

II

(Icke-lagstiftningsakter)

FÖRORDNINGAR

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 900/2014

av den 15 juli 2014

om ändring, för anpassning till tekniska framsteg, av förordning (EG) nr 440/2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG ⁽¹⁾, särskilt artikel 13.2, och

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 ⁽²⁾ fastställs testmetoder som ska användas för tillämpning av förordning (EG) nr 1907/2006 när det gäller bestämning av kemikaliers fysikalisk-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet.
- (2) Det är nödvändigt att uppdatera förordning (EG) nr 440/2008 för att med prioritet införa nya och uppdaterade testmetoder som nyligen har antagits av OECD, i syfte att ta hänsyn till tekniska framsteg och säkerställa en minskning av antalet djur som används för försök, i enlighet med Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU ⁽³⁾. Samråd har förts med berörda parter om detta utkast.
- (3) Denna anpassning till tekniska framsteg omfattar sex nya testmetoder för bestämning av toxicitet och andra hälsoeffekter, inbegripet en studie av utvecklingsneurotoxicitet, en utökad engenerationsstudie av reproduktionstoxicitet, ett *in vivo*-genmutationstest på transgena gnagare, ett *in vitro*-test för att bedöma effekter på syntes av steroidhormoner samt två *in vivo*-metoder för att bedöma östrogena och (anti)androgena effekter.
- (4) Förordning (EG) nr 440/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.
- (5) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats i enlighet med artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

⁽¹⁾ EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Kommissionens förordning (EG) nr 440/2008 av den 30 maj 2008 om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) (EUT L 142, 31.5.2008, s. 1).

⁽³⁾ Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras i enlighet med bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 15 juli 2014.

På kommissionens vägnar
José Manuel BARROSO
Ordförande

BILAGA

Bilagan till förordning (EG) nr 440/2008 ska ändras på följande sätt:

Kapitlen B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 och B.58 ska införas:

"B.53 STUDIE AV UTVECKLINGSNEUROTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 426 (2007). En OECD-arbetsgrupp för reproduktions- och utvecklingstoxicitet diskuterade i Köpenhamn i juni 1995 behovet av att uppdatera befintliga OECD-testriktlinjer för reproduktions- och utvecklingstoxicitet samt utarbeta nya riktlinjer för endpoints som ännu inte omfattas (se hänvisning 1). Arbetsgruppen rekommenderade att en testriktlinje för utvecklingsneurotoxicitet bör skrivas på grundval av en riktlinje från den amerikanska miljöskyddsmyndigheten, som sedan dess har reviderats (se hänvisning 2). I juni 1996 hölls ett andra samrådsmöte i Köpenhamn för att förse sekretariatet med vägledning om utkast till en ny testriktlinje för utvecklingsneurotoxicitet, inklusive de viktigaste delarna som t.ex. uppgifter om val av djurart, doseringsperiod, testperiod, endpoints som ska bedömas och kriterier för utvärdering av resultaten. En amerikansk riktlinje för riskbedömning av neurotoxicitet publicerades 1998 (se hänvisning 3). Ett OECD-expertmöte och en ILSI Risk Science Institute-workshop hölls direkt efter varandra i oktober 2000 och ett expertmöte hölls i Tokyo 2005. Dessa möten hölls för att diskutera vetenskapliga och tekniska frågor i samband med den aktuella testriktlinjen, och rekommendationerna från mötena (se hänvisning 4, 5, 6, 7) övervägdes vid utarbetandet av denna testmetod. Ytterligare information om genomförandet, tolkningen och terminologin som används för denna testmetod finns i OECD:s vägledning nr 43 om testning och utvärdering av reproduktionstoxicitet (se hänvisning 8) och nr 20 om testning av neurotoxicitet (se hänvisning 9).

INLEDANDE ÖVERVÅGANDEN

2. Ett antal kemikalier är kända för att ge utvecklingsneurotoxiska effekter hos människor och andra arter (se hänvisning 10, 11, 12, 13). Bestämning av risken för utvecklingsneurotoxicitet kan behövas för att bedöma och utvärdera de toxiska egenskaperna hos en kemikalie. Utvecklingsneurotoxiska studier är utformade för att tillhandahålla uppgifter, bland annat dos-responskaraktärisering av de potentiella funktionella och morfologiska effekterna på utvecklingen av nervsystemet hos avkomman som kan uppstå vid exponering i livmodern och tidigt i livet.
3. En studie om utvecklingsneurotoxicitet kan genomföras som en separat studie som ingår i en studie om reproduktionstoxicitet och/eller vuxenneurotoxicitet (t.ex. testmetoderna B.34 [se hänvisning 14], B.35 [se hänvisning 15], B.43 [se hänvisning 16]), eller läggas till i en studie om prenatal utvecklingstoxicitet (t.ex. testmetod B.31 [se hänvisning 17]). När studien om utvecklingsneurotoxicitet införlivas i, eller ansluts till, en annan studie är det viktigt att bevara integriteten för båda studietyperna. Alla tester ska följa gällande lagstiftning eller statliga och institutionella riktlinjer för användning av försöksdjur inom forskningen (se t.ex. hänvisning 18).
4. Testlaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testkemikalien innan studien genomförs. Sådan information innehåller kemikalins identitet och struktur, dess fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra *in vitro*- eller *in vivo*-toxicitetsstudier av kemikalien, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier samt den förväntade användningen av kemikalien. Denna information är nödvändig för att förvisa alla berörda parter om att testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och att det är behjälpligt vid valet av en lämplig startdos.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

5. Testkemikalien administreras till djuren under dräktighet och laktation. Moderdjur testas för att bedöma effekter hos dräktiga och lakterande honor och kan också ge jämförande information (moderdjur kontra avkomma). Avkomman är slumpmässigt utvald inom kullarna för utvärdering av neurotoxicitet. Utvärderingen består av observationer för att upptäcka grova neurologiska och beteendemässiga avvikelser, inklusive en bedömning av fysisk utveckling, beteendemässig ontogeni, motorik, motoriska och sensoriska funktioner och inlärning och minne, samt utvärderingen av hjärnvikter och neuropatologi under postnatal utveckling och vuxenliv.

6. När testmetoden genomförs som en separat studie kan ytterligare tillgängliga djur i varje grupp användas för specifika neurobeteendemässiga, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska förfaranden som kan komplettera uppgifterna från de undersökningar som rekommenderas i denna testmetod (se hänvisning 16, 19, 20, 21). De kompletterande förfarandena kan vara särskilt användbara när empirisk observation, förväntade effekter eller mekanism/tillvägagångssätt indikerar en viss typ av neurotoxicitet. Dessa kompletterande förfaranden kan användas för moderdjuren såväl som för avkomman. Dessutom kan *ex vivo*- eller *in vitro*-förfaranden också användas, förutsatt att dessa förfaranden inte förändrar integriteten för *in vivo*-förfarandena.

FÖRBEREDELSE FÖR TESTET

Val av djurart

7. Rekommenderad testart är råttor. Andra arter kan användas vid behov. Observera dock att dräktighetsdagar (GD) och postnatale dagar (PND) som anges i denna testmetod är specifika för de råttstammar som vanligen används, och jämförbara dagar bör väljas om en annan art eller ovanlig stam används. Användningen av annan art bör motiveras utifrån toxikologiska, farmakokinetiska och/eller andra data. Motiveringen bör omfatta tillgängligheten av artspecifika postnatale neurobeteendemässiga och neuropatologiska bedömningar. Om ett tidigare test föranlett problem, bör arten/stammen som varit problematisk beaktas. På grund av de skilda prestandaattributen hos olika råttstammar, bör det finnas evidens för att den stam som ska användas har adekvat fruktsamhet och mottaglighet. Andra arters tillförlitlighet och känslighet när det gäller att upptäcka utvecklingsneurotoxicitet bör dokumenteras.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs då målet bör vara 50–60 %. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Det är också möjligt att vända ljuscykeln före parningen och under hela studien, för att utföra bedömningar av funktionella och beteendemässiga endpoints under mörkerperioden (vid rött ljus), dvs. under den tid som djuren normalt är aktiva (se hänvisning 22). Eventuella förändringar i ljus-mörkercykeln bör innefatta tillräcklig aklimatiseringstid för att låta djuren anpassa sig till den nya cykeln. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med fri tillgång till dricksvatten. Den typ av foder och vatten som används bör redovisas och båda bör analyseras beträffande föroreningar.
9. Djuren kan inhysas individuellt eller i burar i små grupper av samma kön. Parningsförfarandena bör utföras i burar som är lämpliga för ändamålet. Efter tecken på parning, eller senast dag 15 av dräktigheten, bör parade djur inhysas separat i förlossnings- eller moderskapsburar. Burarna bör placeras så att eventuell påverkan beroende på deras placering blir så liten som möjligt. Parade honor bör förses med lämpliga och definierade material i redet när nedkomsten är nära. Det är allmänt känt att olämplig hantering eller stress under dräktigheten kan leda till motsatt resultat, inberäknat prenatal förlust samt förändrad fosterutveckling och postnatal utveckling. Som skydd mot förlust av foster genom faktorer som inte är behandlingsrelaterade, bör djuren hanteras varsamt under dräktigheten och stress från yttre faktorer såsom högt buller bör undvikas.

Förberedelse av djuren

10. Friska djur ska användas vilka har aklimatiserats till laboratoriemiljön och inte använts i tidigare försöksförfaranden, såvida inte studien ingår i en annan studie (se punkt 3). Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Varje djur tilldelas och märks med ett unikt identifieringsnummer. Djuren i alla testgrupper bör, så vitt det är praktiskt möjligt, ha enhetlig vikt och ålder och ligga inom det normala intervallet för den art och stam som studeras. Unga vuxna honor utan avkomma bör användas vid varje dosnivå. Syskon ska inte paras och försiktighet bör iaktas för att säkerställa detta. Dräktighetsdagen (GD) 0 är den dag då en vaginalplugg och/eller sperma observeras. Adekvat aklimatiseringstid (t.ex. 2–3 dagar) bör tillåtas vid köp av tidsdräktiga djur från en leverantör. Parade honor bör anvisas på ett opartiskt sätt till kontroll- och behandlingsgrupperna och så vitt det är möjligt bör de fördelas jämnt mellan grupperna (t.ex. ett stratifierat slumpmässigt förfarande rekommenderas för att ge en jämn fördelning i alla grupper, exempelvis baserat på kroppsvikt). Honor som har befruktats av samma hane bör fördelas jämnt i grupperna.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

11. Varje test- och kontrollgrupp bör innehålla ett tillräckligt antal dräktiga honor som ska exponeras för testkemikalien, för att säkerställa att ett tillräckligt antal avkommor produceras för utvärderingen av neurotoxicitet. Sammanlagt 20 kullar rekommenderas vid varje dosnivå. Doseringsutformningar med replikat och förskjutna grupper är tillåtna om det totala antalet kullar per grupp uppnås och om lämpliga statistiska modeller används för att redovisa replikat.
12. Senast postnatal dag (PND) 4 (nedkomstdag är PND 0), bör storleken på varje kull justeras genom att extra ungar utesluts genom ett slumpmässigt urval för att ge en enhetlig kullstorlek för alla kullar (se hänvisning 23). Kullens storlek ska inte överstiga den genomsnittliga kullstorleken för den stam av gnagare som används (8–12). Kullen bör i möjligaste mån ha lika många han- och honungar. Selektiv uteslutning av ungar, t.ex. baserat på kroppsvikt, är inte lämpligt. Efter standardisering av kullarna (gallring) och före vidare testning av funktionella endpoints, bör enskilda ungar som är schemalagda för testning före eller efter avvänjningen identifieras unikt med hjälp av en lämplig human metod för identifiering (se t.ex. hänvisning 24).

Anvisning av djur till funktions- och beteendetester, hjärnvikter och neuropatologiska utvärderingar

13. Testmetoden medger olika tillvägagångssätt när det gäller anvisning av djur som exponerats *in utero* och genom laktation till funktions- och beteendetester, könsmognad, fastställande av hjärnvikt och neuropatologisk utvärdering (se hänvisning 25). Andra tester av kognitiva funktioner (t.ex. socialt beteende), neurokemi eller neuropatologi kan läggas till i en bedömning från fall till fall, så länge integriteten hos de ursprungliga nödvändiga testerna inte äventyras.
14. Ungar väljs ut från varje dosgrupp och anvisas till endpointbedömning på PND 4 eller senare. Urvalet av ungar bör utföras så att, i möjligaste mån, båda könen från varje kull i varje dosgrupp är lika representerade i alla test. För testning av motorisk aktivitet bör samma par av han- och honungar testas vid alla åldrar före avvänjningen (se punkt 35). För alla andra tester kan samma eller separata par av han- och hondjur anvisas till olika beteendetester. Olika ungar kan behöva anvisas till tester av kognitiv funktion för avvanda djur kontra vuxna för att undvika störning av effekter från ålder och tidigare träning på dessa mätningar (se hänvisning 26, 27). Vid avvänjning (PND 21) kan ungar som inte valts ut för testning avlivas på ett humant sätt. Eventuella förändringar i anvisning av ungar ska redovisas. Den statistiska enheten bör vara kullen (eller moderdjuret), och inte ungen.
15. Det finns olika sätt att anvisa avkommor till undersökningar före och efter avvänjning, kognitiva tester, patologiska undersökningar etc., (se figur 1 för allmän utformning, och tillägg 1 för exempel på anvisning). Rekommenderat minsta antal djur i varje dosgrupp för undersökningar före och efter avvänjning är följande:

Kliniska observationer och kroppsvikt	Alla djur
Detaljerade kliniska observationer	20/kön (1/kön/kull)
Hjärnvikt (efter fixering) PND 11–22	10/kön (1/kull)
Hjärnvikt (ej fixerad) ~ PND 70	10/kön (1/kull)
Neuropatologi (immersions- eller perfusionsfixering) PND 11–22	10/kön (1/kull)
Neuropatologi (perfusionsfixering) PND ~ 70	10/kön (1/kull)

Könsmognad	20/kön (1/kön/kull)
Andra utvecklingsmarkörer (valfria)	Alla djur
Beteendeontogeni	20/kön (1/kön/kull)
Motorisk aktivitet	20/kön (1/kön/kull)
Motoriska och sensoriska funktioner	20/kön (1/kön/kull)
Inlärning och minne	10/kön ^(a) (1/kull)

^(a) Beroende på hur känsliga de kognitiva funktionstesterna är, bör en undersökning med ett större antal djur övervägas, t.ex. upp till 1 hane och 1 hona per kull (för djurtilldelning, se tillägg 1) (ytterligare vägledning om urvalsstorlek finns i OECD:s vägledning 43 [se hänvisning 8]).

Dosering

16. Minst tre dosnivåer och en jämsides behandlad kontroll ska användas. Dosisnivåerna bör spridas ut för att ge en gradering av de toxiska effekterna. Den högsta dosnivån ska väljas, om kemikalien inte har några begränsningar på grund av sina fysikalisk-kemiska eller biologiska egenskaper, i syfte att framkalla en viss maternell toxicitet (t. ex. kliniska tecken, minskad viktuppgång (högst 10 %) och/eller tecken på dosbegränsande toxicitet i ett målorgan). Den höga dosen kan begränsas till 1 000 mg/kg/dag kroppsvikt, med några undantag. Exempelvis kan förväntad exponering av människor indikera ett behov av att använda en högre dosnivå. Alternativt bör pilotstudier eller preliminära dosfinnande studier utföras för att fastställa den högsta dos som ska användas för att producera en minimal grad av maternell toxicitet. Om testkemikalien har visat sig vara utvecklingsmässigt toxisk, antingen i en vanlig undersökning av fosterskadande effekter eller i en pilotstudie, bör den högsta dosnivån vara den högsta dos som inte framkallar alltför stor toxicitet i avkomman, eller *in utero* eller neonatal död eller missbildning, tillräckligt för att utesluta en meningsfull utvärdering av neurotoxicitet. Den lägsta dosen bör syfta till att inte ge några tecken på vare sig maternell eller utvecklingsmässig toxicitet, inklusive neurotoxicitet. En fallande dosnivå bör väljas i syfte att påvisa en eventuell dosrelaterad respons och en nivå där ingen skadlig effekt observeras (Noael) eller doser nära detektionsgränsen vilka gör det möjligt att fastställa en referensdos. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna, och att lägga till en fjärde dosgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på 10) mellan doseringarna.
17. Dosisnivåerna bör väljas med hänsyn till alla befintliga toxicitetsdata samt ytterligare information om metabolism och toxikokinetik hos testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Denna information kan också hjälpa till att visa doseringsschemats lämplighet. Direkt dosering av ungar bör övervägas baserat på exponeringsinformation och farmakokinetisk information (se hänvisning 28, 29). Fördelar och nackdelar bör övervägas noga innan direktdoseringsstudier utförs (se hänvisning 30).
18. Den jämsides behandlade kontrollgruppen bör vara en kontrollgrupp som får en överksam behandling (placebo) eller en vehikelkontrollgrupp om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Samtliga djur bör normalt ges samma volym av antingen testkemikalien eller vehikeln baserat på kroppsvikten. Om en vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen ska hänsyn tas till följande egenskaper: påverkan på absorption, distribution, metabolism eller lagring av testkemikalien; effekter på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan ändra dess toxiska egenskaper, samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtionen eller djurens näringsstatus. Vehikeln ska inte leda till effekter som kan störa tolkningen av studien, inte heller ska den vara neurobeteendetoxisk eller ha effekter på fortplantning eller utveckling. När det gäller nya vehiklar bör en placebobehandlad kontrollgrupp ingå förutom en vehikelkontrollgrupp. Djur i kontrollgrupper ska hanteras på samma sätt som djur i testgrupper.

Administration av doser

19. Testkemikalien eller vehikeln bör ges på det sätt som är mest relevant för potentiell exponering av människor och baserat på tillgänglig information om metabolism och spridning i försöksdjuren. Administrationsvägen är i allmänhet oral (t.ex. sondmatning, via föda, via dricksvatten) men andra vägar (t.ex. hud eller inandning) kan användas beroende på egenskaper och förväntade eller kända vägar för mänsklig exponering (ytterligare vägledning finns i vägledningsdokument 43 [se hänvisning 8]). Motivering bör ges för valet av administrationsväg. Testkemikalien bör ges vid ungefär samma tid varje dag.
20. Den dos som ges till varje djur ska normalt baseras på den senaste bestämningen av individuell kroppsvikt. Dock bör försiktighet iaktas vid justering av doser under sista tredjedelen av dräktigheten. Om överskottstoxicitet noteras i de behandlade moderdjuren bör dessa avlivas på ett humant sätt.
21. Testkemikalien eller vehikeln bör, som ett minimum, administreras dagligen till parade honor från tiden för implanteringen (GD 6) och under laktationen (PND 21), så att avkomman är exponerad för testkemikalien under den pre- och postnatala neurologiska utvecklingen. Den ålder då doseringen startar, och doseringens varaktighet och frekvens, kan justeras om evidens stöder en experimentell utformning som är mer relevant för mänsklig exponering. Doseringsvaraktigheter bör justeras för andra arter för att säkerställa exponering under alla tidiga perioder av hjärnans utveckling (dvs., motsvarande prenatal och tidig postnatal tillväxt av den mänskliga hjärnan). Doseringen kan börja när dräktigheten inleds (GD 0), även om man bör överväga risken för att testkemikalien kan orsaka preimplantatorisk förlust. Administration som börjar på GD 6 skulle kunna undvika denna risk, men utvecklingsstadierna mellan GD 0 och GD 6 skulle då inte behandlas. När ett laboratorium köper tidsparade djur är det opraktiskt att börja dosera på GD 0, och därmed vore GD 6 en bra startdag. Testlaboratoriet bör ställa in doseringsschemat i enlighet med relevant information om testkemikaliens effekter, tidigare erfarenhet och logistiska faktorer; detta kan omfatta en förlängning av doseringen förbi avvänjningen. Doseringen bör inte ske på nedkomstdagen hos de djur som inte har fött fram hela sin avkomma. I allmänhet antas det att exponering av ungarna sker via modersmjölken, dock ska direktdosering av ungar övervägas i de fall då det saknas evidens på fortsatt exponering av avkomman. Belägg för kontinuerlig exponering kan t.ex. hämtas från farmakokinetisk information, toxicitet hos avkomma eller förändringar av biologiska markörer (se hänvisning 28).

OBSERVATIONER**Observation av moderdjur**

22. Alla moderdjur bör observeras noga minst en gång dagligen avseende deras hälsotillstånd, inbegripet sjuklighet och dödlighet.
23. Under behandlings- och observationsperioderna bör mer detaljerade kliniska observationer utföras regelbundet (minst två gånger under dräktighetsdoseringsperioden och två gånger under laktationsdoseringsperioden) med minst tio moderdjur per dosnivå. Djuren ska observeras utanför buren av utbildade tekniker som är omedvetna om djurens behandling, med hjälp av standardiserade procedurer som minimerar djurens stress och observatörernas partiskhet och maximerar tillförlitligheten mellan observatörer. Om det är möjligt bör observationerna i en given studie göras av samma tekniker.
24. Förekomst av observerade tecken ska registreras. När det är möjligt bör också de observerade tecknens omfattning registreras. Kliniska observationer bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningssmönster och/eller munandning, och eventuella ovanliga tecken på urinerings eller avföring).
25. Eventuella ovanliga reaktioner med avseende på kroppsställning, aktivitetsnivå (t.ex. minskad eller ökad utforskning av standardområdet) och samordning av rörelser bör också noteras. Förändringar i gång, (t.ex. vaggande, ataxi), kroppsställning (t.ex. krökt rygg) och reaktivitet mot hantering, placering eller andra miljömässiga stimuli, liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, konvulsioner, darrningar, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, ovanliga huvudrörelser, repetitivt cirklande), bisart beteende (t.ex. bitande eller överdrivet slickande, självstympning, baklängesgång, vokalisering) eller aggressioner bör registreras.

26. Tecken på toxicitet bör registreras, inklusive dag för första tecken, tid på dygnet, grad och varaktighet.
27. Djuren bör vägas vid doseringstidpunkten minst en gång i veckan under hela studien, på eller nära nedkomstdagen, och på PND 21 (avvänjning). Vid sondmatningsstudier bör moderdjuren vägas minst två gånger per vecka. Doserna ska vid behov justeras i samband med varje bestämning av kroppsvikt. Foderkonsumtionen bör mätas minst en gång i veckan under dräktighet och laktation. Vattenförbrukningen bör mätas minst en gång i veckan om exponeringen sker via vattenförsörjningen.

Observationer av avkomma

28. All avkomma bör observeras noggrant minst en gång per dag för att upptäcka eventuella tecken på toxicitet, sjuklighet och dödlighet.
29. Under behandlings- och observationsperioderna bör mer detaljerade kliniska observationer av avkomman genomföras. Avkomman (minst en unge per kön/kull) bör observeras av utbildade tekniker som är omedvetna om djurens behandling, med hjälp av standardiserade procedurer som minimerar partiskheten och maximerar tillförlitligheten mellan observatörer. Om möjligt bör observationerna göras av samma tekniker. Som ett minimum, bör de endpoints som beskrivs i punkterna 24 och 25 övervakas på lämpligt sätt för det utvecklingsstadium som observeras.
30. Alla tecken på toxicitet hos avkomman bör registreras, inklusive dag för första tecken, tid på dygnet, grad och varaktighet.

Fysiska och utvecklingsmässiga markörer

31. Förändringar i utvecklingsmarkörer före avvänjningen (t.ex. ytterörats utvikning, ögonöppning, tandsprickning) är starkt korrelerade med kroppsvikten (se hänvisning 30, 31). Kroppsvikten kan vara den bästa indikatorn på fysisk utveckling. Mätning av utvecklingsmarkörer rekommenderas därför endast när det finns tidigare belägg på att dessa endpoints kan ge ytterligare information. Tidpunkten för bedömningen av dessa parametrar anges i tabell 1. Beroende på de förväntade effekterna och resultaten av de inledande mätningarna, kan det vara lämpligt att lägga till ytterligare tidpunkter eller att utföra mätningarna under andra utvecklingsstadier.
32. Det är lämpligt att använda postkoital ålder i stället för postnatal ålder vid bedömning av fysisk utveckling (se hänvisning 33). Om avkomman testas på dagen för avvänjningen, rekommenderas att detta test genomförs före själva avvänjningen för att undvika feltolkning på grund av stress i samband med avvänjningen. Dessutom bör inte något test av avkomman ske under två dagar efter avvänjningen.

Tabell 1

Tidpunkt för bedömningen av fysiska och utvecklingsmässiga markörer och av funktionella/beteendemässiga endpoints ^(a)

Endpoints \ Åldersperioder	Före avvänjning ^(b)	Ungdjur ^(b)	Unga vuxna ^(b)
Fysiska och utvecklingsmässiga markörer			
Kroppsvikt samt kliniska observationer	en gång i veckan ^(c)	minst varannan vecka	minst varannan vecka
Hjärnvikt	PND 22 ^(d)		vid avslutningen
Neuropatologi	PND 22 ^(d)		vid avslutningen
Könsmognad	—	i förekommande fall	—
Andra utvecklingsmarkörer ^(e)	i förekommande fall	—	—

Endpoints	Åldersperioder	Före avvänjning ^(b)	Ungdjur ^(b)	Unga vuxna ^(b)
-----------	----------------	--------------------------------	------------------------	---------------------------

Funktionella och beteendemässiga endpoints

Beteendeontogeni	Minst två mätningar			
Motorisk aktivitet (inklusive tillvänjning)	1–3 gånger ^(f)	—	—	en gång
Motoriska och sensoriska funktioner	—	en gång	en gång	en gång
Inlärning och minne	—	en gång	en gång	en gång

^(a) Denna tabell visar minsta antalet mätillfällen. Beroende på de förväntade effekterna och resultaten av de inledande mätningarna, kan det vara lämpligt att lägga till ytterligare tidpunkter (t.ex. äldre djur) eller utföra mätningarna under andra utvecklingsstadier.

