に TG 457 として成立した¹¹⁾。第 3 者公開評価会議における評価資料や評価レポートおよび最終プロトコルなどは ICCVAM ウェブサイトから入手可能である¹²⁾。

2 材料および試薬

2.1 生物材料

(1) BG1Luc4E2 細胞

測定に用いる BG1Luc4E2 細胞は、カリフォルニア大学 (Davis, California, USA) *1 もしくは Xenobiotic Detection Systems (Durham, North Carolina, USA) *2 から入手する。細胞の入手には、技術ライセンス契約が必要である。

(2) 培養試薬

- ・ RPMI 1640 培地、L-グルタミン含有 (RPMI 1640)
- ・ Dulbecco's Modification of Eagle's 培地 (DMEM)、4.5 g/L グルコース、ピルビン酸ナトリウム含有、フェノールレッド、L-グルタミン不含
- ・ ウシ胎児血清 (FBS)
- ・ ウシ胎児血清、charcoal/dextran 処理, triple 0.1 μ m sterile filtered (charcoal/dextran 処理 FBS) [Hyclone, Cat. No. SH30068.03]
- ・ 10x トリアプシン、2.5% in Hank's balanced salt solution (HBSS)、Ca、Mg、フェノールレッド不含
- ・ ペニシリン/ストレプトマイシン 5000IU 溶液 (Pen-Strep)、ペニシリン、5000 μ g/mL ストレプトマイシン

*1 UC Davis, Office of Research Technology Transfer Services 1850 Research Park Drive, Suite 100 Davis, CA 95618, (530) 754-8649, E-mail: msdenison@ucdavis.edu

*2 Xenobiotic Detection Systems, Inc. 1601 E Geer St # S Durham, NC 27704, (919) 688-4804, E-mail: info@dioxius.com

- ・ リン酸緩衝液 (PBS, 1x) Ca、Mg 不含
- ・ Gentamycin Sulfate (G418)、50 mg/mL
- ・ L-グルタミン、29.2 mg/mL

2.2 試薬^{*3}

(1) ルシフェラーゼ測定用試薬

- ・ 5x Lysis 溶液 [Promega, Cat. No. E1531]
- ・ Luciferase Assay System (10-Pack) [Promega Cat. No. E1501]

(2) 溶媒

- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5)

※被験物質を溶解可能かつ細胞培養液と混和可能な他の溶媒も使用可能である。DMSO、水およびエタノール (95% 以上) 等が推奨される。被験物質とコントロールは、同一の 100% 溶媒に溶解した後、適切な濃度まで培養液で希釈して用いる。溶媒の培地中最終濃度は細胞毒性を示さず、測定結果に影響を与えない事が確認済みの濃度以下とする。DMSO を用いる場合は、最終濃度 1.0% 以下とする。本稿では、溶媒として DMSO を用い、培地中最終濃度 1.0% で添加する場合について記載した。

(3) 陽性コントロール化合物

- ・ アゴニスト・アンタゴニストアッセイ共通: 17 β -estradiol (E2, CAS No. 50-28-2)
- ・ アゴニストアッセイ: *p,p'*-methoxychlor (Meth, CAS No. 72-43-5)
- ・ アンタゴニストアッセイ: Raloxifene (Ral, CAS No. 84449-90-1), Tamoxifen (Tam, CAS No. 10540-29-1)

2.3 器具・機器

- ・ マイクロプレートルミノメーター: Berthold Orion L, II [Titertek-Berthold, AL, USA] など

※細胞培養およびルシフェラーゼ化学発光測定に用いる一般的な器具および理化学機器を用いる。具体的な例について表 S1 (本書添付 CD に取載) に示す。

3 試験方法

本試験法は、化学物質による ER 活性化を検出するアゴニストアッセイと E2 による ER 活性化の阻害を検出するアンタゴニストアッセイから構成される。各アッセイは独立したプロトコル

*3 () 内には、本文中で用いた略称および CAS ナンバーを示す。また、一部の試薬については、[] 内に代表的なメーカー・カタログ番号を示したが、同等品であれば使用可能である。

ル^{15,16)}であるが、多くの操作は共通であることから、本稿では異なる操作が必要となる部分についてのみ個別の項目を設けて記載した。

3.1 細胞の準備

3.1.1 培地および関連試薬の調整

・RPMI 細胞増殖用培地 (PRMI)

RPMI 1640 に 0.9% Pen-Strep と 8.0% FBS を添加して RPMI 増殖培地を調整する。RPMI1640 500 mL ボトルで調整する場合、室温に戻した FBS 44 mL, Pen-Strep 5 mL を RPMI1640 500 mL ボトルに添加して混和する。

・エストロゲン除去 DMEM 測定用培地 (EFM)

DMEM に 4.5% charcoal/dextran 処理 FBS, 1.9% L-グルタミン, 0.9% Pen-Strep を添加して調整する。DMEM 500 mL ボトルで調整する場合、charcoal/dextran 処理 FBS 24 mL, L-グルタミン 10 mL および Pen-Strep 5 mL を DMEM 500 mL ボトルに添加して混和する。

・1x トリプシン溶液

10x トリプシン溶液は 10 mL ずつ分注して -20°C で保存する。10x トリプシン溶液 1 mL と 1x PBS 9 mL を 15 mL 滅菌済み遠心チューブで混和する (10 本調整する)。1x トリプシン溶液は、-20°C で保管する。

・1x 細胞溶解液

15 mL 遠心チューブに 5x Lysis 溶液 2 mL と脱イオン蒸留水 8 mL を混和して調整する。5x 溶液, 1x 溶液ともに -20°C で保管し、1 年以内に使用する。

