OECD/OCDE

2023/07/04

試験ガイドライン No.456

H295R ステロイド産生試験

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 (2023), Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-456-2023.pdf.

©OECD(2023)

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

OECD/OCDE 456

採択：
2023 年 6 月 30 日
改訂：2023 年 7 月 4 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

H295R ステロイド産生試験

1. はじめに

1. OECD（経済開発協力機構）は、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび試験のための既存の試験ガイドラインの改訂および、新たな試験ガイドラインの作成のため、1998 年に優先度の高い作業を開始した。2002 年の OECD 内分泌かく乱化学物質の試験と評価に関する概念枠組みは 5 つのレベルから構成されており、各レベルは異なるレベルの生物学的複雑性に対応している（1）。本試験ガイドライン（TG）に記載する *in vitro* H295R ステロイド産生試験（H295R）では、ヒト副腎癌細胞株（NCI-H295R 細胞）を用いており、スクリーニングおよび優先順位付けのために用いるレベル 2 の「機構に関するデータを提供する *in vitro* 試験」を構成する。ステロイド産生、特に 17β-エストラジオール（E2）およびテストステロン（T）の産生に対する化学的影響のスクリーニングとしての試験の開発および標準化を多段階プロセスにて行った。H295R 試験は最適化され、検証された（2）（3）（4）（5）。

2. H295R ステロイド産生試験の目的は、E2 および T の産生に影響を及ぼす物質を検出することである。H295R 試験は、コレステロールから E2 および/または T の産生までの一連の反応に始まり、細胞内生化学経路を構成する内因性成分をその標的部位として持つ生体異物を特定することを目的としている。H295R 試験は、視床下部-下垂体-性腺（HPG）軸に対する影響によりステロイド産生に影響を及ぼす物質を特定することを目的としていない。本試験の目的は、化学物質が T および E2 の産生を誘導または阻害する可能性に関して、はい/いいえの回答を提供することである。ただし、場合によっては定量的な結果が得られることもある（第 53 段落および第 54 段落を参照）。試験の結果を、溶媒対照（SC）と比較したホルモン産生の相対的変化として表す。この試験は、被験物質と内分泌系の相互作用に関する特定の機構に関する情報を提供することを目的としていない。特定の酵素およびプロゲステロンなどの中間ホルモンに対する影響を確認するために、細胞株を用いた研究が行われている（2）。

3. 本試験ガイドラインで使用する定義および略語は、補遺 1 に記載する。

© OECD, (2023)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

溶液の調製、細胞の培養および試験の様々な側面の実施方法に関する指示を含む詳細なプロトコルは、OECD 文書「*テストステロンおよびエストラジオール産生のモジュレーターを特定するための H295R ステロイド産生試験の多施設共同バリデーション*」（4）の付録 I～III に記載されている。

2. 最初に考慮すべき事項および限界

4. 6 種類の性ステロイドホルモンの生合成には、6 種類の反応を触媒する 5 種類の酵素が関与している。チトクローム P450（CYP）コレステロールの側鎖切断酵素（CYP11A）によるコレステロールのプレグネノロンへの酵素変換は、ステロイド最終生成物の合成に至る一連の生化学的反応の最初の段階である。次の 2 つの反応の順序に応じて、ステロイド産生経路は Δ^5-ヒドロキシステロイド経路および Δ^4-ケトステロイド経路の 2 つの経路に分かれ、これらはアンドロステンジオン産生に収束する（図 1）。

5. アンドロステンジオンは、17β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（17β-HSD）によりテストステロン（T）に変換される。テストステロンは、中間体および最終ホルモン生成物である。男性では、T は前立腺および精嚢などのアンドロゲン作用の標的組織の細胞膜、核膜および小胞体に存在する 5α 還元酵素により、ジヒドロテストステロン（DHT）に変換される。DHT は、T よりもアンドロゲンとして非常に強力であり、最終生成ホルモンともみなされる。H295R 試験では DHT を測定しない（第 10 段落参照）。

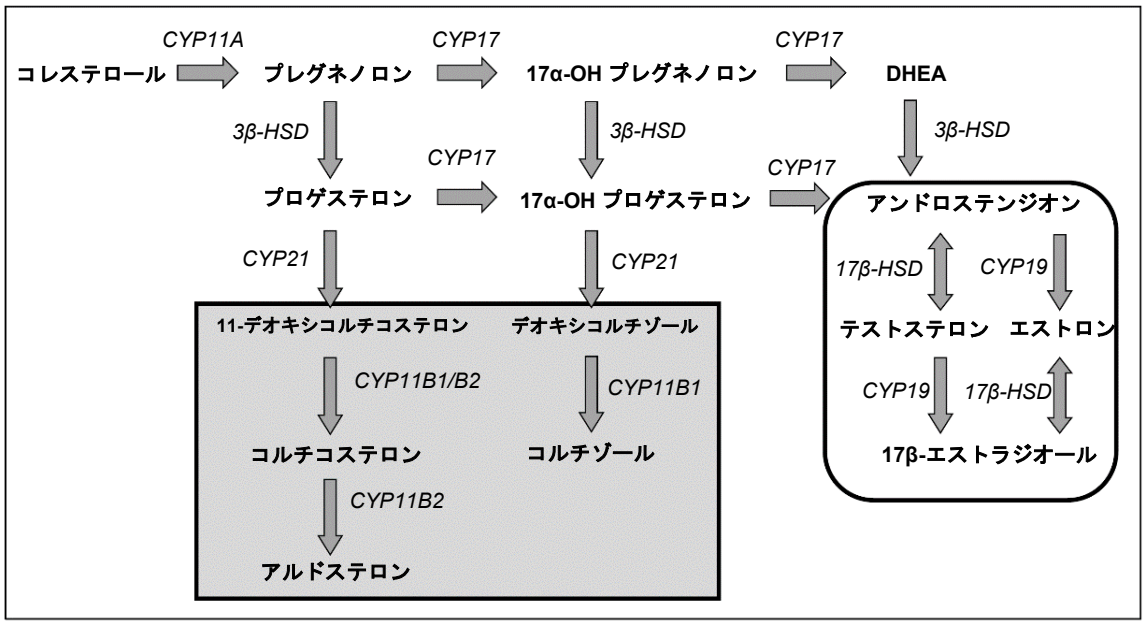
6. アンドロゲン物質をエストロゲン物質に変換するステロイド産生経路に関与する酵素はアロマターゼ（CYP19）である。CYP19 は T を 17β-エストラジオール（E2）に、アンドロステンジオンをエストロンに変換する。E2 および T はステロイド産生経路の最終生成ホルモンと考えられている。

7. CYP17 のリアーゼ活性の特異性は、種間で中間基質について異なる。ヒトでは、この酵素は Δ^5-ヒドロキシステロイド経路の基質（プレグネノロン）に有利であるのに対し、ラットでは Δ^4-ケトステロイド経路の基質（プロゲステロン）に有利である（19）。CYP17 リアーゼ活性におけるこのような差は、*in vivo* でステロイド産生を変化させる物質に対するいくつかの種依存性の差を説明する可能性がある（6）。H295 細胞は、ヒト成人の副腎酵素の発現およびステロイド産生パターンを最もよく反映することが示されているが（20）、アンドロゲン合成について Δ^5-ヒドロキシステロイド経路および Δ^4-ケトステロイド経路の両方の酵素を発現することが知られている（7）（11）（13）（15）。

© OECD, (2023)

図 1.H295R 細胞におけるステロイド産生経路

酵素はイタリック体、ホルモンは太字、矢印は合成の方向を示す。背景が灰色の場合は、コルチコステロイド経路/生成物を示す。性ステロイド経路/生成物は丸で囲まれている。CYP＝チトクローム P450、HSD＝ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼ、DHEA＝デヒドロエピアンドロステロン