^(b) Det rekommenderas att avkomman inte testas under två dagar efter avvänjningen (se punkt 32). Rekommenderade åldrar för testning av ungdjur är: lärande och minne = PND 25 ± 2, motoriska och sensoriska funktioner = PND 25 ± 2. Rekommenderade åldrar för att testa unga vuxna är PND 60–70.

^(c) Kroppsvikten bör mätas minst två gånger i veckan vid direktdosering av ungarna för att justera doserna under perioder med snabb viktuppgång.

^(d) Hjärnvikter och neuropatologi kan bedömas vid en tidigare tidpunkt (t.ex. PND 11), vid behov (se punkt 39).

^(e) Andra utvecklingsmarkörer utöver kroppsvikten (t.ex. öppna ögon) bör registreras vid behov (se punkt 31).

^(f) Se punkt 35.

33. Levande avkomma ska räknas och könsbestämmas, t.ex. genom visuell inspektion eller mätning av anogenitalt avstånd (se hänvisning 34, 35), och var och en av ungarna i en kull bör vägas individuellt vid födseln eller strax därefter, minst en gång i veckan under diandet, och minst en gång varannan vecka därefter. När könsmognad utvärderas bör djurets ålder och kroppsvikt bestämmas när vaginal öppning (se hänvisning 36) eller preputial separation (se hänvisning 37) förekommer, hos minst en hane och en hona per kull.

Beteendeontogeni

34. Ontogeni för utvalda beteenden bör mätas på minst en unge/kön/kull under lämplig åldersperiod med samma ungar som ska användas på alla testdagar för de beteenden som ska bedömas. Mätningdagarna ska fördelas jämnt över denna period för att definiera antingen normal eller behandlingsrelaterad förändring i ontogenesen för detta beteende (se hänvisning 38). Följande är några exempel på beteenden för vilka ontogenesen kunde bedömas: upprätningsreflex, negativ geotaxis och motorisk aktivitet (se hänvisning 38, 39, 40).

Motorisk aktivitet

35. Motorisk aktivitet bör övervakas (se hänvisning 41, 42, 43, 44, 45) under perioden före avvänjningen och i vuxen ålder. För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Testperioden bör vara tillräckligt lång för att visa tillvänjning inom perioden för icke-behandlade kontroller. Att använda motorisk aktivitet för att bedöma beteendeontogeni rekommenderas bestämt. Om detta används som ett beteendeontogenitest, bör testningen nyttja samma djur för alla testsessioner före avvänjningen. Testning bör ske tillräckligt ofta för att man ska kunna bedöma ontogenin för tillvänjning inom sessionen (se hänvisning 44). Detta kan kräva tre eller flera tidsperioder före, och inklusive, dagen för avvänjningen (t.ex. PND 13, 17, 21). Test av samma djur eller kullsyskon bör även ske i vuxen ålder nära studiens avslutning (t.ex. PND 60–70). Tester på ytterligare dagar kan utföras vid behov. Motorisk aktivitet bör övervakas av en automatisk apparat för aktivitetsregistrering som bör kunna upptäcka både ökad och minskad aktivitet, (dvs. aktivitetsgrundvärdet som mäts av apparaten bör inte vara så låg att upptäckten av minskningar hindras och inte heller så hög att upptäckten av aktivitetsökningar hindras). Varje enhet bör testas genom standardförfaranden, för att så långt som möjligt säkerställa tillförlitlighet i driften mellan olika apparater och mellan olika dagar. I den mån det är möjligt, bör behandlingsgrupperna balanseras mellan enheterna. Varje

djur bör testas individuellt. Behandlingsgrupperna bör fördelas jämnt över testtiderna för att undvika aktivitetsmönster kopplade till dygnsrytm stör resultaten. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala och inte systematiskt relaterade till behandlingen. Bland de variabler som kan påverka många beteendemätningar inklusive motorisk aktivitet, är ljudnivån, storlek och form på testburen, temperatur, relativ luftfuktighet, ljusförhållanden, lukter, användning av buren eller en ny provbur, samt miljömässiga störningar.

Motoriska och sensoriska funktioner

36. Motoriska och sensoriska funktioner bör undersökas i detalj minst en gång under adolescensen och en gång under den tidiga vuxenperioden (t.ex. PND 60–70). För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Tillräcklig testning bör utföras för att säkerställa en lämplig kvantitativ provtagning av sensoriska modaliteter (t.ex. somatosensoriska, vestibulära) och motoriska funktioner (t.ex. styrka, koordination). Några exempel på tester avseende motorisk och sensorisk funktion är extensorreflex (se hänvisning 46), upprätningsreflex (se hänvisning 47, 48), tillvänjning till plötsliga ljud (se hänvisning 40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) och framkallade potentialer (se hänvisning 55).

Tester av inlärning och minne

37. Ett test av associativ inlärning och minne bör utföras efter avvänjningen (t.ex. 25 ± 2 dagar) och för unga vuxna (PND 60 och äldre). För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Samma eller separata tester kan användas för dessa två utvecklingsstadier. En viss flexibilitet är tillåten vid val av tester för inlärning och minne hos avvanda och vuxna råttor. Emellertid bör testerna vara utformade så att de uppfyller två kriterier. För det första bör inläringen antingen bedömas som en förändring över flera upprepade inlärningsförsök eller sessioner, eller, i tester som involverar ett enda försök, med hänvisning till ett villkor som kontrollerar icke-associativa effekter av utbildningserfarenheten. För det andra bör testerna omfatta någon mätning av minnet (korttids- eller långtidsminne), utöver den ursprungliga inläringen (tillägnet), dock kan denna mätning av minnet inte rapporteras i avsaknad av måttet på tillägnande som erhållits från samma test. Om tester av inlärning och minne avslöjar en påverkan av testkemikalien, kan att ytterligare tester övervägas för att utesluta alternativa tolkningar som baseras på förändringar i sensorisk, motiverande och/eller motorisk kapacitet. Förutom ovanstående två kriterier rekommenderas det att testet av inlärning och minne väljs utifrån dess visade känslighet för den klass av kemikalier som utreds, om sådan information finns tillgänglig i litteraturen. I avsaknad av sådan information, inkluderar följande exempel tester som kan göras för att uppfylla ovanstående kriterier: passivt undvikande (se hänvisning 43, 56, 57), fördröjd-matchning-till-position för vuxen råtta (se hänvisning 58) och för råttungar (se hänvisning 59), olfaktorisk betingning (se hänvisning 43, 60), Morris vattenlabyrint (se hänvisning 61, 62, 63), Biel- eller Cincinnati-labyrint (se hänvisning 64, 65), 'radial arm maze' (se hänvisning 66), T-labyrint (se hänvisning 43), samt förvärv och upprätthållande av schemastyrt beteende (se hänvisning 26, 67, 68). Ytterligare tester beskrivs i litteraturen för avvanda (se hänvisning 26, 27) och för vuxna råttor (se hänvisning 19, 20).

Obduktion

38. Honor kan avlivas efter avvänjning av avkomman.
39. Neuropatologisk utvärdering av avkomman kan genomföras med hjälp av vävnad från djur som avlivats humant på PND 22 eller vid en tidigare tidpunkt mellan PND 11 och PND 22, samt vid studiens avslutning. För avkomma som avlivats från PND 22 bör hjärnvävnaden utvärderas, för djur som avlivats vid avslutningen, bör både centrala nervsystemets (CNS) och perifera nervsystemets (PNS) vävnader utvärderas. Djur som avlivas på PND 22 eller tidigare kan antingen fixeras genom immersion eller perfusion. Djur som avlivas vid studiens avslutning bör fixeras genom perfusion. Under alla moment i prepareringen av vävnadsprover, från perfusion av djuren till dissektion av vävnadsprover, vävnadsbehandling och färgning av utstryksglas bör man använda sig av en balanserad utformning, så att varje sats innehåller representativa prover från varje dosgrupp. Ytterligare vägledning om neuropatologi finns i OECD:s vägledning nr 20 (se hänvisning 9), se även (se hänvisning 103).

Beredning av vävnadsprover

40. Alla större avvikelser som är uppenbara vid obduktionstidpunkten bör noteras. De vävnadsprover som tas bör representera alla stora regioner i nervsystemet. Vävnadsproverna bör bevaras i ett lämpligt fixativ och beredas enligt publicerade histologiska standardprotokoll (se hänvisning 69, 70, 71, 103). Paraffininjutning är acceptabelt för vävnader från CNS och PNS men användning av osmium i efterfixeringen tillsammans med epoxiinjutning kan vara lämplig när högre upplösning krävs (t.ex. för perifera nerver, när en perifer neuropati misstänks och/jeller för morfometrisk analys av perifera nerver). Hjärnvävnad som samlas in för morfometrisk analys bör

ingjutas i lämpligt medium för alla dosnivåer vid samma tidpunkt för att undvika krympning av artefakter, vilket kan förknippas med långvarig lagring i fixativ (se hänvisning 6).

Neuropatologiska undersökningar

41. Syftet med den kvalitativa undersökningen är

- i) att identifiera regioner inom nervsystemet som uppvisar tecken på neuropatologiska förändringar,
- ii) identifiera olika typer av neuropatologiska förändringar till följd av exponering för testkemikalien och
- iii) fastställa allvarlighetsgraden för de neuropatologiska förändringarna.

Representativa histologiska snitt från vävnadsproverna bör undersökas mikroskopiskt av en lämpligt utbildad patolog avseende belägg på neuropatologiska förändringar. Alla neuropatologiska förändringar bör tilldelas en subjektiv klass som anger allvarlighetsgraden. Ett hematoxylin- och eosinfärgämne kan vara tillräckligt för att utvärdera hjärnsnitt från djur som avlivats humant på PND 22, eller tidigare. Emellertid kan ett myelinfärgämne (t.ex. Luxol snabb blå/kresylviolett) och en silverfärg (t.ex. Bielschowskys eller Bodians färgämnen) rekommenderas för snitt av CNS- och PNS-vävnader från djur som avlivs vid studiens avslutning. Med förbehåll för patologens yrkesmässiga bedömning och typen av förändringar som har observerats, kan andra färgämnen anses lämpliga för att identifiera och karakterisera vissa typer av förändringar (t.ex. surt gliafibrillärt protein [GFAP], eller lektin histo-kemi för att bedöma glia- och mikrogliaförändringar [se hänvisning 72], fluoro-jade för att detektera nekros [se hänvisning 73, 74], eller silverfärgämnen specifika för neural degenerering [se hänvisning 75]).

42. Morfometrisk (kvantitativ) utvärdering bör utföras eftersom dessa uppgifter kan bidra till att upptäcka en behandlingsrelaterad effekt och är värdefulla vid tolkningen av behandlingsrelaterade skillnader i hjärnans vikt eller morfologi (se hänvisning 76, 77). Nervvävnad bör provtas och prepareras för en morfometrisk utvärdering. Morfometriska utvärderingar kan t.ex. omfatta linjära mätningar eller arealmätningar av specifika delar av hjärnan (se hänvisning 78). Linjära mätningar eller arealmätningar kräver att man använder noggrant utvalda homologa snitt baserat på tillförlitliga mikroskopiska markörer (se hänvisning 6). Stereologi kan användas för att identifiera behandlingsrelaterade verkningar på parametrar såsom volym eller cellantal för specifika neuroanatomiska områden (se hänvisning 79, 80, 81, 82, 83, 84).

43. Hjärnan bör undersökas avseende belägg på behandlingsrelaterade neuropatologiska förändringar och lämpliga prover bör tas från alla stora regioner av hjärnan (t.ex. luktbluben, hjärnbarken, hippocampus, basala ganglier, thalamus, hypothalamus, mitthjärnan (tectum, tegmentum och cerebrala pedunklar), pons, medulla oblongata, cerebellum) för att säkerställa en grundlig undersökning. Det är viktigt att snitten tas i samma plan för alla djur. På vuxna djur, som avlivs humant vid studiens avslutning, bör prover tas från representativa delar av ryggmärgen och PNS. De undersökta områdena bör innehålla ögat med synnerv och näthinna, ryggmärgen vid cervikal och lumbal svullnad, dorsala och ventrala rotfibrer, proximala ischiasnerven, proximala tibialnerven (vid knät) och tibialnervens vadmuskलगrenar. Ryggmärgen och perifera nervsnitt bör omfatta diagonala, tvärgående och längsgående snitt.

44. Neuropatologiska utvärderingar bör innehålla en undersökning av tecken på utvecklingsskador på nervsystemet (se hänvisning 6, 85, 86, 87, 88, 89) utöver de cellulära förändringarna (t.ex. neuronal vakuolisering, degeneration, nekros), och vävnadsförändringar (t.ex. gliosis, leukocytisk inlagring, cystisk bildning). I detta avseende är det viktigt att behandlingsrelaterade effekter kan särskiljas från normala utvecklingshändelser kända för att inträffa vid ett utvecklingsstadium som motsvarar tidpunkten för avlivningen (se hänvisning 90). Exempel på viktiga förändringar som indikerar utvecklingsmässig skada inkluderar, men är inte begränsad till, följande:

- Förändring av storlek eller form på luktbluberna, storchjärnan eller lillhjärnan.
- Förändringar av relativ storlek på olika hjärnregioner, inklusive minskning eller ökning av storlek på regioner till följd av förlust eller uthållighet hos vanligtvis tillfälliga cellpopulationer eller axonala projektioner (t.ex. externt germinalt lager hos lillhjärnan, hjärnbalken).
- Förändringar i proliferation, migration och differentiering, vilket indikeras av områden med överdriven apoptos eller nekros, grupper eller spridda populationer av ektopiska, desorienterade eller missbildade nerv-celler, eller förändringar i relativ storlek hos olika lager av kortikala strukturer.

- Förändringar i myelinationsmönster, inklusive en generell minskning av storlek eller förändrad färgning av myeliniserade strukturer.
- Tecken på hydrocefalus, särskilt utvidgning av kamrarna, cerebral akveduktstenos och förtunning av hjärnhälvorna.

Analys av sambandet mellan dos och respons hos neuropatologiska förändringar

45. Följande stegvisa förfarande rekommenderas för de kvalitativa och kvantitativa analyserna av neuropatologi. Först jämförs snitten från högdosgruppen med dem i kontrollgruppen. Om inga tecken på neuropatologiska förändringar påträffas hos djuren i högdosgruppen så krävs inga fler analyser. Om tecken på neuropatologiska förändringar påträffas i högdosgruppen så undersöks djuren i mellan- och lågdosgruppen. Om högdosgruppen faller bort på grund av dödsfall eller annan störande toxicitet, bör hög- och mellandosgruppen analyseras avseende neuropatologiska förändringar. Om det finns eventuella tecken på neurotoxicitet i lägre dosgrupper, bör neuropatologisk analys utföras för dessa grupper. Om eventuella behandlingsrelaterade neuropatologiska förändringar påträffas i den kvalitativa eller kvantitativa undersökningen, bör den dosberoende förekomsten, frekvensen och allvarlighetsgraden av skadorna eller de morfometriska ändringarna fastställas på grundval av en bedömning av samtliga djur i alla dosgrupper. Samtliga regioner i hjärnan som uppvisar tecken på neuropatologiska förändringar bör ingå i denna utvärdering. För varje typ av skada bör de egenskaper som används för att definiera varje allvarlighetsgrad beskrivas och de egenskaper som används för att åtskilja varje klass anges. Frekvensen för varje typ av skada och dess allvarlighetsgrad bör registreras, och en statistisk analys bör utföras för att bedöma hur dos-respons sambandet ser ut. Användning av kodade utstryksglas rekommenderas (se hänvisning 91).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Data bör rapporteras individuellt och sammanställas i tabellform, och för varje testgrupp visa förändringstyper och antalet moderdjur, avkomma efter kön och kullar för varje typ av förändring. Om direkt postnatal exponering av avkomman har utförts, bör sättet, varaktigheten och exponeringsperioden rapporteras.

Utvärdering och tolkning av resultaten

47. En studie av utvecklingsneurotoxicitet ger information om effekterna av upprepade exponering för en kemikalie under *in utero* och tidig postnatal utveckling. Eftersom vikten läggs på endpoints för både allmän toxicitet och utvecklingsneurotoxicitet, kommer resultaten från studien att möjliggöra en åtskillnad mellan neuroutvecklingsfaktorer som förekommer i frånvaron av allmän maternell toxicitet, och de som bara uttrycks på nivåer som också är giftiga för moderdjuret. På grund av de komplexa sambanden mellan studieutformning, statistisk analys och biologisk signifikans för data, inbegriper en adekvat tolkning av data om utvecklingsneurotoxicitet en expertbedömning (se hänvisning 107, 109). Vid tolkningen av testresultaten bör man använda en metod som bygger på evidensvärde (se hänvisning 20, 92, 93, 94). Mönster av beteendemässiga eller morfologiska fynd bör, om det finns, diskuteras, liksom belägg för dos-respons. Data från alla studier som är relevanta för bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet, inklusive mänskliga epidemiologiska studier och fallrapporter, samt experimentella djurstudier (t.ex. toxikokinetiska data, struktur-aktivitetsinformation, data från andra toxicitetsstudier), bör ingå i denna karakterisering. Detta inkluderar relationen mellan doser av testkemikalien och närvaron eller frånvaron, förekomsten och omfattningen av eventuell neurotoxisk effekt för varje kön (se hänvisning 20, 95).
48. Utvärderingen av data bör omfatta en diskussion om både den biologiska och statistiska signifikansen. Statistisk analys bör ses som ett verktyg som vägleder, snarare än bestämmer, tolkningen av data. Avsaknad av statistisk signifikans bör inte vara den enda grunden för att fastslå en avsaknad av behandlingsrelaterad effekt, precis som statistisk signifikans inte bör vara den enda motiveringen för att fastslå en behandlingsrelaterad effekt. För att skydda sig mot eventuella falska negativa fynd och svårigheterna i att 'bevisa ett negativt resultat' bör tillgängliga positiva resultat och historiska kontrolldata diskuteras, särskilt när det saknas behandlingsrelaterade effekter (se hänvisning 102, 106). Sannolikheten för falska positiva resultat bör diskuteras i ljuset av den totala statistiska utvärderingen av data (se hänvisning 96). Utvärderingen bör omfatta det eventuella sambandet mellan observerade neuropatologiska och beteendemässiga förändringar.

49. Samtliga resultat bör analyseras med hjälp av statistiska modeller som är lämpliga för försökets utformning (se hänvisning 108). Valet av en parametrisk eller icke-parametrisk analys bör motiveras med tanke på faktorer såsom typen av data (transformerad eller ej) och fördelning, samt den relativa robustheten i den valda statistiska analysen. Syftet och utformningen av studien bör styra valet av statistiska analyser för att minimera fel av typ I (falskt positiva) och typ II (falskt negativa) (se hänvisning 96, 97, 104, 105). Utvecklingsstudier med hjälp av multipara arter där flera ungar per kull testas, bör inkludera kullen i den statistiska modellen som skydd mot överdrivna felfrekvenser av typ I (se hänvisning 98, 99, 100, 101). Den statistiska enheten bör vara kullen, och inte ungen. Försök bör utformas så att kullsyskon inte behandlas som oberoende observationer. Varje endpoint som mäts upprepade gånger hos samma försöksdjur bör analyseras med hjälp av statistiska modeller som står för icke-oberoendet hos dessa mätningar.

Testrapport

50. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Identifieringsdata, inklusive källa.
- Beredningens renhet, samt kända och/eller förväntade föroreningar.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel, om annan än vatten eller fysiologisk koksaltlösning.

Försöksdjur:

- Art och stam som används, samt en motivering om annat än rått används.
- Leverantör av försöksdjur.
- Djurens antal, ålder vid start och kön.
- Ursprung, inhysning, foder, vatten etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

- Grund för val av dosnivå.
- Grund för doseringssätt och tidsperiod.
- Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda ämnets fysikaliska form.
- Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, beredningens stabilitet och homogenitet.
- Metod som används för att unikt identifiera moderdjur och avkomma.
- En detaljerad beskrivning av de statistiska stickprovsmetoder som används för att anvisa moderdjur till behandlingsgrupperna, välja ungar för avlivning, samt anvisa ungar till testgrupper.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Omräkning av testkemikaliens koncentration (ppm) från foder/dricksvatten eller genom inhalation till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.
- Miljöförhållanden.
- Uppgifter om kvalitet på foder och vatten (t.ex. kran, destillerat).
- Datum för studiens start och slut.

Observationer och testförfaranden:

- En detaljerad beskrivning av de förfaranden som används för att standardisera observationer och förfaranden, samt operationella definitioner för att värdera observationer.
- En förteckning över samtliga testförfaranden, samt motivering av deras användning.
- Uppgifter om de beteendemässiga/funktionella, patologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska metoder som används, inklusive information och detaljer om automatiserade enheter.
- Rutiner för kalibrering och säkerställande av likvärdiga enheter, och balansen mellan behandlingsgrupper i testförfaranden.
- En kort motivering som förklarar eventuella beslut som inbegriper en yrkesmässig bedömning.

Resultat (enskilda och sammanfattande, inklusive medelvärde och varians i förekommande fall):

- Antalet djur vid studiens början och i slutet av studien.
- Antalet djur och kullar som används för varje testmetod.
- Identifikationsnummer för varje djur och kullen som den kommer från.
- Kullstorlek och medelvikt vid födseln för respektive kön.
- Kroppsvikt och kroppsviktsförändringsdata, inklusive terminal kroppsvikt för moderdjur och avkomma.
- Uppgifter om foderintag, och i tillämpliga fall uppgifter om vattenintag (t.ex. om testkemikalien tillförs via vatten).
- Uppgifter om toxiska reaktioner för respektive kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet eller dödlighet, inklusive tidpunkt för, och orsak till dödsfall, om detta är tillämpligt.
- Natur, allvarlighetsgrad, varaktighet, dag för första tecken, tid på dygnet, och efterföljande förlopp för de detaljerade kliniska observationerna.
- Värde för varje utvecklingsmarkör (vikt, könsmognad och beteendeontogeni) vid varje observationstidpunkt.
- En detaljerad beskrivning av alla beteendemässiga, funktionella, neuropatologiska, neurokemiska, elektrofysiologiska fynd för respektive kön, som omfattar både ökning och minskningar från kontroller.
- Obduktionsfynd.
- Hjärnvikter.
- Eventuella diagnoser som härrör från neurologiska symtom och skador, inklusive naturligt förekommande sjukdomar eller tillstånd.
- Bilder på typiska exempel på fynd.
- Lågupplösta bilder för att bedöma homologer i snitt som används för morfometri.
- Absorptions- och metabolismdata, inklusive kompletterande uppgifter från en separat toxikokinetisk studie, om sådan finns.
- Statistisk bearbetning av resultaten, inklusive statistiska modeller som används för att analysera data, och resultaten, oavsett om de var signifikanta eller ej.
- Förteckning över personal som utför studien, inklusive deras yrkesutbildning.

Diskussion av resultaten:

- Dos-respons-information, för respektive kön och grupp.
- Eventuella toxiska effekters samband med en slutsats om testkemikaliens neurotoxiska potential, för respektive kön och grupp.

- Hur påverkas slutsatserna av eventuell toxikokinetisk information.
- Likheter med effekter från alla kända neurotoxiska ämnen.
- Data som stöder testmetodens tillförlitlighet och känslighet (dvs. positiva och historiska kontrolldata).
- Eventuella samband mellan neuropatologiska och funktionella effekter.
- Noael- eller referensdos för moderdjur och avkomma, för respektive kön och grupp.

Slutsatser:

- En diskussion om den övergripande tolkningen av data baserad på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida testkemikalien orsakat utvecklingsneurotoxicitet och Noael.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1995). Utkast till rapport från OECD:s *ad hoc*-arbetsgrupp för reproduktion och utvecklingstoxicitet. Köpenhamn, Danmark, 13–14 juni 1995.
2. US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Finns på: http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/
3. US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Finns på: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>
4. Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79–91.
5. Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101–111.
6. Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93–100.
7. OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.
8. OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. Juli 2008 finns på: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)
9. OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, september 2003. Finns på: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html
10. Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173–292.
11. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
12. Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188–197.
13. Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1:a utgåvan*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14. Kapitel B.34 i denna bilaga, reproduktionstoxicitetstest på en generation.
15. Kapitel B.35 i denna bilaga, test avseende reproduktionstoxicitet på två generationer.
16. Kapitel B.43 i denna bilaga, test avseende neurotoxicitet på gnagare.
17. Kapitel B.31 i denna bilaga, test avseende prenatal utvecklingstoxicitet.
18. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).
19. WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, Förenta staterna. Finns på: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>
20. WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Finns på: <http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/ehc223.htm>
21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1:a utgåvan, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
22. De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499–509.
23. Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2–6.
24. Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110–112.
25. Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118–136.
26. Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
27. Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
28. Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
29. Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87–94.
30. Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1–4.
31. ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
32. Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433–439.
33. Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449–457.
34. Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383–390.
35. Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350–365.

36. Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579–586.
37. Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298–303.
38. Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489–95.
39. Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896–920.
40. Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. I: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, s. 67–100.
41. Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53–66.
42. Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37–82.
43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117–129.
44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247–260.
45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599–609.
46. Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405–411.
47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661–669.
48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589–591.
49. Davis, M. (1984) The mammalian startle response. I: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287–351
50. Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107–128.
51. Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181–211.
52. Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199–211.
53. Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25–30.
54. Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437–445.
55. Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. I: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125–145.
56. Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321–332.

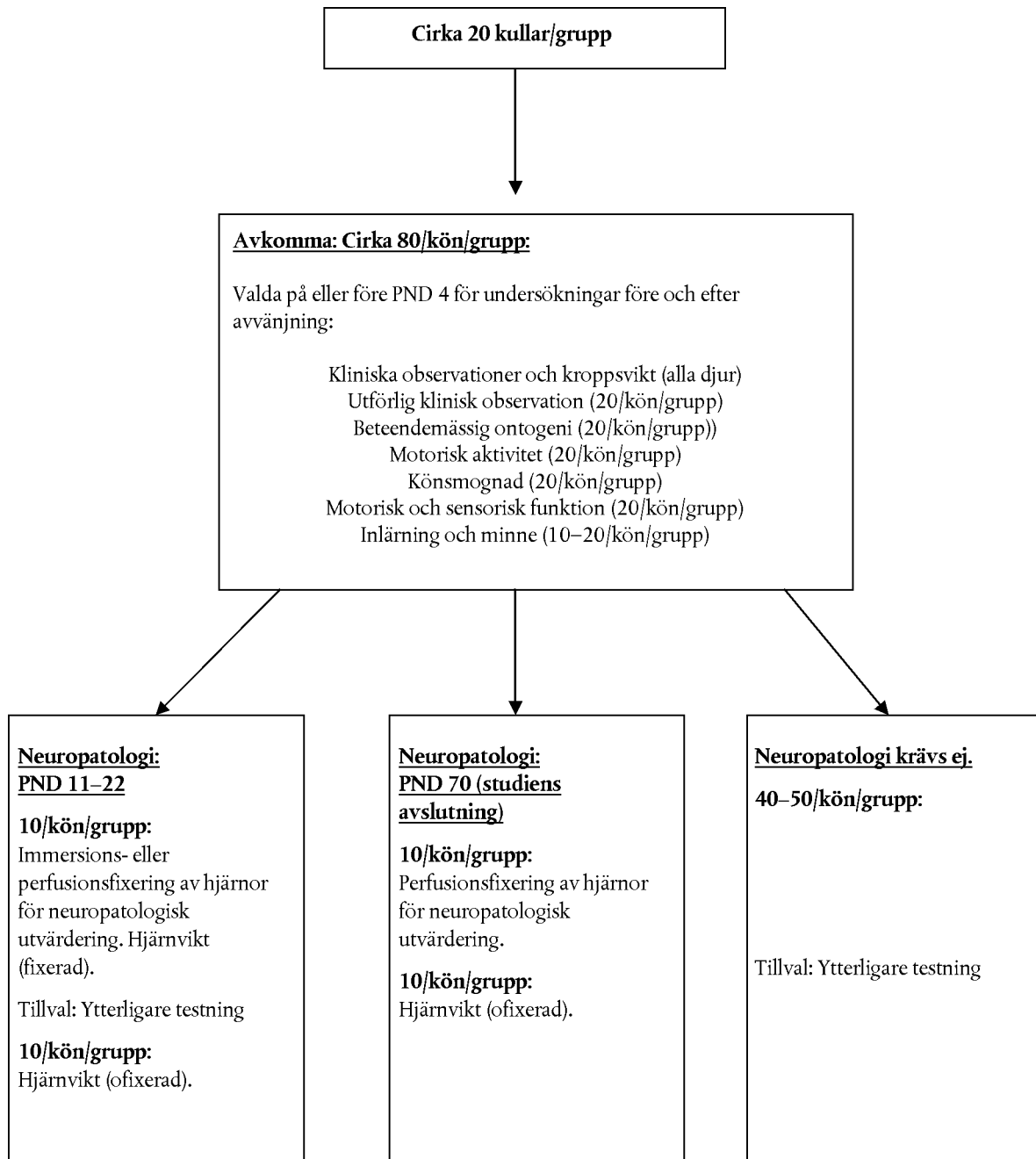
57. Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247–296.
58. Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237–244.
59. Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98–105.
60. Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465–479.
61. Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47–60.
62. Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29–69.
63. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60–90.
64. Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235–241.
65. Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387–399.
66. Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327–332.
67. Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342–352.
68. Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338–341.
69. Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122–131.
70. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.
71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
72. Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291–304.
73. Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123–130.
74. Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365–372.
75. De Olmos, I.S., Beltramino, C.A. och de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545–561.
76. De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745–755.

77. De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S. H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417–432.
78. Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129–135.
79. Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
80. Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305–310.
81. Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262–268.
82. Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707–710.
83. West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51–61.
84. Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813–831.
85. Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113–121.
86. Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294–298.
87. Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. I: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.
88. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70–74.
89. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
90. Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
91. House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127–133.
92. Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401–405.
93. US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.
94. US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.
95. Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
96. Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113–126.
97. Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 08:21–27.

98. Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329–335.
99. Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165–172.
100. Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221–228.
101. Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587–90.
102. Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345–352.
103. Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296–313.
104. Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205–210.
105. Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295–301.
106. Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.
107. Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288–325.
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.
109. Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

Figur 1

Allmänt testschema för funktions- och beteendetester, neuropatologisk utvärdering samt hjärnvikter. Detta diagram baseras på beskrivningen i punkterna 13–15 (PND = postnatal dag). Exempel på anvisning av djur finns i tillägg 1



Tillägg 1

1. Exempel på möjliga anvisningar av försöksdjur beskrivs och visas i tabellform nedan. Dessa exempel ges för att visa att anvisning av djur till olika testparadigm kan åstadkommas på flera olika sätt.

Exempel 1

2. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för testning av beteendontogeni före avväjningen. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane eller 1 hona per kull) humant på PND 22. Hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för histopatologisk utvärdering. Dessutom samlas hjärnviktsdata in från de ej fixerade hjärnorna från de återstående 10 hanarna och 10 honorna per dosnivå.
3. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för funktions-/beteendetester efter avväjningen (detaljerade kliniska observationer, motorisk aktivitet, plötsliga ljud och kognitiv funktionstestning av unga djur) samt bedömning av ålder för könsmodnhet. Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering in situ, tas hjärnan ut och bereds för en neuropatologisk utvärdering.
4. För kognitiva funktionstester av unga vuxna (t.ex. PND 60–70) används en tredje uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Av dessa djur avlivas 10 djur/kön/grupp (1 hane och 1 hona per kull) vid studiens avslutning och hjärnan avlägsnas och vägs.
5. Återstående 20 djur/kön/grupp reserveras för eventuella ytterligare test.

Tabell 1

Unge nr ^(a)		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f 10 m + 10 f	Beteendontogeni PND 22 hjärnvikt/neuropatologi/morfometri PND 22 hjärnvikt
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Detaljerade kliniska observationer Motorisk aktivitet Könsmodnhet Motoriska och sensoriska funktioner Inlärning och minne (PND 25) Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
3	7	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Inlärning och minne (unga vuxna) Unga vuxna hjärnvikt ~ PND 70
4	8	—	Reservdjur till utbyten eller ytterligare tester

^(a) I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.

Exempel 2

6. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för testning av beteendearbete före avväjningen. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (1 hane eller 1 hona per kull) humant på PND 11. Hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för en histopatologisk utvärdering.
7. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (1 hane och 1 hona per kull) används för undersökningar efter avväjningen (detaljerade kliniska observationer, motorisk aktivitet, åldersbedömning av könsmoder samt motoriska och sensoriska funktioner). Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering *in situ*, tas hjärnan ut, vägs och bereds för en neuropatologisk utvärdering.
8. För kognitiv funktionstestning av ungdjur och unga vuxna används 10 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Olika djur används för kognitiva funktionstester på PND 23 och unga vuxna. Vid avslutningen avlivas de 10 djur/kön/ grupp som testades som vuxna, och hjärnan avlägsnas och vägs.
9. De återstående 20 djur/kön/grupp som inte valts ut för testning avlivs och kasseras vid avväjningen.

Tabell 2

Unge nr ^(a)		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Beteendearbete PND 11 hjärnvikt/neuropatologi/morfometri
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Detaljerade kliniska observationer Motorisk aktivitet Könsmoder Motoriska och sensoriska funktioner Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Inläring och minne (PND 23)
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Inläring och minne (unga vuxna) Unga vuxna hjärnvikt
4	8	—	Djur som avlivs och kasseras PND 21

^(a) I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.

^(b) Olika ungar används för kognitiva tester på PND 23 och för unga vuxna (t.ex. jämn/udda kullar av totalt 20).

Exempel 3

10. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för bedömning av hjärnvikt och neuropatologi på PND 11. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) humant på PND 11 och hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för en histopatologisk utvärdering. Dessutom samlas hjärnviktsdata in från de ej fixerade hjärnorna från de återstående 10 hanarna och 10 honorna per dosnivå.

11. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för undersökningar av beteendeontogeni (motorisk aktivitet) efter avvänjningen (motorisk aktivitet och bedömning av ålder för könsmognad) samt testning av kognitiv funktion hos ungdjur.
12. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för motoriska och sensoriska funktionstester (plötsliga ljud) och detaljerade kliniska observationer. Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering *in situ*, tas hjärnan bort, vägs och bereds för en neuropatologisk utvärdering.
13. Ytterligare en uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå används för testning av kognitiv funktion hos unga vuxna (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Av dessa avlivas 10 djur/kön/grupp (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) vid avslutningen, och hjärnan avlägsnas och vägs.

Tabell 3

Unge nr ^(a)		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	PND 11 hjärnvikt/neuropatologi/morfometri PND 11 hjärnvikt
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Beteendeontogeni (motorisk aktivitet) Motorisk aktivitet Könsmognad Inläring och minne (PND 27)
3	7	20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Plötsliga ljud (ungdjur och unga vuxna) Detaljerade kliniska observationer Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Inläring och minne (unga vuxna) Unga vuxna hjärnvikt

^(a) I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.

*Tillägg 2***Definitioner**

kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

B.54 UTEROTROF BIOASSAY PÅ GNAGARE: ETT KORTTIDSSCREENINGTEST FÖR ÖSTROGENA EGENSKAPER**INLEDNING**

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 440 (2007). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga riktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande ämnen (se hänvisning 1). En del av verksamheten var att ta fram en riktlinje för den uterotrofa bioassayen på gnagare. Den uterotrofa bioassayen på gnagare undergick då ett omfattande valideringsprogram, inklusive sammanställandet av ett detaljerat bakgrundsdocument (se hänvisning 2, 3) och genomförandet av omfattande studier inom och mellan laboratorier för att visa testets relevans och reproducerbarhet med en potent referensöstrofen, svaga östrofenreceptoragonister, en stark östrofenreceptorantagonist och en negativ referenskemikalie (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8, 9). Denna testmetod B.54 är resultatet av de erfarenheter som vunnits under valideringen av testprogrammet och de resultat som erhållits därigenom med östrogena agonister.
2. Den uterotrofa bioassayen är ett korttidsscreeningstest som har sitt ursprung på 1930-talet (se hänvisning 27, 28) och som först standardiserades för screening av en expertkommitté 1962 (se hänvisning 32, 35). Den baseras på ökningen av livmodervikt eller uterotrof respons (för översikt, se hänvisning 29). Den utvärderar en testkemikalies möjlighet att framkalla biologiska aktiviteter som är förenliga med agonister eller antagonister för naturliga östrogener (t.ex. 17- β -östradiol), dock används den inte lika ofta för att upptäcka antagonister som för agonister. Livmodern svarar på östrofen på två sätt. En första reaktion är viktökning på grund av vattenupptag. Detta följs av viktökning på grund av vävnadstillväxt (se hänvisning 30). Livmoderns reaktion hos råttor och möss är kvalitativt jämförbara.
3. Denna bioassay tjänar som ett *in vivo*-screeningstest och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av 'OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier' (tillägg 2). I denna konceptuella ram ingår den uterotrofa bioassayen i nivå 3 som ett *in vivo*-test som ger data om en enda endokrin mekanism, dvs. östrofenicitet.
4. Den uterotrofa bioassayen är avsedd att ingå i en serie *in vitro*- och *in vivo*-tester för att identifiera kemikalier med potential att interagera med det endokrina systemet, vilket slutligen leder till riskbedömningar för människors hälsa eller miljön. OECD:s valideringsprogram använder både starka och svaga östrofenagonister för att utvärdera metodens prestanda att identifiera östrogena kemikalier (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Därigenom visades att metodens känslighet när det gäller östrofenagonister var god, vid sidan av en god reproducerbarhet inom och mellan laboratorier.
5. När det gäller negativa kemikalier, så ingick bara en enda 'negativ' referenskemikalie som redan rapporterats negativ genom uterotrof bioassay samt *in vitro*-receptorbindning och receptortest i valideringsprogrammet, men ytterligare testdata, som inte är relaterade till OECD:s valideringsprogram, har utvärderats, vilket ger ytterligare stöd till den särskilda karaktären hos den uterotrofa bioassayen för screening av östrofenagonister (se hänvisning 16).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

6. Östrofenagonister och -antagonister verkar som ligander för östrofenreceptorerna a och b och kan aktivera respektive inhibera receptorernas transkriptionella verkan. Detta har potentialen att leda till negativa hälsorisker, inklusive reproduktions- och utvecklingseffekter. Därför föreligger behovet av att snabbt bedöma och utvärdera en kemikalie som en möjlig östrofenagonist eller -antagonist. Affiniteten hos en ligand för en östrofenreceptor eller en transkriptionell aktivering av rapportörgener *in vitro* är informativ men den är bara en av flera faktorer som är avgörande för eventuella risker. Andra bestämningsfaktorer kan omfatta metabolisk aktivering och avaktivering vid införandet i kroppen, fördelning till målgruppsvävnader samt utträde ur kroppen, beroende, åtminstone delvis, på administreringsväg och kemikalien som testas. Detta medför att det är nödvändigt att granska en kemikalies möjliga aktivitet *in vivo* enligt tillämpliga villkor, såvida inte kemikalies egenskaper vad gäller absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) redan ger lämplig information. Livmodervävnader svarar med snabb och kraftig tillväxt vid östrofenstimulering, särskilt hos laboratoriegnagare då brunstcykeln varar cirka 4 dagar. Gnagare, framför allt råttor, är också vanliga i toxicitetsstudier för riskbedömning. Därför är gnagares livmoder ett lämpligt målorgan för *in vivo*-screeningen av östrofenagonister och -antagonister.
7. Denna testmetod baseras på de protokoll som används i OECD:s valideringsstudie som har visat sig vara tillförlitlig och repeterbar i studier inom och mellan laboratorier (se hänvisning 5, 7). För närvarande finns det två metoder tillgängliga, en metod med ovariektomerade vuxna honor (OVX-adultmetod) och en metod med ej

ovarietkoterade omogna honor (immaturmetod). Det visades i OECD:s valideringstestprogram att båda metoderna har jämförbar känslighet och reproducerbarhet. Immaturmetoden är dock något mindre specifik eftersom den har en intakt hypothalamus-hypofys-gonad-axel (HPG-axeln), men den täcker ett större undersökningsområde än ovariectomerade djur eftersom den kan reagera på kemikalier som interagerar med HPG-axeln och inte bara med östrogenreceptorn. Råttans HPG-axel är funktionell när djuret är ca 15 dygn gammalt. Dessförinnan kan puberteten inte påskyndas med behandlingar som GnRH. Allteftersom honorna börjar nå puberteten, före vaginal öppning, har honan flera tysta cykler som inte resulterar i vaginal öppning eller ägglossning men där det finns vissa hormonella svängningar. Om en kemikalie stimulerar HPG-axeln direkt eller indirekt leder det till tidig pubertet, tidig ägglossning och påskyndad vaginal öppning. Det är inte bara kemikalier som verkar på HPG-axeln som leder till detta, utan vissa typer av föda med högre metaboliserbara energinivåer än andra stimulerar tillväxten och påskyndar vaginal öppning utan att vara östrogena. Sådana kemikalier framkallar inte en uterotrof respons hos ovariectomerade vuxna djur eftersom deras HPG-axel inte fungerar.

8. Av djurskyddsskäl bör företräde ges till den metod som använder omogna råttor, undviker kirurgisk förbehandling av djuren samt även undviker en eventuell icke-användning av de djur som visar eventuella tecken på brunst (se hänvisning 30).
9. Den uterotrofa responsen är inte helt och hållet av östrogen ursprung, dvs. andra kemikalier än agonister eller antagonister av östrogen kan också ge en respons. Exempelvis kan relativt höga doser av progesteron, testosteron eller olika syntetiska progestiner alla leda till en stimulerande respons (se hänvisning 30). Eventuell respons kan analyseras histologiskt för keratinisering och förhornning av vaginan (se hänvisning 30). Oavsett det möjliga ursprunget till responsen, bör ett positivt utfall av en uterotrof bioassay normalt initiera åtgärder för vidare utredning. Ytterligare bevis på östrogenicitet kan komma från *in vitro*-metoder, såsom ER-bindnings- och transkriptionsaktiveringstesterna, eller från andra *in vivo*-metoder såsom honligt pubertetstest.
10. Med beaktande av att den uterotrofa bioassayen tjänar som ett *in vivo*-screeningstest, tog valideringsstrategin både hänsyn till djurens välbefinnande och fungerade som en strategi för stegvis testning. För detta ändamål riktades ansträngningarna mot att noggrant validera reproducerbarheten och känsligheten hos östrogenicitet – det största problemet för många kemikalier, medan liten ansträngning riktades mot antiöstrogenicitetskomponenten i testet. Endast ett antiöstrogen med kraftig aktivitet testades, eftersom antalet kemikalier med en tydlig antiöstrogen profil (som inte skymms av någon östrogen aktivitet) är mycket begränsad. Denna testmetod är således avsedd för det östrogena protokollet, medan protokollet som beskriver testets antagonistläge ingår i ett vägledningsdokument (se hänvisning 37). Testets reproducerbarhet och känslighet för kemikalier med uteslutande antiöstrogen aktivitet kommer att definieras tydligare längre fram, efter det att testförfarandet har använts rutinmässigt under en tid och fler kemikalier med detta verkningssätt har identifierats.
11. Alla djurbaserade förfaranden ska uppfylla lokala normer för djurskötsel. De beskrivningar av vård och behandling som anges nedan är minimala prestandakrav som kommer att ersättas av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 38). Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (se hänvisning 25).
12. Som med alla tester som använder sig av levande djur är det viktigt att se till att uppgifterna verkligen är nödvändiga innan testet påbörjas. Två förhållanden där data kan krävas är:
 - Hög exponeringspotential (nivå 1 i den konceptuella ramen, tillägg 2) eller indikationer på östrogenicitet (nivå 2) för att undersöka om sådana effekter kan uppstå *in vivo*.
 - Effekter som indikerar östrogenicitet i *in vivo*-tester på nivå 4 eller 5, för att styrka att effekterna var relaterade till en östrogen mekanism som inte kan beläggas med hjälp av ett *in vitro*-test.
13. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Den uterotrofa bioassayen förlitar sig på känsligheten hos ett djurtestsystem där hypothalamus-hypofys-ovarie-axeln inte är funktionell, vilket leder till låga endogena nivåer av cirkulerande östrogen. Detta säkerställer en låg livmoderreferensvikt och ett maximalt responsområde för administrerade östrogener. Två östrogenkänsliga tillstånd hos hongnagar uppfyller detta krav:
 - i) Omogna honor efter avvänjning och före puberteten och
 - ii) unga vuxna honor efter ovariektomi med tillräcklig tid för livmodervävnaden att gå i regress.
15. Testkemikalien tillförs dagligen via sondmatning eller subkutan injektion. Stegvisa testkemikaliadoser ges till minst två behandlingsgrupper av försöksdjur (se punkt 33 för vägledning), med en dosnivå per grupp, och för immaturmetoden en administreringsperiod av tre på dagar i följd och för OVX-adultmetoden en administreringsperiod av minst tre dagar i följd. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. För östrogenagonister utvärderas medelvärdet för livmodervikten hos de behandlade djurgrupperna i förhållande till vehikelgruppen avseende en statistiskt signifikant ökning. En statistiskt signifikant ökning av den genomsnittliga livmodervikten hos en testgrupp visar en positiv respons i denna bioassay.

BESKRIVNING AV METODEN

Val av djurart

16. Vanligen använda stammar av laboratoriegnagare kan användas. Till exempel användes Sprague-Dawley- och Wistar-råttstammar vid valideringen. Stammar med en livmoder som är eller misstänks vara mindre känslig bör inte användas. Laboratoriet bör påvisa känslighet hos den stam som används, enligt beskrivningen i punkt 26 och 27.
17. Råttor och mus har rutinmässigt använts för den uterotrofa bioassayen sedan 1930-talet. OECD:s valideringsstudier har endast utförts med råttor, grundat på en förståelse för att båda arterna bedöms vara likvärdiga och att det därmed bör räcka med en art för den världsomfattande valideringen för att spara resurser och djur. Råttan är den art som används i de flesta studier om reproduktions- och utvecklingstoxicitet. Med hänsyn till att det finns en stor historisk databas för möss och därmed möjlighet att bredda testmetoden för uterotrof bioassay på gnagare och använda möss som testart, har en begränsad uppföljande valideringsstudie genomförts på möss (se hänvisning 16). En överbryggande studie, med ett begränsat antal testkemikalier och deltagande laboratorier och utan kodad provtestning, har valts i enlighet med den ursprungliga avsikten att spara resurser och djur. Denna överbryggande valideringsstudie visar för den uterotrofa bioassayen på unga vuxna ovariektomerade möss att data som erhålls från råttor och möss överensstämmer väl, både kvalitativt och kvantitativt. Resultatet från den uterotrofa bioassayen kan bli inledningen till en långsiktig studie, vilket gör att djur från samma stam och ursprung kan användas i båda försöken. Den överbryggande studien begränsades till OVX-möss och rapporten ger inte en robust datauppsättning för att validera immaturmodellen, och därför beaktas inte immaturmodellen för möss i denna testmetod.
18. Således kan, i vissa fall, möss användas i stället för råttor. En motivering bör ges för denna art baserat på toxikologiska, farmakokinetiska och/eller andra kriterier. Ändringar i protokollet kan bli nödvändigt för möss. Till exempel är foderkonsumtionen hos möss i förhållande till kroppsvikt högre än den hos råttor och därför bör innehållet av fytoöstrogen i fodret vara lägre för möss än för råttor (se hänvisning 9, 20, 22).

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

19. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Dessa beskrivningar av vård och behandling är minimikrav och ersätts av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 38). Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 °C (med ett ungefärligt intervall på ± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målet bör vara relativ luftfuktighet på 50–60 %. Artificiell belysning bör användas. Den dagliga belysningssekvensen bör vara 12 timmar ljus, 12 timmar mörker.
20. Djuren ska ha fri tillgång till laboratoriefoder och dricksvatten. Unga vuxna djur kan inhysas individuellt eller i burar om grupper på upp till tre djur. På grund av de omogna djurens låga ålder rekommenderas social gruppinhysning.

21. Höga nivåer av fytoöstrogener i laboratoriefoder har varit kända för att öka livmodervikterna tillräckligt mycket hos gnagare för att störa den uterotrofa bioassayen (se hänvisning 13, 14, 15). Höga nivåer av fytoöstrogener och omsättbar energi i laboratoriefoder kan också leda till tidig pubertet om omogna djur används. Förekomsten av fytoöstrogener kommer främst från soja och alfalfaprodukter som tillförts laboratoriefodret, och koncentrationer av fytoöstrogener har visat sig variera mellan olika partier av standardlaboratoriefoder (se hänvisning 23). Kroppsvikt är en viktig variabel, eftersom den mängd livsmedel som konsumeras är relaterad till kroppsvikten. Därför kan den faktiska fytoöstrogendosen som konsumeras genom samma foder variera mellan arter och åldrar (se hänvisning 9). För omogna honrättor kan foderkonsumtionen på grundval av kroppsvikten vara ungefär dubbelt så stor som hos ovariektomerade unga vuxna honor. För unga vuxna möss kan foderkonsumtionen på grundval av kroppsvikten vara ungefär fyrdubblad som den för ovariektomerade unga vuxna honrättor.
22. Resultat från den uterotrofa bioassayen (se hänvisning 9, 17, 18, 19) visar dock att begränsade mängder fytoöstrogener i fodret är acceptabla och minskar inte bioassayens känslighet. Som en vägledning bör nivåerna av fytoöstrogener i fodret inte överstiga 350 µg genisteinkvivalenter/gram laboratoriefoder för omogna Sprague Dawley- och Wistar-honrättor (se hänvisning 6, 9). Sådant foder bör också vara lämplig vid testning av unga vuxna ovariektomerade rättor, eftersom foderkonsumtionen på basis av kroppsvikten är mindre hos unga vuxna jämfört med omogna djur. Om vuxna ovariektomerade möss eller mer fytoöstrogenkänsliga rättor används, måste en proportionell minskning av fytoöstrogennivåerna i fodret övervägas (se hänvisning 20). Dessutom kan skillnader i tillgänglig metabolisk energi för olika typer av föda leda till tidsförskjutning av pubertetsdebuten (se hänvisning 21, 22).
23. Ett noggrant val av foder utan förhöjda nivåer av fytoöstrogener (för vägledning, se hänvisning 6, 9) eller omsättbar energi, som kan påverka resultaten (se hänvisning 15, 17, 19, 22, 36), krävs före studien. Att säkerställa ett korrekt utförande av det testsystem som används på laboratoriet enligt punkterna 26 och 27 är en viktig kontroll av båda dessa faktorer. Som en säkerhetsåtgärd enligt god laboratoriesed (GLP) bör representativ provtagning av varje parti av foder som tillförs under studien utföras för eventuell analys av fytoöstrogeninnehållet (t.ex. vid hög livmoderkontrollvikt i förhållande till historiska kontroller, eller en otillräcklig respons på referensöstrogener, 17-alfa-etinylestradiol). Alikvoter ska analyseras som en del av studien eller frysas vid – 20 °C eller på sådant sätt att provet inte bryts ned i väntan på analys.
24. Vissa strömaterial kan innehålla naturligt förekommande östrogena eller antiöstrogena kemikalier (t.ex. är majskolvar kända för att påverka cykliciteten hos rättor och förefaller vara antiöstrogena). Det valda ströet bör ha en minimal halt av fytoöstrogener.