・ルシフェラーゼ試薬

ルシフェラーゼ試薬は、ルシフェラーゼバッファーと凍結乾燥ルシフェラーゼ基質から構成される。未開封のルシフェラーゼ試薬は、-70°C で保管し 1 年以内に使用する。ルシフェラーゼバッファー 10 mL を凍結乾燥ルシフェラーゼ基質容器に加え、ボルテックスミキサーを用いて軽く攪拌して基質を溶解させる。溶解したら 15 mL 遠心チューブに分注して -20°C で保存し、一ヶ月以内に使用する。

3.1.2 細胞の増殖

細胞は、細胞培養フラスコを用いて CO₂ インキュベーター (温度: 37°C ± 1°C, 湿度: 90% ± 5% および CO₂ 濃度: 5.0% ± 1%) で単層培養する。培養中の細胞は、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞形態や接着の程度を毎日観察記録する。細胞培養の手順は、Good Cell Culture Practice ガイドラインに準拠して行う^{15,16)}。

- ① 凍結保存された BG1 を解凍して、マイクロピペットを用いて 2 mL クライオバイアルから 50 mL コニカル遠心チューブに移す。クライオバイアルを 1x PBS で 2 回リンスして、リ

ンス液も細胞と同じコニカル遠心チューブに移す。RPMI 20 mL をコニカル遠心チューブに添加し、1000 xg, 8 分間遠心してペレットにする。(ペレットにならない場合は、さらに 5 分遠心する。)

- ② 培地を吸引除去した後、RPMI 5 mL を添加し、1.0 mL セロロジカル・ピペットを用いて細胞塊が残らないように再懸濁する。細胞懸濁液を 25 cm² 細胞培養フラスコ (T25) に移して、80~90% コンフルエントに達するまで約 48~72 時間培養する。
- ③ T25 が、80~90% コンフルエントに達したら、PRMI を吸引除去し、1xPBS 5 mL を加え細胞を洗浄し、PBS を吸引除去した後、1x トリプシン溶液 2 mL を加え、CO₂ インキュベーターで 5~10 分間消化して細胞を剥離する。(細胞の剥離が不十分時は、さらに 2 分間インキュベートする。) 細胞が剥離したら、1x PBS 5 mL を加えて細胞を懸濁し、50 mL コニカルチューブに移す。T25 は、1x PBS 5 mL でさらに 1 回リンスして、リンス液も 50 mL コニカルチューブに移す。50 mL コニカルチューブに移した細胞懸濁液には、トリプシン活性を阻害するため、直ちに 20 mL RPMI を加え、遠心してペレットにして PRMI を吸引除去した後、RPMI 10 mL で再懸濁する。細胞懸濁液を 75 cm² 細胞培養フラスコ (T75) に移して、80~90% コンフルエントに達するまで約 48~72 時間培養する。
- ④ T75 が、80~90% コンフルエントに達したら、上述と同様に 1x トリプシン 2 mL で細胞を剥離した後、20 mL RPMI に再懸濁して 150 cm² 細胞培養フラスコ (T150) に移してさらに約 48~72 時間培養する。
- ⑤ T150 が、80~90% コンフルエントに達したら、同様に 3 mL 1x トリプシンで細胞を剥離した後、40 mL RPMI に再懸濁して T1502 本に各 20 mL ずつ移してさらに約 48~72 時間培養する。

3.1.3 アッセイ用細胞の前培養

試験に用いる細胞は、エストロゲン非存在下で前培養を行う。

T150 2 本の細胞を 4 本の T150 に分割し、うち 2 本を測定用として EFM で培養し、うち 2 本は継代用として RPMI で培養を行う。EFM で培養する測定用細胞については、RPMI のコンタミに十分注意する。

(1) 細胞懸濁液の調整

80~90% コンフルエントに達した T150 2 本それぞれについて、PRMI を吸引除去し、1xPBS 5 mL を加え細胞を洗浄した後、1xPBS を吸引除去して 1x トリプシン 3 mL を添加して前述同様に細胞を剥離する。細胞が剥離したら、片方の T150 に 1xPBS 5 mL を加えて細胞を懸濁し、もう一方の T150 に移す。T150 2 本分の細胞懸濁液を 50 mL コニカルチューブに移した後、1xPBS 5 mL で同様の操作により両方のフラスコをリンスして、リンス液を 50 mL コニカルチューブに移す。50 mL コニカルチューブに移した細胞懸濁液には、トリプシン活性を阻害するため、直ちに EFM 20 mL を加える。一度、遠心してペレットにし、培地を吸引除去した後、

EFM 4 mL に再懸濁する。

(2) 継代用細胞

T150 2 本に RPMI 20 mL を分注し、220 μ L G418 を添加し、上記で準備した細胞懸濁液 1 mL を加えて培養する。G418 添加 24 時間後に培養液を交換して、レポータープラスミドを発現していない死細胞を除去する。交換後の培養液に、G418 を添加する必要はない。80~90% コンフルエントに達するまで約 48~72 時間培養を行い、前述に従い継代する。

(3) 測定用細胞

- ① T150 2 本に EFM 20 mL を分注し、150 μ L G418 を添加し、上記で準備した細胞懸濁液 1 mL を加えて培養する。G418 添加 24 時間後に培養液を交換して、レポータープラスミドを発現していない死細胞を除去する。交換後の培養液に、G418 を添加する必要はない。80~90% コンフルエントに達するまで約 48~72 時間培養する。
- ② 測定用細胞が、80%~90% コンフルエントに達したら、上述と同様に 1x トリプシン 3 mL で細胞を剥離した後、50 mL コニカル遠心チューブを用いてエストロゲン除去 DMEM 20 mL に再懸濁し、細胞懸濁液 15 μ L を分取して、血球計算板を用いて細胞密度を計測し、結果をもとに 200,000 cells/mL になるように EFM を加えて希釈する。
- ③ 200,000 cells/mL に調整した細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに 200 μ L/ウェル (40,000 cells/ウェル) 播種して、19~24 時間前培養する。前培養は最大 48 時間以内とする。測定に用いないウェルには、EFM 200 μ L のみを加える。
- ④ 通常、80~90% コンフルエントの T150 2 本分の細胞で、96 ウェルプレート 3~4 枚分の測定が実施可能である。