8. ヒト H295R 副腎癌細胞株は、ステロイドホルモン合成に対する影響を検討するための有用な *in vitro* モデルである（2）（7）（8）（9）（10）。H295R 細胞株は、上記のステロイド産生の全ての主要酵素をエンコードする遺伝子を発現する（11）（15）（図 1）。これらの遺伝子の *in vivo* 発現は組織および発生段階に特異的であり、通常 1 つの組織または 1 つの発生段階ではステロイド産生に関与するすべての遺伝子を発現しないため、このことは固有の特性である（2）。H295R 細胞は、段階的に未分化のヒト胎児副腎細胞の生理学的特性を有する（11）。分析法のバリデーションは T および E2 の検出のみに行われたが、本細胞は、成人副腎皮質および生殖腺で認められるすべてのステロイドホルモンを産生する能力を有し、コルチコステロイド合成ならびにアンドロゲンおよびエストロゲンなど性ステロイドホルモンの産生の両方に対する作用の試験が可能であるという点で、特有の *in vitro* 系である。T および E2 産生の変化という形で試験系により記録された変化は、H295R 細胞により発現されるステロイド産生機能と被験化学物質との多くの異なる相互作用の結果である可能性がある。これらには、ステロイドホルモンの産生、変換または消失に関与する酵素の発現、合成または機能の調節が含まれる（12）（13）（14）。ホルモン産生の阻害は、この経路における酵素への直接の競合的結合、NADPH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）および cAMP（環状アデノシン一リン酸）などの補因子に対する影響、および/またはステロイド代謝の増加またはステロイド産生経路におけるある種の酵素の遺伝子発現の抑制によると考えられる。阻害はホルモン産生に関与する直接的または間接的なプロセスの両方の機能である可能性があるが、誘導は NADPH および cAMP（フォルスコリンの場合のように）などの補因子への影響、ステロイド代謝の減少（13）、および/またはステロイド産生遺伝子発現のアップレギュレーションなどによる間接的な性質である。

© OECD, (2023)

9. H295R 試験にはいくつかの利点がある。

- T と E2 の両方の産生について、増加と減少の両方を検出することができる。
- 細胞生存率/細胞毒性に対する化学物質の影響を直接評価することができる。化学物質とステロイド産生経路との直接的な相互作用による作用と、細胞毒性による作用とを区別できるため、重要な特徴である。これは、様々な感度および機能性を有する複数の細胞からなる組織外植片システムでは不可能である。
- 動物を使用する必要がない。
- H295R 細胞株は市販されている。

10. 本試験の主な限界は以下のとおりである。

- 代謝能は不明だが、おそらく極めて限られている。したがって、本試験では代謝的活性化が必要な物質は検出されない可能性が高い。
- H295R は、副腎組織由来であり、グルココルチコイドおよび鉱質コルチコイドならびに性ホルモンを産生できる酵素を有する。したがって、グルココルチコイドおよび鉱質コルチコイドの産生に対する影響は、試験で観察された T および E2 のレベルに影響する可能性がある。
- DHT を測定するものではない。そのため、5α 還元酵素を阻害する物質は検出されないと考えられ、その場合、Hershberger 試験（16）を使用することができる。
- H295R 試験では、視床下部-下垂体-性腺系（HPG）軸に影響を及ぼすことによりステロイド産生に影響を及ぼす物質は検出されない。これは無処置の動物でのみ試験できるためである。

3. 試験の原理

11. 本試験の目的は、T および E2 産生に影響を及ぼす物質の検出である。T は E2 を産生する経路の中間体でもある。本試験は、ステロイド産生経路の酵素を典型的に阻害または誘導する化学物質を検出することができる。

12. 本試験は、通常、24 ウェル培養プレートを用いた標準的な細胞培養条件下で実施する。あるいは、他のプレートサイズを使用して試験を実施することもできる。しかし、性能基準の遵守を維持するために、播種および実験条件を適宜調整する必要がある。

13. マルチウェルプレートで 24 時間の馴化期間を置いた後、細胞を 7 濃度の被験化学物質に 48 時間曝露させる試験を少なくとも 3 回反復する。陰性対照および陽性対照として、溶媒ならびに既知のホルモン産生阻害剤および誘導剤を一定の濃度で試験する。曝露期間終了時に、各ウェルから培地を除去する。培地を除去した直後に各ウェルの細胞生存率を分析する。培地中のホルモン濃度は、市販のホルモン測定キットなどの様々な方法および/または、液体クロマ

© OECD, (2023)

トグラフィー質量分析法（LC-MS）などの機器を用いて測定することができる。データは、溶媒対照に対する倍率変化および最小影響濃度（LOEC）として表す。試験が陰性の場合、試験した最高濃度を無影響濃度（NOEC）として報告する。ステロイド産生に影響を及ぼす化学物質の作用に関する結論は、少なくとも 2 回の独立した試験実施に基づく必要がある。溶解性または細胞毒性の問題が生じた場合、あるいは化学物質の活性が試験した濃度範囲の端にあると思われる場合、該当する場合は、初回の試験は後続の 2 回目および 3 回目の試験の濃度調整のための範囲探索試験とすることができる。

4. 培養手順

4.1. 細胞株

14. NCI-H295R 細胞は、物質移動合意書（MTA）に署名した上で米国標準培養コレクション（ATCC）から市販されている [1]。

4.2. はじめに

15. 齢/継代の増加に伴ってE2産生能が変化するため（2）、細胞を使用する前に特定のプロトコルに従って培養し、細胞を解凍してからの継代数および凍結して液体窒素保存庫に保存した時点での継代数を記録する必要がある。最初の番号は実際の継代数を示し、2 番目の番号は凍結保存した時点での継代数を示す。たとえば、5継代後に凍結し、解凍、再び培養した後に3回スプリットした細胞（解凍直後の細胞を第1継代として計数して4継代）には、第4.5継代と表示される。付番方法の例をバリデーション報告書（4）の付録Iに示す。

16. 添加培地および凍結培地の基剤として保存培地を用いる。添加培地は細胞培養に必要な成分である。凍結培地は、長期保存のために影響を与えずに細胞を凍結できるよう特別に設計されている。使用前に、補充培地の成分であるNu-serum（または、試験性能および品質管理（QC）要件を満たすデータを生成することが実証されている同等の特性の血清）のバックグラウンドTおよびE2濃度を分析する必要がある。これらの溶液の調製は、バリデーション報告書（4）の付録IIに記載する。

17. 元のATCCバッチからH295R細胞培養を開始した後、細胞を5継代培養する（すなわち、細胞を 4 回スプリットする）。その後、第 5 継代細胞を液体窒素中で凍結し保存する。細胞を凍結する前に、過去の第 4 継代細胞の試料をQCプレートで測定し（第36段落および第37段落を参照）、ホルモンの基礎産生および陽性対照化学物質に対する反応が、表 5 に規定する試験品質管理基準に適合するかどうかを確認する。

18. 適切な継代/齢の細胞が常に培養および使用可能であるために、H295R細胞は、培養、凍結および液体窒素中で保存する必要がある。H295R 試験で許

[1] ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

© OECD, (2023)

容される継代数として、新たな[2]または凍結した[3]細胞バッチを培養に使用した後の最大継代数は、10 を超えてはならない。たとえば、第 5 継代で凍結したバッチからの細胞の培養に許容される継代は 4.5 から 10.5 である。これらの凍結バッチから開始した細胞については、第 19 段落に記載されている手順に従うこと。これらの細胞は、試験に使用する前に、さらに少なくとも 4 継代（4）（第 4.5 継代）培養する必要がある。