Förberedelse av djuren

25. Försöksdjur utan tecken på sjukdom eller fysiska abnormiteter väljs slumpmässigt ut för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras så att eventuella effekter beroende på placering blir så små som möjligt. Djuren bör identifieras unikt. Helst bör omogna djur placeras i bur tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur fram till avvänjningen under aklimatiseringen. Aklimatiseringsperioden före studiens start bör vara ca 5 dagar för unga vuxna djur och omogna djur som levererats tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur. Om omogna djur erhålls som avvanda utan moderdjur kan det vara nödvändigt att förkorta aklimatiseringsperioden eftersom doseringen bör inledas omedelbart efter avvänjningen (se punkt 29).

FÖRFARANDE

Kvalifikationsprövning av laboratorium

26. Två olika alternativ kan användas för att kvalitetspröva laboratorier:
 - Återkommande kontroller eller förlita sig på en inledande positiv grundkontrollstudie (se punkt 27). Minst var 6:e månad och varje gång det sker en förändring som kan påverka utförandet av testet (t.ex. en ny beredning av foder, byte av personal som utför dissektioner, förändringar av djurstam eller leverantör, etc.), bör känsligheten hos testsystemet (djurmodell) verifieras med en lämplig dos (baserat på den inledande positiva grundkontrollstudien beskriven i punkt 27) av ett referensöstrogener: 17a-etinylestradiol (CAS-nr 57-63-6) (EE).
 - Användning av jämsides behandlade kontroller genom att inkludera en grupp som tillförs en lämplig dos av referensöstrogener i varje test.

Om systemet inte svarar som förväntat bör försöksbetingelserna granskas och ändras i enlighet därmed. Det rekommenderas att dosen av referensöstrogen som används i båda fallen bör vara ungefär ED 70 till 80.

27. **Positiv grundkontrollstudie** – Innan ett laboratorium genomför en undersökning enligt denna testmetod för första gången bör laboratoriets kompetens visas i ett test av djurmodellens respons genom fastställande av dosresponsen för ett referensöstrogen: 17 α -etinyloestradiol (CAS-nr 57-63-6) (EE) med minst fyra doser. Livmoderviktsresponsen kommer att jämföras med etablerade historiska data (se hänvisning 5). Om denna positiva grundkontrollstudie inte ger förväntade resultat bör försöksbetingelserna granskas och ändras.

Djurens antal och skick

28. Varje behandlad grupp och kontrollgrupp bör innehålla minst 6 djur (protokoll för både immatur- och OVX-adultmetod).

Ålder på omogna djur

29. För den uterotrofa bioassayen med omogna djur måste födelsedatum anges. Doseringen bör starta tillräckligt tidigt för att säkerställa, i slutet av tillförseln av testkemikalien, att den fysiologiska ökningen av endogena östrogener som sammanhänger med puberteten ännu inte har ägt rum. Å andra sidan finns det belegg för att mycket unga djur kan vara mindre känsliga. För att definiera optimal ålder bör varje laboratorium ta sina egna bakgrundsdata om mognad i beaktande.

Som en allmän vägledning kan doseringen av råttor påbörjas omedelbart efter tidig avvänjning på postnatal dag 18 (postnatal dag 0 är födelsedatum). Doseringen av råttor bör helst vara avslutad på postnatal dag 21 men i alla händelser före postnatal dag 25, eftersom hypotalamus-hypofys-ovarie-axeln blir funktionell efter den åldern och endogena östrogennivåer kan börja stiga vilket leder till en ökning av referensmedelvärden för livmodervikt och gruppens standardavvikelser (se hänvisning 2, 3, 10, 11, 12).

Förfarande för ovariectomi

30. För ovariectomerad honråtta och honmus (behandlings- och kontrollgrupper) bör ovariectomin ske mellan 6 och 8 veckors ålder. För råttor bör minst 14 dagar förflyta mellan ovariectomin och den första dagen för tillförseln så att livmodern går i regress till en minimal, stabil referensnivå. För möss bör åtminstone 7 dagar förflyta mellan ovariectomin och tillförselns första dag. Eftersom små mängder av äggstocksvävnad är tillräckliga för att ge betydande cirkulerande nivåer av östrogen (se hänvisning 3), bör djuren testas före användningen genom att prov av epitelceller från vagina observeras minst fem dagar i följd (t.ex. dag 10–14 efter ovariectomin för råttor). Om djuren visar tecken på brunst bör de inte användas. Vid obduktionen bör äggstocksresterna undersökas avseende eventuella tecken på äggstocksvävnad. Om så är fallet bör djuret inte tas med i beräkningarna (se hänvisning 3).
31. Ovariectomiproceduren inleds med djuret placerat i ventral halvliggande ställning, efter att djuret har blivit ordentligt bedövat. Snittet som öppnar den dorsolaterala bukväggen bör vara ca 1 cm på längden vid mittpunkten mellan revbensbroskets undre kant och höftbenskammen, och några millimeter i sidled fram till den laterala kanten på ryggmuskeln. Äggstockarna bör tas ut ur bukhålan till ett aseptiskt underlag. Äggstockarna bör lossas vid förbindelsen mellan äggledaren och livmodern. Efter att ha bekräftat att ingen massiv blödning sker, bör bukväggen tillslutas med en sutur och huden tillslutas med autoclips eller lämplig sutur. Ligaturpunkterna visas schematiskt i figur 1. Lämplig postoperativ smärtlindring bör användas i enlighet med rekommendationer från en veterinär med erfarenhet av gnagarvård.

Kroppsvikt

32. För OVX-adultmetoden är kroppsvikt och livmodervikt inte korrelerade eftersom livmodervikten påverkas av hormoner som östrogen, men inte av tillväxtfaktorer som reglerar kroppsstorleken. Däremot är kroppsvikten relaterad till livmoderns vikt i immaturmodellen, samtidigt som den mognar (se hänvisning 34). Således bör, vid början av studien, viktskillnaden mellan djuren som används i immaturmodellen vara minimal och inte

överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten. Detta innebär att uppfödaren bör standardisera kullstorleken, för att säkerställa att avkomman från olika moderdjur kommer att matas ungefär likadant. Djuren bör anvisas till grupper (både kontroll- och behandlingsgrupper) genom slumpmässig viktfordelning, så att medelvärdet för kroppsvikten i varje grupp inte statistiskt skiljer sig åt från andra grupper. Man bör överväga att undvika anvisning av kullsyskon till samma behandlingsgrupp, så vitt det är möjligt, utan att öka antalet kullar som ska användas för undersökningen.

Dosering

33. För att fastställa huruvida en testkemikalie kan ha östrogen aktivitet *in vivo* är normalt två dosgrupper och en kontrollgrupp tillräckliga, och denna utformning är därför att föredra av djurskyddsskäl. Om syftet är att antingen erhålla en dos-responskurva eller att extrapolera till lägre doser, behövs minst 3 dosgrupper. Om information utöver identifiering av östrogen aktivitet (t.ex. en uppskattning av potens) krävs, bör ett annat doseringsschema övervägas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som i testgruppen. Om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som används i de behandlade grupperna (eller den största volym som används i testgrupperna om detta skiljer sig åt mellan grupperna).
34. Målet för den uterotrofa bioassayen är att välja doser som garanterar djurens överlevnad och som inte orsakar signifikant toxicitet eller lidande hos djuren, efter tre dagar i följd med tillförsel av kemikalien upp till en maximal dos på 1 000 mg/kg/dag. Alla dosnivåer bör väljas med hänsyn till eventuella toxicitetsdata och (toxiko-)kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosen bör ta hänsyn till LD 50 och/eller information om akut toxicitet för att undvika dödsfall, svår smärta och lidande hos djuren (se hänvisning 24, 25, 26). Den högsta dosen bör motsvara maximal tolererbar dos (MTD). En studie som genomförs vid en dosnivå som framkallar en positiv uterotrof respons accepteras också. Som en screening är breda intervall (t.ex. halva logenheter som motsvarar en dosprogression på 3,2 eller till och med upp till en logenhet) mellan doseringarna i allmänhet godtagbara. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en dosfinnande studie genomföras som hjälp för att bestämma vilka doser som ska användas.
35. Alternativt, om den östrogena potensen hos en agonist kan uppskattas genom *in vitro*-data (eller datormodeller) kan dessa beaktas vid valet av dos. Exempelvis kan mängden testkemikalie som skulle framkalla en uterotrof respons som är likvärdig med referensagonisten (etinyloestradiol) uppskattas genom dess relativa *in vitro*-potens jämfört med etinyloestradiol. Den högsta testdosen ges genom att multiplicera denna ekvivalentdos med en lämplig faktor, t.ex. 10 eller 100.

Överväganden för dosfinnande studie

36. Vid behov kan en preliminär dosfinnande studie genomföras med några få djur. För detta ändamål kan man använda OECD:s vägledning nr 19 (se hänvisning 25) som definierar kliniska tecken som tyder på toxicitet eller lidande för djuren. Om det är möjligt inom denna dosfinnande studie kan, efter tre dagars tillförsel, livmodern skäras ut och vägas ca 24 timmar efter att sista dosen getts. Dessa data kan sedan användas vid utformning av huvudstudien (val av en acceptabel största och minsta dos och rekommenderat antal dosgrupper).

Tillförsel av doser

37. Testkemikalien tillförs via sondmatning eller subkutan injektion. Djurskydd såväl som toxikologiska aspekter av betydelse för den mänskliga exponeringsvägen för kemikalien (t.ex. oral sondmatning för att efterlikna förtäring, subkutan injektion för att efterlikna inandning eller hudabsorption), de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos testmaterialet och i synnerhet gällande toxikologisk information och data om metabolism och kinetik (t.ex. behovet att undvika första passage-metabolism, större effektivitet via en bestämd rutt) måste tas med i beräkningen när man väljer administrationssätt.
38. Det rekommenderas att i första hand överväga att använda en vattenbaserad lösning/suspension, om det är möjligt. Men eftersom de flesta östrogenligander eller deras metaboliska prekursorer tenderar att vara hydrofoba, är den vanligaste metoden att använda en lösning/suspension i olja (t.ex. majs-, jordnöts-, sesam- eller olivolja). Dessa oljor har olika kaloriinnehåll och fetthalt, sålunda kan vehikeln påverka det totala metaboliserbara energiintaget (ME) och därmed eventuellt förändra uppmätta endpoints såsom livmodervikten, i synnerhet för immaturmetoden (se hänvisning 33). Före studien bör därför alla vehiklar som ska användas testas mot kontroller utan

vehiklar. Testkemikalier kan lösas upp i en minimal mängd av 95 % etanol eller annat lämpligt lösningsmedel, och spädas ut till slutliga koncentrationer i testvehikeln. De toxiska egenskaperna hos lösningsmedlet måste vara kända, och bör testas med endast lösningsmedel i en separat kontrollgrupp. Om testkemikalien bedöms vara stabil kan försiktig uppvärmning och kraftig mekanisk påverkan användas för att hjälpa till att lösa upp testkemikalien. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Om testkemikalien är stabil under hela studien kan en startalikvot av testkemikalien beredas, och därefter kan de angivna doseringsutspädningarna beredas dagligen.

39. Doseringstidpunkterna beror på den modell som används (se punkt 29 för immaturmodellen och punkt 30 för OVX-adultmodellen). Omogna råttor av honkön doseras dagligen med testkemikalien tre dagar i följd. En tredagars behandling rekommenderas också för ovariektomerade honrättor, men längre exponeringar är acceptabla och kan förbättra upptäckten av svagt aktiva kemikalier. För ovariektomerade honmöss bör tre dagar vara tillräckligt, och det finns inte någon påvisbar fördel med en förlängning på upp till sju dagar för starka östrogenagonister, dock påvisades inte detta förhållande för svaga östrogener i valideringsstudien (se hänvisning 16), alltså bör doseringen förlängas upp till sju dagar i följd för ovariektomerade vuxna möss. Dosen bör ges vid samma tid varje dag. Doserna bör justeras vid behov för att bibehålla en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (t.ex. mg av testkemikalien per kg kroppsvikt per dag). När det gäller testvolymen bör dess variationer på grundval av kroppsvikten minimeras, genom justering av koncentrationen i doseringslösningen, för att säkerställa en konstant volym på grundval av kroppsvikten, vid alla dosnivåer och för varje administrationsväg.
40. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en daglig engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Lokala djurvårdsriktlinjer bör följas, men volymen bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, utom i fråga om vattenlösningar där 10 ml/kg kroppsvikt får användas.
41. När testkemikalien administreras genom subkutan injektion, bör detta ske i en enda daglig dos. Doserna ska ges i dorsoscapular- eller lumbarregionen med en steril nål (t.ex. med grovleken 23 eller 25), och en tuberkulinspruta. Rakning av injektionsstället är valfritt. Eventuell förlust, läckage vid injektionsstället eller ofullständig dosering ska registreras. Den totala volymen som injiceras per rätta per dag bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, uppdelat på 2 injektionsställen, utom i fråga om vattenhaltiga lösningar, där 10 ml/kg kroppsvikt kan användas.

Observationer

Allmänna och kliniska observationer

42. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag och oftare när tecken på toxicitet observeras. Observationerna bör företrädesvis utföras vid samma tidpunkt varje dag och med hänsyn till förväntade toppeffekter efter doseringen. Alla djur ska observeras avseende dödlighet, sjuklighet och allmänna kliniska tecken, såsom förändringar i beteende, hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek och ovanligt andningsmönster).

Kroppsvikt och foderkonsumtion

43. Alla djur bör vägas dagligen med en noggrannhet på 0,1 g, med början strax före starten av behandlingen, dvs., när djuren fördelas i grupper. Som en valfri mätning, kan mängden foder som konsumeras under behandlingsperioden mätas per bur genom vägning av fodertrågen. Foderkonsumtionsresultaten bör uttryckas i gram per rätta per dag.

Dissekering och mätning av livmodervikt

44. Råttorna ska avlivas humannt tjugofyra timmar efter den sista behandlingen. Helst ska obduktionsordningen randomiseras mellan grupperna för att undvika progression direkt upp eller ner i dosgrupperna, vilket på ett subtilt sätt kan påverka data. Bioassayens mål är att mäta både våt och torr livmodervikt. Den våta vikten inkluderar livmodern och det luminala vätskeinnhållet. Den torra vikten mäts efter att det luminala innehållet i livmodern har angivits och avlägsnats.

45. Före dissektionen granskas vaginan beträffande öppningsstatus hos omogna djur. Dissektionsförfarandet inleds genom att öppna bukväggen med början vid blygdbenssammanfogningen. Sedan lossas livmoderhornet och äggstockarna, om de är kvar, från den dorsala bukväggen. Urinblåsan och urinledarna tas bort från den ventrala och laterala sidan av livmodern och vaginan. Fibrös vidhäftning mellan rektum och vaginan avskiljs tills övergången mellan vaginalöppning och perineal hud kan identifieras. Livmodern och vaginan avskiljs från kroppen genom ett snitt i vaginalväggen precis ovanför förbindelsen mellan perineal hud såsom visas i figur 2. Livmodern avskiljs från kroppsväggen genom att livmoderbandet försiktigt skärs av vid fästpunkten, längs hela längden av den dorsolaterala aspekten av varje livmoderhorn. När livmodern tagits ut ur kroppen bör den hanteras tillräckligt snabbt för att undvika uttorkning av vävnaderna. Viktförluster på grund av uttorkning blir mer betydelsefulla med små vävnader såsom uterus (se hänvisning 23). Om äggstockarna finns kvar så tas äggstockarna bort från äggledarna för att undvika förlust av luminal vätska från livmoderhornet. Om djuret har ovariektomerats så bör resterna undersökas beträffande förekomsten av eventuell äggstocksvävnad. Överflödigt fett och bindväv ska putsas bort. Vaginan tas bort från livmodern precis under livmoderhalsen så att livmoderhalsen förblir i livmodern, såsom visas i figur 2.
46. Varje livmoder bör överföras till en individuellt märkt och vägd behållare (t.ex. en petriskål eller ett vikttråg i plast) med fortsatt omsorg om att undvika uttorkning före vägningen (t.ex. så kan filterpapper som fuktats med saltlösning placeras i behållaren). Livmodern med luminal vätska vägs med en noggrannhet på 0,1 mg (våt livmodervikt).
47. Varje livmoder bearbetas sedan enskilt för att avlägsna luminal vätska. Båda livmoderhornen genomborras eller skärs longitudinellt. Livmodern placeras på lätt fuktat filterpapper (t.ex. Whatman nr 3) och pressas försiktigt med ett andra stycke lätt fuktat filterpapper för att helt avlägsna den luminala vätskan. Livmodern utan lumbalt innehåll vägs med en noggrannhet på 0,1 mg (torr livmodervikt).
48. Livmodervikten vid avslutningen kan användas för att säkerställa att lämplig ålder för den omogna intakta råttan inte överskreds, dock är de historiska uppgifterna om rättstammen som används på laboratoriet avgörande i detta hänseende (se punkt 56 för tolkning av resultaten).

Valfria undersökningar

49. Efter vägningen kan livmodern fixeras i 10 % neutral buffrad formalin för att undersökas histopatologiskt efter haematoxylin-eosin-färgning (HE). Vaginan kan undersökas i enlighet därmed (se punkt 9). Dessutom kan morfometriska mätningar av endometriets epitel utföras för en kvantitativ jämförelse.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Studiedata bör omfatta
- antalet djur vid testets början,
 - antalet och identiteten för de djur som påträffats döda under testet eller som avlivats av humana skäl, samt datum och tid för varje dödsfall eller avlivning,
 - antalet och identiteten för de djur som visar tecken på toxicitet och en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och hur allvarliga de toxiska effekterna är samt
 - antalet och identiteten hos de djur som visar eventuella skador och en beskrivning av typen av skador.
51. Individuella försöksdjursdata ska registreras avseende kroppsvikt, våt livmodervikt och torr livmodervikt. Ensidiga statistiska analyser av agonister bör användas för att bestämma huruvida administrering av en testkemikalie resulterade i en statistiskt signifikant ($p < 0,05$) ökning av livmodervikten. Lämpliga statistiska analyser bör utföras för testning avseende behandlingsrelaterade förändringar av torr och våt livmodervikt. Exempelvis kan data utvärderas genom en kovariansanalys (Ancova), med kroppsvikten vid obduktionen som samvariabel. En variansstabiliserande logaritmisk transformation kan utföras på livmoderdata före dataanalysen. Dunnett och Hsus test är

lämpliga för att göra parvisa jämförelser mellan varje dosgrupp och vehikelkontroller och för att beräkna konfidensintervallet. Studentiserade residualer kan användas för att upptäcka eventuella avvikande värden och bedöma variansens homogenitet. Dessa förfaranden tillämpades i OECD:s valideringsprogram med hjälp av PROC GLM i Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC), version 8 (se hänvisning 6, 7).

52. En slutrapport ska innehålla:

Testanläggning:

- Ansvarig personal och deras studieansvar.
- Data från utgångsvärdet för det positiva kontrolltestet och periodiska positiva kontrolldata (se punkterna 26 och 27)

Testkemikalie:

- Karakterisering av testkemikalier.
- Fysikalisk form och om det är relevant, fysikalisk-kemikaliska egenskaper.
- Metod och frekvens för beredning av utspädningar.
- Eventuella stabilitetsdata som genererats.
- Eventuella analyser av doseringslösningar.

Vehikel:

- Karakterisering av testvehikel (form, leverantör och parti)
- Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

- Art och stam, samt motivering av valet.
- Leverantör och specifik leverantörsanläggning.
- Leveransålder med födelsedatum.
- För omogna djur: uppgift om huruvida de har levererats tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur, samt datum för avvänjningen.
- Uppgifter om djuracklimatiseringsförfarande.
- Antalet djur per bur.
- Detaljer och metod för identifiering av enskilda djur och grupper.

Testbetingelser:

- Uppgifter om randomiseringsprocess (dvs. metoden som använts)
- Motivering för valet av dos.
- Uppgifter om testkemikaliens sammansättning, dess uppnådda koncentrationer, stabilitet och homogenitet.
- Uppgifter om tillförsel av testkemikalien samt motivering av valet av exponeringsväg.
- Foder (namn, typ, leverantör, innehåll och, om möjligt, fytööstrogennivåer).
- Vattenkälla (t.ex. kranvatten eller filtrerat vatten) och tillförselsätt (genom slang från en stor behållare, i flaskor, etc.).
- Strö (namn, typ, leverantör, innehåll).
- Registrering av burförhållanden, belysningsintervall, rumstemperatur och luftfuktighet, rengöring.
- Detaljerad beskrivning av obduktion och livmodervägning.
- Beskrivning av statistiska metoder.

*Resultat**För enskilda djur:*

- Alla dagliga individuella kroppsvikter (från anvisningen till grupper och fram till obduktionen) (med en noggrannhet på 0,1 g).
- Ålder på varje djur (räknat i dagar med födelsedatum som dag 0) när behandlingen med testkemikalien börjar.
- Datum och tid för varje doseringstillfälle.
- Beräknad volym och dos som administreras, samt observationer av eventuella doseringsförluster under eller efter administreringen.
- Daglig dokumentation av djurens status, inklusive relevanta symtom och iakttagelser.
- Misstänkt dödsorsak (om den hittas döende eller död under studien).
- Datum och tid för human avlivning med tidsintervall till sista doseringen.
- Våt livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg) och eventuella observationer av förlust av luminal vätska vid dissekering och förberedelser för vägning.
- Torr livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg).

För varje grupp av djur:

- Genomsnittliga dagliga kroppsvikter (med noggrannhet på 0,1 g) och standardavvikelser (från anvisningen till grupper till obduktionen).
- Genomsnittlig våt livmodervikt och genomsnittlig torr livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg), samt standardavvikelser.
- Daglig foderkonsumtion om den mäts (beräknat som gram foder som konsumeras per djur).
- Resultaten av statistiska analyser som jämför både våta och torra livmodervikter i behandlade grupper i förhållande till samma mått i vehikelkontrollgrupperna.
- Resultaten av statistisk analys som jämför den totala kroppsvikten och kroppsviktökning i behandlade grupper i förhållande till samma mått i vehikelkontrollgrupperna.

