OECD/OCDE

2007/10/16

試験ガイドライン No.440

げっ歯類における子宮肥大試験：
エストロゲン様作用の短期スクリーニング試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2007), Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264067417-en.

©OECD(2007)

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

440

2007 年 10 月 16 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

げっ歯類における子宮肥大試験：エストロゲン様作用の短期スクリーニング試験

はじめに

1. OECD は 1998 年に内分泌かく乱物質のスクリーニングと試験のため、既存ガイドラインの改訂と新規ガイドラインの作成という、最重要の活動を開始した(1)。その活動の一つが、げっ歯類を用いた子宮肥大試験のガイドライン作成であった。このげっ歯類子宮肥大試験については、その後徹底的な有効性評価計画が実施され、その中で詳細な参考資料の編集(2)(3)と広範な試験機関内および試験機関間での検討が行われた。後者では、強い参照エストロゲン、弱いエストロゲン受容体活性剤、強いエストロゲン受容体拮抗剤および陰性参照物質を用いて、試験法の妥当性と再現性が示された(4)(5)(6)(7)(8)(9)。この試験ガイドライン 440 は、その有効性評価計画中に得られた経験とエストロゲン活性剤についての結果に基づくものである。

2. 子宮肥大試験は 1930 年代に始まった短期スクリーニング試験で(27)(28)、1962 年に初めて専門家委員会によってスクリーニング用に標準化された(32)(35)。本試験は子宮重量の増加または子宮肥大反応に基づくものであり（総説については 29 を参照）、化学物質が天然エストロゲン（17β-エストラジオールなど）の活性剤または拮抗剤としての生物活性を発揮する能力を評価するが、拮抗剤検出のための使用は活性剤のための使用よりもかなり少ない。子宮はエストロゲンに対して二通りに反応する。最初の反応は水分による膨潤で生じる重量増加であり、この反応後に組織の成長による重量増加が起きる(30)。ラットとマウスにおける子宮の反応は、質的には同じである。

3. この試験法は *in vivo* スクリーニング試験として使用でき、その適用は「内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み」（補遺 2）の関連の中でみることができる。この概念的枠組みの中で、子宮肥大試験は単一の内分泌メカニズム（エストロゲン様作用）に関してのデータを提供する *in vivo* 試験としてレベル 3 に含まれている。

4. 子宮肥大試験は、内分泌系に影響を与える可能性のある化学物質を特定するための *in vitro* および *in vivo* 試験の組合せに含めるように意図されており、最終的にはヒトの健康や環境に対するリスク評価を目指すものである。OECD 有効性評価計画では、強いエストロゲン活性剤と弱いエストロゲン活性剤の両方を用いて、この試験法が持つエストロゲン様化合物の特定性能を評価した(4)(5)(6)(7)(8)。このため、この試験法については試験機関内および試験機関間の良好な再現性に加え、エストロゲン活性剤に対する感度も十分に示されている。

5. 陰性化合物に関しては、有効性評価計画には子宮肥大試験と *in vitro* 受容体結合試験で陰性と報告されていた単一の「陰性」参照化学物質しか含まれていなかった。しかし、OECD の有効性評価計画とは別の追加試験データの評価が行われ、エストロゲン活性剤のスクリーニングとしての子宮肥大試験の特異度を更に裏付ける結果が得られている(16)。

最初に考慮すべき事項および限界

6. エストロゲン活性剤と拮抗剤はエストロゲン受容体αとβにリガンドとして作用し、受容体の転写活性をそれぞれ活性化または阻害する。これは生殖や発生に対する影響など有害な健康影響をもたらす可能性があるため、エストロゲン活性剤や拮抗剤の可能性のある化学物質を速やかに評価する必要がある。*in vitro* におけるリガンドのエストロゲン受容体（ER）に対する親和性やレポーター遺伝子の転写活性化は有用な情報であるが、有害性をもたらすいくつかの決定因子の一つにすぎない。その他の決定因子としては、体内に入ってからの代謝活性化や非活性化、標的組織への分布、体内からの排出などが含まれる（少なくともその一部は投与経路と試験対象の化学物質にもよる）。したがって、ある化学物質が活性を有する可能性は、その物質の吸収 - 分布 - 代謝 - 排泄（ADME）に関する特性からすでに適切な情報が得られていない限り、*in vivo* の関連条件下でスクリーニングする必要があるということになる。子宮組織、特に性周期が約 4 日の実験用げっ歯類の子宮組織は、エストロゲンの刺激に対する反応として急速かつ顕著な成長を示す。また、げっ歯類、特にラットは有害性確認のための毒性試験で広く用いられている。このため、げっ歯類の子宮は、エストロゲン活性剤と拮抗剤の *in vivo* スクリーニングにおける標的器官に適しているといえる。

7. このガイドラインは OECD の有効性評価試験で用いられたプロトコールに基づくもので、このプロトコールについては試験機関内および試験機関間での検討によって信頼性と再現性が示されている(5)(7)。現時点では二つの試験法、すなわち卵巣摘出（OVX）した成熟雌動物を用いる方法（OVX 成熟動物法）と、幼若な卵巣非摘出動物を用いる方法（幼若動物法）がある。OECD の有効性評価試験計画では、両方法の感度と再現性は同程度であることが示された。ただし、幼若動物は完全な視床下部 - 下垂体 - 性腺（HPG）軸を有しており、エストロゲン受容体だけでなく HPG 軸に影響する物質にも反応できることから、卵巣摘出動物に比べ、やや特異度は低いものの、より広範囲の検査に対応する。ラットの HPG 軸が機能的になるのは約 15 日齢で、それ以前では性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）などを投与しても思春期を促進することはできない。雌は思春期に達し始めると、膣開口前に無徴候の性周期を数回示す。このときには膣開口も排卵も起きないが、ホルモン変動がいくらか認められる。化学物質が HPG 軸を直接的または間接的に刺激すると、思春期早発、早期排卵、膣開口の促進が起きる。ただし、これをもたらすのは HPG 軸に作用する化学物質に限られるわけではなく、他より代謝エネルギーレベルが高い一部の飼料もエストロゲン様作用を持たないにもかかわらず成長を刺激し、膣開口を促進する。一方、OVX 成熟動物では HPG 軸が働いていないため、このような物質は子宮肥大反応を引き起こさないであろう。