4.3. 凍結保存からの細胞の開始

19. 培養および試験を目的として液体窒素保存から新たな細胞バッチを取り出す場合は、凍結保存から細胞を開始する手順を用いる。本手順の詳細は、バリデーション報告書（4）の付録 III に定められている。細胞を液体窒素保存から取り出し、急速に解凍し、遠心管内の添加培地に入れ、室温で遠心分離し、添加培地に再懸濁し、培養フラスコに移す。翌日、培地を交換する。H295R 細胞を大気中で 5% CO_2 存在下、37°C のインキュベーターで培養し、週 2〜3 回培地交換を行う。細胞が約 85〜90%コンフルエントになったら、スプリットする。細胞の健康と増殖を確保し、バイオアッセイを実施するための細胞を維持するために、細胞のスプリットが必要である。細胞をリン酸緩衝生理食塩水（Ca^{2+} Mg^{2+}非含有 PBS）で 3 回洗浄し、PBS（Ca^{2+} Mg^{2+}非含有）に加えたトリプシンなどの適切な剥離酵素を添加して培養フラスコから剥離する。細胞が培養フラスコから剥離した直後に、酵素処理に使用した容量の 3 倍の割合で添加培地を添加して酵素作用を停止させる。細胞を遠心管に入れ、室温で遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットを添加培地に再懸濁する。新しい培養フラスコに適量の細胞溶液を入れる。細胞が 5〜7 日以内にコンフルエントになるように細胞液量を調整する。推奨される継代培養比は 1:3〜1:4 である。プレートには慎重にラベルを貼付する。これで細胞は試験に使用できる状態になった。余剰細胞は第 20 段落に記載した通り、液体窒素で凍結する。

4.4. H295R 細胞の凍結（液体窒素保存のための細胞の調製）

20. 凍結用の H295R 細胞を調製する場合、上記の細胞のスプリット手順を、遠心管の底の細胞ペレットを再懸濁するところまで実施する。ここで、細胞ペレットを凍結培地に再懸濁する。この溶液を極低温保存用バイアルに移し、適切にラベル表示し、-80°C で 24 時間凍結した後、極低温保存用バイアルを液体窒素に移して保存する。本手順の詳細は、バリデーション報告書（4）の付録 III に定められている。

[2] 「新規バッチ」とは、ATCC から入手した新規の細胞のバッチを指す。

[3]「凍結バッチ」とは、ATCC 以外の試験施設で前に培養し、凍結した細胞を指す。

© OECD, (2023)

4.5. 試験用細胞の播種および前培養

21. 第 19 段落で概説したとおり準備した 24 ウェルプレートの必要数は、試験する化学物質の数および培養皿内の細胞のコンフルエント度によって異なる。原則として、80～90%コンフルエントの細胞の培養フラスコ 1 個（75 cm^2）は、培地 1 mL あたり 200,000～300,000 細胞の目標密度で、1 から 1.5 枚（24 ウェル）のプレートに十分な細胞を供給し、24 時間時点のウェルで約 50～60%コンフルエントになる（図 2）。これは通常、試験におけるホルモン産生に最適な細胞密度である。より高密度では、T および E2 の産生パターンが変化する。初回試験を実施する前に、200,000 から 300,000 細胞/mL の異なる播種密度を試験し、24 時間後にウェル内で 50～60%のコンフルエントになる密度を選択してその後の試験を行うことが推奨される。

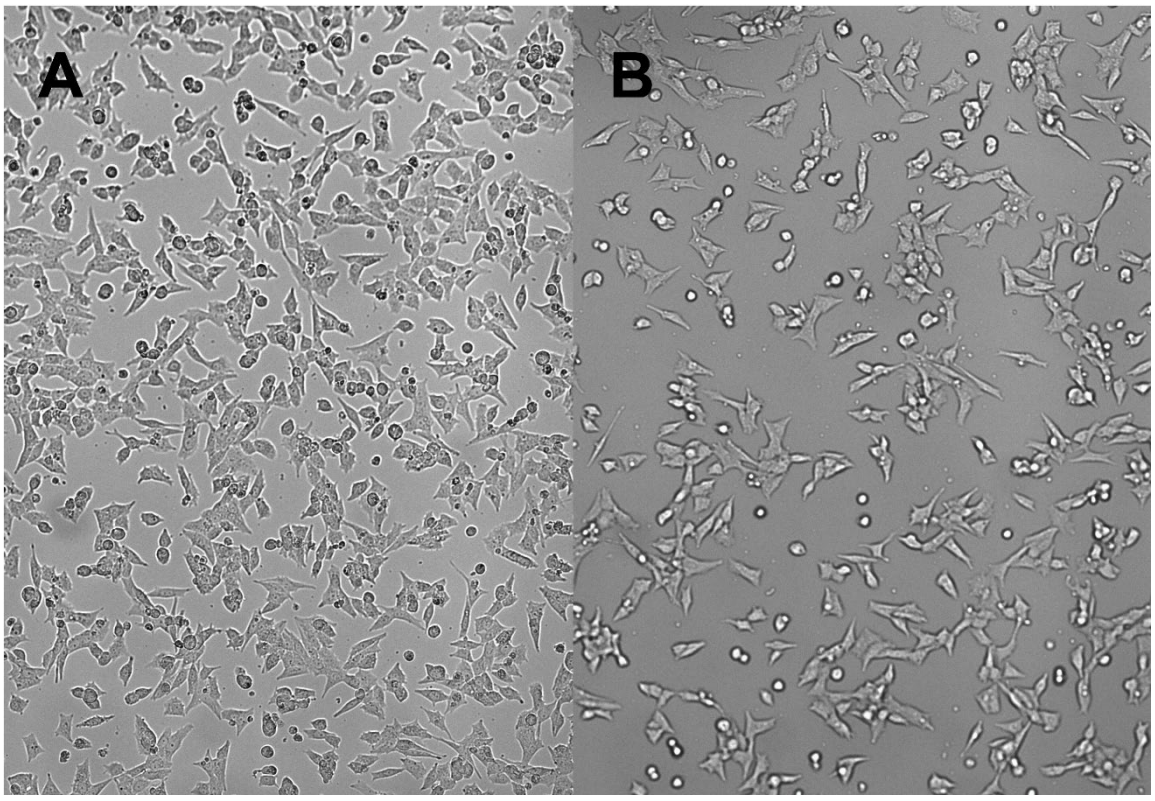


図 2：H295R 細胞の 24 ウェル培養プレートにおける播種密度 50%、24 時間後のウェルの端（A）および中央（B）における顕微鏡写真。

22. 培地を培養フラスコからピペットで移し、滅菌 PBS（$Ca^{2+}Mg^{2+}$不含）で細胞を 3 回洗う。酵素溶液（PBS 中）を加えて、培養フラスコから細胞を分離する。細胞の剥離に適した時間が経った後、酵素処理に使用する液量の 3 倍の割合で添加培地を加えて酵素作用を停止させる。細胞を遠心管に入れ、室温で遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットを添加培地に再懸濁する。細胞密度は、血球計算盤やセルカウンターなどを用いて計算する。細胞溶液を所望の播種密度に希釈し、細胞密度が均一になるように十分に混合する。1 mL 細胞溶液/ウェルで細胞を播種し、プレートとウェルにラベルを貼付する。播種したプレ

© OECD, (2023)

ートを大気中で 5% CO_2 下、37°C で 24 時間培養し、細胞をウェルに接着させる。

5. 品質管理要件

23. 投与中に溶液および試料の正確な量をウェルに注入することが重要である。これらの量によって、測定結果の計算に使用する濃度が決定するためである。

24. 細胞培養およびその後の試験を開始する前に、各試験施設は、ホルモン測定システムの感度を実証しなければならない（第 29〜31 段落）。

25. 抗体ベースのホルモン測定試験を使用する場合、試験を開始する前に、試験する化学物質について、第 32 段落に概説するように、T および E2 の定量に使用する測定システムに干渉する可能性を分析する。

26. 試験に推奨される溶媒は DMSO である。代替溶媒を使用する場合、以下を決定すること。

- 被験化学物質、フォルスコリンおよびプロクロラズの溶媒中での溶解性、および
- 溶媒濃度の関数としての細胞毒性。

最大許容溶媒濃度は、溶媒の細胞毒性が最も低い濃度の 10 倍希釈を超えないことが推奨される。

27. 試験の初回実施前に、試験施設は適格性評価実験を行い、試験施設が第 33〜35 段落に記載されている化学試験に必要な適切な細胞培養と実験条件を維持、達成できることを実証しなければならない。

28. 新しいバッチを使用して試験を開始する場合は、細胞の新しいバッチを使用する前に対照プレートで試験を行い、第 36 段落および第 37 段落に記載されているとおり細胞の性能を評価する。