3.1.4 細胞の安定性

安定な測定結果を得るため、凍結ストックから起眠した細胞は、RPMI 細胞増殖用培地にて数回継代を行う。また、30 代以上継代した細胞は測定には用いない。BG1Luc4E2 細胞は、約 3 カ月で 30 代となる。

3.1.5 細胞生存率の目視判定

培養後の 96 ウェルプレートはプロットングペーパーに転倒して培養液を除去する。各ウェルを 1x PBS 50 μ L で洗浄し、すぐに除去する。倒立顕微鏡を用いて全てのウェルの細胞を観察し、表 1 に示す基準に従いスコアを付ける。

各スコアに相当する細胞の観察例は、ICCVAM ウェブサイトに掲載されている "Visual Observation Cell Viability Manual"¹⁷⁾ を参考にすると良い。また、バリデーション試験における検討から、目視判定スコアが 1 となる場合、一般的に用いられる定量的評価法により細胞生存率が 80% 以上、目視判定スコアが 2 以上の場合、細胞生存率が 80% 以下となることが確認されている¹⁸⁾。

表 1 細胞生存率の目視判定スコア

細胞生存率スコア	細胞の状況
1	細胞密度、形態とも正常である。
2	細胞形態に変化が認められる。もしくは、細胞間に若干、隙間がある。
3	細胞形態に変化が認められる。もしくは、細胞間に大きな隙間がある。
4	細胞が、僅かしか (もしくは、全く) 認められない。
P	被験物質の析出が認められる。

3.2 コントロールの準備

下記では、◆は、アゴニストアッセイ、◇は、アンタゴニストアッセイで用いる試薬を示す。

3.2.1 ストック溶液の準備

- ◆ 1.0×10^{-2} μ g/mL E2 ストック溶液
 - ① E2 10 mg/mL 100% DMSO 溶液を調整する。
 - ② ①で調整した E2 溶液 10 μ L に 990 μ L の DMSO を加えてボルテックスで撹拌する。
 - ③ ②をさらに 2 回繰り返して 1.0×10^{-2} μ g/mL 溶液を調整する。
 - ◇ 5.0×10^{-3} μ g/mL E2 ストック溶液
 - ① 1.0×10^{-2} μ g/mL E2 ストック溶液を 100% DMSO で 2 倍希釈する。
 - ◆ 313 μ g/mL Meth ストック溶液
 - ① Meth 10 mg/mL 100% DMSO 溶液を調整する
 - ② ①で調整した Meth 溶液 94 μ L に DMSO 2906 μ L を加えてボルテックスで撹拌する。
 - ◇ 2.5 μ g/mL Ral ストック溶液
 - ① Ral 10 mg/mL 100% DMSO 溶液を調整する。
 - ② ①で調整した Ral 10 mg/mL 溶液 10 μ L に DMSO 990 μ L を加え 100 μ g/mL 溶液を調整する。
 - ③ ②で調整した Ral 100 μ g/mL 溶液 150 μ L に DMSO 2850 μ L 加え 5 μ g/mL 溶液を調整する。
 - ④ ③で調整した Ral 5 μ g/mL 溶液 1.5 mL に DMSO 1.5 mL を加え 2.5 μ g/mL 溶液を調整する。
- ※各物質の DMSO ストック溶液は、室温で約 3 以内もしくは、各試薬の分析証明により定められた有効期限内に使用する。

3.2.2 用量設定試験で用いる標準液の調整

- ◆◇ DMSO 標準液: 13 mm ガラス試験管を用いて、DMSO 10 μ L を EFM 1000 μ L と混合する。
- ◆アゴニストアッセイ用 E2 標準液
 - ① 4 mL コニカルチューブを用いて、#1 から #4 の希釈系列を調整する。

- #1 1.0×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック 6 μL + 100% DMSO 6 μL
 #2 1.0×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック 6 μL + 100% DMSO 18 μL
 #3 #2 E2 溶液 6 μL + 100% DMSO 18 μL
 #4 #3 E2 溶液 6 μL + 100% DMSO 18 μL

- ② 13 mm ガラス試験管を4本用意して、それぞれに600 μL の EFM を準備し、①で調整した #1~#4 の E2 希釈系列をそれぞれ6 μL 加えて、アッセイ用標準液を調整する。
 ※E2 標準液の最終濃度は、それぞれ 1.84×10^{-10} , 4.59×10^{-11} , 1.15×10^{-11} , 2.87×10^{-12} M となる。

◇アゴニストアッセイ用 Ral/E2 標準液

- ① 4 mL コニカルチューブを用いて、#1~#4 の Ral 希釈系列を調整し、#2~#4 を用いる。
 #1 6.25×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液: 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral ストック溶液 250 μL + DMSO 750 μL
 #2 3.13×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液: 6.25×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral 溶液 500 μL + DMSO 500 μL
 #3 7.81×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液: 3.13×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral 溶液 250 μL + DMSO 750 μL
 #4 1.95×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液: 7.81×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral 溶液 125 μL + DMSO 375 μL
 ② #2~#4 の Ral 溶液各 500 μL と 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック溶液 500 μL を混合する
 ③ 13 mm ガラス試験管を3本用意して、それぞれに600 μL の EFM を準備し、②で調整した #2~#4 の Ral/E2 溶液をそれぞれ6 μL 加えて、アッセイ用標準液を調整する。
 ※Ral/E2 標準液の最終濃度は、それぞれ Ral 3.06×10^{-9} , 7.67×10^{-10} , 1.92×10^{-10} M (E2 9.18×10^{-11} M 共存) となる。