8. 動物愛護の観点から動物の外科的前処置を避けるため、また、手術したにもかかわらず発情期の徴候を示したためその動物を使用しないといったことのないように（段落 30 参照）、幼若ラットを用いる方法を優先させる。

9. 子宮肥大反応は全てエストロゲン作用によるとは限らず、エストロゲン活性剤や拮抗剤以外の化合物でも反応を生じさせることがある。例えば、比較的高用量のプロゲステロン、テストステロン、種々の合成プロゲスチンは全て刺激性反応を引き起こす可能性がある(30)。このため、いずれの反応についても組織学的に膣の角化を確認した方がよいかもしれない(30)。しかし、通常は、子宮肥大試験の結果が陽性であれば反応の原因のいかんにかかわらず、更なる解明のための検討を開始する。エストロゲン様作用に関する追加の証拠は、ER 結合試験や転写活性化試験などの *in vitro* 試験から、また雌の思春期試験など、その他の *in vivo* 試験から得ることができよう。

10. *In vivo* スクリーニング試験としての子宮肥大試験の使用を考慮し、その有効性評価方法は動物愛護に配慮しつつ段階的試験戦略にも役立つものとした。すなわち、エストロゲン様作用（多くの化学物質における主たる懸念事項）検出の再現性と感度の厳格な有効性評価に

ついて努力が注がれた一方、抗エストロゲン作用の検出部分についてはほとんど努力が向けられなかった。明らかな（部分的なエストロゲン様作用によってあいまいにならない）抗エストロゲンプロファイルを有する物質は非常に限られているため、強力な活性を持つ抗エストロゲン物質については一つしか試験を行わなかった。したがって、この試験ガイドラインの記載は、エストロゲン様作用検出のためのプロトコールに限られたものである。拮抗剤検出用の試験法を記載したプロトコールは、ガイダンス文書に含まれている。純粋な抗エストロゲン活性を有する物質のための試験法の再現性と感度は、後日、当該試験法がある程度の期間にわたって日常的に用いられ、この作用様式を有する物質が更に特定されてから、より明確に示されるであろう。

11. 動物を用いる全ての手順は、動物管理に関する各国の基準に従うものとする。管理および取扱いに関する以下の記載は最低限守るべき基準であり、各国の規制が優先される。動物の人道的な取扱いに関する更なるガイダンスが OECD から出されている(25)。

12. 生きた動物を用いる全ての試験と同様、データが真に必要であることを試験開始前に確認することが必須である。データが要求される場合の例としては、以下の二つがある。

- 高暴露の可能性があるか（補遺 2、概念的枠組みのレベル 1）、エストロゲン様作用が示唆され（レベル 2）、そのような作用が *in vivo* で起きるかを調べる必要がある場合
- レベル 4 または 5 の *in vivo* 試験でエストロゲン様作用を示唆する影響がみられ、その影響がエストロゲン様メカニズムによるものであったことを証明するのに、*in vitro* 試験では明らかにできない場合

13. この試験ガイドラインの中で用いた定義を補遺 1 に示す。

試験の概要

14. 子宮肥大試験の感度は、視床下部 - 下垂体 - 卵巣軸が機能しておらず、そのため内因性循環エストロゲンレベルが低い動物の試験系に依存している。これによって、投与前子宮重量は低くなり、投与されたエストロゲンに対する反応幅は最大となる。この要件を満たす雌のげっ歯類におけるエストロゲン感受性の状態には、以下の二つがある。

i） 離乳後で思春期前の幼若雌動物
ii） 卵巣摘出後、子宮組織が退縮するまで適切な期間を置いた若齢成熟雌動物

15. 被験物質は毎日強制経口投与するか、皮下投与する。実験動物からなる少なくとも 2 投与群に、被験物質を段階的な用量で投与する（1 群 1 用量）（ガイダンスについては段落 33 参照）。投与は幼若動物法では 3 日間連続、OVX 成熟動物法では最低 3 日間連続とする。最終投与の約 24 時間後に動物を剖検する。エストロゲン活性剤については、投与群の平均子宮重量を溶媒群の重量と比較し、統計学的に有意な増加の有無を判定する。投与群における平均子宮重量の統計学的に有意な増加が、すなわちこの試験の陽性反応である。

試験方法

動物種の選択

16. 一般的に用いられている実験用げっ歯類の系統を使用してよい。例えば、有効性評価では Sprague-Dawley 系と Wistar 系のラットが用いられた。反応性が低いことが知られていたり、またはそれが疑われる系統は用いない。試験機関は、26 および 27 段落に述べる方法で、用いる系統の感受性を明らかにする。

17. 子宮肥大試験では 1930 年代からラットとマウスが日常的に用いられてきた。OECD 有効性評価試験はラットのみを用いて行われたが、これは両動物種が同等であることが予想され、したがって資源と動物を節約するために世界規模での有効性評価には一つの動物種で十分であるとの理解に基づくものであった。ラットは、大部分の生殖および発生毒性試験で用いられている動物種である。ただし、マウスについても膨大な背景データベースが存在することを考慮し、げっ歯類におけるこの子宮肥大試験ガイドラインの範囲を広げてマウスも試験動物種として用いるようにするため、限定的ながら追加の有効性評価試験がマウスを用いて行われた(16)。試験では資源と動物を節約するという当初の意図を守るため、橋渡し的な方法として被験物質数と参加試験機関数を限定し、サンプル試験をコード化しない方法を選択した。この橋渡し的な有効性評価試験により、卵巣摘出若齢成熟マウスにおける子宮肥大反応試験について、ラットとマウスで得られたデータは質的にも量的にも互いによく一致することが示されている。子宮肥大試験の結果を長期試験のための予備的なものとする場合、これは両試験で同じ系統および供給元の動物を使用できることを意味する。なお、この橋渡し的な方法が行われたのは OVX マウスのみで、報告書には幼若動物モデルの有効性評価のための頑健なデータがない。このため、現行の試験ガイドラインの範囲下ではマウスの幼若動物モデルを考慮しないものとする。