53. Sammanfattning av de viktigaste vägledningsfakta för testmetoden.

	Råtta	Möss
Djur		
Stam	Vanlig laboratoriestam av gnagare	
Antal försöksdjur	Minst 6 djur per dosgrupp	
Antal grupper	Minst 2 testgrupper (se punkt 33 för vägledning) och en negativ kontrollgrupp För vägledning om positiva kontrollgrupper se punkterna 26 och 27	
Inhysnings- och utfodringsförhållanden		
T° i djurutrymmet	22 °C ± 3 °C	
Relativ luftfuktighet	50–60 % och inte under 30 % eller över 70 %	
Daglig belysningssekvens	12 timmar ljus, 12 timmar mörker	
Foder och dricksvatten	Fri tillgång	

	Rått	Möss
Inhysning	Individuellt eller i grupper på upp till tre djur (social gruppinhysning rekommenderas för omogna djur)	
Foder och strö	En låg halt av fytoöstrogener rekommenderas i foder och strö	

Protokoll

Metod	Ej ovariectomerad immatur-metoden (föredras) Ovariectomerad adult hona-metoden	Ovariectomerad adult hona-metoden
Ålder för dosering av omogna djur	Tidigast PND 18. Doseringen bör vara avslutad före PND 25	Ej relevant inom tillämpningsområdet för den aktuella testmetoden
Ålder vid ovariectomi	Mellan 6 och 8 veckors ålder	
Ålder för dosering av ovariectomerade djur	Minst 14 dagar bör förflyta mellan ovariectomin och 1:a administreringsdagen	Minst 7 dagar bör förflyta mellan ovariectomin och 1:a administreringsdagen
Kroppsvikt	Kroppsviktsvariationen bör vara minimal och inte överstiga $\pm 20\%$ av den genomsnittliga vikten	

Dosering

Administrationssätt	Oral sondmatning eller subkutan injektion	
Administreringsfrekvens	Daglig engångsdos	
Volym för sondmatning och insprutning	$\leq 5\text{ ml/kg}$ kroppsvikt (eller upp till 10 ml/kg kroppsvikt i fråga om vattenlösningar) (i 2 injektionsställen för subkutan administrering)	
Administreringens varaktighet	3 dagar i följd för immaturmodellen Minst 3 dagar i följd för OVX-modellen	7 dagar i följd för OVX-modellen
Tidpunkt för obduktion	Ungefär 24 timmar efter den sista dosen	

Resultat

Positiv respons	Statistiskt signifikant ökning av medelvärdet för livmodervikt (våt och/eller torr)
Referensöstrogener	17 α -etinyloestradiol

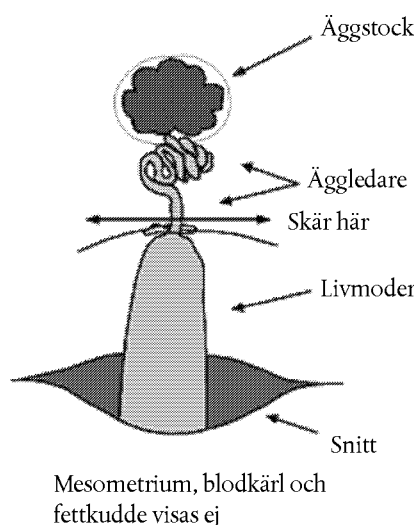
RIKTLINJER FÖR TOLKNING OCH GODKÄNNANDE AV RESULTATEN

54. I allmänhet bör ett test för östrogenicitet anses vara positivt om det finns en statistiskt signifikant ökning i livmodervikt ($p < 0,05$), åtminstone vid den höga dosnivån jämfört med lösningsmedelskontrollgruppen. Ett positivt resultat stöds också av en demonstration av ett biologiskt rimligt förhållande mellan dosen och responsens omfattning, med tanke på att överlappning av östrogena och antiöstrogena aktiviteter hos testkemikalien kan påverka dos-responskurvens form.
55. Man måste vara försiktig med att inte överskrida den maximalt tolererbara dosen för en meningsfull tolkning av data. Minskning av kroppsvikt, kliniska tecken och andra fynd bör noggrant utvärderas i detta hänseende.

56. En viktig fråga för godkännandet av data från den uterotrofa bioassayen är livmodervikterna i vehikelkontrollgruppen. Höga kontrollvärden kan äventyra responsen hos bioassayen och förmågan att upptäcka mycket svaga östrogenagonister. Litteraturstudier och data som genereras under valideringen av den uterotrofa bioassayen tyder på att höga kontrollmedelvärden kan förekomma spontant, i synnerhet hos omogna djur (se hänvisning 2, 3, 6, 9). Eftersom livmodervikten hos omogna råttor beror på många variabler som stam eller kroppsvikt, kan ingen definitiv övre gräns för livmodervikten ges. Som en vägledning bör, om de torra livmodervikterna hos omogna kontrollrättor ligger mellan 40 och 45 mg, kan resultatet betraktas som misstänkt, och livmodervikter över 45 mg kan leda till att testet görs om igen. Dock måste detta beaktas från fall till fall (se hänvisning 3, 6, 8). Vid testning på vuxna råttor kan ofullständig ovariectomi som kvarlämnar äggstocksvävnad producera endogent östrogen och fördröja regressionen av livmoderns vikt.
57. Torra livmodervikter i vehikelkontroll som är mindre än 0,09 % av kroppsvikten för omogna honrättor, och mindre än 0,04 % för ovariectomerade unga vuxna honor tycks ge acceptabla resultat (se tabell 31 [hänvisning 2]). Om kontrolllivmodervikterna är högre än dessa siffror, bör olika faktorer granskas, bland annat djurens ålder, korrekt ovariectomi, fytoöstrogener i foder, och så vidare, och ett negativt testresultat (ingen indikation på östrogen aktivitet) bör användas med försiktighet.
58. Historiska data för vehikelkontrollgrupperna bör bevaras i laboratoriet. Historiska data för responser på positiva referensöstrogener, såsom 17 α -etinyloestradiol, bör också bevaras i laboratoriet. Laboratorier kan också testa responsen på kända svaga östrogenagonister. Alla dessa data kan jämföras med tillgängliga data (se hänvisning 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) för att säkerställa att laboratoriets metoder ger tillräcklig känslighet.
59. De torra livmodervikterna visade mindre variabilitet i samband med OECD:s valideringsstudie än de våta livmodervikterna (se hänvisning 6, 7). Däremot skulle en betydande respons i båda mätningarna tyda på att testkemikalien är positiv för östrogen aktivitet.
60. Den uterotrofa responsen är inte helt av östrogen ursprung, dock bör ett positivt resultat från den uterotrofa bioassayen generellt tolkas som bevis för östrogen potential *in vivo*, och bör normalt initiera åtgärder för vidare utredning (se punkt 9 och 'OECD:s ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier', tillägg 2).

Figur 1

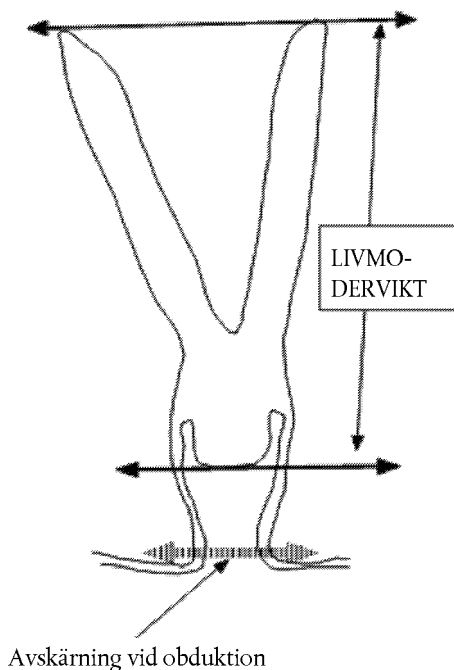
Schematiskt diagram som visar det kirurgiska avlägsnandet av äggstockarna



Proceduren börjar med att den dorsolaterala bukväggen öppnas vid mittpunkten mellan revbensbroskets nedre kant och höftbenskammen, och några millimeter i sidled till den laterala kanten på ryggmuskeln. I bukålan lokaliserar äggstockarna. På ett aseptiskt underlag avlägsnas sedan äggstockarna fysiskt från bukålan, en ligatur

placeras mellan äggstocken och livmodern för att hindra blödning, och äggstocken lossas genom ett snitt ovanför ligaturen vid forbindelsen mellan äggledaren och varje livmoderhorn. Efter att det bekräftats att ingen signifikant blödning kvarstår bör bukväggen tillslutas med suturer och huden tillslutas, t.ex. med autoclips eller sutur. Djuren bör få återhämta sig och livmoderns vikt får gå i regress i minst 14 dagar före användning.

Figur 2

Borttagning och beredning av livmoderns vävnader för viktmätning

Proceduren börjar med att bukväggen öppnas vid blygdbenssammanfogningen. Sedan avlägsnas äggstockar, om de finns kvar, och livmoderhorn från den dorsala bukväggen. Urinblåsan och urinledarna avlägsnas från den ventrala och laterala sidan av livmodern och vaginan. Fibrös vidhäftning mellan rektum och vaginan tas bort tills sammanfogningen av vaginalöppningen och perineal hud kan identifieras. Livmodern och vaginan avskiljs från kroppen genom ett snitt i vaginalväggen precis ovanför forbindelsen mellan perineal hud, såsom visas i figuren. Livmodern avskiljs från kroppsväggen genom att livmoderbandet försiktigt skärs av vid fästpunkten, längs hela längden av den dorsolaterala aspekten av varje livmoderhorn. Efter uttagning ur kroppen putsas överflödigt fett och bindväv bort. Om äggstockarna finns kvar så tas äggstockarna bort från äggledarna varvid förlust av luminal vätska från livmoderhornet undviks. Om djuret har ovariektomerats bör resterna undersökas avseende förekomst av eventuell äggstocksvävnad. Vaginan tas bort från livmodern precis under livmoderhalsen så att livmoderhalsen är kvar i livmodern, såsom visas i figuren. Livmodern kan sedan vägas.

Tillägg 1

DEFINITIONER

Antiöstrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av östradiol 17 β i en däggdjursorganism.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Födelsedatum: postnatal dag 0.

Dosering: en allmän term som omfattar dos, dess frekvens och doseringens varaktighet.

Dos: mängden testkemikalie som administreras. För uterotrof bioassay uttrycks dosen som vikten testkemikalie per enhet kroppsvikt hos försöksdjuret per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag).

Maximal tolererbar dos (MTD): den största mängden av en kemikalie som, när den förs in i kroppen, inte dödar försöksdjuret (betecknas med LD₀) (IUPAC, 1993).

Östrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att agera som östradiol 17 β i en däggdjursorganism.

Postnatal dag X: den X:e dagen i livet efter födelsedatum.

Känslighet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som korrekt klassificeras genom testet. Detta är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Specifitet: den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som korrekt klassificeras genom testet. Detta är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Uterotrof: en term som används för att beskriva en positiv inverkan på tillväxten av livmodervävnad.

Validering: en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

Tillägg 2

Notera: Dokument utarbetat av testriktlinjeprogrammets sekretariat baserat på den överenskommelse som nåddes vid EDTA-arbetsgruppens 6:e möte

OECD:s konceptuella ram för testing och bedömning av endokrinstörande kemikalier

Nivå 1 Sortering & prioritering baserat på befintlig information	— Fysikaliska & kemiska egenskaper, t.ex. molekylvikt, reaktivitet, volatilitet, biologisk nedbrytbarhet — Exponering av människor & miljö, t.ex. produktionsvolym, utsläpp, användningsmönster — Fara, t.ex. tillgängliga toxikologiska data
Nivå 2 <i>In vitro</i>-analyser som ger mekanistiska data	— ER-, AR-, TR-receptorbindningsaffinitet — Transkriptionsaktivering — Aromatas och steroidogenes <i>in vitro</i> — Aryl hydrocarbon receptor igenkänning/bindning — QSAR — Förscreening med hög genomströmning — Sköldkörtelfunktion — Fiskhepatocyt VTG-assay — Andra (i förekommande fall)
Nivå 3 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om enskilda endokrina mekanismer och effekter	— Uterotrof bioassay (östrogenerelaterad) — Hershbergers bioassay (androgenrelaterad) — Icke receptorförmiddad hormonfunktion — Andra (t.ex. sköldkörtel) — Fisk VTG-assay (vitellogenin) (östrogenerelaterad)
Nivå 4 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om multipla endokrina mekanismer och effekter	— Utökad OECD 407 (endpoints baserade på endokrina mekanismer) — Analyser av pubertala hanar och honor — Analys av vuxen intakt hane — Analys av gonadal histopatologi hos fisk — Analys av groddmetamorfos
Nivå 5 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om effekter från endokrina & andra mekanismer	— 1-generationsanalys (TG415 utökad)¹ — 2-generationsanalys (TG416 utökad)¹ — Reproduktionsscreeningstest (TG421 utökad)¹ — Kombinerat 28-dagars/ reproduktionsscreeningstest (TG 422 utökad)¹ ¹ Potentiell utökning kommer att övervägas av VMG mamm — Partiell och fullständig livscykelanalys på fisk, fåglar, groddjur & ryggradslösa djur (utveckling och reproduktion)

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment.

NOTER TILL RAMEN:

- Not 1: Inmatning på alla nivåer och utmatning på alla nivåer är möjlig och beror på vilken typ av befintliga informationsbehov för fara och riskbedömningsändamål.
- Not 2: På nivå 5 bör ekotoxikologi omfatta endpoints som anger mekanismer för biverkningar och potentiella populationsskador.
- Not 3: När en multimodal modell täcker flera av de enskilda endpointtesterna, ersätter denna modell användningen av de enskilda endpointtesterna.
- Not 4: Bedömningen av varje kemikalie bör baseras på en bedömning från fall till fall, med beaktande av all tillgänglig information, med hänsyn till funktionen hos de övergripande nivåerna.
- Not 5: Ramen bör inte betraktas som heltäckande för närvarande. På nivå 3, 4 och 5 finns det tester som antingen är tillgängliga, eller för vilka ett godkännande pågår. När det gäller den senare, ingår dessa preliminärt. När de väl har utvecklats och validerats, kommer de formellt att läggas till ramen.
- Not 6: Nivå 5 bör inte betraktas som att den endast omfattar slutgiltiga tester. Tester som ingår på den nivån anses bidra till allmän faro- och riskbedömning.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10–11 mars 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 [¹²⁵I]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 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229–2237.
12. Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerker 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 (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 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. och 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. och 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. och 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. och 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 och 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.
37. OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
38. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

B.55 HERSHBERGERS BIOASSAY PÅ RÅTTA: ETT KORTTIDSSCREENINGTEST FÖR (ANTI)ANDROGENA EGENSKAPER

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 441 (2009). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga riktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande ämnen (se hänvisning 1). En del av verksamheten var att ta fram en riktlinje för Hershbergers bioassay på råttor. Efter att ha i flera decennier använts av läkemedelsindustrin, standardiserades detta test först av en officiell expertkommitté 1962 som ett screeningverktyg för androgena kemikalier (se hänvisning 2). Under 2001–2007 har Hershbergers bioassay på råttor genomgått ett omfattande valideringsprogram med framtagningen av ett bakgrundsgranskningsdokument (se hänvisning 23), sammanställningen av ett detaljerat metoddokument (se hänvisning 3), utvecklingen av en dissektionsvägledning (se hänvisning 21) och genomförandet av omfattande studier inom och mellan laboratorier för att visa tillförlitligheten och reproducerbarheten hos bioassayerna. Dessa valideringsstudier har genomförts med en potent referensandrogen (testosteronpropionat [TP]), två potenta syntetiska androgener (trenbolonacetat och metyltestosteron), ett potent antiandrogen läkemedel (flutamid), en potent hämmare av syntesen (finasterid) hos det naturliga androgenet (dihydrotestosteron-DHT), flera svagt antiandrogena bekämpningsmedel (linuron, vinklozolin, procymidon, p,p'-DDE), en potent 5 α -reduktashämmare (finasterid) och två kända negativa kemikalier (dinitrofenol och nonylfenol) (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Denna testmetod är resultatet av lång historisk erfarenhet av bioassayerna och de erfarenheter som vunnits under valideringstestprogrammet, samt de resultat som erhållits därifrån.
2. Hershbergers bioassay är ett *in vivo*-korttidsscreeningtest som använder tillhörande vävnader från hanliga könsorgan. Testet har sitt ursprung på 1930-talet och ändrades på 1940-talet till att omfatta androgenmottagliga muskler i hanliga könsorgan (se hänvisning 2, 9–15). På 1960-talet utvärderades över 700 möjliga androgener med hjälp av en standardiserad version av protokollet (se hänvisning 2, 14) och användningen av testet för både androgener och antiandrogener ansågs vara en standardmetod på 1960-talet (se hänvisning 2, 15). Den nuvarande bioassayen bygger på förändringar i vikten för fem androgenberoende vävnader hos den kastratperipubertala hanrättan. Den utvärderar förmågan hos en kemikalie att framkalla biologiska aktiviteter som är förenliga med androgena agonister, antagonister eller 5 α -reduktashämmare. De fem androgenberoende målvävnaderna som ingår i denna testmetod är den ventrala prostatan (VP), sädesblåsor (SV) (plus vätskor och koagulerande körtlar), levator ani-bulbocavernosusmuskler (LABC), pariga Cowpers körtlar (COW) och ollonet (GP). Hos den kastratperipubertala hanrättan svarar dessa fem vävnader på androgener med en ökning i absolut vikt. När dessa samma vävnader stimuleras för att öka i vikt genom administrering av en potent referensandrogen svarar dessa fem vävnader på antiandrogener med en minskning av absolut vikt. Den primära modellen för Hershbergers bioassay har varit den kirurgiskt kastrerade peripubertala hanen, som validerades i fas 1, 2 och 3 i Hershbergers valideringsprogram.
3. Hershbergers bioassay fungerar som ett mekanistiskt *in vivo*-screeningtest för androgena agonister, androgenantagonister och 5 α -reduktashämmare och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av 'OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier' (tillägg 2). I denna konceptuella ram ingår den uterotrofa bioassayerna i nivå 3 som ett *in vivo*-test som ger data om en enda endokrin mekanism, dvs. östrogenicitet. Den är avsedd att ingå i en serie *in vitro*- och *in vivo*-tester för att identifiera kemikalier med potential att interagera med det endokrina systemet, vilket slutligen leder till faro- och riskbedömningar av människors hälsa eller miljön.

4. På grund av djurskyddsaspekter vad gäller kastrering undersöktes om den intakta (okastrerade) stimulerade avvanda hanen kunde vara en alternativ modell för Hershbergers bioassay för att undvika kastreringssteget. Testmetoden med stimulerade avvanda hanar validerades (se hänvisning 24), men i valideringsstudierna verkade inte denna version av Hershbergers bioassay konsekvent kunna upptäcka effekter på androgenberoende organvikter från svaga antiandrogener vid de testade doserna. Därför har versionen med avvanda hanar inte inkluderats i den här testmetoden. Eftersom dess användning inte bara ger djurskyddsfördelar utan också kan ge information om andra verkningssätt finns den dock beskriven i OECD:s vägledning 115 (se hänvisning 25).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Androgena agonister och antagonister fungerar som ligander för androgenreceptorn och kan aktivera eller hämma respektive gentranskription som styrs av receptorn. Dessutom kan vissa kemikalier inhibera omvandlingen av testosteron till den mer potenta naturliga androgenen dihydrotestosteron i vissa androgena målvävnader (5 α -reduktashämmare). Sådana kemikalier har potentialen att leda till negativa hälsorisker, inklusive reproduktions- och utvecklingseffekter. Därför finns regleringsbehovet av att snabbt bedöma och utvärdera en kemikalie som en möjlig androgen agonist eller antagonist, eller 5 α -reduktashämmare. Även om den är informativ så är affiniteten hos en ligand för en androgen receptor mätt genom receptorbindning eller transkriptionsaktivering av reporter-gener *in vitro* inte den enda faktorn för möjlig fara. Andra avgörande faktorer inkluderar metabolisk aktivering och avaktivering vid införandet i kroppen, kemisk distribution till målvävnader samt eliminering ur kroppen. Detta leder till behovet att screena den möjliga aktiviteten hos kemikalien *in vivo* under relevanta förhållanden och exponeringar. *In vivo*-utvärdering är mindre kritisk om kemikalien egenskaper vad gäller absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) är kända. Androgenberoende vävnader svarar med en snabb och kraftig tillväxt vid stimulering med androgener, framför allt i kastratperipubertala hanrättor. Gnagare, framför allt råttor, är också vanliga i toxicitetsstudier för riskbedömning. Därför är den version av testet som använder den kastrerade peripubertala rättan och de fem målvävnaderna i detta test lämplig för *in vivo*-screening av androgena agonister och antagonister samt 5 α -reduktashämmare.
6. Denna testmetod baseras på de protokoll som användes i OECD:s valideringsstudie vilken har visat sig vara tillförlitlig och repeterbar i studier inom och mellan laboratorier (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Både androgen- och antiandrogenförfaranden presenteras i denna testmetod.
7. Även om det fanns en viss variation i den dos TP som användes för att upptäcka antiandrogener i OECD:s valideringsprogram för Hershbergers bioassay i olika laboratorier (0,2 jämfört med 0,4 mg/kg/d, subkutan injektion) fanns det liten skillnad mellan dessa två protokollvariationer i förmågan att detektera svag eller stark antiandrogen aktivitet. Det är emellertid klart att dosen av TP inte bör vara alltför hög för att blockera effekterna av svaga androgenreceptor (AR)-antagonister eller så låg att de androgena vävnaderna visar liten tillväxtrespons även utan antiandrogen samadministration.
8. Tillväxtresponsen för de individuella androgenberoende vävnaderna är inte helt och hållet av androgent ursprung, dvs. andra kemikalier än androgena agonister kan förändra vikten hos vissa vävnader. Dock bestyrker tillväxtresponsen för flera vävnader samtidigt en mer androgenspecifik mekanism. Exempelvis kan höga doser av potenta östrogener öka sädesblåsornas vikt, dock reagerar de andra androgenberoende vävnaderna i testet inte på ett liknande sätt. Antiandrogena kemikalier kan antingen fungera som androgenreceptorantagonister eller som 5 α -reduktashämmare. 5 α -reduktashämmare har en varierbar effekt, eftersom omvandlingen till mer potent dihydrotestosteron varierar beroende på vävnad. Antiandrogener som hämmar 5 α -reduktas, såsom finasterid, har mer uttalade effekter i den ventrala prostatan än i övriga vävnader jämfört med en potent AR-antagonist, såsom flutamid. Denna skillnad i vävnadsrespons kan användas för att skilja mellan AR-medierade och 5 α -reduktasmedi-erade verkningsmekanismer. Dessutom är androgenreceptorn evolutionärt besläktad med den hos andra steroidhormoner, och vissa andra hormoner, när de ges i höga suprafysiologiska doseringsnivåer, kan binda och motverka de tillväxtfrämjande effekterna av TP (se hänvisning 13). Vidare är det också troligt att ökad steroidmetabolism och en åtföljande sänkning av serumtestosteron kan minska androgenberoende vävnadstillväxt. Därför bör varje positivt resultat i Hershbergers bioassay normalt utvärderas med hjälp av en sammanvägd bedömning, inklusive *in vitro*-tester, såsom AR- och östrogenreceptor (ER)-bindningstester och motsvarande transkriptionsaktiveringstester, eller från andra *in vivo*-tester som undersöker liknande androgena målvävnader, såsom pubertal hane-test, 15-dagars-test av vuxen intakt hane, eller 28-dagars- eller 90-dagarsstudie med upprepade dosering.

9. Erfarenheten visar att xenobiotiska androgener är mer ovanliga än xenobiotiska antiandrogener. Förhoppningen är att Hershbergers bioassay kan användas oftare för screeningen av antiandrogener. Förfarandet att testa för androgener kan ändå rekommenderas för steroida eller steroidliknande kemikalier, eller kemikalier för vilka en indikation på eventuella androgena effekter härrör från metoder som ingår i nivå 1 eller 2 i den konceptuella ramen (tillägg 2). På samma sätt kan negativa effekter i samband med (anti-)androgena profiler observeras i nivå 5-tester, vilket leder till behovet att bedöma om en kemikalie styrs av en endokrin verkningsmekanism.
10. Alla djurbaserade förfaranden bör uppfylla lokala normer för djurvård. De beskrivningar av vård och behandling som anges nedan är minimala prestandakrav som kommer att ersättas av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 26). Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (se hänvisning 17).
11. Som i alla bioassayer som använder sig av försöksdjur, bör noggranna överväganden göras om nödvändigheten av att genomföra denna studie. I princip kan det finnas två skäl till ett sådant beslut:
 - Hög exponeringspotential (nivå 1 i den konceptuella ramen) eller indikationer på (anti-)androgenicitet i *in vitro*-tester (nivå 2) som stöder undersökningar huruvida sådana effekter kan uppstå *in vivo*.
 - Effekter som överensstämmer med (anti-)androgenicitet på nivå 4 eller 5 i *in vivo*-test för undersökningar av särskilda verkningsmekanismer, t.ex. för att avgöra om effekterna berodde på en (anti-)androgener mekanism.
12. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

13. Hershbergers bioassay uppnår sin känslighet genom att använda hanar med minimal endogen androgenproduktion. Detta uppnås genom användning av kastrerade hanar som ges tillräcklig tid efter kastreringen för att låta målvävnaderna gå i regress till en minimal och jämn utgångsvikt. Vid screeningen av potentiell androgen aktivitet, när det finns låga endogena nivåer av cirkulerande androgener och hypotalamus-hypofys-gonad-axeln inte kan återges för att kompensera via återkopplingsmekanismer, så maximeras vävnadernas respons och vävnadernas utgångsviktsvariationer minimeras. Vid screening av potentiell antiandrogen aktivitet kan en mer enhetlig vävnadsviktökning uppnås när vävnaderna stimuleras av en referensandrogen. Som en följd kräver Hershbergers bioassay endast 6 djur per dosgrupp, medan andra tester med intakta pubertala eller vuxna hanar föreslår att man använder 15 hanar per dosgrupp.
14. Kastrering av peripubertala hanråttor bör ske på lämpligt sätt med godkända bedövningsmedel och aseptisk teknik. Smärtstillande medel bör administreras de närmaste dagarna efter operationen för att eliminera postoperativa obehag. Kastrering förbättrar testets precision när det gäller att upptäcka svaga androgener och antiandrogener, genom att eliminera kompensatoriska endokrina återkopplingsmekanismer som finns hos intakta djur som kan dämpa effekterna av administrerade androgener och antiandrogener, och genom att eliminera de stora variationerna i serumtestosteronnivåer mellan individer. Följaktligen minskar kastreringen antalet djur som krävs för att screena för dessa endokrina aktiviteter.
15. Vid screening för potentiell androgen aktivitet, administreras testkemikalien dagligen genom oral sondmatning eller subkutan injektion under en period av tio dagar i följd. Testkemikalier administreras till minst två behandlingsgrupper av försöksdjur med en dosnivå per grupp. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. En statistiskt signifikant ökning av vikter för två eller flera målorgan i testkemikaliegrupperna jämfört med vehikelkontrollgruppen, tyder på att testkemikalien är positiv för potentiell androgen aktivitet (se punkt 60). Androgener som trenbolon, som inte kan 5 α -reduceras har mer uttalade effekter på LABC och GP kontra TP, men alla vävnader bör visa ökad tillväxt.
16. Vid screening av potentiell antiandrogen aktivitet, administreras testkemikalien dagligen via oral sondmatning eller subkutan injektion under en period av tio dagar i följd tillsammans med dagliga TP-doser (0,2 eller 0,4 mg/kg/d) genom subkutan injektion. Det fastställdes i valideringsprogrammet att endera 0,2 eller 0,4 mg/kg/d av TP kan

användas eftersom båda är effektiva vid upptäckt av antiandrogener och därför bör man endast använda en dos i testet. Graderade testkemikaliedoser administreras till minst tre behandlingsgrupper av försöksdjur, med en dosnivå per grupp. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. En statistiskt signifikant minskning av vikterna hos två eller flera målorgan i testkemikalie- plus TP-grupperna jämfört med endast TP-kontrollgruppen, tyder på att testkemikalien är positiv för potentiell antiandrogen aktivitet (se punkt 61).