5.1. ホルモン測定システムの性能

5.1.1. 試験法の感度、正確度、真度および試料マトリックスとの交差反応性

29. 各試験施設は、定量限界（LOQ）を含む性能基準を満たす限り、H295R 細胞による T および E2 産生の分析のために任意のホルモン測定システムを使用することができる。これらは、バリデーション試験で観察された基礎ホルモン濃度に基づき、名目上、T は 100 pg/mL、E2 は 10 pg/mL である。ただし、実施する試験施設で達成される基礎ホルモン濃度に応じて、値の増減が適切な場合がある。QC プレートおよび試験の実行を開始する前に、試験施設は、内部ホルモン対照を添加した添加培地を分析することにより、使用するホルモン試験が表 1 および表 5 に記載された QC 基準を満たすのに十分な正確度および真度で添加培地中のホルモン濃度を測定できることを実証する必要がある。添加培地には、少なくとも各ホルモン 3 濃度（例：T の 100、500 および 2500 pg/mL、E2 の

© OECD, (2023)

10、50 および 250 pg/mL または、選択したホルモン測定システムの検出限界に基づいた最低可能濃度を T および E2 の最低添加濃度として用いることができる）を添加し、分析する。抽出していない試料のホルモン濃度の測定値が公称濃度の 30%以内であり、同じ試料の反復測定間の変動が 25%を超えないこと（追加の QC 基準については表 8 も参照）。これらの QC 基準が満たされた場合、選択されたホルモン測定試験は十分な正確性と真度を有しており、培地成分（試料マトリックス）と試験結果に重大な影響を及ぼすことが予想される交差反応をしないとみなされる。この場合、ホルモン測定前の試料の抽出は不要である。

30. 表 1 および表 8 の QC 基準を満たさない場合、重大なマトリックス効果が生じる可能性があるため、抽出した添加培地を用いた実験を実施すること。抽出手順の例は、バリデーション報告書（4）の付録 II に記載されている。抽出試料中のホルモン濃度の測定は 3 回反復する [4]。抽出後、培地の成分が QC 基準に定義されているホルモン検出法に干渉しないことが示された場合は、抽出した試料を用いてその後のすべての実験を実施する。抽出後に QC 基準を満たすことができない場合、使用したホルモン測定システムは H295R ステロイド産生試験の目的に適していないため、代替のホルモン検出法を使用すること。

5.2. 標準曲線

31. 溶媒対照（SC）のホルモン濃度は、標準曲線の直線部分内であること。ホルモン産生の誘導および阻害を確実に測定できるように、SC 値は直線部分の中心近くであることが望ましい。測定する培地（または抽出物）の希釈は適宜選択する。直線関係は適切な統計学的アプローチにより決定する。

5.3. 化学物質による干渉試験

32. 酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）および放射免疫測定法（RIA）などの抗体に基づく測定法をホルモンの測定に使用する場合、化学物質によってはこれらの試験に干渉する可能性があるため（17）、実際の化学物質試験を開始する前に、使用するホルモン測定システムと干渉する可能性について各化学物質を試験する必要がある（バリデーション報告書（4）の付録 III）。ホルモン測定において、T および/または E2 に対する基礎ホルモン産生の 20%以上の干渉が生じた場合、有意な（20%以上）干渉が生じる閾値濃度を特定するために、すべての被験化学物質原液希釈液について化学物質ホルモン測定干渉試験（バリデーション報告書（4）第 5.0 節の付録 III に記載）を実施する必要がある。干渉が 30%未満の場合、結果を干渉について補正してもよい。干渉が 30%を超える場合データは無効であり、これらの濃度のデータは破棄すべきである。被験化学物質とホルモン測定システムとの有意な干渉が、2 つ以上の非細胞毒性濃度で生じた場合は、別のホルモン測定システムを使用すること。汚染物質によ

[4] 備考：抽出が必要な場合、各抽出物について 3 回の反復測定を行う。各試料の抽出は 1 回のみとする。

© OECD, (2023)

る干渉を避けるため、適切な溶媒を用いて培地からホルモンを抽出することが推奨される。使用可能な方法はバリデーション報告書（4）に記載されている。

表 1. ホルモン測定システムの性能基準

パラメータ	*判定基準*
測定方法の感度	定量限界（LOQ） T:100 pg/mL、E2:10 pg/mL[a]
ホルモン抽出効率（抽出が必要な場合のみ）	ホルモン添加量における平均回収率（3 回反復測定に基づく）と添加量の差は 30%以下であること。
化学物質の干渉（抗体ベースのシステムのみ）	細胞が産生するあらゆるホルモンとの実質的な（それぞれのホルモンの基礎ホルモン産生の 30%以上）交差反応性を示さないこと[b, c]。

備考：
a：分析法の測定限界値は、表 5 に示す基礎ホルモン産生量の値に基づいており、性能に基づいている。より多くの基礎ホルモン産生を達成できれば、限界値はより大きくなる可能性がある。
b：一部の T 抗体および E2 抗体は、それぞれアンドロステンジオンおよびエストロンと、より高いパーセンテージで交差反応する可能性がある。このような場合、17β-HSD に対する影響を正確に測定することはできない。しかし、データからは、エストロゲンまたはアンドロゲン産生に対する一般的な影響に関して有用な情報が得られる可能性がある。このような場合、データは E2 および T ではなくアンドロゲン/エストロゲン応答として表すべきである。
c：以下が含まれる：コレステロール、プレグネノロン、プロゲステロン、11-デオキシコルチコステロン、コルチコステロン、アルドステロン、17α-プレグネノロン、17α-プロゲステロン、デオキシコルチゾール、コルチゾール、DHEA、アンドロステンジオン、エストロン。

5.4. 試験施設習熟度試験

33. 未知の物質を試験する前に、試験施設は習熟度試験を実施することにより、試験の適切な実施に必要な適切な細胞培養および試験条件を維持、達成できることを実証しなければならない。試験の性能は、試験を実施する試験施設職員に直接関連するため、試験施設職員に変更があった場合は、これらの手順を部分的に繰り返さなければならない。

34. 習熟度試験は、第 39～41 段落までに記載した条件と同じ条件下で、細胞を 7 段階の濃度の強い、中等度および弱い誘導剤および阻害剤、ならびに陰性化学物質に曝露させることにより実施する（表 2 参照）。特に、試験する化学物質には、表 2 に示すように、強力な誘導剤フォルスコリン（CAS 番号 66575-29-9）、強力な阻害剤プロクロラズ（CAS番号67747-09-5）、中等度の誘導剤アトラジン（CAS 番号 1912-24-9）、中等度の阻害剤アミノグルテチミド（CAS 番号 125-84-8）、弱い誘導剤（E2 産生）および弱い阻害剤（T 産生）ビスフェノール A（CAS No.80-05-7）および、陰性化学物質ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）（CAS番号9002-61-3）が含まれる。すべての化学物質について、表 6 に示す形式で個別のプレートで測定する。毎日の習熟度試験用化学物質の測定には、1 枚の QC プレート（表 4、第 36～37 段落）を含める必要がある。

© OECD, (2023)

表 2. 習熟度試験用化学物質および曝露濃度

化学物質	試験濃度（μM）
プロクロラズ	0 [a], 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10
フォルスコリン	0 [a], 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30
アトラジン	0 [a], 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
アミノグルテチミド	0 [a], 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
ビスフェノール A	0 [a], 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 [a], 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100

備考：
a：溶媒（DMSO）対照（0）、1 μL DMSO/ウェル
試験施設習熟度試験中に、24 ウェルプレートで H295R を習熟度試験用化学物質に曝露させる。投与量はすべての被験化学物質濃度について μM で示す。各濃度につき DMSO 中に 1 ウェル当たり 0.1% v/v で投与する。すべての試験濃度を 3 つ反復ウェルで試験する（表 6）。各化学物質について個別のプレートで測定する。毎日の測定ごとに 1 つの QC プレートが含まれる。

35. 細胞生存率とホルモンの分析は、第 43～47 段落に提示する方法で実施しなければならない。閾値（最小影響濃度（LOEC））および分類の決定を報告し、表 3 の値と比較すること。表 3 の LOEC および決定分類を満たす場合、データは許容可能とみなされる。