3.2.3 本試験で用いる標準液の調整

◆DMSO 標準液: DMSO 10 μL を EFM 1000 μL と混合する。

◆E2 標準液

- ① 4 mL コニカルチューブを用いて、11段階の2倍希釈系列を調整する。

- #1 1.0×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック 6 μL
 #2 1.0×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック 6 μL + DMSO 6 μL
 #3 #2 で調整した E2 溶液 6 μL + 100% DMSO 6 μL
 #4~#11 #3 と同様に2倍希釈系列を調整

- ② 13 mm ガラス試験管を11本用意して、それぞれに600 μL の EFM および①で調整した11段階(#1~#11)のE2希釈系列をそれぞれ6 μL 加えて、試験用標準液とする。
 ※E2の最終濃度範囲は、 3.67×10^{-10} から 3.59×10^{-13} M となる。

◆Meth 標準液: 13 mm ガラス試験管を用いて、313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Meth ストック 10 μL を EFM 1000 μL と混合する。※Meth 最終濃度は、 9.06×10^{-9} M となる。◇DMSO 標準液: DMSO 8 μL を EFM 800 μL と混合する。◇E2 標準液: 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック溶液 4 μL および DMSO 4 μL を EFM 800 μL と混合する。※E2 最終濃度は、 9.18×10^{-11} M となる。

◇Ral/E2 溶液

- ① 4 mL コニカルチューブを用いて、下記9段階の2倍希釈系列を各500 μL 調整する。
 #1 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral ストック溶液 500 μL
 #2 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ral ストック溶液 500 μL + DMSO 500 μL
 #3 #2 で調整した Ral 溶液 500 μL + DMSO 500 μL
 #4~#9 #3 と同様に2倍希釈系列を調整
 ※#9は、調整後500 μL を除去して500 μL にする。

- ② #1~#9 の Ral 溶液各 500
- μL
- と
- 5×10^{-3}
- $\mu\text{g}/\text{mL}$
- E2 ストック溶液 500
- μL
- を混合する。

◇Tam/E2 溶液: 2.5 mg/mL Tam 溶液を調整し、 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ E2 ストック溶液と1対1の割合で混合する。◇Ral/E2 標準液, Tam/E2 標準液: 13 mm ガラス試験管を用意して、それぞれに600 μL の EFM を準備し、上記で調整した溶液をそれぞれ6 μL 加えて、試験用標準液とする。※Ral/E2 標準液の最終濃度は、Ral 濃度範囲 3.67×10^{-10} から 3.59×10^{-13} M (E2 9.18×10^{-11} M 共存) となる。Tam/E2 標準液の最終濃度は、Tam 3.36×10^{-6} M (E2 9.18×10^{-11} M 共存) となる。

3.3 被験物質の準備

被験物質溶液は、媒体中での安定性が確認されていない場合には、調整後24時間以内に使用する。

3.3.1 アゴニスト試験

(1) 用量設定試験

- ① まず始めに100 mg/mL DMSO 溶液を調整する。ボルテックスにより攪拌して、被験物質が溶解しない場合は、1/10濃度(10 mg/mL)の溶液を再調整し、溶解するまで1/10ずつ濃度を下げて最大溶解濃度溶液を調整する。
 ② 最大溶解濃度を1段階目として7段階の10倍希釈系列4 mL コニカルチューブを用いて調整する。
 ③ 13 mm ガラス試験管を7本用意して、それぞれに600 μL の EFM を準備し、被験物質の最大溶解濃度溶液および①で調整した7段階の被験物質希釈系列を各6 μL 加える。

(2) 本試験

- ① 用量設定試験結果をもとに決定した最大試験濃度および希釈倍率に従って、11段階のDMSO希釈系列を4 mL コニカルチューブを用いて調整する。

- ② 13 mm ガラス試験管を11本用意して、それぞれに800 μLのEFMを準備し、①で調整した被験物質希釈系列を各8 μL加える。

3.3.2 アンタゴニスト試験

(1) 用量設定試験

- ① アゴニスト試験と同様に最大溶解濃度溶液を1段階目として7段階の10倍希釈系列を調整する。ただし、最大溶解濃度が、10 mg/mL以上の場合は、10 mg/mLを1段階目として7段階の10倍希釈系列を調整する。
- ② 13 mm ガラス試験管を11本用意して、それぞれに800 μLのEFMを準備し、①で調整した被験物質希釈系列を各4 μLと5×10⁻³ μg/mL E2ストック溶液4 μLを加える。

(2) 本試験

- ① 用量設定試験結果をもとに決定した最大濃度および希釈倍率に従って、11段階のDMSO希釈系列を4 mL コニカルチューブを用いて調整する
- ② 13 mm ガラス試験管を11本用意して、それぞれに800 μLのEFMを準備し、①で調整した被験物質希釈系列を各4 μLと5×10⁻³ μg/mL E2ストック溶液4 μLを加える。

3.4 各試験施設における背景データベースの構築

試験結果の採用基準を決定するためアゴニストアッセイおよびアンタゴニストアッセイそれぞれの標準物質とコントロールについて、本試験プレートデザインに従い少なくとも10回以上の実施日の異なる測定を行い背景データベースを構築する。4項で示す基準項目が背景データの標準偏差の2.5倍以内であれば試験結果を採用する。背景データベースには、以降の測定において基準を満たした試験結果を追加する。なお、測定機器等を変更した場合には、新たに背景データベースを構築する。