BESKRIVNING AV METODEN

Val av art och stam

17. Råttan har rutinmässigt använts i Hershbergers bioassay sedan 1930-talet. Det är biologiskt sannolikt att både råttan och mus visar liknande responser, men baserat på 70 års erfarenhet av råttmodellen är råttan den art som väljs för Hershbergers bioassay. Dessutom, eftersom data från Hershbergers bioassay kan användas som förberedelse för en långtids flergenerationsstudie, möjliggör detta att djur från samma art, stam och ursprung används för båda studierna.
18. Detta protokoll möjliggör för laboratorier att välja den stam av råttan som ska användas i testet, vilket i regel bör vara den som historiskt sett använts av det deltagande laboratoriet. Vanligen använda laboratorieråttstammar kan användas, men stammar som mognar betydligt senare än 42 dagar bör inte användas, eftersom kastrering av dessa hanar vid 42 dagars ålder kan hindra mätningar av ollonvikter, vilket endast kan göras efter det att förhuden separerats från penisskafet. Därför bör stammar som härrör från Fisher 344-råttan inte användas, utom i sällsynta fall. Fisher 344-råttan utvecklas sexuellt vid en annan tidpunkt jämfört med andra oftare använda stammar såsom Sprague Dawley- eller Wistar-stammar (se hänvisning 16). Om en sådan stam ska användas bör laboratoriet kastrera dem vid en något högre ålder och kunna påvisa känsligheten hos den stam som används. Laboratoriet bör tydligt ange motiveringen för valet av råttstam. När screeningtestet är inledningen till en upprepade oralstudie, en reproduktions- och utvecklingsstudie eller en långtidsstudie ska helst djur från samma stam och ursprung användas till alla studierna.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

19. Alla förfaranden bör överensstämma med samtliga lokala normer för laboratoriedjurvård. Dessa beskrivningar av vård och behandling är minimikrav och kommer att ersättas av mer stringenta lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 26). Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 °C (med ett ungefärligt intervall på ± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målet bör vara relativ luftfuktighet på 50–60 %. Artificiell belysning bör användas. Den dagliga belysningssekvensen bör vara 12 timmar ljus, 12 timmar mörker.
20. Gruppinhysning är att föredra framför isolering, på grund av djurens låga ålder och det faktum att råttor är sociala djur. Genom inhysning av två eller tre djur per bur undviks trängsel och åtföljande stress som kan störa den hormonella kontrollen av utvecklingen av de tillhörande könsvävnaderna. Burarna bör rengöras noggrant för att avlägsna eventuella föroreningar, och placeras på ett sådant sätt att eventuell påverkan på grund av placeringen minimeras. Burar av lämplig storlek (~ 2 000 kvadratcentimeter) förhindrar överbeläggning.
21. Varje djur ska identifieras individuellt (t.ex. öronmärkning eller etikett) med en human metod. Identifieringsmetoden bör registreras.
22. Djuren ska ha fri tillgång till laboratoriefoder och dricksvatten. Laboratorier som utför Hershbergers bioassay bör använda det laboratoriefoder som normalt används i deras kemikalietestningsarbete. I valideringsstudierna för bioassayen observerades inga effekter eller variationer som kan hänföras till fodret. Det foder som används registreras, och ett prov av laboratoriefodret bör behållas för framtida analys.

Prestandakriterier för androgenberoende organvikter

23. Under valideringsstudien fanns inga bevis för att en minskning av kroppsvikten påverkade ökningarna eller minskningarna av tillväxten av vävnadsvikter hos målvävnaderna (dvs. detta bör vägas in i denna studie).

24. Bland de olika råttstammar som framgångsrikt använts i valideringsprogrammet, är de androgenberoende organvikterna större hos de tyngre råttstammarna än hos de lättare stammarna. Därför inkluderar inte prestandakriterierna för Hershbergers bioassay absoluta förväntade organvikter för positiva och negativa kontroller.
25. Eftersom variationskoefficienten för en vävnad har ett omvänt förhållande till statistisk styrka, är prestationskriterierna för Hershbergers bioassay baserat på maximala CV-värden för varje vävnad (tabell 1). Variationskoefficienterna härrör från OECD:s valideringsstudier. Vid negativa resultat bör laboratorierna granska variationskoefficienterna från kontrollgruppen och högdosbehandlingsgruppen för att avgöra om de maximala prestandakriterierna för variationskoefficienten har överskridits.
26. Studien bör upprepas om 1) tre eller fler av tio möjliga individuella variationskoefficienter i kontroll- och högdosbehandlingsgrupperna överstiger det maximum som utsetts för agonist- och antagoniststudier i tabell 1 och 2) minst två målvävnader var marginellt obetydliga, dvs. r-värden mellan 0,05 och 0,10.

Tabell 1

Högsta tillåtna variationskoefficienter som fastställts för målkönets tillhörande vävnader i kastratmodellen i OECD:s valideringsstudier ⁽¹⁾.

Vävnad	Antiandrogena effekter	Androgena effekter
Sädesblåsor	40 %	40 %
Ventral prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowpers körtlar	35 %	55 %
Ollon	17 %	22 %

FÖRFARANDE

Regelefterlevnad och laboratoriekontroll

27. Till skillnad från den uterotrofa assayen (kapitel B.54 i denna bilaga) är en demonstration av laboratoriets kompetens innan studien påbörjas inte nödvändig för Hershbergers bioassay eftersom jämsides behandlade positiva (testosteronpropionat och flutamid) och negativa kontroller körs som en integrerad del av testet.

Djurens antal och tillstånd

28. Varje behandlad grupp och kontrollgrupp bör bestå av minst 6 djur. Detta gäller både det androgena och det antiandrogena protokollet.

Kastrering

29. Efter mottagandet av djuren bör de få en inledande akklimatiseringsperiod på flera dagar så att man ser att de är friska och trivs. Eftersom djur som kastreras före 42 dagars ålder eller postnatal dag (PND) 42 kanske inte uppvisar preputial separation, så bör djuren kastreras på PND 42 eller senare, inte tidigare. Djuren kastreras under bedövning genom att ett snitt görs i pungen, och både testiklarna och bitestiklarna avlägsnas med underbindning av blodkärl och sädesledare. Efter att det bekräftats att ingen blödning uppstått bör pungen tillslutas med sutur eller autoclips. Djuren bör behandlas med smärtstillande medel under de närmaste dagarna efter operationen för att lindra eventuella postoperativa obehag. Om kastrerade djur köps från en djurleverantör så bör djurens ålder och könsmognad garanteras av leverantören.

⁽¹⁾ Variationskoefficientens tröskelvärde för en given vävnad identifierades från en kurva över variationskoefficientvärden – ordnade från minsta sekventiella till största – för alla medelvärden från alla experiment under valideringsperioden med användning av en specifik modell (agonist eller antagonist). Variationskoefficientens tröskelvärde avlästes från den punkt vid vilken stegen mellan de näst högsta variationskoefficienterna i serien är dramatiskt större än de få föregående variationskoefficienterna – 'brytpunkten'. Det bör noteras att även om denna analys identifierade relativt pålitliga 'brytpunkter' för antagonistmodellen av testet, visade variationskoefficientkurvorna i agonisttestet en mer likformig ökning vilket gör identifieringen av ett tröskelvärde för variationskoefficienten med denna metod något godtycklig.

Acklimatisering efter kastreringen

30. Djuren bör fortsätta sin acklimatisering till laboratoriemiljön för att låta målvävnadsvikterna gå i regress under minst sju dagar efter kastreringen. Djuren bör observeras dagligen, och alla djur som visar tecken på sjukdom eller fysiska avvikelser bör tas bort. Således kan behandling med dosering (studie) påbörjas så tidigt som PND 49, dock inte senare än PND 60. Ålder vid obduktionen bör inte vara högre än PND 70. Denna flexibilitet gör det möjligt för ett laboratorium att effektivt schemalägga det experimentella arbetet.

Kroppsvikt och grupp-randomisering

31. Skillnader i individuella kroppsvikter är en källa till variabilitet i vävnadsvikterna både inom och mellan grupper av djur. Ökande vävnadsviktsvariabilitet resulterar i en ökad variationskoefficient (CV) och minskar den statistiska styrkan i testet (ibland kallad testkänslighet). Därför bör variationer i kroppsvikt kontrolleras både experimentellt och statistiskt.
32. Experimentell kontroll innebär små variationer i kroppsvikt inom och mellan studiegrupperna. För det första bör ovanligt små eller stora djur undvikas och inte placeras ut i studiekohorten. Vid studieinledningen bör viktskillnaden mellan djuren som används inte överstiga $\pm 20\%$ av medelvikten (t.ex. $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ för kastrerade peripubertala råttor). För det andra bör djuren anvisas till grupper (både kontroll- och behandlingsgrupper) genom slumpmässig viktfordelning, så att medelvärdet för kroppsvikten i varje grupp inte statistiskt skiljer sig från andra grupper. Det förfarande som används för blockrandomisering bör registreras.
33. Eftersom toxicitet kan minska kroppsvikten hos de behandlade grupperna jämfört med kontrollgruppen kan kroppsvikten på den första dagen för testkemikalieadministration användas som den statistiska kovariaten, och inte kroppsvikten vid obduktion.

Dosering

34. För att fastställa huruvida en testkemikalie kan ha androgen verkan *in vivo*, räcker det oftast med två dosgrupper av testkemikalien plus positiv kontroll och vehikelkontroll (negativ) (se punkt 43). Denna utformning är därför att föredra av djurskyddsskäl. Om syftet är att antingen erhålla en dos-responskurva eller att extrapolera till lägre doser, behövs minst 3 dosgrupper. Om information utöver identifiering av androgen aktivitet (t.ex. en uppskattning av potens) krävs, bör ett annat doseringsschema övervägas. För att testa för antiandrogener ges testkemikalien tillsammans med en referensandrogenagonist. Minst 3 testgrupper bör användas med olika doser av testkemikalien, samt en positiv och en negativ kontroll (se punkt 44). Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används för testgruppen.
35. Alla dosnivåer bör väljas med hänsyn till eventuella toxicitetsdata och (toxiko-)kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån bör först ta hänsyn till LD₅₀ och/eller information som akut giftighet för att undvika dödsfall, svår smärta och lidande hos djuren (se hänvisning 17, 18, 19, 20), och för det andra ta hänsyn till tillgänglig information om de doser som använts i subkroniska och kroniska studier. I allmänhet bör högsta den dosen inte orsaka en minskning av den slutliga kroppsvikten hos djuren som är större än 10% av kontrollvikten. Den högsta dosen bör antingen vara 1) den högsta dos som garanterar djurens överlevnad utan signifikant toxicitet eller lidande för djuren efter tio dagar i följd med administrering upp till en maximal dos på $1\,000\text{ mg/kg/dag}$ (se punkt 36) eller 2) en dosinducerande (anti-)androgen effekt, beroende på vilken som är lägre. Vid en screening är stora mellanrum, t.ex. en halv log-enhet (motsvarande en dosprogression av 3,2) eller till och med en log-enhet mellan doseringarna acceptabla. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga, kan en dosfinnande studie (se punkt 37) genomföras som hjälp för att bestämma vilka doser som ska användas.

Dosnivågräns

36. Om ett test vid dosgränsen $1\,000\text{ mg/kg}$ kroppsvikt/dag och en lägre dos, med hjälp av de förfaranden som beskrivs för denna studie, inte leder till en statistiskt signifikant förändring av reproduktionsorganens vikter, anses ytterligare dosnivåer vara onödiga. Dosgränsen tillämpas utom när human exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Överväganden för dosfinnande studie

37. Vid behov kan en preliminär dosfinnande studie genomföras med några få djur för val av lämpliga dosgrupper (med hjälp av metoder för testning av akut toxicitet [kapitel B.1a, B.1b i denna bilaga (se hänvisning 27), OECD TG 425 (se hänvisning 19)]). Målet för Hershbergers bioassay är att välja doser som garanterar djurens överlevnad och som inte innebär signifikant toxicitet eller lidande för djuren efter tio dagar i följd med administrering av kemikalien upp till en gränsdos på 1 000 mg/kg/dag som angetts i punkterna 35 och 36. För detta ändamål kan man använda OECD:s vägledning (se hänvisning 17) som definierar kliniska tecken som tyder på toxicitet eller lidande för djuren. Om det är möjligt inom denna dosfinnande studie kan, efter tio dagars tillförsel, målorganen skäras ut och vägas ca 24 timmar efter att sista dosen getts. Dessa data kan sedan användas som hjälp vid valet av doser i huvudstudien.

Referenskemikalier och vehikel

38. Referensandrogenagonist bör vara testosteronpropionat (TP), CAS-nr 57-82-5. TP-referensdosen kan antingen vara 0,2 mg/kg kroppsvikt/d eller 0,4 mg/kg kroppsvikt/d. Referensandrogenantagonist bör vara flutamid (FT), CAS-nr 1311-84-7. FT-referensdosen bör vara 3 mg/kg kroppsvikt/d och bör ges tillsammans med TP-referensdosen.
39. Det rekommenderas att i första hand överväga att använda en vattenbaserad lösning/suspension, om det är möjligt. Men eftersom många androgenligander eller deras metaboliska prekursorer tenderar att vara hydrofoba, är den vanligaste metoden att använda en lösning/suspension i olja (t.ex. majs-, jordnöts-, sesam- eller olivolja). Testkemikalier kan lösas upp i en minimal mängd av 95 % etanol eller annat lämpligt lösningsmedel och spädas ut till slutliga koncentrationer i testvehikeln. De toxiska egenskaperna hos lösningsmedlet bör vara kända, och bör testas med endast lösningsmedel i en separat kontrollgrupp. Om testkemikalien bedöms vara stabil, kan försiktig uppvärmning och kraftig mekanisk påverkan användas för att hjälpa till att lösa upp testkemikalien. Testkemikalien's stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Om testkemikalien är stabil under hela studien, så kan en startalikvot av testkemikalien beredas, och de angivna doseringsutspädningsarna noggrant beredas dagligen för att undvika kontaminering och nedbrytning av proverna.

Tillförsel av doser

40. TP ska tillföras genom subkutan injektion och FT genom oral sondmatning.
41. Testkemikalien tillförs via sondmatning eller subkutan injektion. Djurskyddsaspekter och testkemikalien fysikalisk-kemiska egenskaper måste beaktas vid val av administreringsväg. Dessutom måste toxikologiska aspekter, som relevans till mänsklig exponeringsväg av kemikalien (t.ex. oral sondmatning till modellförtäring, subkutan injektion till inandningsmodell eller dermal adsorption) och befintlig toxikologisk information och data om metabolism och kinetik (t.ex. behovet av att undvika första passage-metabolism, bättre effektivitet via en bestämd väg) beaktas innan omfattande, långvariga tester påbörjas om positiva resultat erhålls genom injektion.
42. Djuren bör doseras på samma sätt och tidssekvens under tio dagar i följd med ca 24 timmars mellanrum. Doseringsnivån bör justeras dagligen på basis av samtidiga dagliga mätningar av kroppsvikt. Dosvolymen och tidpunkten då den tillförs bör registreras varje exponeringsdag. Försiktighet bör iaktas så att inte den maximala dosen överskrids såsom beskrivs i punkt 35 för att möjliggöra en meningsfull tolkning av data. Minskning av kroppsvikt, kliniska tecken och andra fynd bör noggrant utvärderas i detta avseende. Vid oral sondmatning bör en magsond eller en lämplig intubationskanyl användas. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Lokala djurvårdsriktlinjer bör följas, men volymen bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, utom i fråga om vattenlösningar där 10 ml/kg kroppsvikt får användas. Vid subkutana injektioner bör doserna administreras till dorsoscapular- och/eller lumbaregionen via steril nål (t.ex. med grovleken 23 eller 25) och en tuberkulinspruta. Rakning av injektionsstället är valfritt. Eventuella förluster, läckage vid injektionsstället eller ofullständig dosering ska registreras. Den totala volymen injicerad per rätta per dag bör inte överstiga 0,5 ml/kg kroppsvikt.

Särskilda förfaranden för androgena agonister

43. För testet för androgena agonister är vehikeln den negativa kontrollen och den TP-behandlade gruppen den positiva kontrollen. Biologisk aktivitet i överensstämmelse med androgena agonister testas genom administration av en testkemikalie till behandlingsgrupper vid de valda doserna under 10 dagar i följd. Vikterna för de fem tillhörande könsvävnaderna från testkemikaliegrupperna jämförs med vehikelgruppen för statistiskt signifikanta ökningar av vikterna.

Särskilda förfaranden för androgena antagonister och 5 α -reduktashämmare

44. Vid testet för androgena antagonister och 5 α -reduktashämmare, är den TP-behandlade gruppen den negativa kontrollen, och gruppen som samtidigt tillförs TP- och FT-referensdoser den positiva kontrollen. Biologisk aktivitet i överensstämmelse med androgena antagonister och 5 α -reduktashämmare testas genom tillförsel av en TP-referensdos samt tillförsel av testkemikalien under tio dagar i följd. Vikterna hos de fem tillhörande könsvävnaderna från TP samt testkemikaliegrupperna jämförs med TP-referensgruppen (endast TP) avseende statistiskt signifikanta minskningar av vikterna.

OBSERVATIONER**Kliniska observationer**

45. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag och oftare när tecken på toxicitet observeras. Observationerna bör företrädesvis utföras vid samma tidpunkt varje dag och med hänsyn till förväntade topp effekter efter doseringen. Alla djur bör observeras avseende dödlighet, sjuklighet och allmänna kliniska tecken såsom förändringar i beteende, hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster).
46. Alla djur som hittas döda ska avlägsnas och bortskaffas utan ytterligare dataanalys. All dödlighet hos djuren före obduktionen bör ingå i studieresultatet tillsammans med eventuella orsaker till dödligheten. Eventuella döende djur bör avlivas på ett humant sätt. Eventuella döende och sedan avlivade djur bör ingå i studieresultatet med uppenbara orsaker till sjukligheten.

Kroppsvikt och foderkonsumtion

47. Alla djur bör vägas dagligen med en noggrannhet på 0,1 g, med början strax före starten av behandlingen, dvs. när djuren fördelas i grupper. Som en valfri mätning, kan mängden foder som konsumeras under behandlingsperioden mätas per bur genom vägning av fodertrågen. Foderkonsumtionsresultaten bör uttryckas i gram per råtta per dag.

Dissekering och mätning av vävnads- och organvikter

48. Cirka 24 timmar efter den sista administreringen av testkemikalien bör råttorna avlivas och tömmas på blod enligt de normala förfarandena på laboratoriet och obduktion utföras. Metoden för human avlivning bör registreras i laboratorierapporten.
49. Helst ska obduktionsordningen randomiseras mellan grupperna för att undvika progression direkt upp eller ner i dosgrupperna vilket kan påverka data. Alla fynd vid obduktionen, dvs. patologiska förändringar/synliga skador, bör noteras och rapporteras.
50. De fem androgenberoende vävnaderna (VP, SV, LABC, COW, GP) ska vägas. Dessa vävnader bör skäras ut, noggrant putsas från överflödig angränsande vävnad och fett, och deras färska (ofixerade) vikter bestämmas. Varje vävnad bör hanteras med särskild omsorg för att undvika förlust av vätska och undvika uttorkning, vilket kan

medföra väsentliga fel och variabilitet genom att minska de registrerade vikterna. Flera av vävnaderna kan vara mycket små eller svåra att dissekera, och detta kommer att medföra variabilitet. Därför är det viktigt att personer som utför dissektion av tillhörande könsvävnader är bekanta med standarddissektionsförfaranden för dessa vävnader. En handbok med standardförfaranden för genomförande (*standard operation procedure*, SOP) av dissektion finns tillgänglig från OECD (se hänvisning 21). Noggrann utbildning enligt SOP-vägledningen minimerar en potentiell källa till variation i studien. Helst bör samma person ansvara för dissektion av en given vävnad för att eliminera skillnader i vävnadsbehandling mellan olika personer. Om detta inte är möjligt bör obduktionen utformas så att varje person dissekerar en viss vävnad från alla behandlingsgrupper, i stället för att en person dissekerar alla vävnader från en kontrollgrupp medan någon annan är ansvarig för de behandlade grupperna. Varje tillhörande könsvävnad bör vägas utan torkning med en noggrannhet på 0,1 mg, och vikten registreras för varje djur.

51. Flera av vävnaderna kan vara mycket små eller svåra att dissekera, och detta kommer att medföra variabilitet. Tidigare arbete har indikerat ett intervall för variationskoefficienter som förefaller skilja sig beroende på laboratoriets skicklighet. I några få fall har stora skillnader i de absoluta vikterna av vävnader såsom VP och COW observerats inom ett visst laboratorium.
52. Lever-, parvisa njur- och parvisa adrenalvikter är valfria mått. Återigen bör vävnaderna putsas från tillhörande bindvävshinnor och fett. Levern bör vägas och registreras med en noggrannhet på 0,1 g och de pariga njurarna och pariga binjurarna ska vägas och registreras med en noggrannhet på 0,1 mg. Levern, njurarna och binjurarna påverkas inte bara av androgener, utan är också användbara mätare på systemisk toxicitet.
53. Mätning av serumluteiniserande hormon (LH), follikelstimulerande hormon (FSH) och testosteron (T) är valfritt. T-serumnivåerna är användbara för att avgöra om testkemikalien orsakar levermetabolism av testosteron och sänker serumnivåerna. Utan T-data kan en sådan effekt verka vara en antiandrogen mekanism. LH-nivåer ger information om förmågan hos en antiandrogen att inte bara minska organvikterna, utan också påverka hypotalamus-hypofys-funktionen, vilket i långtidsstudier kan orsaka testikeltumörer. FSH är ett viktigt hormon för spermatogenes. Serum T4 och T3 är också valfria mått som kan ge användbar kompletterande information om förmågan att störa sköldkörtelhormonbalansen. Om hormonmätningar ska göras bör råttorna bedövas före obduktionen och blod tas från hjärtat, och narkosmetoden väljas med omsorg så att den inte påverkar hormonmätningen. Framställningsmetoden för serumet, källan till radioimmunanalys eller andra mätningstrustningar, analysmetoder och resultat bör registreras. LH-nivåer ska rapporteras som ng per ml serum, och T bör också redovisas som ng per ml serum.
54. Dissektionen av vävnaderna beskrivs enligt följande med en utförlig dissektionsvägledning med bilder som publiceras som kompletterande material som en del av valideringsprogrammet (se hänvisning 21). En dissektionsvideo finns också tillgänglig från webbsidan för *Korea Food and Drug Administration* (se hänvisning 22).
 - Med den ventrala ytan på djuret uppåt, fastställ om förhuden på penis har separerats från ollonet. Om så är fallet, dra tillbaka förhuden och avlägsna ollonet, väg (med en noggrannhet på 0,1 mg) och notera vikten.
 - Öppna bukens hud och vägg så att de inre organen exponeras. Om de valfria organen vägs, ta bort och väg levern med en noggrannhet på 0,1 g, ta bort mage och tarmar, ta bort och väg de pariga njurarna och pariga binjurarna med en noggrannhet på 0,1 mg. Denna dissektion exponerar blåsan och påbörjar dissektionen av de hanliga tillhörande målvävnaderna.
 - För att dissekera VP, separera blåsan från det ventrala muskellagret genom att skära bindvävnaden längs mittlinjen. Förskjut blåsan anteriort mot sädesblåsorna (SV), så att vänster och höger lob på den ventrala prostatan visas (täckt med ett lager av fett). Ta försiktigt bort fett från höger och vänster lob på den ventrala prostatan. Förskjut försiktigt den ventrala prostatans högra lob från urinröret och dissekera loben från urinröret. Fortsätt hålla den ventrala prostatans högra lob, förskjut försiktigt den ventrala prostatans vänstra lob från urinröret och dissekera sedan, väg med en noggrannhet på 0,1 mg och notera vikten.
 - För att dissekera SVCG, förskjut blåsan kaudalt, exponera sädesledaren och sädesblåsornas högra och vänstra lob samt koagulerande körtlar (SVCG). Förhindra läckage av vätska genom att spänna fast en hemostat vid basen av SVCG där sädesledaren ansluter sig till urinröret. Dissekera försiktigt SVCG, och med hemostaten på plats putsa bort fett och närliggande organ, placera i ett tarerat viktråg, ta bort hemostaten och väg med en noggrannhet på 0,1 mg och registrera vikten.