表 3. 習熟度確認物質の閾値（LOEC）および決定分類

	CAS 番号	LOEC（μM）		決定分類	
		T	***E2***	***T***	***E2***
プロクロラズ	67747-09-5	≤0.1	≤1.0	+ [a](阻害)	+ (阻害)
フォルスコリン	66575-29-9	≤10	≤0.1	+ (誘導)	+ (誘導)
アトラジン	1912-24-9	≤100	≤10	+ (誘導)	+ (誘導)
アミノグルテチミド	125-84-8	≤100	≤100	+ (阻害)	+ (阻害)
ビスフェノール A	80-05-7	≤10	≤10	+ (阻害)	+ (誘導)
HCG	9002-61-3	該当なし	該当なし	陰性	陰性

備考：
a+：陽性
n/a：陰性対照の非細胞毒性濃度への曝露後は変化が生じないはずであるため、該当しない。

5.5. 品質管理プレート

36. 品質管理（QC）プレートを使用して、標準培養条件下での H295R 細胞の性能を検証し、溶媒対照、陽性対照および陰性対照中のホルモン濃度ならびに他の経時的な QC 測定値に関する実績データベースを確立する。

- H295R 細胞の性能は、新しい ATCC バッチごとに QC プレートを用いて評価するか、以前凍結した細胞ストックを初めて使用した後に評価する。ただし、当該バッチの細胞を用いた試験施設習熟度試験（第 33～35 段

© OECD, (2023)

落）を実施した場合はこの限りではない。

- QC プレートは、化学物質の試験時に試験条件（細胞生存率、溶媒対照、陰性対照、陽性対照、試験内および試験間変動など）の完全な評価を提供するもので、各試験の測定の一部に含めなければならない。

37. QC 試験は 24 ウェルプレートで実施し、化学物質の試験のため、第 39～47 段落に記載するのと同じ培養、投与、細胞生存率/細胞毒性、ホルモン抽出、ホルモン分析の手順に従う。QC プレートには、ブランク、溶媒対照のほか、E2 および T 合成の既知の誘導剤（フォルスコリン、1 µM、10 µM）および阻害剤（プロクロラズ、0.1 µM、1 µM）の 2 つの濃度が含まれる。また、細胞生存率/細胞毒性試験の陽性対照として、選択したウェルで MeOH を使用する。プレート配置の詳細な説明を表 4 に示す。QC プレートで満たすべき基準を表 5 に示す。溶媒対照およびブランクの両方のウェルで、T および E2 の最小基礎ホルモン産生が満たされなければならない。

表 4：曝露されていない H295R 細胞、ならびに E2 および T 産生の既知の阻害剤（PRO = プロクロラズ）および刺激剤（FOR = フォルスコリン）に曝露させた細胞の性能を試験するための品質管理プレート配置

曝露実験を終了し、培地を除去した後、70%メタノール溶液をすべての MeOH ウェルに添加して、細胞毒性の陽性対照とする（バリデーション報告書（4）付録 III の細胞毒性試験を参照）。

	1	2	3	4	5	6
A	ブランク [a]	ブランク [a]	ブランク [a]	ブランク [a] (+ MeOH)[b]	ブランク [a] (+ MeOH)[b]	ブランク [a] (+ MeOH)[b]
B	DMSO[c] 1 µL	DMSO[c] 1 µL	DMSO[c] 1 µL	DMSO[c] 1 µL (+ MeOH)[b]	DMSO[c] 1 µL (+ MeOH)[b]	DMSO[c] 1 µL (+ MeOH)[b]
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0.1 µM	PRO 0.1 µM	PRO 0.1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

備考：
a：ブランクウェルの細胞には培地のみを添加する（すなわち、溶媒を添加しない）。
b：曝露終了後にメタノール（MeOH）を添加し、これらのウェルから培地を除去する。
cDMSO 溶媒対照（1 µL/ウェル）。

表 5. 品質管理プレートの性能基準

	T	E2
溶媒対照（SC）中のホルモンの基礎産生	LOQ の 5 倍以上	LOQ の 2.5 倍以上
誘導（10 µM フォルスコリン）	SC の 1.5 倍以上	SC の 7.5 倍以上
阻害（1 µM プロクロラズ）	SC の 0.5 倍以下	SC の 0.5 倍以下

© OECD, (2023)

5.6. 試験プレートの品質管理

38. QC プレートの基準に適合することに加え、反復ウェル間の許容可能な変動、反復実験、ホルモン測定システムの直線性および感度、同じ試料の反復ホルモン測定間の変動、および培地抽出後のホルモンスパイクの回収率に関するその他の品質基準（該当する場合。抽出要件に関しては第 30 段落を参照）を満たしている必要があり、表 8 に示す。データは、さらなる評価を検討すべき各パラメータについて規定された許容範囲内にあること。これらの基準が満たされない場合、スプレッドシートに当該試料について QC 基準を満たさなかったことを記録し、試料を再分析するか、データセットから除外する。

表 8：H295R 試験プレートのパラメータの許容範囲および/または変動（%）LOQ：ホルモン測定システムの定量限界 CV：変動係数、SC：溶媒対照、DPM：壊変毎分

	比較対象	T	E2
SC における基礎ホルモン産生	LOQ に対する倍率	5 倍以上	2.5 倍以上
曝露実験 – SC のプレート内 CV（反復ウェル）	絶対濃度	30%以下	30%以下
ホルモン測定システム – SC の反復測定 CV[a]	絶対濃度	25%以下	25%以下
培地抽出 – 内部 ^{3}H 標準の回収（該当する場合）	DPM	公称値の 65%以上	

備考：
a：同一試料の反復測定を指す

6. 化学物質への曝露手順

39. 前培養した細胞をインキュベーターから取り出し（第 21 段落）、顕微鏡で確認し、投与前に細胞が良好な状態（付着、形態）であることを確認する。

40. 細胞をバイオセーフティーキャビネットに入れ、添加培地を取り除き、新しい添加培地に交換する（1 mL/ウェル）。DMSO は、本試験ガイドラインで推奨される溶媒である。ただし、他の溶媒を使用する理由がある場合には、科学的根拠を記載すること。1 mL の添加培地（ウェル容量）あたり 1 µL の適切な原液の DMSO 溶液を添加して細胞を被験化学物質に曝露させる（バリデーション報告書（4）の付録 II を参照）。これにより、ウェル内の DMSO の最終濃度は 0.1%となる。適切な混合を保証するためには、被験化学物質の DMSO 溶液の適切な原液を添加培地と混合して各濃度の望ましい最終濃度とし、古い培地を除去した直後に各ウェルに混合液を添加するのが一般的である。このオプションを使用する場合、DMSO の濃度（0.1%）は全ウェルで一定に保つ必要がある。2 つの最も高い濃度のウェルについて、被験物質の溶解性が不完全であること

© OECD, (2023)

の指標として、沈殿物の形成または混濁を目視で実体顕微鏡を用いて評価する。このような条件（濁り、沈殿物の形成）が認められた場合、次に低い濃度のウェルも検査し（以下同様）、完全に溶解しなかった濃度は、以降の評価および分析から除外する。プレートをインキュベーターに戻し、大気中 5% CO_2 下、37°C で 48 時間培養する。被験化学物質のプレート配置を表 6 に示す。ストック 1 -7 は、被験化学物質濃度の昇順の配置を示す。

表 6. 24 ウェルプレートにおいて H295R 細胞に被験化学物質を曝露するための投与図

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	ストック 4	ストック 4	ストック 4
B	ストック 1	ストック 1	ストック 1	ストック 5	ストック 5	ストック 5
C	ストック 2	ストック 2	ストック 2	ストック 6	ストック 6	ストック 6
D	ストック 3	ストック 3	ストック 3	ストック 7	ストック 7	ストック 7