18. したがって、場合によってはラットの代わりにマウスを用いてもよいが、毒性学的、薬物動態学的、その他の基準に基づき、この動物種の選択理由を述べるものとする。また、マウスの場合にはプロトコールの修正が必要になるかもしれない。例えば、マウスの体重あたりの摂餌量はラットより多いため、マウス用の飼料中の植物エストロゲン含量はラット用より低めにする(9)(20)(22)。

<u>飼育および給餌条件</u>

19. 全ての手順は、実験動物の管理に関する各国の基準に従うものとする。管理および取り扱いに関する以下の記載は最低限守るべき基準であり、各国の規制がある場合にはそれが優先される。動物飼育室の温度は 22°C（約± 3°C の幅）とする。相対湿度は目標値を 50～60％とし、30％以上、70％を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。

20. 実験動物用飼料と飲水を自由に摂取させる。若齢成熟動物は個別飼育または群飼い（最大 3 匹まで）とする。幼若動物は日齢が若いことから、社会的な群飼いが推奨される。

21. 実験動物用飼料中の植物エストロゲン濃度が高いとげっ歯類の子宮重量を増加させ、子宮肥大試験に影響を与える可能性があることが知られている(13)(14)(15)。また、幼若動物を用いる場合、実験動物用飼料中の植物エストロゲン濃度や代謝エネルギーレベルが高いと思春期の早期化をもたらす場合もある。植物エストロゲンは主に実験動物用飼料中の大豆とアルファルファ産物に起因し、その濃度は標準的な実験動物用飼料でバッチごとに異なることが示されている(23)。また、摂取される飼料の量は体重によるため、体重は重要な変量であり、同じ飼料から実際に摂取される植物エストロゲンの量は動物種や日（週）齢によって異なる場合がある(9)。幼若雌ラットの場合、体重あたりの摂餌量は卵巣摘出若齢成熟雌動物の値の約 2 倍にもなり得る。また、若齢成熟マウスの体重あたりの摂餌量は、卵巣摘出若齢成熟雌ラットの値の約 4 倍にもなる。

22. ただし、飼料中の植物エストロゲンはある程度ならば許容可能で、試験の感度を低下させないことが子宮肥大試験の結果から示されている(9)(17)(18)(19)。一つの目安として、Sprague-Dawley 系および Wistar 系の幼若雌ラットの場合、植物エストロゲンは実験動物用飼料 1 g あたりゲニステイン相当量として 350 µg を超えないものとする(6)(9)。若齢成熟動

物では幼若動物に比較して体重あたりの摂餌量が少ないため、そのような飼料は卵巣摘出若齢成熟ラットを用いて試験をする場合でも適切であるといえる。卵巣摘出成熟マウスや植物エストロゲンに対する感受性がより高いラットを用いる場合には、飼料中の植物エストロゲン濃度をそれに合わせて下げることを考慮する必要がある(20)。加えて、異なる飼料から得られる代謝エネルギーの違いにより、思春期の開始時期のずれが生じる場合がある(21)(22)。

23. 試験開始前に、結果を混乱させかねない高濃度の植物エストロゲン（ガイダンスについては(6)(9)参照）や高い代謝エネルギーを含まない飼料を注意深く選択する必要がある(15)(17)(19)(22)(36)。26 および 27 段落に示す方法で試験機関の使用する試験系の性能の適切さを確認することは、これら両因子の重要な検査となる。なお、GLP と共通する保証手段として、植物エストロゲンの含量分析の可能性（背景対照データに比べて対照群の子宮重量が高かった場合や、参照エストロゲンである 17α-エチニルエストラジオールに対する不適切な反応がみられた場合など）に備え、試験中に与えた飼料の各バッチから代表的なサンプルを採取する。小分けしたサンプルを試験の一部として分析するか、－20°C もしくはサンプルが分析前に分解しないような条件で冷凍する。

24. 一部の床敷材は天然のエストロゲン様物質や抗エストロゲン物質を含んでいる場合がある（例えば、トウモロコシの穂軸はラットの性周期に影響を与えることが知られており、抗エストロゲン作用を有するようである）。このため、最低限の濃度の植物エストロゲンしか含まない床敷材を選択する。

動物の準備

25. 疾病の徴候や身体的異常のない実験動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には個体識別を施す。幼若動物は馴化期間中、離乳まで、母親または里親とともに飼育することが望ましい。試験開始前の馴化期間は、若齢成熟動物および母親または里親とともに届けられた幼若動物については約 5 日とする。幼若動物を母親なしに離乳児として入手した場合には、離乳直後に投与を開始する必要がある（段落 29 参照）ため、馴化期間を短くしなければならない可能性がある。

手順

試験機関の技能の証明

26. 試験機関の技能を証明するには、以下の二つの方法がある。

- 最初の基準となる陽性対照試験（段落 27 参照）に基づく定期的な確認。すなわち、少なくとも 6 カ月ごとおよび試験結果に影響を与える可能性のある変化（新しい組成の飼料、解剖担当者の変更、動物の系統や供給元の変更など）があるたびに、参照エストロゲンである 17α-エチニルエストラジオール（CAS 番号 57-63-6）（EE）を（段落 27 に記載する基準となる陽性対照試験に基づく）適切な用量で投与して試験系（動物モデル）の反応性を確認する。
- 同時対照群の使用。すなわち、参照エストロゲンを適切な用量で投与する群を各試験に含める。