3.5 技術実証試験

試験施設の試験実施技術レベルを実証し、測定結果の信頼性を保証するため、背景データを整備した後、表2および3に示すアゴニストおよびアンタゴニストの実証物質の測定を実施し、各表に示した陽性陰性の結果が得られることを確認しなければならない。表に示すEC50もしくはIC50値は、参考情報であり同程度の値が得られれば良い。

それぞれの実証物質について、本試験プレートデザインに従い少なくとも実施日の異なる2回の測定を実施する。本試験における測定開始濃度は濃度設定試験結果をもとに決定する。2回の試験結果の判定が一致しない、もしくは1回の試験結果が判定不能であった場合には追加測定を実施する。それぞれの実証物質について表に示す判定により技術レベルの実証を行う。実証試験は、新たに試験を実施する全ての試験者が必ず実施する。

表2 アゴニストアッセイ技術実証物質

Substance	CAS RN*	Expected Response*	BGLuc ER TA Mean EC50 (M) ^b	MeSH Chemical Class ^c	Product Class ^d
Ethyl paraben	120-47-8	POS	2.48 × 10 ⁻⁵	Carboxylic Acid, Pheno	Pharmaceutical, Preservative
Kaempferol	520-18-3	POS	3.99 × 10 ⁻⁶	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	POS	1.98 × 10 ⁻⁶	Carboxylic Acid, Ester, Phthalic Acid	Plasticizer, Industrial Chemical
Apigenin	520-36-5	POS	1.85 × 10 ⁻⁶	Heterocyclic Compound	Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate
Daidzein	486-66-8	POS	8.71 × 10 ⁻⁷	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Bisphenol A	80-05-7	POS	5.33 × 10 ⁻⁷	Phenol	Chemical Intermediate, Flame Retardant, Fungicide
Genistein	446-72-0	POS	2.71 × 10 ⁻⁷	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product, Pharmaceutical
Coumestrol	479-13-0	POS	8.77 × 10 ⁻⁸	Heterocyclic Compound	Natural Product
17α-Estradiol	57-91-0	POS	1.54 × 10 ⁻⁹	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Estrone	53-16-7	POS	2.57 × 10 ⁻¹⁰	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	3.34 × 10 ⁻¹¹	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical, Veterinary Agent
17α-Ethinyl estradiol	57-63-6	POS	7.31 × 10 ⁻¹²	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Atrazine	1912-24-9	NEG	-	Heterocyclic Compound	Herbicide
Corticosterone	50-22-6	NEG	-	Steroid	Pharmaceutical
Linuron	330-55-2	NEG	-	Urea	Herbicide
Spirolactone	52-01-7	NEG	-	Lactone, Steroid	Pharmaceutical

* : CAS RN : Chemical Abstracts Service Registry Number

† : NEG : negative, POS : positive (LUMI-CELL ER (BGLuc ER TA) 試験法の Independent Scientific Peer Review Panel Report で報告された ICCVAM コンセンサスデータ)

‡ : BGLuc ER TA バリエーション試験参加施設の平均 EC50 値

§ : 米国国立医学図書館の Medical Subject Headings (MeSH) に基づく分類 (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

¶ : 米国国立医学図書館の Hazardous Substances Database に基づく分類 (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

3.6 発光強度の測定

発光強度は、一般的なインジェクター付きのルミノメーターを用いて300~650 nmの範囲で測定を行う。各ウェルの発光強度は、ウェルあたりのRLU (Relative Light Units) で記録する。

表3 アンタゴニストアッセイ技術実証物質

Substance	CAS RN*	Expected Response ^a	BGLuc ER TA Mean IC50 (M) ^b	MeSH Chemical Class ^c	Product Class ^d
Tamoxifen	10540-29-1	POS	8.17 × 10 ⁻⁷	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	2.08 × 10 ⁻⁷	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
Raloxifene HCl	82640-04-8	POS	1.19 × 10 ⁻⁹	Hydrocarbon (Cyclic)	Pharmaceutical
17 α -Ethinyl estradiol	57-63-6	NEG	-	Steroid	Pharmaceutical, Veterinary Agent
Apigenin	520-36-5	NEG	-	Heterocyclic Compound	Dye, Natural Product, Pharmaceutical Intermediate
Chrysin	480-40-0	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Coumestrol	479-13-0	NEG	-	Heterocyclic Compound	Natural Product
Genistein	446-72-0	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product, Pharmaceutical
Kaempferol	520-18-3	NEG	-	Flavonoid, Heterocyclic Compound	Natural Product
Resveratrol	501-36-0	NEG	-	Hydrocarbon (Cyclic)	Natural Product

* : CAS RN : Chemical Abstracts Service Registry Number
^a : NEG : negative, POS : positive (LUMI-CELL ER (BGLuc ER TA) 試験法の Independent Scientific Peer Review Panel Report で報告された ICCVAM コンセンサスデータ)
^b : BGLuc ER TA ナリレーション試験参加施設の平均 IC50 値
^c : 米国立医学図書館の Medical Subject Headings (MeSH) に基づく分類 (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)
^d : 米国立医学図書館の Hazardous Substances Database に基づく分類 (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>)

3.7 用量設定試験

用量設定試験では、結果をもとに本試験における最大測定濃度および希釈系列の希釈倍率（本試験では、5倍もしくは2倍を用いる）を決定する。

アゴニスト試験、アンタゴニスト試験のいずれにおいても、用量設定試験および本試験それぞれで細胞生存率の評価を行う。細胞生存率の評価は、目視判定によるスコアリング法（3.1.5参照）の他、一般的な定量的評価法を用いることも可能である。目視判定によるスコアが2以上もしくは細胞毒性試験により20%以上の生存率阻害を引き起こす被験物質濃度は、評価に用いない。