41. 48 時間後、曝露プレートをインキュベーターから取り出し、顕微鏡ですべてのウェルの細胞の状態（付着、形態、コンフルエンスの程度）および細胞毒性の徴候がないかを確認する。各ウェルの培地を等量ずつ 2 つに分け（各約 490 µL）、適切にラベルを貼付した 2 本の別々のバイアルに移す（すなわち、各ウェルに対し予備の試料として 1 アリコート）。細胞の乾燥を防ぐため、培地は 1 行または 1 列ずつ取り出し、細胞生存率/細胞毒性試験用の培地と交換する。細胞生存率/細胞毒性を直ちに測定しない場合は、各ウェルに Ca^{2+}および Mg^{2+}含有 PBS を 200 µL 加える。ホルモン濃度を分析する追加処理（第 45～47 段落を参照）が行われるまで、培地を-80°C で凍結する。一般に、-80°C で保存している培地中の T および E2 は少なくとも 3 ヵ月間は安定であるが、保存中のホルモンの安定性は、各試験施設にて記録すること。

42. 培地の除去後直ちに、各曝露プレートの細胞生存率/細胞毒性を測定する。

6.1. 細胞生存率の測定

43. 選択した細胞生存率/細胞毒性試験を用いて、被験化学物質が細胞生存率に及ぼす影響の可能性を判定することができる。この試験は、ウェルに存在する生細胞の割合の真の測定値を提供できるか、あるいはそれが Live/Dead® Assay（の線形関数）と直接比較可能であることを実証できる必要がある（バリデーション報告書（4）の付録 III を参照）。同等に有効であることが示されている代替法として、MTT［3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物］試験がある（18）。上記の方法を用いた細胞生存率の評価は相対的な測定であり、必ずしもウェル内の細胞の絶対数と直線関係を示すわけではない。したがって、分析担当者による各ウェルの主観的な平行目視評価を実施する必要があり、後になって必要が生じた場合に真の細胞密度の評価を可能にするために、SC および 2 つの最大非細胞毒性濃度のデジタル写真を撮

© OECD, (2023)

影し保存する。細胞密度は一般にウェルの中央よりも端の方がはるかに大きいため、ウェルの端の写真を 2〜3 枚とウェル中央の写真を 2〜3 枚を保存する事を推奨する。目視検査または生存率/細胞毒性試験で示されたように細胞数が増加しているようであれば、明らかな増加を検証する必要がある。細胞数の増加が確認された場合は、その旨を試験報告書に記載する。細胞生存率は、生細胞100%と考えられる SC の平均反応に対して表示し、使用する細胞生存率/細胞毒性試験に応じて算出する。MTT 試験には以下の式を用いることができる。

生細胞率（%） ＝（ウェル中の反応 - MeOH 処理［= 100%死亡］ウェル中の平均反応）÷（SC ウェル中の平均反応 - MeOH 処理［= 100%死亡］ウェル中の平均反応）

44. SC の平均生存率（= 100%の生存率）に対して生存率が 80%未満のウェルは、最終データ解析に含めるべきではない。約 20%の細胞毒性の存在下で生じるステロイド産生の阻害については慎重に評価し、細胞毒性が阻害の原因ではないことを確認すべきである。また、細胞生存率が 120%を超える場合は、偽陽性の可能性を識別するために、データにフラグを付ける。

6.2. ホルモン分析

45. 各試験施設は、T および E2 の分析のためにホルモン測定システムを選択し、使用することができる。濃度を標準曲線の直線部分内にするために、各処理群から得た培地の予備アリコートを用いて希釈液を調製することができる。第 29 段落に記載のとおり、各試験施設は、QC 測定または化学物質の試験を実施する前に、内部ホルモン対照を添加した添加培地を分析することにより、ホルモン測定システム（ELISA、RIA、LC-MS、LC-MS/MS など）が QC 基準に適合していることを実証しなければならない。試験系の成分がホルモン測定に干渉しないようにするために、測定前にホルモンを培地から抽出する必要がある場合がある（抽出が必要な条件または不要な条件については第 30 段落を参照）。抽出は、バリデーション報告書（4）付録 III の手順に従って行うことを推奨する。

46. ホルモン産生を測定するために市販の検査キットを使用する場合、検査キット製造者が提供するマニュアルに従ってホルモン分析を実施する。ほとんどの製造者は、ホルモン分析を実施するための独自の手順を有している。溶媒対照の予想ホルモン濃度が個々の試験の標準曲線の線形範囲の中心内に収まるように、試料の希釈液を調整する必要がある（バリデーション報告書（4）の付録 III）。標準曲線の直線部分を外れた値は棄却する。

47. 最終的なホルモン濃度は以下のように算出される。

例:

- 抽出：450 µL 培地
- 再溶解：250 µL 試験緩衝液
- 試験における希釈：1:10（試料を標準曲線の線形範囲に入れるため）

© OECD, (2023)

- 試験におけるホルモン濃度：150 pg/mL（測定試料 1 mL あたりの濃度に調整済み）
- 回収率：89%
- 最終ホルモン濃度 =（ホルモン濃度（1 mL あたり）÷回収率）（希釈倍率）
- 最終ホルモン濃度 =（150 pg/mL）÷（0.89）×（250 µL/450 µL）×10 = 936.3 pg/mL

6.3. 個々の測定の評価に基づく試験濃度の選択手順

48. 陽性、陰性、または不確定の測定の基準を図 3 に示す。少なくとも 2 回の独立した試験を実施する必要がある。溶解限度または細胞毒性に関する情報などの事前情報が試験濃度の選択の根拠とならない限り、初回測定の試験濃度は 10^{-3} M を最高濃度として $\log_{10}$ 間隔で測定することが推奨される。化学物質が可溶性であり、試験したいずれの濃度でも細胞毒性がなく、初回の測定がすべての濃度で陰性であった場合、初回の測定と同じ条件を用いた測定をもう 1 回実施し、確認する（表 7）。初回の試験結果が*不確定*または陽性であった場合、表 7 および図 3 の脚注「a」に示すように、選択した試験濃度を精緻化して試験を再度実施する。測定 2 および 3（該当する場合）の試験濃度は、LOEC を達成するために低濃度を使用する必要がある場合を除き、初回測定の結果に基づき、1/2 log 濃度間隔を用いて、効果を誘導した濃度を含めて調整する（たとえば、初回測定 0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000 µM において 1 および 10 µM で誘導が生じた場合、2 回目の測定で試験する濃度は 0.1、0.3、1、3、10、30、100 µM とする）。後者の場合、2 回目の測定では、初回測定で試験した最低濃度よりも 1/2-log スケールで 5 つ以上低い濃度を使用する。

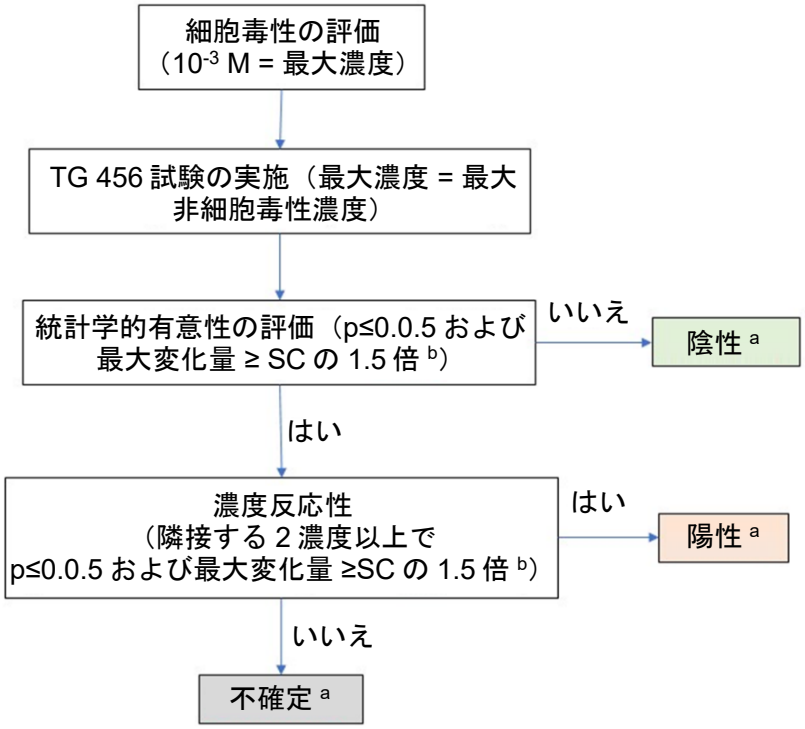
2 回目の測定で初回測定を裏付けることができなかった場合は、初回の試験条件で 3 回目の試験を実施する。