試験系が予想された反応を示さない場合には、試験条件を調べて適切に修正する。上記いずれの方法においても、用いる参照エストロゲンの用量は、おおむね ED70～80 であることが推奨される。

27. **基準となる陽性対照試験** - 試験機関はこのガイドラインに従って最初に試験を行う前に、参照エストロゲンである 17α-エチニルエストラジオール（CAS 番号 57-63-6）（EE）を最低 4 用量用いて、用量反応性を明らかにすることにより動物モデルの反応性を調べ、試験機関の技能を示す。子宮重量の反応については、確立された背景データと比較する（参考文献(5)参照）。この基準となる陽性対照試験で予期された結果が得られない場合には、試験条件を調べて修正する。

動物数および動物の状態

28. 各投与群および対照群とも少なくとも 6 匹の動物を用いる（幼若動物法と OVX 成熟動物法の両プロトコール共通）。

幼若動物の日齢

29. 幼若動物を用いる子宮肥大試験では、出生日を特定する必要がある。投与は十分に早い時期に始め、被験物質投与終了時にはまだ思春期に伴う内因性エストロゲンの生理的上昇が起きていないようにする。一方、非常に若い動物は感受性が低い可能性があることも示されている。このため各試験機関は最適な日齢を決めるにあたって、成熟に関するその機関の背景データを考慮する。

一般的な目安として、ラットの投与は生後 18 日（出生日を生後 0 日とする）の早期離乳直後に開始してよい。投与は生後 21 日に終了することが望ましく、遅くとも生後 25 日前には終了するものとする。これは、生後 25 日以降、視床下部 - 下垂体 - 卵巣軸が機能的になり、内因性エストロゲン濃度が上昇し始めるとともに、基準となる子宮の平均重量の増加と標準偏差の増加が生じる可能性があるためである(2)(3)(10)(11)(12)。

卵巣摘出方法

30. 卵巣摘出雌ラットおよび卵巣摘出雌マウス（投与群および対照群）を得るには、6～8 週齢で卵巣を摘出する。ラットでは卵巣摘出から投与初日までに最低 14 日間を置き、子宮が退縮して最も小さい安定した基準状態になるようにする。マウスでは卵巣摘出から投与初日までに少なくとも 7 日間を置く。少量の卵巣組織でもかなりの循環エストロゲン濃度をもたらすことから(3)、使用する前に少なくとも連続 5 日間（ラットでは卵巣摘出後 10～14 日など）、膣垢中の上皮細胞を観察して動物を調べる。発情期の徴候がみられた動物は用いない。更に、剖検時に卵巣摘出部を検査し、卵巣組織の有無を調べる。卵巣組織がみられた場合には、その動物は計算に用いない(3)。

31. 卵巣摘出では、まず動物を適切に麻酔した後、腹臥位にし、肋骨下縁と腸骨稜の中間点で、腰部筋肉の外側縁の数 mm 外側の背外側部腹壁を約 1 cm 切開する。卵巣を腹腔から無菌エリアに取り出し、卵管と子宮の接合部で切断する。大量出血がないことを確認後、腹壁を縫合し、皮膚をオートクリップで留めるか、または適切に縫合する。結紮位置を**図 1** に概略的に示す。げっ歯類の管理の経験が豊富な獣医師の勧めに従って、適切な術後麻酔を用いる。

体重

32. 子宮重量はエストロゲンのようなホルモンによって影響を受けるが、身体の大きさを制御する成長因子には影響されないため、OVX 成熟動物法では体重と子宮重量は相関しない。これに対して幼若動物モデルでは、動物が成熟する間、体重と子宮重量は関連している(34)。このため、幼若動物法では試験開始時の使用動物の体重のばらつきを最小限にし、平均体重の±20%を超えないようにする。それには、生産者において同腹児数を調整し、母動物が異なっても出生児の哺乳量がほぼ同じになるようにする必要がある。動物を体重分布に基づいて無作為に各群（対照群および投与群）に割り付け、各群の平均体重には他のいずれの群と比較しても有意差がないようにする。試験に用いる腹数を増やさずに、可能な範囲で同腹児を同じ試験群に割り付けないように配慮する。

投与量

33. 被験物質が *in vivo* でエストロゲン様作用を有するかを示すには、2 用量群と 1 対照群で通常は十分であり、したがって動物愛護のためにはこのデザインが望ましい。用量反応曲線を得たり、低用量に外挿したりすることを目的とする場合には、少なくとも 3 用量群が必要である。エストロゲン様作用の特定以上の情報（強さの推定など）が必要な場合には、別の投与法を考慮する。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。被験物質の投与に溶媒を用いる場合には、投与群に用いられるのと同量（群間で量が異なる場合には、投与群で用いられる最大量）の溶媒を対照群に投与する。

34. 子宮肥大試験の場合、最大 1000 mg/kg/day までの用量のうち、その物質を 3 日間連続投与しても動物が生存し、かつ顕著な毒性や苦痛を生じさせない用量を設定することを目標とする。いずれの用量も、被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性および（トキシコ）キネティクスデータを考慮して提案ならびに選択する。最高用量についてはまず LD50 や急性毒性情報を考慮し、動物の死亡や重度の疼痛または苦痛を生じさせないようにする(24)(25)(26)。最高用量は最大耐量（MTD）とするが、ある用量で陽性の子宮肥大反応がみられれば、その試験は許容される。スクリーニング試験であるため、一般には用量間隔は大きくてもよい（3.2 倍の用量に相当する 0.5 対数単位や、更に高い 1 対数単位など）。適当なデータがない場合には、用量設定試験を行って用いる用量を決定してもよい。