3.7.1 プレートデザイン

アゴニストアッセイ、アンタゴニストアッセイそれぞれの用量設定試験における96ウェルプレートのプレートデザインを図1、2に示す。用量設定試験では、1プレートあたり6被験物質の測定が可能である。

3.1.3項で調整した、細胞播種後19~24時間前培養した96ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡で細胞生存率について目視判定を行い、全てのウェルの細胞生存

率スコアが1と判定されたプレートのみを測定に用いる。

プロテイングペーパーの上にプレートを転倒して、軽く叩きつけてウェルに残った培養液を除去する。

3.2および3.3項で調整したコントロールおよび被験物質を含むEFMを図1、2のプレートデザインに従って、各200 μ l/ウェルの用量で添加し、細胞への化学物質暴露を行い、インキュベーターで19~24時間培養してルシフェラーゼ活性を測定する。

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

図1 アゴニストアッセイ用量設定試験における96ウェルプレートデザイン
 VC : 媒体コントロール (DMSO, 1% v/v EFM)
 E2-1~E2-4* : E2標準希釈系列
 TSx-1~TSx-7* : 被験物質希釈系列 (xは、被験物質番号)
 *E2, 被験物質の-以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも-1が最高濃度、-2以下は数字の順に低濃度

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

図2 アンタゴニストアッセイ用量設定試験における96ウェルプレートデザイン
 VC : 媒体コントロール (DMSO, 1% v/v EFM)
 E2 : E2コントロール (9.18 × 10⁻¹¹M)
 Ral-1~Ral-3* : Ral/E2標準希釈系列
 TSx-1~TSx-7* : 被験物質希釈系列 (xは、被験物質番号)
 *Ral, 被験物質の-以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも-1が最高濃度、-2以下は数字の順に低濃度
 **VC以外の全てのウェルは、E2 9.18 × 10⁻¹¹M 共存

3.7.2 アゴニスト用量設定試験の評価

アゴニスト本試験における測定開始（最大）濃度、希釈倍率を以下に従って決定する。

- 全ての測定濃度においてDMSOコントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える反応 (mean+3SD) が検出されない場合、本試験では溶解可能な最大濃度を開始濃度として希釈倍率2倍で11濃度の測定を行う。
- いずれかの測定濃度においてDMSOコントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える反応 (mean+3SD) が検出された場合、本試験では用量設定試験で最大反応が検出された濃度の10倍以上高い濃度を測定開始濃度とする。希釈倍率は、用量設定試験結果から、2倍希釈で用量反応曲線を完全にカバー出来ると判断できる場合には2倍、そうでない場合は5倍とする。
- 用量設定試験で2相性の反応を示した場合、本試験における測定では両方の相を含むように開始濃度および希釈倍率を決定する。

3.7.3 アンタゴニスト用量設定試験の評価

アンタゴニスト本試験における測定開始（最大）濃度、希釈倍率を以下に従って決定する。

- 全ての測定濃度においてE2コントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える阻害 (mean-3SD) が検出されない場合、本試験では溶解可能な最大濃度を開始濃度として希釈倍率2倍で11濃度の測定を行う。
- いずれかの測定濃度においてE2コントロールの平均値から標準偏差の3倍を超える阻害 (mean-3SD) が検出された場合、本試験における開始濃度は、①用量設定試験において最も強い阻害反応が認められた濃度、②最大溶解濃度、③細胞毒性を示す最も低い濃度、のいずれかに従って決定する。希釈倍率は用量設定試験結果から、2倍希釈で用量反応曲線を完全にカバー出来ると判断できる場合には2倍、そうでない場合は5倍とする。

3.8 本試験

アゴニストアッセイ、アンタゴニストアッセイそれぞれの本試験におけるプレートデザインを図3、4に示す。本試験では、96穴プレート1プレートあたり2被験物質の測定が可能である。

3.1.3項で調整した、細胞播種後19~24時間前培養した96ウェルプレートインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡で細胞生存率について目視判定を行い、全てのウェルの細胞生存率スコアが1と判定されたプレートのみを測定に用いる。

プロテティングペーパーの上にプレートを転倒して、軽く叩きつけてウェルに残った培養液を除去する。

3.2および3.3項で調整したコントロールおよび被験物質を含むEFMを図3、4のプレートデザインに従って、各200μL/ウェルの用量で添加し、細胞への化学物質曝露を行い、インキュベーターで19~24時間培養してルシフェラーゼ活性を測定する。

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

図3 アゴニストアッセイ本試験における96ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1%v/v EFM.)
 Meth : p,p' methoxychlor コントロール
 E2-1~E2-11* : E2 標準希釈系列
 TSx-1~TSx-11* : 被験物質希釈系列 (xは、被験物質番号)
 *E2, 被験物質の-以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも-1が最高濃度、-2以下は数字の順に低濃度

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

図4 アンタゴニストアッセイ本試験における96ウェルプレートデザイン

VC : 媒体コントロール (DMSO, 1%v/v EFM.)
 E2 : E2 コントロール (9.18×10⁻¹¹M)
 Tam : Tam/E2 標準液
 Ral-1~Ral-9* : Ral/E2 標準希釈系列
 TSx-1~TSx-11* : 被験物質希釈系列 (xは、被験物質番号)
 *Ral, 被験物質の-以降の数字は、濃度段階を示しており、いずれも-1が最高濃度、-2以下は数字の順に低濃度
 **VC以外の全てのウェルは、E2 9.18×10⁻¹¹M 共存