後続の 2 回の測定のいずれにおいても、初回測定で観察された効果が確認できなかった場合、初回測定の不確実な結果は陰性とみなす。不確実な結果は、±1 の濃度増分でさらに 2 回以上の測定で反応を確認できる場合、弱い陽性反応（効果）とみなされる [5]（全体的なデータ解釈手順については第 55～56 段落および図 3 を参照）。単調でない濃度反応パターンはまれであるが、可能性はある。低濃度で再現性のある効果が認められ、高濃度で消失する、および/または最高濃度で復活する場合、このデータを無視してはならず、試験報告書に含めること。

[5] 有意な効果が生じる濃度のわずかな変動を許容する理由は、細胞ベースの試験法に固有の変動によるものである。

© OECD, (2023)

図 3.個々の測定内のデータ解釈手順の概要



備考：
a 表 7 および第 48 段落に規定された通り 2 回目または 3 回目の検証的試験を実施する。頭字語：Conc = 濃度、SC = 溶媒対照
b SC の 1.5 倍は、第 56 段落で説明したように、誘導と阻害の両方に適用される。

© OECD, (2023)

表 7：起こり得る転帰シナリオについての決定マトリックス

測定 1		測定 2		測定 3		最終判断
シナリオ	*決定*	*シナリオ*	*決定*	*シナリオ*	*決定*	
陰性	確認する [a]	陰性	停止する			陰性
陰性	確認する [a]	陽性/不確定 [c]	精緻化する [b]	陰性	停止する	陰性
陰性	確認する [a]	陽性	精緻化する [b]	陽性	停止する	陽性
陰性	確認する [a]	陽性	精緻化する [b]	不確定 [c]	停止する	弱い陽性
陰性	確認する [a]	不確定 [c]	精緻化する [b]	陽性/不確定 [c]	停止する	弱い陽性
不確定 [c]	精緻化する [b]	陰性	確認する [a]	陰性	停止する	陰性
不確定 [c]	精緻化する [b]	陰性	確認する [a]	陽性/不確定 [c]	停止する	弱い陽性
不確定 [c]	精緻化する [b]	不確定 [c]	確認する [a]	不確定 [c]/陽性	停止する	弱い陽性
不確定 [c]	精緻化する [b]	陽性	停止する			陽性
陽性	精緻化する [b]	陽性	停止する			陽性
陽性	精緻化する [b]	陰性	確認する [a]	陽性	停止する	陽性

備考：
a 同じ実験デザイン/濃度間隔を用いて前の測定を確認する
b 1⁄2 log 濃度間隔（先行試験で有意な差が認められた濃度を含める）で試験を再実行する。2 回目と 3 回目の測定で濃度間隔を小さくすることを推奨する理由は、10 倍の間隔だと 1 つの濃度しか有意な反応を示さない現実的な可能性があるためである。1⁄2 log またはさらに小さい間隔の増分を適用すると、少なくとも 2 つの有意な応答が得られるはずである。低濃度の 1/2 log スケールでの確認測定が陽性の場合、当該化学物質は陽性である。しかし、まれに、1 つの濃度でのみ効果を示す「全か無か」の反応が生じることがあり、これはこの決定プロセスによって捉えられる。
c 1 濃度での倍率変化が SC と統計学的に差がある

© OECD, (2023)

7. データ解析および報告

7.1. データ解析

49. 化学的に変化したホルモン産生の相対的な増加/減少を評価するために、結果を各試験プレートの平均 SC 値で正規化し、結果を各試験プレートの SC に対する変化として表す。データはすべて平均値±1 標準偏差（SD）で示す。

50. データ解析には、細胞毒性が 20%未満のウェルから得られたホルモンデータのみを含める。相対的変化は以下のように算出する。

相対変化＝（各ウェルのホルモン濃度）÷（全溶媒対照ウェルの平均ホルモン濃度）

51. 第 43 段落に記載したように、ウェルの目視検査または生存率/細胞毒性試験で示されるように細胞数が増加しているようであれば、明らかな増加を検証する必要がある。細胞数の増加が確認された場合は、その旨を試験報告書に記載する。

52. 統計解析を実施する前に、正規性および分散の均質性の仮定を評価すること。正規性は、標準的な確率プロットまたは他の適切な統計手法（例：Shapiro-Wilk 検定）を用いて評価すべきである。データ（倍率変化）が正規分布でない場合、正規分布に近似するためにデータの変換を試みる必要がある。データが正規分布しているか、あるいは正規分布に近似している場合は、*濃度*を独立変数、*応答*（倍率変化）を従属変数とするパラメトリック検定（Dunnett 検定など）を用いて、化学物質濃度群と SC の差を分析すべきである。データが正規分布でない場合は、適切なノンパラメトリック検定を用いること（例：Kruskal Wallis、Steel's Many-one rank test）。$p \leq 0.05$ を有意差ありとする。統計学的評価は、独立した反復データ点を示す各ウェルの平均値に基づいて行う。多くの場合、初回測定における濃度の間隔（$\log_{10}$ スケール）が大きいため、2 つの最大濃度がシグモイド曲線の直線部分にある明確な濃度-反応関係を表すことはできないと予想される。したがって、この条件が発生した初回測定またはその他のデータセット（最大効果を推定できない場合など）に対しては、上記のようなタイプ I 固定変数統計を適用する。

53. 曲線の直線部分に 3 点以上のデータポイントがあり、最大効果を算出できる場合（半対数間隔の曝露濃度を用いて実施される 2 回目の測定の一部で予想されるように）、プロビット、ロジット、またはその他の適切な回帰モデルを使用して有効濃度（例：EC50 および EC20）を算出する。

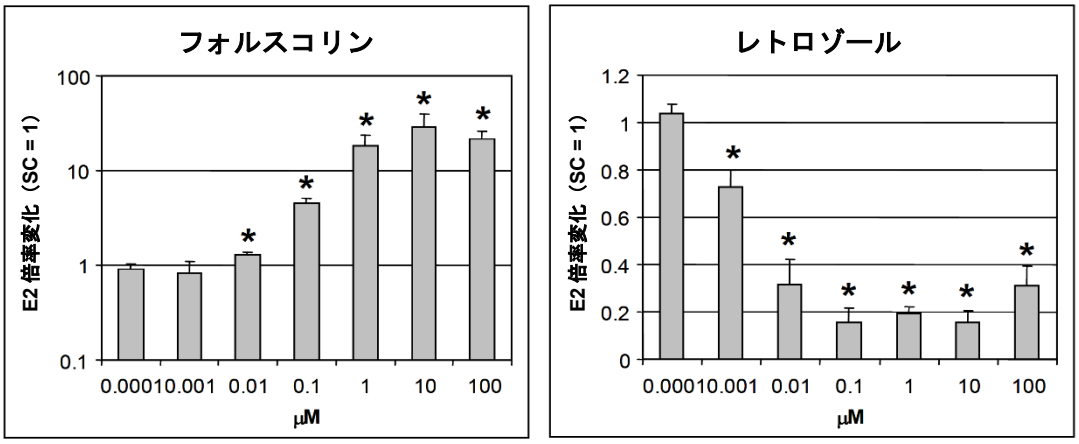
54. 結果は、グラフ形式（平均+/- 1 SD を表す棒グラフ）および表形式（LOEC/NOEC、効果の方向性、およびデータの濃度-反応部分の一部である最大反応の強さ）の両方で示すこと（例については図 4 を参照）。データ評価は、少なくとも 2 回の独立して実施された測定に基づいている場合にのみ有効とみなされる。新しい一連の溶液および対照を用いて別の日に実施された実験また