35. 一方、ある活性剤のエストロゲン様作用の強さが *in vitro*（または *in silico*）データから推定される場合には、用量設定の際にこれを考慮してもよい。例えば、参照活性剤（エチニルエストラジオール）と同等の子宮肥大反応を引き起こす被験物質量は、*in vitro* でのエチニルエストラジオールに対する相対的な強さから推定することができ、この相当用量に適当な係数（10 または 100 など）を乗じることで最高用量が得られる。

用量設定に関する考察

36. 必要であれば、少数の動物を用いて予備的な用量設定試験を行ってもよい。この場合、毒性を示す徴候や動物の苦痛の定義として、OECD のガイダンス文書 No.19(25)が参考になるであろう。また、可能であれば、この用量設定試験において 3 日間の投与終了後約 24 時間の時点で子宮を摘出し、秤量する。このデータは、主試験の計画（適切な最高用量とその下の各用量の設定および望ましい用量群数の選択）に役立つであろう。

投与

37. 被験物質は強制経口投与または皮下投与する。投与経路を選択する際には、動物愛護に関する配慮と毒性学的観点に関する考察が必要である。毒性学的観点には、その物質のヒトにおける暴露経路との関連性（口からの摂取のモデルとしては強制経口投与、吸入または経皮吸収のモデルとしては皮下投与など）、被験物質の物理的／化学的性質、更に特に既存の毒性学的情報と代謝や動態に関するデータ（例えば、初回通過代謝を避ける必要性や、特定の経路における効率のよさ）などが含まれる。

38. 可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮することが推奨される。しかし、大部分のエストロゲンのリガンドやその代謝前躯体は疎水性の傾向があるため、最も一般的には油（コーン油、ピーナッツ油、ゴマ油、オリーブ油など）の溶液／懸濁液が用いられる。これらの油はカロリーや脂肪含量がそれぞれ異なるため、溶媒が総代謝エネルギー（ME）摂取量に影響を与え、その結果、特に幼若動物法では子宮重量などの評価項目の測定値を変化させる可能性がある(33)。このため、用いようとする溶媒については、試験前に溶媒なしの対照との比較を行う。被験物質をごく少量の 95%エタノールまたは他の適当な溶剤に溶解し、試験用の溶媒で希釈して最終的な使用濃度にすることもできる。ただし、溶剤の毒性学的特徴が分かっている必要があり、溶剤単独の対照群を別に設けて試験を行う。被験物質が安定であると考えられる場合には、徐々に加熱しながら強い機械的処理を施して溶解を促すこともできる。溶媒中の被験物質の安定性を確認する。被験物質が試験期間中安定である場合には、最初に被験物質溶液の原液を調製し、必要な投与量の希釈液を毎日調製してもよい。

39. 投与時期は用いるモデルによって異なる（幼若動物モデルについては段落 29 を、OVX 成熟動物モデルについては 30 段落を参照）。幼若雌ラットに対しては、被験物質を 1 日 1 回、3 日間連続投与する。卵巣摘出雌ラットに対しても 3 日間投与が推奨されるが、より長期間の暴露でもよく、そうすることで作用の弱い物質の検出力が向上する可能性がある。一方、卵巣摘出雌マウスでは、強いエストロゲン活性剤ならば 3 日間の投与期間で十分であり、7 日間に延長しても顕著な利点はないが、弱いエストロゲン物質については有効性評価試験でそのような関係は認められなかった(16)。このため、OVX 成熟マウスでは投与を延長して連続 7 日間とする。投与は毎日ほぼ同じ時刻に行う。また、必要に応じて投与量を調整し、体重あたりの用量（被験物質 mg/kg 体重/day など）を一定に保つ。投与容量については、体重あたりのばらつきが最小になるように投与液の濃度を調整し、いずれの投与経路でも全ての用量において体重あたり一定の容量で投与されるようにする。

40. 被験物質を強制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて 1 日 1 回投与する。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なる。投与容量は動物の管理に関する各国のガイドラインに従うが、5 mL/kg 体重を超えないようにする。ただし、水溶液については 10 mL/kg 体重まで投与してもよい。

41. 被験物質を皮下投与する場合には、滅菌注射針（23 または 25 ゲージなど）とツベルクリン用注射筒を用いて、背側肩甲部または腰部に 1 日 1 回投与する。投与部位の剃毛は任意とする。投与液の損失、投与部位からの漏れおよび不完全な投与を全て記録する。ラット 1 匹あたりの 1 日の総投与容量は、2 カ所に分けて投与した場合で 5 mL/kg 体重を超えないようにする。ただし、水溶液については 10 mL/kg 体重まで投与してもよい。

観察

一般状態の観察

42. 一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回、また、毒性徴候が認められた場合にはより頻繁に行う。観察は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら、毎日同じ時刻に行うことが望ましい。全ての動物について、生死と病気の有無に加え、行動、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）といった一般状態を観察する。

体重および摂餌量

43. 全ての動物について 0.1 g 単位で毎日体重を測定する。測定は投与開始直前（群分け時）から始める。任意の測定として給餌器を秤量し、投与期間中のケージごとの摂餌量を求めてもよい。摂餌量の結果は g/rat（ラット）/day で表わす。

解剖および子宮重量の測定

44. 最終投与の 24 時間後にラットを安楽死させる。用量群の下または上からの順序だった剖検はデータに微妙な影響を与えかねないため、これを避けるために理想としては各群の剖検順を無作為にする。試験の目的は、子宮の湿重量（wet weight）と内腔液を除いた重量（blotted weight）の両方を測定することである。湿重量には子宮と腔内の液状内容物が含まれる。内腔液を除いた重量は、子宮腔の内容物を絞り出して除いてから測定する。