4 試験結果の採用基準

4.1 アゴニスト用量設定試験

誘導率 : 各プレートの誘導率としてE2標準の平均最大RLUと媒体 (DMSO) コントロールの平均RLUの比を求める。通常、誘導率は5倍程度となるが、4倍以上であれば採用す

る。

- ・DMSO コントロール：媒体コントロール RLU 値は、背景データにおける媒体コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。
- ※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.2 アゴニスト本試験

用量設定試験の採用基準に加えて下記の基準を満たさなければならない。

- ・E2 標準曲線：E2 標準の濃度反応曲線がシグモイド曲線を示し、3 測定濃度以上が直線領域に含まれること。
- ・Meth 陽性コントロール：Meth コントロールの平均 RLU が、DMSO コントロールの平均値より標準偏差の 3 倍以上高い値であること。
- ※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.3 アンタゴニスト用量設定試験

- ・阻害率：各プレートの阻害率は、Ral/E2 標準の平均最大 RLU と Ral/E2 標準の平均最小 RLU との比を求める。通常、阻害率は通常 5 倍程度となるが、3 倍以上であれば採用する。
- ・E2 コントロール：E2 コントロール RLU 値は、背景データにおける E2 コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。
- ・DMSO コントロール：媒体コントロール RLU 値は、背景データにおける媒体コントロール RLU 値の平均から標準偏差の 2.5 倍以内でなければならない。
- ※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

4.4 アンタゴニスト本試験

用量設定試験の採用基準に加えて下記の基準を満たさなければならない。

- ・Ral/E2 標準曲線：Ral/E2 標準の濃度反応曲線がシグモイド曲線を示し、3 測定濃度以上が直線領域に含まれること。
- ・Tam/E2 陽性コントロール：Tam/E2 コントロールの平均 RLU が、E2 コントロールの平均値より標準偏差の 3 倍以上低い値であること。
- ※いずれかの採用基準を満たさない結果は、評価対象外として再試験を実施する。

5 データ解析と陽性（陰性）判定基準

5.1 データ解析

ルミノメーター測定値を解析テンプレートのスプレッドシートに張り付けた後、解析から除外すべきウェルが無いかを確認する。

以下には、スプレッドシートを用いた解析の概略を示す。詳細については、本書添付 CD のスプレッドシート入力例および ICCVAM ウェブサイトで公開されているプロトコル^{14,19}を参考にする。

5.2 用量設定試験

5.2.1 アゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・被験物質の平均 EC50 値を計算する

5.2.2 アンタゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・Ral/E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・被験物質の平均 IC50 値を計算する

5.3 本試験

5.3.1 アゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・E2 標準および被験物質の平均 EC50 値を計算する
- ・Meth 標準の平均補正 RLU を計算する

5.3.2 アンタゴニストアッセイ

- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を計算する
- ・DMSO 媒体コントロールの平均値を各ウェルの測定値から除してデータの正規化を行う
- ・Ral/E2 標準の平均誘導率を計算する
- ・Ral/E2 標準および被験物質の平均 IC50 値を計算する
- ・Tam/E2 標準の平均補正 RLU を計算する
- ・E2 標準の平均値を計算する

5.4 陽性（陰性）判定基準

5.4.1 アゴニストアッセイ

(a) 陽性

- ・ベースラインから正（増加）方向の反応を経て定常状態もしくはピークとなる用量反応曲線を示す被験物質を陽性と判定する。場合によっては、測定濃度範囲に陽性反応の用量反応曲線の一部のみが含まれる物質も陽性と判定する。
- ・反応の直線部分は、ベースラインとなる測定点を除く標準偏差のエラーバーが重ならない3つ以上の測定点を含む。
- ・測定された反応の最大値が基準となるエストロゲンの最大反応の20%以上である。（エストロゲンの最大反応を10000RLUに調整した場合、2000RLU以上の反応が検出されなければならない。）
- ・可能であればEC50値を算出する。

(b) 陰性

- ・全ての測定濃度における補正RLUが、DMSOコントロールの平均RLU値から標準偏差の3倍以内であった場合は陰性と判定する。

(c) 判定不能

- ・測定結果が、陽性・陰性いずれの基準にも適合しない場合には、判定不能として再試験を実施する。

5.4.2 アンタゴニストアッセイ

(a) 陽性

- ・被験物質の用量反応曲線が、ベースラインから負（減少）方向の反応を示す。
- ・反応の直線部分が標準偏差のエラーバーが重ならないベースラインとなる測定点を除く3つ以上の測定点を含む。
- ・基準となるエストロゲンの最大反応（Ral/E2系列の最大反応）の80%以下までの阻害効果が検出される。（エストロゲンの最大反応を10000RLUに調整した場合、8000RLU以下の反応が検出されなければならない。）
- ・細胞毒性を示さない最高被験物質濃度は、 1×10^{-5} M以下でなければならない。
- ・可能であればIC50値を算出する。

(b) 陰性

- ・ 1×10^{-5} M以下の全ての測定濃度における補正RLUがエストロゲンの最大反応の80%以下とならなかった場合は陰性と判断する。

(c) 判定不能

- ・測定結果が、陽性・陰性いずれの基準にも適合しない場合には、判定不能として再試験を実施する。

5.5 EC50/IC50の算出

陽性反応が検出された場合には、アゴニスト試験におけるEC50（50%効果濃度）およびアンタゴニスト試験におけるIC50（50%阻害濃度）を測定された濃度反応データから求める。