- För att dissekera levator ani samt bulbocavernosusmuskler (LABC), exponeras musklerna och penisbasen. LA-musklerna är lindade runt tjocktarmen, medan de främre LA- och BC-musklerna är fästade vid penislöskarna. Huden och närliggande organ från den perianala regionen som sträcker sig från basen på penis till främre delen av anus tas bort. BC-musklerna dissekeras gradvis från penisbulberna och -vävnaderna. Grovtarmen skärs i två delar och hela LABC kan dissekeras och tas bort. LABC bör putsas från fett och närliggande organ, vägas med en noggrannhet på 0,1 mg, och vikten ska registreras.
 - Efter att LABC tagits bort, är de runda Cowpers körtlar (COW) synliga vid basen av, och något dorsal till, penisbulberna. Noggrann dissekering krävs för att undvika snitt i den tunna kapseln och förhindra vätskeläckage. Väg COW parvis med en noggrannhet på 0,1 mg, och registrera vikten.
 - Dessutom, om vätska förloras genom någon körtel under obduktion och dissektion bör detta registreras.
55. Om utvärderingen av varje kemikalie kräver obduktion av fler djur än vad som är rimligt under en enda dag, kan studiens start delas upp på två på varandra följande dagar, så att obduktionen och arbetet fördelas på två dagar. Om de fördelas på detta sätt bör hälften av djuren per behandlingsgrupp användas per dag.
56. Kropparna ska omhändertas på lämpligt sätt efter obduktionen.

RAPPORTERING

Data

57. Data bör rapporteras individuellt (dvs. kroppsvikt, tillhörande könsvävnaders vikter, valfria mätningar samt andra responser och observationer) för varje grupp av djur (medelvärden och standardavvikelser beräknas för alla gjorda mätningar). Data bör sammanfattas i tabellform. Data ska visa antalet djur vid testets början, antal djur som hittats döda under testet eller som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och omfattning.
58. En slutrapport bör innehålla:

Testanläggning

- Namn på anläggning, adress.
- Försöksledaren och annan personal samt deras studieansvar.
- Respektive datum då studien började och slutade, dvs. den första dagen testkemikalien administrerades och den sista obduktionsdagen.

Testkemikalie

- Källa, parti-/batchnummer, identitet, renhet, leverantörens fullständiga adress och karakterisering av testkemikalien.
- Fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemikaliska egenskaper.
- Förvaringsförhållanden samt metod och frekvens för framställning av utspädningar.
- Eventuella stabilitetsdata som genererats.
- Eventuella analyser av doseringslösningar/-suspensioner.

Vehikel

- Karakterisering av vehikeln (identitet, leverantör och parti-#).
- Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur och djurhållningsförfaranden

- Art/stam som används samt motivering av val.
- Ursprung eller leverantör av djuren, inklusive fullständig adress.
- Försöksdjurens antal och ålder.

- Inhysningsförhållanden (temperatur, belysning osv.).
- Foder (namn, typ, leverantör, partinummer, innehåll och, om det är känt, fytoöstrogennivåer).
- Strö (namn, typ, leverantör, innehåll).
- Burförhållanden och antalet djur per bur.

Testbetingelser

- Ålder vid kastrering och acklimatiseringens varaktighet efter kastrering.
- De enskilda djurens vikt vid studiens början (med en noggrannhet på 0,1 g).
- Randomiseringsprocess och en dokumentation av anvisning till vehikel-, referens-, testkemikaliegrupper och burar.
- Medelvärde och standardavvikelse för kroppsvikterna hos varje grupp varje vägningsdag under hela studien.
- Motivering för valet av dos.
- Administrering av testkemikalien samt motivering för valet av exponeringsväg.
- För test av antiandrogenicitet: TP-behandling (dos och volym).
- Testkemikaliebehandling (dos och volym).
- Tidpunkt för dosering.
- Obduktionsförfaranden, inklusive blodtömningssätt och eventuell narkos.
- Vid serumanalyser bör uppgifter om metoden lämnas. Om till exempel RIA används, ska RIA-förfarandet, RIA-satsernas ursprung, satsernas förfallodatum, förfarandet för scintillationsräkningen och standardiseringen rapporteras.

Resultat

- Dagliga observationer av varje djur under dosering, inklusive:
- Kroppsvikter (med en noggrannhet på 0,1 g).
- Kliniska tecken (om några).
- Eventuella mätningar eller noteringar gällande födointag.
- Obduktionsobservationer av varje djur, inklusive:
- Datum för obduktion.
- Djurbehandlingsgrupp.
- Djur-ID.
- Prosektor.
- Tid på dagen då obduktion och dissektion utförs.
- Djurens ålder.
- Slutlig kroppsvikt vid obduktionen, notera eventuell statistisk signifikant ökning eller minskning.
- Arbetsordning för djurens blodtömning och dissektion vid obduktionen.
- Vikter hos de fem androgenberoende målvävnaderna:
- Ventral prostata (med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Sädesblåsor samt koagulerande körtlar, inklusive vätska (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Levator ani samt bulbocavernosus muskelkomplex (med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Cowpers körtlar (färsk vikt – parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Ollon (färsk vikt med en noggrannhet på 0,1 mg).

- Vikter på valfria vävnader, om de utförs:
- Lever (med en noggrannhet på 0,1 g).
- Njure (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Binjure (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).
- Allmänna synpunkter och kommentarer.
- Analyser av serumhormoner, om de utförs.
 - LH-Serum (tillval – ng per ml serum), och
 - T-Serum T (tillval – ng per ml serum).
- Allmänna synpunkter och kommentarer.

Sammanställning av data

Data bör sammanställas i tabellform och innehålla urvalsstorlek för varje grupp, genomsnittliga värden, och standardfel för medelvärdet eller standardavvikelsen. Tabeller bör innehålla obduktionskroppsvikter, kroppsviktförändringar från början av doseringen fram till obduktionen, vikter för accessoriska könsvävnader och eventuella vikter för valfria organ.

Diskussion av resultaten

Analys av resultaten

59. Kropps- och organvikter vid obduktionen bör analyseras statistiskt avseende egenskaper såsom homogen varians, med lämpliga dataomvandlingar vid behov. Behandlingsgrupperna bör jämföras med en kontrollgrupp med användning av tekniker såsom ANOVA följt av parvisa jämförelser (t.ex. Dunnetts asymmetriska test) och kriteriet för statistisk skillnad, till exempel $p \leq 0,05$. De grupper som uppnår statistisk signifikans bör identifieras. Dock bör 'relativa organ'-vikter undvikas på grund av de ogiltiga statistiska antaganden som ligger bakom denna data-manipulation.
60. För androgena agonister ska kontrollen vara testgruppen för endast vehikel. Verkningsmekanismen hos en testkemikalie kan leda till olika relativa responser bland vävnaderna, t.ex. trenbolon, vilken inte kan 5-alfa-reduceras, och som har mer uttalade effekter på LABC och GP än vad TP har. En statistiskt signifikant ökning ($p \leq 0,05$) av två eller fler av de fem androgenberoende målvävnadsvikterna (VP, LABC, GP, CG och SVCG) bör betraktas som ett positivt androgenagonistresultat, och alla målvävnader bör visa en viss grad av ökad tillväxt. Kombinerad utvärdering av vävnadsresponser hos samtliga accessoriska könsorgans (ASO) kan uppnås med hjälp av en lämplig multivariat dataanalys. Detta skulle kunna förbättra analysen, speciellt i de fall där endast en enda vävnad ger ett statistiskt signifikant svar.
61. För androgen antagonism bör kontrollen vara referensandrogentestgruppen (endast testosteronpropionat). Verknings sättet hos en testkemikalie kan leda till olika relativa responser bland vävnaderna, t.ex. 5 α -reduktashämmare, såsom finasterid, har mer uttalade effekter på den ventrala prostatan än andra vävnader jämfört med potenta AR-antagonister, såsom flutamid. En statistiskt signifikant minskning ($p \leq 0,05$) i två eller flera av de fem androgenberoende målvävnadsvikterna (VP, LABC, GP, CG och SVCG) i förhållande till enbart TP-behandling bör betraktas som ett positivt androgenantagonistresultat, och samtliga målvävnader bör visa en viss grad av minskad tillväxt. Kombinerad utvärdering av samtliga ASO-vävnadsresponser kan uppnås med hjälp av en lämplig multivariat dataanalys. Detta skulle kunna förbättra analysen, speciellt i de fall där endast en enda vävnad ger ett statistiskt signifikant svar.
62. Data bör sammanställas i tabellform och innehålla medelvärde, standardfel för medelvärdet (standardavvikelse skulle också kunna accepteras) och urvalsstorlek för varje grupp. Individuella datatabeller bör också ingå. De enskilda värdena, medelvärde, SE (SD) och CV-värden för kontrolldata bör undersökas, för att avgöra om de uppfyller acceptabla kriterier för överensstämmelse med förväntade historiska värden. För variationskoefficienter, som överstiger CV-värden som anges i tabell 1 (se punkterna 25 och 26) för varje organvikt, bör man fastställa om det finns fel i dataregistreringen eller posten, eller om laboratoriet ännu inte behärskar en korrekt dissektion

av androgenberoende vävnader, och om ytterligare utbildning/praktik är motiverad. I allmänhet är variationskoefficienter (standardavvikelsen dividerad med medelvärdet för organvikten) repeterbara från laboratorium till laboratorium och studie till studie. Data som presenteras bör minst omfatta: ventrala prostatan, sädesblåsor, levator ani samt bulbocavernosus, Cowpers körtlar, ollon, lever, samt kroppsvikter och kroppsviktsförändringar från början av doseringen fram till obduktionen. Data kan även presenteras efter kovariansjustering av kroppsvikt, men bör inte ersätta presentation av ej justerad data. Och om preputial separation (PPS) inte förekommer i någon av grupperna, bör förekomsten av PPS registreras och jämföras statistiskt med kontrollgruppen med hjälp av Fishers exakta test.

63. Vid kontroll av datorns dataposter med de ursprungliga databladerna avseende noggrannhet, bör organviktsvärden som inte är biologiskt rimliga eller varierar med mer än tre standardavvikelser från behandlingsgruppen medelvärdet, granskas noga och kan behöva uteslutas eftersom de sannolikt beror på registreringsfel.
 64. Jämförelse av studieresultaten med OECD:s CV-värden (i tabell 1) är ofta ett viktigt steg i tolkningen beträffande valideringen av studieresultaten. Historiska data för vehikelkontrollgrupperna bör bevaras i laboratoriet. Historiska data för responser på positiva referenskemikalier, såsom TP och FT, bör också bevaras i laboratoriet. Laboratorier kan också regelbundet testa responsen på kända svaga androgena agonister och antagonister och bevara dessa uppgifter. Dessa uppgifter kan jämföras med tillgängliga OECD-data för att säkerställa att laboratoriets metoder ger tillräcklig statistisk precision och styrka.
-

Tillägg 1

DEFINITIONER

Androgen: en term som används för att beskriva en positiv inverkan på tillväxten av androgenberoende vävnader.

Antiandrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av TP i en däggdjursorganism.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Födelsedatum: postnatal dag 0.

Dos: den mängd testkemikalie som administreras. För Hershbergers bioassay uttrycks dosen som vikten testkemikalie per enhet kroppsvikt hos försöksdjuret per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag).

Dosering: en allmän term som omfattar dos, dess frekvens samt doseringens varaktighet.

Döende: en term som används för att beskriva ett djur i döende tillstånd, dvs. nära döden.

Postnatal dag X: den X:e dagen i livet efter födelsedatum.

Känslighet: förmågan hos en testmetod att korrekt identifiera kemikalier som har den egenskap som de testas för.

Specificitet: förmågan hos en testmetod att korrekt identifiera kemikalier som inte har den egenskap som de testas för.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Validering: en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

Tillägg 2

Notera: Dokument utarbetat av testriktlinjeprogrammets sekretariat baserat på den överenskommelse som nåddes vid EDTA-arbetsgruppens 6:e möte

OECD:s konceptuella ram för testing och bedömning av endokrinstörande kemikalier

Nivå 1 Sortering & prioritering baserat på befintlig information	— Fysikaliska & kemiska egenskaper, t.ex. molekylvikt, reaktivitet, volatilitet, biologisk nedbrytbarhet — Exponering av människor & miljö, t.ex. produktionsvolym, utsläpp, användningsmönster — Fara, t.ex. tillgängliga toxikologiska data	
Nivå 2 <i>In vitro</i>-analyser som ger mekanistiska data	— ER-, AR-, TR-receptorbindningsaffinitet — Transkriptionsaktivering — Aromatas och steroidogenes <i>in vitro</i> — Aryl hydrocarbon receptor igenkänning/bindning — QSAR	— Förscreening med hög genomströmning — Sköldkörtelfunktion — Fiskhepatocyt VTG-assay — Andra (i förekommande fall)
Nivå 3 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om enskilda endokrina mekanismer och effekter	— Uterotrof bioassay (östrogenerelaterad) — Hershbergers bioassay (androgenrelaterad) — Icke receptorförmedlad hormonfunktion — Andra (t.ex. sköldkörtel)	— Fisk VTG-assay (vitellogenin) (östrogenerelaterad)
Nivå 4 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om multipla endokrina mekanismer och effekter	— Utökad OECD 407 (endpoints baserade på endokrina mekanismer) — Analyser av pubertala hanar och honor — Analys av vuxen intakt hane	— Analys av gonadal histopatologi hos fisk — Analys av groddmetamorfos
Nivå 5 <i>In vivo</i>-analyser som ger data om effekter från endokrina & andra mekanismer	— 1-generationsanalys (TG415 utökad)¹ — 2-generationsanalys (TG416 utökad)¹ — Reproduktionsscreeningstest (TG421 utökad)¹ — Kombinerat 28-dagars/ reproduktionsscreeningstest (TG 422 utökad)¹ ¹ Potentiell utökning kommer att övervägas av VMG mamm	— Partiell och fullständig livscykelanalys på fisk, fåglar, groddjur & ryggradslösa djur (utveckling och reproduktion)

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

NOTER TILL RAMEN

- Not 1: Inmatning på alla nivåer och utmatning på alla nivåer är möjlig och beror på typ av befintliga informationsbehov för fara och riskbedömningsändamål.
- Not 2: På nivå 5, bör ekotoxikologi omfatta endpoints som anger mekanismer för biverkningar och potentiella populationsskador.
- Not 3: När en multimodal modell täcker flera av de enskilda endpointtesterna, ersätter denna modell användningen av de enskilda endpointtesterna.
- Not 4: Bedömningen av varje kemikalie bör baseras på en bedömning från fall till fall, med beaktande av all tillgänglig information, med hänsyn till funktionen hos de övergripande nivåerna.
- Not 5: Ramen bör för närvarande inte betraktas som heltäckande. På nivå 3, 4 och 5 finns det tester som antingen är tillgängliga, eller för vilken ett godkännande pågår. När det gäller den senare, ingår dessa preliminärt. När de väl har utvecklats och validerats, kommer de formellt att läggas till ramen.
- Not 6: Nivå 5 bör inte betraktas som att den endast omfattar slutgiltiga tester. Tester som ingår på den nivån anses bidra till allmän faro- och riskbedömning.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10–11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
2. Dorfman RI (1962). *Standard methods adopted by official organization*. Academic Press, NY.
3. Gray LE Jr, Furr J och Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. I: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
4. OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
5. OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
6. OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
7. Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265–1269.
8. Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671–8.
9. Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413–422.
10. Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306–1314.
11. Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38–44.
12. Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113–119.
13. Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.

14. Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
15. Dorfman RI (1969). *Androgens and anabolic agents. I: Methods in Hormone Research*, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York: Academic Press, 151–220.
16. Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology*, volume I. New York: Humana Press, s 38.
17. 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.
18. OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
19. OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
20. 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.
21. Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265–1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>
22. Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html
23. OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
24. OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
25. OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
26. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).
27. Följande kapitel i denna bilaga:
 - B.1a, Akut toxicitet (oralt) – metod med fasta särskiljande doser
 - B.1b, Akut toxicitet (oralt) – metod för bestämning av akut toxicitetsklass

B.56 UTÖKAD ENGENERATIONSSTUDIE AV REPRODUKTIONSTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 443 (2012). Den är baserad på förslaget från *Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) Technical Committee* inom *ILSI Health and Environmental Sciences Institute (HESI)* om en utökad engenerationsstudie av reproduktion i livsskede F₁, publicerat i Cooper et al., 2006 (se hänvisning 1). Flera förbättringar och förtydliganden har gjorts i studieutformningen för att ge flexibilitet och betona vikten av att börja med befintlig kunskap och använda observationer av levande djur för att styra och skräddarsy testningen. Denna testmetod ger en detaljerad beskrivning av det operativa genomförandet av en utökad engenerationsstudie av reproduktionstoxicitet. Testmetoden beskriver tre kohorter för F₁-djur:

Kohort 1: Bedömer reproduktiva/utvecklingsmässiga endpoints. Denna kohort kan utvidgas till att omfatta en F₂-generation.

Kohort 2: Bedömer eventuella effekter av kemisk exponering av ett nervsystem under utveckling.

Kohort 3: Bedömer eventuella effekter av kemisk exponering av ett immunsystem under utveckling.

2. Beslut om bedömningen av andra generationen och utelämnningen av den utvecklingsmässiga neurotoxicitetskohorten och/eller utvecklingsmässiga immunotoxicitetskohorten bör återspegla befintlig kunskap för den kemikalie som utvärderas, liksom behoven av olika tillsynsmyndigheter. Syftet med testmetoden är att ge information om hur studien kan utföras och hur varje kohort ska utvärderas.
3. Förfarande för beslutet om den interna triggnings för att producera en andra generation beskrivs i OECD:s vägledning 117 (se hänvisning 39) för de tillsynsmyndigheter som använder interna triggers.

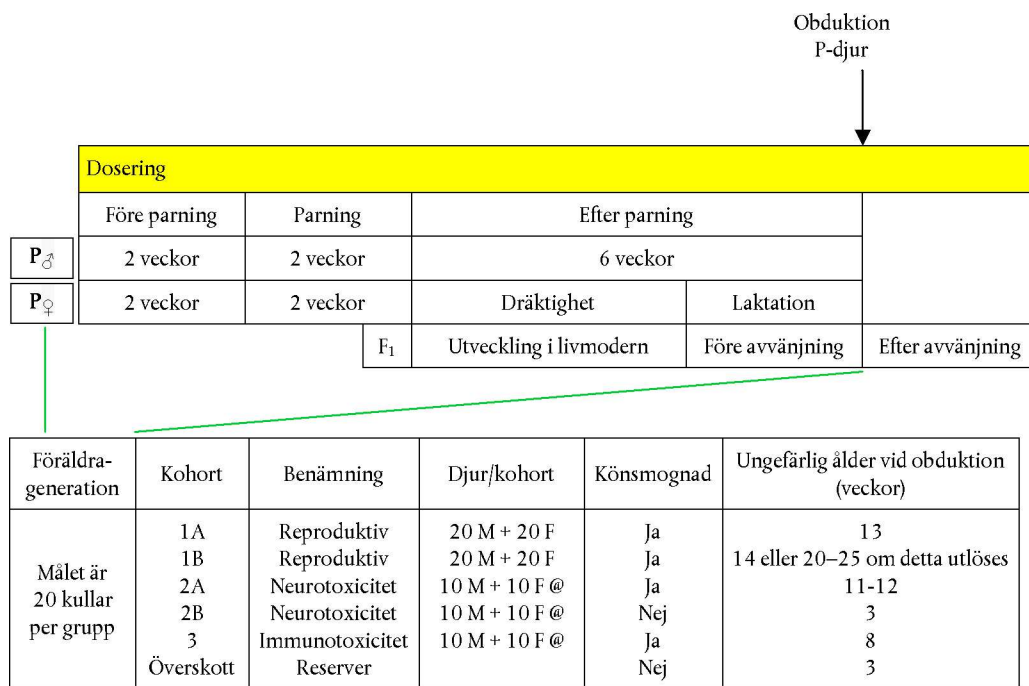
INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH MÅL

4. Huvudsyftet med den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet är att utvärdera specifika livsstadier som inte omfattas av andra typer av toxicitetsstudier, och tester av effekter som kan uppstå till följd av pre- och postnatal kemisk exponering. För reproduktiva endpoints är det tänkt att, som ett första steg och när det är tillgängligt, information från studier med upprepad dosering (inklusive screening av reproduktionstoxicitetsstudier, t. ex. OECD:s TG 422 [se hänvisning 32]), eller kortvariga screeningtester av endokrinstörande ämnen (t.ex. uterotrof assay – testmetod B.54 [se hänvisning 36] och Hershbergers bioassay – testmetod B.55 [se hänvisning 37]) används för att påvisa effekter på fortplantningsorganen hos hanar och honor. Detta kan inkludera spermatogenesis (testikelhistopatologi) för hanar, och brunstcykler, follikelantal/oocytmognad och äggstocksintegritet (histopatologi) för honor. Den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet fungerar sedan som ett test för reproduktionsendpoints som kräver interaktion mellan hanar och honor, honor och befruktade ägg, honor och avkomma samt F₁-generationen tills efter könsmognaden (se OECD:s vägledning 151 som stöder denna testmetod [hänvisning 40]).
5. Testmetoden är utformad för att ge en utvärdering av kemikaliers pre- och postnatala effekter på utvecklingen, såväl som en grundlig utvärdering av systemisk toxicitet hos dräktiga och lakterande honor samt ung och vuxen avkomma. Detaljerad undersökning av viktiga utvecklingsendpoints, såsom avkommans levnadsduglighet, neonatala hälsa, utvecklingsstatus vid födseln samt fysisk och funktionell utveckling upp till vuxen ålder, förväntas identifiera specifika målorgan hos avkomman. Vidare kommer studien att ge och/eller bekräfta information om en testkemikalies effekter på integritet och prestanda hos vuxna hanars och honors fortplantningssystem. Specifikt, men inte endast, beaktas följande parametrar: gonadfunktion, brunstcykel, epididymal spermiemognad, parningsbeteende, befruktning, dräktighet, förlossning och laktation. Dessutom kommer information som erhålls från bedömningar av utvecklingsneurotoxicitet och immunotoxicitet att karakterisera potentiella effekter på dessa system. Data som härrör från dessa tester bör göra det möjligt att bestämma nivåer där ingen skadlig effekt observeras (Noel), lägsta observerade effektnivåer (Loel) och/eller referensdoser för olika endpoints och/eller användas för att karakterisera effekter som upptäckts i föregående studier med upprepad dosering, och/eller fungera som en vägledning för efterföljande testning.
6. En översikt över protokollet presenteras i figur 1. Testkemikalien administreras kontinuerligt i graderade doser till flera grupper av köns mogna hanar och honor. Denna föräldrageneration (P) doseras under en bestämd period före parningen (väljs på basis av den information som finns tillgänglig om testkemikalien, men minst två veckor) samt en parningsperiod på två veckor. P-hanarna fortsätter att behandlas, åtminstone till avvänjningen av F₁. De bör behandlas i minst 10 veckor. De kan behandlas längre om det finns ett behov av att klargöra effekter på reproduktionen. Behandlingen av P-honorna fortsätter under dräktighet och laktation fram till avslutningen, efter avvänjningen av deras kullar (dvs. 8–10 veckors behandling). F₁-avkomman får ytterligare behandling med testkemikalien, från avvänjningen upp till vuxen ålder. Om en andra generation bedöms (se OECD:s vägledningsdokument 117 [hänvisning 39]), kommer F₁-avkomman att hållas kvar på behandling till avvänjningen av F₂, eller fram till studiens avslutning.
7. Kliniska observationer och patologiska undersökningar utförs på alla djur efter tecken på toxicitet, med särskild tonvikt på hos de hanliga och honliga fortplantningssystemens integritet och prestanda samt avkommans hälsa, tillväxt, utveckling och funktion. Vid avvänjningen tilldelas den valda avkomman till specifika undergrupper (kohorter 1–3, se punkterna 33 och 34 samt figur 1) för ytterligare undersökningar, inklusive könsmognad, integritet och funktion hos fortplantningsorganen, neurologiska och beteendemässiga endpoints samt immunförsvaret.
8. Vid genomförandet av cancerogenitetsstudien bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledning nr 19 om erkännandet, bedömningen och användningen av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (se hänvisning 34).

9. När tillräckligt många studier finns tillgängliga för att utvärdera effekterna av den nya studieutformningen, kommer testmetoden att ses över och vid behov revideras i ljuset av de erfarenheter som gjorts.

Figur 1

Schema för den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet



@ en per kull och representativt för 20 kullar totalt, om möjligt

BESKRIVNING AV METODEN OCH FÖRBEREDELSE FÖR TESTET

Djur

Val av djurart och stam

10. Valet av art för testning av reproduktionstoxicitet bör noggrant övervägas i ljuset av all tillgänglig information. På grund av den stora mängden bakgrundsdata och jämförbarheten med allmänna toxicitetstester är dock rätten normalt sett den art som föredras, och kriterierna och rekommendationerna som ges i den här testmetoden avser denna art. Om en annan art används bör detta motiveras, och lämpliga ändringar av protokollet blir nödvändiga. Stammar med låg fertilitet eller välkänt höga förekomster av spontana utvecklingsdefekter ska inte användas.