45. 幼若動物では、解剖前に膣開口の状態を検査する。解剖では、まず恥骨結合部から腹壁を切開する。次に、子宮角と卵巣（あれば）を背側腹壁から分離する。子宮と膣の腹側面と側面から膀胱と尿管を外す。直腸と膣の間の線維性の結合を外し、膣口と会陰部皮膚の接合部が分かるようにする。図 2 に示すように、膣壁を会陰部皮膚との接合部のすぐ上で切断して、子宮と膣を身体から分離する。左右子宮角の背外側部の全長にわたって子宮間膜を付着部で丁寧に切断していき、子宮を体壁から分離する。取り出した後の子宮の取り扱いは迅速に行い、組織の乾燥を防ぐ。子宮のような小さい組織では、乾燥による重量減少の影響はより重大となる(23)。卵巣がある場合には、子宮角から内腔液が失われないように注意しながら卵管の位置で卵巣を取り外す。卵巣摘出が行われた動物では、卵巣摘出部について卵巣組織の有無を調べる。余分な脂肪と結合織を取り除く。図 2 に示すように膣を子宮頸の直下で子宮から外し、子宮頸が子宮体とともに残るようにする。

46. 秤量前の乾燥を避けるために注意を払いながら、各子宮を個々に印を付けた秤量済みの容器（ペトリ皿やプラスチック製秤量皿など）に移す（生理食塩液で軽度に湿らせたろ紙を容器に敷いてもよい）。内腔液を含む子宮の重量を 0.1 mg の単位まで測定する（子宮湿重量）。

47. 次に、各子宮について個別に内腔液を除くための処置を行う。まず、両側子宮角に穴をあけるか、縦に切れ目を入れる。子宮を軽度に湿らせたろ紙（Whatman No.3 など）の上に置き、同じく軽度に湿らせた 2 枚目のろ紙で静かに抑えて内腔液を完全に除く。腔内に内容物を含まない子宮の重量を 0.1 mg の単位まで測定する（内腔液を除いた子宮重量）。

48. 殺処分時の子宮重量から、卵巣を摘出していない正常幼若ラットが適切な日齢を超えていなかったことが確認できる。ただし、この点に関して決定的なのは、その試験機関で使われたラットの系統の背景データである（結果の解釈については段落 56 参照）。

任意検査

49. 秤量後、子宮を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して病理組織学的検査を行ってもよい。それに応じて膣の検査を行ってもよい（段落 9 参照）。また、量的な比較のため、内膜上皮の形態計測を行う場合もある。

データおよび報告

データ

50. 試験データには以下を含む。

- 試験開始時の動物数
- 試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽死させた動物の数と動物番号、および死亡または安楽死の日時
- 毒性徴候を示した動物の数と動物番号、および認められた毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）
- 病変を示した動物の数と動物番号、および病変の種類

51. 体重、子宮湿重量および内腔液を除いた子宮重量について、動物の個体ごとのデータを記録する。活性剤については、片側性の統計解析を用いて被験物質の投与が子宮重量の統計学的に有意な（$p < 0.05$）増加をもたらしたかを調べる。子宮湿重量と内腔液を除いた子宮重量における投与に関連した変化を検定するため、適切な統計解析を行う。例えば、剖検時の体重を共変量として、共分散分析（ANCOVA）によってデータを評価してもよい。データの解析前に、子宮重量について分散安定化のための対数変換を行う場合もある。各用量群と溶媒対照群の対比較と信頼区間の算出には、Dunnett および Hsu の検定が適している。外れ値の可能性のある値の検出と分散の均一性の確認には、Student 化した残差プロットを用いることができる。これらの方法は OECD の有効性評価計画で適用され、統計解析システム（SAS Institute、米国ノースカロライナ州キャリー）の PROC GLM、第 8 版が用いられた。

52. 最終報告書には以下を含む。

試験施設

- 試験にかかわる責任者およびその責任
- 基準となる陽性対照試験のデータおよび定期的な陽性対照データ（26 および 27 段落参照）

被験物質

- 被験物質の特性
- 物理的性質、また必要に応じて物理化学的特性
- 希釈液調製の方法および頻度

- 安定性に関して得られた全てのデータ
- 投与液に関する全ての分析データ

溶媒

- 溶媒の特性（性質、入手先、ロット）
- 溶媒選択の妥当性（水以外の場合）

供試動物

- 動物種および系統、選択の妥当性
- 供給元、具体的な供給施設
- 出生日、入荷時の日（週）齢
- 幼若動物の場合は、母親や里親とともに入荷したか否か、また離乳日
- 動物の馴化方法の詳細
- 1 ケージあたりの動物数
- 個々の動物および群の識別方法とその詳細

試験条件

- 無作為化の詳細（使用した方法）
- 用量設定根拠
- 被験物質溶液の詳細、濃度分析値、安定性および均一性
- 被験物質投与の詳細および暴露経路選択根拠
- 飼料（名称、種類、供給元、成分、分かっている場合には植物エストロゲン濃度）
- 給水源（水道水、ろ過水など）、給水方法（大型容器から給水管で、または給水びんでなど）
- 床敷（名称、種類、供給元、成分）
- ケージ条件、照明間隔、動物飼育室の温度と湿度および清掃の記録
- 剖検および子宮秤量手順の詳細
- 統計手順の記載

結果

個体ごと

- 毎日の個体ごとの体重全て（群分けから剖検まで）（0.1 g 単位）
- 被験物質投与開始時の各動物の日（週）齢（出生日を 0 日として計算）
- 各投与日時
- 投与液量計算値、投与量、投与中または投与後の投与液の損失
- 動物の状態に関する毎日の記録（関連する症状および観察結果を含む）
- 推定死因（試験中に瀕死状態で、または死亡して発見された場合）
- 安楽死の日時および最終投与からの時間
- 子宮湿重量（0.1 mg 単位）、解剖や秤量準備中の内腔液の損失の有無
- 内腔液を除いた子宮重量（0.1 mg 単位）