© OECD, (2023)

は測定は、独立しているとみなされる。測定2および3で使用する濃度範囲（必要な場合）は、LOECを含む濃度反応範囲をより明確に定義するために、測定1の結果に基づいて調整することができる（第48段落を参照）。

図4.グラフおよび表形式でのH295R試験の実施中に得られたデータの提示および評価の例

アスタリスクは溶媒対照との統計学的有意差を示す（$p < 0.05$）。LOEC：最小影響濃度、最大変化量：平均 SC 応答（=1）に対する、任意の濃度で観察された応答の最大強度。



化学物質	*LOEC*	*最大変化量*
フォルスコリン	0.01	29倍
レトロゾール	0.001	0.15倍

7.2. 全体的なデータ解釈手順

55. 誘導倍率または阻害倍率が統計学的に差があり（$p \leq 0.05$）、少なくとも2回の独立した測定において、隣接する2つの濃度が溶媒対照と比較して1.5倍の誘導または阻害の閾値を上回るか下回る場合、その化学物質は陽性と判定される（表 7）。ホルモン濃度の増加および減少のいずれにも、1.5倍の閾値が適用される（すなわち、溶媒対照の150%を超える場合および溶媒対照の66.7%未満の場合（細胞毒性は>(=)80%））。2回の独立した陰性の測定、または3回の測定のうち2回が陰性で1回が不確実または陽性である場合、その化学物質は陰性と判定される。3回の独立した実験で得られたデータが、表7に示す判定基準を満たさない場合、実験結果は解釈不能である。溶解限度または細胞毒性濃度を超える濃度での結果は、結果の解釈に含めてはならない。

© OECD, (2023)

8. 試験報告書

56. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

8.1. 試験実施施設：

- 施設名および所在地
- 試験責任者および試験に従事する者とその責務
- 試験開始日および終了日

8.2. 被験物質、試薬および対照物質

- 被験物質、試薬および対照物質の識別情報（必要に応じて、名称/CAS 番号）、入手元、ロット/バッチ番号、純度、供給者、および特性評価
- 被験物質の物理的性質および関連する物理化学的性質
- 被験物質、試薬および対照物質の保存条件、調製法および調製頻度
- 被験物質の安定性

8.3. 細胞

- 細胞の入手元および種類
- 試験に使用する細胞の継代数（細胞継代識別子）
- 細胞培養の維持手順の記載

8.4. 試験前の要件（該当する場合）

- 化学物質によるホルモン測定干渉試験の内容および結果
- ホルモン抽出効率測定の説明と結果
- 実施するすべての分析試験の標準曲線および検量線
- 選択した分析試験の検出限界

8.5. 試験条件

- 培地組成
- 被験化学物質濃度
- 細胞密度（24 時間後および 48 時間後の推定または実測細胞濃度）
- 被験化学物質の溶解性（測定されている場合は、溶解限度）
- 培養時間および条件

© OECD, (2023)

8.6. 試験結果

- 対照および被験物質の各ウェルの生データ（ホルモン産生の測定に使用された機器により提供されたオリジナルデータの形での各反復測定（例：OD、蛍光単位、DPM など））
- データ変換の正規性または説明のバリデーション
- 測定した各ウェルの平均反応+/- 1 SD
- 細胞毒性データ（細胞毒性を生じた試験濃度）
- QC 要件が満たされたことの確認
- 細胞毒性で補正した、溶媒対照と比較した相対的変化
- 第 50～55 段落で述べたように、各濃度における相対値（倍率変化）、SD、統計学的有意性を示す棒グラフ

8.7. データ解釈

- データ解釈手順を結果に適用し、所見を考察する

8.8. 考察

- T/E2データがグルココルチコイドおよび鉱質コルチコイド経路に対する間接的な効果の影響を受ける可能性について、試験から兆候が得られたか?

8.9. 結論

© OECD, (2023)

9. 参考文献

1. OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in annex 2 of: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 440, the Uterotrophic Bioassay in Rodents: A Short-term Screening Test for Oestrogenic Properties (2007). Available: http://www.oecd.org/env/testguidelines
2. Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.
3. Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23−30.
4. OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at:
5. [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
6. OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
7. Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
8. Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78-89.
9. Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.
10. Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

© OECD, (2023)

Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

12. Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

13. He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

14. Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

15. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activtity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

16. Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

17. OECD (2009), *Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 441, Paris, France. Available: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

18. Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

19. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

20. Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

21. Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

© OECD, (2023)

補遺 1-定義

コンフルエンシーとは、細胞が培地上または培地全体を通じて許容される範囲または増殖を指す。

CV は変動係数であり、分布の算術平均に対する標準偏差の比率である。

CYP とは、チトクローム P450 モノオキシゲナーゼ、遺伝子群、およびそれらから生成される酵素のことで、ステロイドホルモンの合成や代謝など、さまざまな生化学反応の触媒に関与する。

DPM は「壊変毎分」である。1 分間に崩壊したと検出される、一定量の放射性物質中の原子の数である。

E2 は、哺乳類系において最も重要なエストロゲンである 17β-エストラジオールである。

H295R 細胞は、段階的に未分化なヒト胎児副腎細胞の生理学的特性を有し、ステロイド産生経路の酵素を全て発現するヒト副腎癌細胞である。これらは ATCC から入手できる。

凍結培地は細胞を凍結し、凍結細胞を保存するのに用いる。保存培地に BD NuSerum およびジメチルスルホキシドを添加したものである。

線形範囲とは、結果が試料中の分析対象物の濃度に比例する、ホルモン測定システムの標準曲線内の範囲である。

LOQ とは「*定量限界*」のことであり、規定された信頼限界内でその物質の不在（ブランク値）と区別できる物質の最低量のことである。本ガイドラインの目的上、別に規定されていない限り、LOQ は通常、試験システムの製造者によって規定される。

LOEC は最小影響濃度であり、溶媒対照の反応と統計学的に差がある試験反応が得られる最低濃度である。

NOEC は無影響濃度であり、分析法が陽性反応を示さなかった場合に試験した最高濃度である。

継代は、凍結ストックからの培養開始後に細胞をスプリットした回数である。凍結ストックから開始した最初の継代は、1 とする（1）。1 回スプリットした細胞を第 2 継代などと表示する。

PBS はダルベッコリン酸緩衝生理食塩水である。

品質管理、略して QC とは、有効なデータを保証するために必要な措置を指す。

© OECD, (2023)

品質管理プレートは 2 つの濃度の陽性および陰性対照を含む 24 ウェルプレートで、新しい細胞バッチの性能をモニタリングするため、または化学物質を試験する場合に試験に陽性対照を提供するためのものである。

測定は、新しい一連の溶液と対照を特徴とする独立した実験である。

保存培地は、他の試薬を調製するための基材である。フェノールレッドまたは炭酸水素ナトリウムを含まない 15 mM HEPES 緩衝液にダルベッコ改変イーグル培地と栄養混合物ハム F-12 を 1:1 の割合で混合したもの（DMEM/F12）である。炭酸水素ナトリウムを緩衝剤として添加する。バリデーション報告書（4）の付録 II を参照のこと。

添加培地は、保存培地に BD Nu-Serum および ITS+プレミアムミックスを添加したものである。バリデーション報告書（4）の付録 II を参照のこと。

ステロイド産生はコレステロールから様々なステロイドホルモンに至る合成経路である。プロゲステロンやテストステロンなどのステロイド合成経路におけるいくつかの中間体は、それ自体が重要なホルモンであるが、合成経路の更に下流のホルモンの前駆物質としても働く。

T は、哺乳類系における最も重要な 2 つのアンドロゲンのうちの 1 つであるテストステロンを表している。

試験プレートとは、H295R 細胞を被験化学物質に曝露させるプレートである。試験プレートは、溶媒対照および 2 種類の被験化学物質の 7 つの濃度レベルが 3 回反復として含まれている。

トリプシン 1X は、細胞培養プレートから細胞を緩めるために使用する、膵臓セリンプロテアーゼである酵素トリプシンの希釈溶液である。バリデーション報告書（4）の付録 III を参照。

© OECD, (2023)