1濃度以上で陽性反応を示した被験物質についてHill式もしくは適切な他の反応モデル式を用いて求める。

Hill式は、以下に示す被験物質濃度と反応における典型的なシグモイド曲線を表す4パラメータのロジスティック数学モデルである。

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

Y：反応（すなわちRLU）

X：対数濃度

B：最小反応

T：最大反応

logEC50（もしくはlogIC50）：50%反応を示す対数濃度

Hillslope：カーブの傾きを示すパラメータ

測定結果がモデルに最も良く適合する各パラメータを適当な統計ソフトウェア（Graphpad Prism [GraphPad Software, Inc, CA, USA] 等）を用いて計算する。

5.6 はずれ値の判定

EC50/IC50の算出においては、Qtest等^{14,15)}によるはずれ値の統計学的判断による使用不可のウェルの判定を実施することが推奨される。また、E2標準に関しては、補正RLU値が背景データベースの該当濃度における補正RLUから20%以上逸脱する場合は、はずれ値として解析から除外する。

5.7 結果報告書

結果報告書には、以下の事項を記載する。

被験物質および標準物質：

- 識別データ（CAS番号、製造者、純度、既知の不純物、ロット番号など）
- 物理化学的特性（揮発性、安定性、溶解性など）
- 混合物の場合は、成分や相対比など

細胞：

- 細胞の供給源
- 解凍時の細胞継代数
- 解凍後の細胞継代数

-細胞維持のための培養に関する情報

試験条件:

- 細胞毒性データと媒体への溶解限度
- 被験物質の濃度
- 媒体の最終暴露濃度と被験物質添加量
- インキュベーション温度, 湿度, CO₂濃度
- 暴露期間
- 被験物質暴露時の細胞密度

試験結果採用基準:

用量設定試験:

- DMSO コントロール RLU 値 (平均値, SD, CV)
- 各プレートの誘導率, 阻害率
- E2 標準の RLU 値 (アンタゴニストアッセイのみ)
- 各プレートの採用・不採用判定結果 (不採用の場合は, 基準を逸脱した項目)

本試験:

- DMSO コントロール RLU 値 (平均値, SD, CV)
- 各プレートの誘導率, 阻害率
- 陽性コントロールの結果
- 標準物質の結果
- E2 標準の RLU 値 (アンタゴニストアッセイのみ)
- 各プレートの採用・不採用判定結果 (不採用の場合は, 基準を逸脱した項目)

結果:

- 発光シグナルの実測定値および補正值
- 本試験における各被験物質の希釈倍率 (1:2 または 1:5)
- 被験物質の陽性・陰性判定結果 (陽性, 陰性もしくは判定不能)
- IC50/EC50 値 (計算可能な場合)
- 統計的解析 (SEM, SD, CV または 95%CI などのエラー尺度を対象とした統計解析を実施した場合, 解析の対象としたエラー尺度と計算方法などについて記載)

考察:

結論:

6 適用限界

本試験法で評価される, ER を介した転写活性化過程は, 内分泌かく乱による健康影響の重要なメカニズムの一つと考えられているが, この他にも重要な内分泌かく乱メカニズム¹⁹⁾が存在し

ており, 本試験の結果を直接 *in vivo* に外挿することは出来ない。本試験の結果は, 内分泌かく乱による有害健康影響を有する可能性のある化学物質のスクリーニングまたは詳細評価の優先順位付け, もしくは, 内分泌かく乱性評価における証拠の重み付けアプローチに使用される。

本試験法では, 媒体 (DMSO 等) に溶解可能な化学物質であれば測定可能であるが, 媒体もしくは細胞培地と反応性を有する化学物質や強い細胞毒性物質は測定することは出来ない。

7 その他注意事項

化学発光は, 高い S/N 比が得られることから様々な測定に用いられている²⁰⁾。本試験では, ホタルルシフェラーゼ酵素を阻害する化学物質やタンパク安定化により発光強度を増強する作用のある化学物質は, 測定結果に影響を与える可能性がある²⁰⁾。また, 同種の測定系では 1 μM 以上の植物エストロゲンによりルシフェラーゼレポーター遺伝子の過活性化により受容体非介在性の発光シグナルが生じることが報告されている^{4,21)}。よって, 用量反応曲線の低濃度領域で真の活性が認められた場合であっても, 高濃度領域での活性については, 植物エストロゲン類似の過活性化や非特異的阻害の可能性について注意深く検討する必要がある²²⁾。

また, 本試験法のアンタゴニスト試験では, バリアーション試験において高濃度領域でのルシフェラーゼ活性の非特異的阻害が認められた¹²⁾ことから, 本試験法で評価可能な被験物質最大濃度は, 媒体への溶解性が良好かつ細胞毒性が認められない場合, アゴニスト試験では 1 mg/mL (約 1 mM), アンタゴニスト試験では 20 μg/mL (約 10 μM) である。

【参考文献】

- 1) OECD, Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD, Paris (2011)
- 2) E. Sonneveld *et al.*, *Toxicol. Sci.*, 89, 173 (2006)
- 3) J.M. Rogers *et al.*, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13, 67 (2000)
- 4) A. Escande *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459 (2006)
- 5) J.-A. Gustafsson, *Journal of Endocrinology*, 163, 379 (1999)
- 6) S. Ogawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243, 122 (1998)
- 7) E. Enmark *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 4258 (1997)
- 8) M. Takeyoshi *et al.*, *Toxicology Letters*, 126, 91 (2002)
- 9) P. Pujol *et al.*, *Cancer. Res.*, 58, 5367 (1998)
- 10) http://ccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/Bg1LucER-TA-TMER-Combined.pdf
- 11) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 457, OECD Publishing, Paris (2012)
- 12) <http://ccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/ERTA-TMER.htm>
- 13) http://ccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB1-AgonProtocol.pdf
- 14) http://ccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxB2-AntagProtocol.pdf