群ごと

- 毎日の平均体重（0.1 g 単位）および標準偏差（群分けから剖検まで）
- 子宮湿重量平均値および内腔液を除いた子宮重量平均値（0.1 mg 単位）ならびに標準偏差
- 毎日の摂餌量（測定した場合。1 匹あたりの摂餌量（g）として算出）
- 投与群の子宮湿重量と内腔液を除いた子宮重量の両方を溶媒対照群の値と比較した統計解析の結果
- 投与群の総体重と体重増加量を溶媒対照群の値と比較した統計解析の結果

53. **本試験ガイドラインにおけるガイダンスの要点まとめ**

	ラット	マウス
動物		
系統	一般的に用いられている実験用げっ歯類の系統	
動物数	各群 6 匹以上	
群数	2 試験群以上（ガイダンスは 33 段落参照）および陰性対照群 陽性対照群に関するガイダンスは段落 26 および 27 参照	
飼育および給餌条件		
動物飼育室の温度	22°C ± 3°C	
相対湿度	50～60%（30%未満や 70%超にならないこと）	
1 日の照明周期	12 時間明期、12 時間暗期	
飼料および飲水	自由摂取	
飼育方法	個別飼育または 3 匹までの群飼い（幼若動物については社会的な群飼いが推奨される）	
飼料および床敷	飼料中と床敷中の植物エストロゲン濃度の低いものを推奨	
プロトコール		
方法	幼若な卵巣非摘出動物を用いる方法（こちらが望ましい） 卵巣摘出した成熟雌動物を用いる方法	卵巣摘出した成熟雌動物を用いる方法
幼若動物の投与日齢	早くても生後 18 日。投与は生後 25 日前に完了すること	現行の試験ガイドラインでは該当なし
卵巣摘出の週齢	6～8 週齢	
卵巣摘出動物の投与時期	卵巣摘出と投与 1 日目との間に最低 14 日間を置くこと	卵巣摘出と投与 1 日目との間に最低 7 日間を置くこと
体重	体重のばらつきは最小限とし、平均体重の± 20%を超えないこと	
投与		
投与経路	強制経口投与または皮下投与	
投与頻度	1 日 1 回	
強制経口投与と皮下投与の容量	≤ 5 mL/kg 体重（水溶液の場合は≤ 10 mL/kg 体重）（経皮投与では 2 カ所の投与部位で）	
投与期間	幼若動物モデルでは 3 日間連続 OVX モデルでは最低 3 日間連続	OVX モデルでは 7 日間連続
剖検時期	最終投与の約 24 時間後	
結果		
陽性反応	平均子宮重量（湿重量と内容液を除いた重量のいずれか、または両方）の統計学的に有意な増加	
参照エストロゲン	17α-エチニルエストラジオール	

結果の解釈および許容性に関するガイダンス

54. 一般に、少なくとも高用量において溶媒対照群と比較して子宮重量の統計学的に有意な増加（$p < 0.05$）が認められた場合、エストロゲン様作用に関する試験は陽性であったと考える。陽性結果は用量と反応の大きさの間に生物学的に妥当と考えられる関係が示されることで、更に裏付けられる。この際、被験物質のエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用が重なることで、用量反応曲線の形が影響を受ける可能性があることを考慮に入れる。

55. 意味のあるデータの解釈を可能にするには、最大耐量を超えないように注意しなければならない。このため、体重減少、症状、その他の所見を十分評価する。

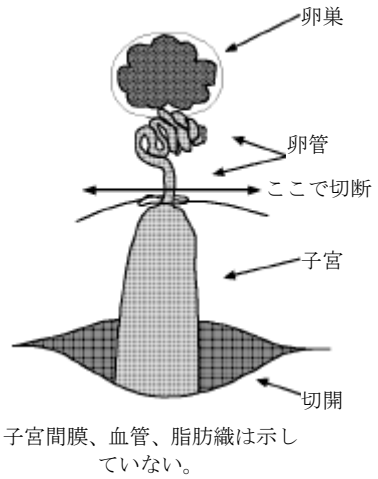
56. 子宮肥大試験のデータの許容性に関する重要な点は、溶媒対照群の子宮重量である。対照群の値が高いと、試験の反応性や非常に弱いエストロゲン活性剤の検出能力が脅かされる可能性がある。文献調査と子宮肥大試験の有効性評価中に得られたデータでは、特に幼若動物において実際に対照群の平均値が自然発生的に高値を示す場合があることが示唆されている(2)(3)(6)(9)。幼若ラットの子宮重量は系統や体重など多くの因子に左右されるため、子宮重量の明確な上限を定めることはできないが、一つの目安として幼若対照ラットの内腔液を除いた子宮重量が 40～45 mg の場合には結果を疑わしいと考えるべきであり、子宮重量が 45 mg を超える場合には再試験が必要になるかもしれない。ただし、これは試験ごとに考える必要がある(3)(6)(8)。一方、成熟動物で試験を行う場合には卵巣摘出が不完全であると残った卵巣組織が内因性エストロゲンを産生し、子宮の退縮が阻害され得る。

57. 溶媒対照群の内腔液を除いた子宮重量が、幼若雌ラットで体重の 0.09%未満、卵巣摘出若齢成熟雌動物で 0.04%未満ならば、許容可能な結果が得られるようである((2)の表 31 参照)。対照群の子宮重量がこれらの値より大きい場合には、種々の因子（動物の日（週）齢、卵巣摘出術の適切さ、飼料中の植物エストロゲンなど）を精査し、陰性試験結果（エストロゲン様作用を示す変化なし）は注意して取り扱う。

58. 試験機関では溶媒対照群の背景データを保存する。また、陽性参照エストロゲン（17α-エチニルエストラジオールなど）の反応に関する背景データも保存する。更に、既知の弱いエストロゲン活性剤に対する反応を試験してもよい。これら全てのデータを入手可能なデータ(2)(3)(4))(5)(6)(7)(8)と比較することで、その試験機関の方法が十分な感度を有していることを確認できる。

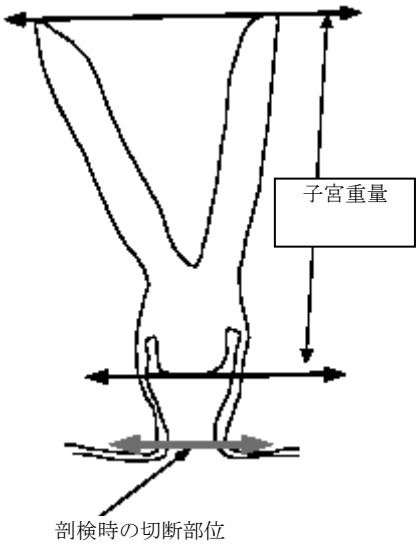
59. OECD の有効性評価試験では、内腔液を除いた子宮重量の方が子宮湿重量よりばらつきが小さかった(6)(7)。しかし、いずれの測定項目でも有意な反応がみられた場合には、被験物質のエストロゲン様作用が陽性であることを示していると考えられる。

60. 子宮肥大反応は必ずしも全てエストロゲンに由来するものではない。しかし、子宮肥大反応試験の陽性結果は、一般に *in vivo* におけるエストロゲン様活性を示すものと解釈し、通常、更なる解明のための検討を開始する（段落 9 および補遺 2「内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み」参照）。



摘出では、まず、肋骨下縁と腸骨稜の中間点で、腰部筋肉の外側縁の数 mm 外側の背外側部腹壁を切開する。腹腔内の卵巣の位置を確認する。卵巣を腹腔から無菌エリアに取り出し、止血のため卵巣と子宮の間を結紮した後、結紮部分の上部の卵管と左右の子宮角の接合部で切断して卵巣を分離する。顕著な出血が続いていないことを確認した後、腹壁を縫合し、皮膚をオートクリップや縫合などで閉じる。動物の回復と子宮の退縮のため、動物を使用する前に最低 14 日間以上置く。

図 1　卵巣摘出術の概略図



摘出では、まず、恥骨結合部から腹壁を切開する。次に、左右の卵巣（あれば）と子宮角を背側腹壁から分離する。子宮と膣の腹側面と側面から膀胱と尿管を外す。直腸と膣の間の線維性の結合を外し、膣口と会陰部皮膚の接合部が分かるようにする。図に示すように、膣壁を会陰部皮膚との接合部のすぐ上で切断して、子宮と膣を身体から分離する。左右子宮角の背外側部の全長にわたって子宮間膜を付着部で丁寧に切断していき、子宮を体壁から分離する。摘出後、余分な脂肪と結合織を取り除く。卵巣がある場合には、子宮角から内腔液が失われないように注意しながら、卵管の位置で卵巣を取り外す。卵巣摘出が行われた動物では、卵巣摘出部について卵巣組織の有無を調べる。図に示すように、膣を子宮頸の直下で子宮から外し、子宮頸が子宮体とともに残るようにする。この状態で子宮を秤量する。

図 2　子宮組織の摘出および秤量の準備

補遺 1

定義

抗エストロゲン作用とは、哺乳動物において17β-エストラジオールの作用を抑制する化学物質の性質をいう。

出生日とは、生後0日をいう。

投与量とは、用量、投与頻度および投与期間からなる一般的な用語である。

用量とは、投与される被験物質の量をいう。子宮肥大試験では用量は1日あたり、かつ試験動物の単位体重あたりの被験物質の重量（mg/kg体重/dayなど）で表わす。

最大耐量（MTD）とは、試験動物の体内に取り込まれてもこれを殺すことのない、物質の最大量をいう（LD_0で表わされる）（IUPAC、1993）。

エストロゲン様作用とは、哺乳動物において17β-エストラジオールのように作用する化学物質の性質をいう。

生後X日とは、出生日のX日後をいう。

感度とは、その試験で正しく分類された全ての陽性／活性物質の割合をいう。分類結果を生み出す試験法の精度の指標で、試験法の妥当性を評価する際の重要な点である。

特異度とは、その試験で正しく分類された全ての陰性／不活性物質の割合をいう。分類結果を生み出す試験法の精度の指標で、試験法の妥当性を評価する際の重要な点である。

子宮肥大とは、子宮組織の成長に対するプラスの影響を示すために用いられる用語である。

有効性評価とは、試験法の遂行上の必要条件と限界を明らかにし、その信頼性と特定の目的に対する関連性を示すために計画される科学的過程である。

補遺 2

注：EDTA 特別専門委員会第 6 回会議の合意内容に基づいて試験ガイドライン計画事務局で作成した文書

内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み



VMG mamm：哺乳動物の試験法と評価に関する検証管理グループ

枠組みに関する注

注1： どのレベルから始めてどのレベルで終わってもよい。これは、有害性およびリスク評価の目的のためにその時点で必要とされている情報の性質による。

注2： レベル5において、環境毒性学は有害影響のメカニズムを示す評価項目と集団に対する障害の可能性を示す評価項目を含むものとする。

注3： 一つの多面的モデルが幾つかの単一項目の試験を含んでいる場合、それら単一項目の試験はそのモデルで置き換えられる。

注4： 各化学物質の評価は枠組みのレベルの役割を念頭に置きつつ、全ての入手可能な情報を考慮しながら個別に行う。

注5： 現時点では、この枠組みを完全に包括的なものとは考えないこと。レベル3、4、5には、現在実施可能な試験と有効性評価が進行中の試験が含まれている。後者は仮に含まれているもので、開発と有効性評価の終了後に正式に枠組みに追加される。

注 6： レベル 5 については、確定試験のみを含むとは考えないこと。このレベルに含まれる試験は、一般的な有害性およびリスク**評価**に貢献すると考えられる。

参考文献

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay - Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 - Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two - Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I125]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA , Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec. 106:369-373.

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol. 20:343-347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596-601.

(24) OECD (2001). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320 - 333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33 - 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288 - 305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284 – 291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development - Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.