Ålder, kroppsvikt och inklusionskriterier

11. Friska föräldradjur som inte har utsatts för tidigare försöksförfaranden bör användas. Både hanar och honor bör studeras, och honorna får inte ha fött ungar eller vara dräktiga. P-djuren bör vara köns mogna med liknande vikt (inom könet) vid doseringens inledning, liknande ålder (cirka 90 dagar) vid parningen, och representativa för den art och stam som studeras. Djur bör acklimatiseras under minst 5 dagar efter ankomsten. Djuren anvisas slumpvis till kontroll- och behandlingsgrupperna, på ett sätt som resulterar i jämförbara genomsnittliga kroppsviktsvärden bland grupperna (dvs. $\pm 20\%$ av medelvärdet).

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

12. Temperaturen i djurutrymmet bör vara $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Den relativa fuktigheten bör vara 30–70 %, med ett ideallikt intervall på 50–60 %. Artificiell belysning bör ställas in på 12 timmar ljus, 12 timmar mörker. Konventionellt

laboratoriefoder kan användas med fri tillgång till dricksvatten. Fodrets innehåll av fitoöstrogener bör beaktas noga, eftersom en hög nivå av fitoöstrogener i fodret kan påverka vissa reproduktiva endpoints. Standardiserat 'open-formula'-foder där östrogena kemikalier har reducerats rekommenderas (se hänvisning 2, 30). Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod. Innehåll, homogenitet och stabilitet av testkemikalien i fodret bör verifieras. Fodret och dricksvattnet bör analyseras regelbundet avseende föroreningar. Prover av varje fodersats som används under studien bör lagras under lämpliga förhållanden (t.ex. frysta vid -20°C) tills rapporten färdigställs, om resultaten kräver en ytterligare analys av fodrets ingredienser.

13. Djuren bör inhysas i burar, i små grupper bestående av samma kön och behandlingsgrupp. De kan inhysas individuellt för att undvika eventuella skador (t.ex. hanar efter parningsperioden). Parningsförfarandena bör utföras i lämpliga burar. Efter tecken på parning inhyses honorna, som antas vara dräktiga, separat i förlossnings- eller moderskapsburar som är försedda med lämpliga och definierade bomaterial. Kullarna är inhysta tillsammans med sina mödrar fram till avvänjningen. F_1 -djur bör hållas i små grupper av samma kön och behandlingsgrupp från avvänjningen till studiens avslutning. Om det är vetenskapligt motiverat kan djuren inhysas individuellt. Det valda strömaterialets innehåll av fitoöstrogener ska vara minimalt.

Djurens antal och identifiering

14. Normalt bör varje test- och kontrollgrupp innehålla ett tillräckligt antal par som parar sig för att ge minst 20 dräktiga honor per dosgrupp. Målet är att producera tillräckligt med dräktiga honor för att säkerställa en meningsfull utvärdering av kemikalies potential att påverka fertilitet, dräktighet och moderbeteende i P-generationen, samt F_1 -avkommans tillväxt och utveckling från befruktning till mognad. Om det önskade antalet dräktiga djur inte uppnås behöver studien inte nödvändigtvis ogiltigförklaras, och bör utvärderas från fall till fall med tanke på ett eventuellt orsakssamband med testkemikalien.
15. Varje P-djur tilldelas ett unikt ID-nummer innan doseringen påbörjas. Om laboratoriets historiska data tyder på att en betydande andel honor inte kan uppvisa regelbundna (4 eller 5 dagar) brunstcykler, rekommenderas en bedömning av brunstcykler före behandlingsstarten. Alternativt kan gruppens storlek ökas för att säkerställa att minst 20 honor i varje grupp ska ha regelbundna (4 eller 5 dagar) brunstcykler vid början av behandlingen. All F_1 -avkomma identifieras unikt vid första undersökningen av nyfödda på postnatal dag (PND) 0 eller 1. Dokument indikerar att ursprungskullen bör bibehållas för alla F_1 -djur, och F_2 -djur i förekommande fall, genom hela studien.

Testkemikalie

Tillgänglig information om testkemikalien

16. Genomgång av befintlig information är viktig för beslut om administrationsätt, val av vehikel, val av djurart, val av dos och potentiella ändringar av doseringsschemat. Följaktligen bör all relevant tillgänglig information om testkemikalien, dvs. fysikalisk-kemiska, toxikokinetiska (inklusive artspecifik metabolism), toxikodynamiska egenskaper, struktur-aktivitetssamband (SAR), *in vitro* metaboliska processer, resultat från tidigare studier om toxicitet och relevant information om strukturella analoger beaktas i planeringen av den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet. Preliminär information om absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) och bioackumulerbarhet kan härröra från kemisk struktur, fysikalisk-kemiska data, grad av plasmaproteinbindning eller toxikokinetiska (TK) studier, medan resultat från toxicitetsstudier ger ytterligare information, t.ex. om Noel, metabolism eller induktion av metabolism.

Beaktande av toxikokinetiska data

17. Även om det inte behövs så är TK-data från tidigare utförda dosfinnande studier eller andra studier mycket användbara i planeringen av studiens utformning, val av dosnivåer samt tolkning av resultaten. Av särskild nytta är uppgifter som 1) verifierar exponeringen av testkemikalien på foster under utveckling samt på ungar (eller relevanta metaboliter), 2) gör en uppskattning av intern dosimetri, och 3) utvärderar potentiell dosberoende mättnad

av kinetiska processer. Ytterligare TK-data, t.ex. metabolitprofiler, koncentration-tidsförlopp etc. bör också övervägas, om de finns tillgängliga. Kompletterande TK-data kan också samlas in under huvudstudien, förutsatt att det inte stör insamlingen och tolkningen av huvudstudiens endpoints.

Som en allmän vägledning kan följande TK-datauppsättning vara användbar i planeringen av den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet:

- Under sen dräktighet (t.ex. dräktighetsdag 20) – maternellt blod och foetalt blod.
- Mitt i laktationen (PND 10) – maternellt blod, blod från ungar och/eller mjölk.
- Strax efter avvänjningen (t.ex. PND 28) – blodprov från avvanda ungar.

Flexibilitet bör användas för att fastställa de specifika analyterna (t.ex. överordnade kemikalier och/eller metaboliter), samt provtagningsschema. Till exempel så är antal och tidpunkt för provtagningar på en viss provtagningsdag beroende av exponeringsvägen och tidigare kunskap om TK-egenskaper hos icke-dräktiga djur. För födestudier är provtagning vid en bestämd tidpunkt under var och en av dessa dagar tillräcklig, medan dosering via sondmatning kan motivera ytterligare provtagningstidpunkter för att få en bättre uppskattning av antalet interna doser. Emellertid är det inte nödvändigt att generera ett fullständigt koncentrations-tidsförlopp på någon av provtagningsdagarna. Vid behov kan blod från djur av samma kön inom kullarna slås samman för fetala och neonatala analyser.

Administrationssätt

18. Valet av administrationssätt bör ta hänsyn till det som är mest relevant för människors exponering. Även om protokollet är avsett för administration av testkemikalien genom födan kan det modifieras för administration via andra vägar (dricksvatten, sondmatning, inandning, hudkontakt) beroende på kemikaliens egenskaper och den information som krävs.

Val av vehikel

19. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas att, om möjligt, användningen av en vattenhaltig lösning/suspension beaktas först, följt av övervägandet om att använda en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja). För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna vara kända. Användningen av en vehikel med potentiell inneboende toxicitet (t.ex. aceton, DMSO) bör undvikas. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Följande egenskaper bör beaktas om en vehikel eller annan tillsats används för att underlätta dosering: effekter på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testkemikalien; effekter på de kemiska egenskaperna hos testkemikalien som kan förändra dess toxiska egenskaper och effekter på foder eller vatten, eller djurens näringsstatus.

Val av dos

20. Normalt bör studien omfatta minst tre dosnivåer och en jämsides behandlad kontrollgrupp. Vid val av lämpliga dosnivåer bör utredaren analysera all tillgänglig information, inklusive doseringsinformation från tidigare studier, TK-data från dräktiga eller icke-dräktiga djur, omfattningen av överföring genom digivning och uppskattningar av människors exponering. Om TK-data finns tillgängliga som tyder på dosberoende mättnad av TK-processer, bör försiktighet iaktas för att undvika höga dosnivåer som tydligt uppvisar mättnad, förutsatt naturligtvis att mänsklig exponering förväntas ligga väl under mättnadspunkten. I sådana fall bör den högsta dosen vara på, eller strax över, brytpunkten för övergången till olinjärt TK-beteende.
21. I brist på relevanta TK-data bör dosnivåerna baseras på toxiska effekter, om de inte begränsas av testkemikalien fysikaliska/kemiska beskaffenhet. Om dosnivåerna baseras på toxicitet bör den högsta dosen väljas i syfte att inducera viss systemisk toxicitet, men inte dödsfall eller allvarligt lidande för djuren.
22. Fallande dosnivåer bör väljas för att påvisa en eventuell dosrelaterad effekt och för att fastställa Noel eller doser nära detektionsgränsen som gör det möjligt att härleda en referensdos för den känsligaste endpointen. För att undvika stora dosavstånd mellan Noel och Loel är ofta två- eller fyrfaldiga dosintervall optimala. Tillägget av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av ett mycket stort intervall (t.ex. mer än en faktor på 10) mellan doserna.

23. Med undantag av behandlingen med testkemikalien hanteras djuren i kontrollgruppen på exakt samma sätt som i testgruppen. Denna grupp bör vara obehandlad, placebobehandlad eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för administrering av testkemikalien. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

Toleranstest

24. Om det inte finns några tecken på toxicitet vid en dos på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag i studier med upprepad dosering, eller om toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt och/eller metaboliskt besläktade kemikalier, vilket indikerar likhet i metaboliska egenskaper *in vivo/in vitro*, är en studie med flera dosnivåer inte nödvändig. I sådana fall kan den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet genomföras med hjälp av en kontrollgrupp och en enda dos på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Dock, skulle evidens för reproduktions- eller utvecklingstoxicitet finnas vid denna gränsdos, kommer ytterligare studier vid lägre dosnivåer att krävas för att identifiera ett Noel-värde. Dessa toleranstestsöversväganden gäller endast när mänsklig exponering inte indikerar ett behov av en högre dosnivå.

FÖRFARANDE

Exponering av avkomma

25. Intag via föda är det föredragna administrationssättet. Om sondmatningsstudier utförs bör det noteras att ungarna normalt endast får testkemikalien indirekt via mjölken, tills direkt dosering startar vid deras avvänjning. I foder- eller dricksvattenstudier kommer ungarna dessutom att få testkemikalien direkt när de börjar äta själva under den sista veckan av laktationsperioden. Ändringar av studiens utformning bör övervägas när utsöndringen av testkemikalien i mjölk är dålig, och det saknas bevis för en kontinuerlig exponering av avkomman. I dessa fall bör man överväga direkt dosering av ungarna under laktationsperioden baserat på tillgänglig TK-information, toxicitet hos avkomman eller förändringar i biologiska markörer (se hänvisning 3, 4). Noggrant övervägande av fördelar och nackdelar bör göras före starten av direktdoseringsstudier av diande ungar (se hänvisning 5).

Doseringsschema och administrering av doser

26. Viss information om brunstcykler, histopatologi i hanliga och honliga reproduktionsorgan och testikel-/epididymala spermieanalyser kan finnas tillgängliga från tidigare toxicitetsstudier av upprepade doser med tillräcklig varaktighet. Behandlingstiden före parning i den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet är därför inriktad på att upptäcka effekter på funktionella förändringar som kan störa parningsbeteendet och fruktsamheten. Behandlingen före parning bör pågå tillräckligt länge för att uppnå ett stabilt tillstånd vad gäller exponeringsförhållandena hos P-hanar och -honor. En 2-veckorsbehandling före parningen för båda könen anses vara tillräcklig i de flesta fall. För honor täcker detta 3–4 kompletta brunstcykler, vilket bör vara tillräckligt för att upptäcka eventuella negativa effekter på cykliciteten. För hanar motsvarar detta den tid som krävs för epididymal transitering av mognande spermier och bör göra det möjligt att upptäcka eftertestikeleffekter på spermier (under slutskedet av spermiation och epididymal spermie-mognad) vid parningen. Vid tidpunkten för avslutningen, då testikel- och epididymalhistopatologi och analys av spermieparametrar är planerade, ska P- och F₁-hanarna ha utsatts för minst en hel spermatogenesprocess (se hänvisning 6, 7, 8, 9 och OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]).
27. Exponeringsscenarier före parningen för hanar ska kunna anpassas, om testikeltoxicitet (nedsatt spermiebildning) eller effekter på spermieintegritet och -funktion tydligt har identifierats i tidigare studier. På samma sätt kan kända effekter av testkemikalien i brunstcykeln, och därmed sexuell mottaglighet hos honor, motivera olika exponeringsscenarier före parningen. I speciella fall kan det vara acceptabelt att behandling av P-honor initieras först efter att spermiepositiva utstryk har erhållits (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]).
28. När väl doseringsperioden före parningen är etablerad, bör djuren behandlas med testkemikalien kontinuerligt 7 dagar per vecka fram till obduktionen. Samtliga djur ska doseras med samma metod. Doseringen bör fortsätta under den 2 veckor långa parningsperioden, och för P-honor genom hela dräktigheten och laktationen fram till avslutningsdagen efter avvänjningen. Hanar bör behandlas på samma sätt fram till avslutningen, vid tidpunkten för F₁-djurens avvänjning. För obduktion bör honor prioriteras, och de bör obduceras på samma eller nästan samma laktationsdag. Obduktionen av hanar kan spridas över ett större antal dagar beroende på

laboratorieanläggning. Om direktdosering inte redan har inletts under laktationsperioden, bör direktdosering av de utvalda F₁-hanarna och -honorna börja vid avvänjningen och fortsätta fram till den planerade obduktionen, beroende på kohortanvisning.

29. För kemikalier som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via födan kan antingen en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det valda alternativet bör anges.
30. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör den vätskevolym som tillförs på en gång normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt (0,4 ml per 100 g kroppsvikt är det maximala för olja, t.ex. majsolja). Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt ger starkare effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Behandlingen bör ges vid samma tid varje dag. Dosen till varje djur ska normalt baseras på den senast fastställda individuella kroppsvikten och bör justeras minst en gång i veckan för vuxna hanar och vuxna icke-dräktiga honor och varannan dag för dräktiga honor och F₁-djur, när de administreras före avvänjningen och under 2 veckor efter avvänjningen. Om TK-data indikerar en låg placentaöverföring av testkemikalien, måste kanske sondmatningsdosen under den sista veckan av dräktigheten justeras för att undvika tillförsel av en alltför toxisk dos till moderjuret. Honor bör inte behandlas genom sondmatning eller någon annan behandlingsväg där djuret måste hanteras på dagen för nedkomsten, och att avstå från att administrera testkemikalien den dagen är att föredra framför att störa förlossningsprocessen.

Parning

31. Varje P-hona ska placeras med en enda, slumpmässigt utvald, obesläktad hane från samma dosgrupp (1:1-parning) tills tecken på kopulation observeras eller 2 veckor har gått. Om det inte finns tillräckligt med hanar, till exempel på grund av dödsfall hos hanarna före hopparning, då kan hanar som redan har parat sig paras ihop (1:1) med en andra hona, så att alla honor blir hopparade. Dag 0 av dräktigheten definieras som den dag då bevis på parning bekräftas (vaginalplugg eller sperma observeras). Djuren bör skiljas åt så snart som möjligt efter att tecken på parning har observerats. Om parning inte har inträffat efter 2 veckor, bör djuren separeras utan ytterligare möjlighet till parning. De par som har parat sig bör tydligt identifieras i data.

Kullstorlek

32. På dag 4 efter födseln kan storleken på varje kull justeras genom att extra ungar elimineras genom slumpmässigt urval så att varje kull i möjligaste mån innehåller fem hanar och fem honor. Selektiv eliminering av ungar, t.ex. baserat på kroppsvikt är inte lämpligt. När antalet han- eller honungar inte medger fem av varje kön per kull, är partiell anpassning acceptabelt (t.ex. sex hanar och fyra honor).

Urval av ungar till studier efter avvänjningen (se figur 1)

33. Vid avvänjningen (omkring PND 21) väljs ungar ut från alla tillgängliga kullar upp till 20 per dos- och kontrollgrupp för ytterligare undersökningar och bibehålls fram till den sexuella mognaden (om inte tidigare testning krävs). Ungarna väljs ut slumpmässigt, med undantag av uppenbart småväxta djur (djur med en kroppsvikt som ligger mer än två standardavvikelser under medelvikten för respektive kull) som inte bör ingå, eftersom de sannolikt inte är representativa för behandlingsgruppen.

På PND 21 fördelas de valda F₁-ungarna slumpvis till en av tre kohorter av djur, enligt följande:

Kohort 1 (1A och 1B) = testning av reproduktions-/utvecklingstoxicitet.

Kohort 2 (2A och 2B) = testning av utvecklingsneurotoxicitet.

Kohort 3 = testning av utvecklingsimmunotoxicitet.

Kohort 1A: En hane och en hona/kull/grupp (20/kön/grupp): prioriterat val för primär bedömning av effekter på reproduktionssystem samt av allmän toxicitet.

Kohort 1B: En hane och en hona/kull/grupp (20/kön/grupp): prioriterat val för uppföljande utvärdering av fortplantningsförmågan genom att para F₁-djur vid bedömningen (se OECD:s vägledning 117 [hänvisning 39]), och för att erhålla ytterligare histopatologiska data vid misstanke om reproduktivt eller endokrint toxiska ämnen, eller när resultaten från kohort 1A är tvetydiga.

Kohort 2A: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en hane eller en hona per kull) anvisas till neurobeetendemässig testning, följt av neurohistopatologisk bedömning som vuxna.

Kohort 2B: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en hane eller en hona per kull) anvisas till neurohistopatologisk bedömning vid avvänjningen (PND 21 eller PND 22). Om det inte finns ett tillräckligt antal djur, bör man i första hand anvisa djur till kohort 2A.

Kohort 3: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en per kull, där så är möjligt). Ytterligare ungar kan krävas från kontrollgruppen för att fungera som positiva kontroldjur i det T-cellsberoende antikroppsresponstestet (TDAR) vid PND 56 ± 3.

34. Om antalet ungar i en kull är tillräckligt för att fylla alla kohorter, har kohort 1 företräde eftersom den kan utvidgas till att producera en F₂-generation. Ytterligare ungar kan tilldelas till någon av kohorterna om det finns särskild anledning, t.ex. om man misstänker en kemikalie för att vara neurotoxisk, immunotoxisk eller reproduktionstoxisk. Dessa ungar kan användas för undersökningar vid olika tidpunkter eller för utvärdering av kompletterande endpoints. Ungar som inte har anvisats till kohorter ska genomgå klinisk biokemi (punkt 55) och obduktion (punkt 68).

Andra parningen av P-djuren

35. En andra parning rekommenderas normalt inte för P-djuren, eftersom det innebär förlust av viktig information om antal implantationsställen (och därmed data om efterimplantation och perinatal dödlighet, indikatorer på en möjlig teratogen potential) i den första kullen. Behovet av att verifiera eller belysa en effekt på exponerade honor kan förbättras genom att undersökningen utvidgas till att omfatta en parning av F₁-generationen. Men en andra parning av P-hanar med obehandlade honor är alltid ett alternativ för att klargöra osäkra slutsatser, eller för att ytterligare karakterisera effekter på fertiliteten som observerats i den första parningen.

OBSERVATIONER AV LEVANDE DJUR

Kliniska observationer

36. För P- och utvalda F₁-djur görs en allmän klinisk observation en gång per dag. Vid sonmatningsdosering, bör tidpunkten för de kliniska observationerna vara före och efter doseringen (för eventuella tecken på toxicitet i samband med maximal plasmakoncentration). Relevanta beteendeförändringar, tecken på svår eller utdragen förlossning och alla tecken på toxicitet registreras. Två gånger dagligen, under helgen en gång dagligen, observeras samtliga djur avseende allvarlig toxicitet, sjuklighet och dödlighet.
37. Dessutom görs en mer ingående granskning av alla P- och F₁-djur (efter avvänjning) en gång i veckan, och kan då lämpligen utföras då djuret vägs för att minimera hanteringsstressen. Observationerna bör genomföras och registreras noggrant med hjälp av bedömningssystem som har fastställts av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning, reaktion på hantering liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, stereotypi (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras.

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

38. P-djuren vägs på den första doseringsdagen och därefter minst en gång per vecka. Dessutom vägs P-honorna under laktationen på samma dagar som vägningen av ungarna i deras kullar (se punkt 44). Alla F₁-djur vägs individuellt vid avvänjningen (PND 21) och därefter minst en gång per vecka. Kroppsvikten registreras också på den dag då de når puberteten (avslutad preputial separation eller vaginal öppning). Alla djur vägs vid avlivningen.
39. Under studien registreras foder- och vattenkonsumtionen (om testkemikalien administreras via dricksvatten) minst en gång i veckan på samma dagar som för djurens kroppsvikt (förutom under saminhysningen). Foderkonsumtion för varje bur med F₁-djur redovisas varje vecka med början vid urvalet till respektive kohort.

Brunstcykler

40. Preliminär information om testkemikalierelaterade effekter på brunstcykeln kan redan finnas tillgängliga genom tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering, och kan användas i utformningen av ett testkemikalispecifikt protokoll för den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet. Normalt startar bedömningen av brunstcykeln (vaginal cytologi) i början av behandlingsperioden och fortsätter tills bekräftelse på parning, eller i slutet av parningsperioden om 2 veckor. Om honorna har screenats för normala brunstcykler före behandlingen är det bra att fortsätta med utstryk när behandlingen påbörjas, men om det finns misstankar om icke-specifika effekter i början av behandlingen (till exempel en initial markant minskning av foderkonsumtion) kan djuren tillåtas att anpassa sig till behandlingen i upp till två veckor innan den två veckor långa utstryksperioden före hopparning inleds. Om honans behandlingsperiod förlängs på detta sätt (dvs. till en 4-veckors behandling före parning) bör man överväga att köpa in yngre djur samt att förlänga hanens behandling före hopparning. När vaginala/cervikala celler erhålls, bör försiktighet iaktas för att undvika skador på slemhinnan och följaktligen framkallande av skendräktighet (se hänvisning 10, 11).
41. Vaginala utstryk bör undersökas dagligen för alla F₁-honor i kohort 1A, efter vaginal öppning tills det första förhornade utstryket registreras, för att bestämma tidsintervallet mellan dessa två händelser. Brunstcykler för alla F₁-honor i kohort 1A bör också övervakas under två veckor, med början runt PND 75. Om parning av F₁-generationen blir nödvändig, kommer den vaginala cytologin i kohort 1B följas från tidpunkten för hopparning tills bevis på parning upptäcks.

Parning och dräktighet

42. Utöver standardendpoints (t.ex. kroppsvikt, foderkonsumtion, kliniska iakttagelser, inklusive kontroller av dödlighet/sjuklighet), registreras datum för hopparning, datum för insemination och tidpunkt för förlossning och precoatalt intervall (hopparning till insemination) och dräktighetstid (insemination till förlossning) beräknas. P-honorna bör undersökas noggrant i samband med förväntad nedkomst efter tecken på dystoki. Eventuella avvikelser i bobyggnad eller omvårdnad ska registreras.
43. Den dag då förlossning sker är laktationsdag 0 (LD 0) för moderdjuret och postnatal dag 0 (PND 0) för avkomman. Alternativt kan alla jämförelser också baseras på postkoital tid för att eliminera störning av postnatala utvecklingsdata genom skillnader i dräktighetstid, dock ska tidpunkten i förhållande till nedkomsten också registreras. Detta är särskilt viktigt när testkemikalien påverkar dräktighetstiden.

Parametrar för avkomman

44. Varje kull bör undersökas så snart som möjligt efter nedkomsten (PND 0 eller 1) för att fastställa ungarnas antal och kön, dödfödda, levande födda samt närvaron av grova anomalier (utvändigt synliga missbildningar, inklusive gomspalt, subkutana blödningar, onormal hudfärg eller -struktur, förekomst av navelsträng, brist på mjölk i magen, förekomst av torkat sekret). Vidare bör den första kliniska undersökningen av nyfödda omfatta en kvalitativ bedömning av kroppstemperatur, aktivitetstillstånd och reaktion på hantering. Ungar som påträffas döda på PND 0 bör undersökas, eller vid ett senare tillfälle undersökas avseende eventuella defekter och dödsorsak. Levande ungar räknas och vägs individuellt på PND 0 eller PND 1, och därefter regelbundet, t.ex. åtminstone PND 4, 7, 14 och 21. Kliniska undersökningar som är lämpliga för djurens ålder bör upprepas när avkomman vägs,

eller oftare om fallspecifika fynd har gjorts vid födseln. Tecken som noteras kan omfatta, men inte begränsas till, yttre missbildningar, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet. Förändringar i gång, hållning, reaktion på hantering liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, stereotypi eller bisart beteende ska också registreras.

45. Det anogenitala avståndet (AGD) hos varje unge bör mätas åtminstone vid ett tillfälle från PND 0 till PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (se hänvisning 12). Förekomsten av bröstvårtor/vårtgård bör kontrolleras på hanungarna PND 12 eller 13.
46. För att upptäcka om könsmognad inträffar tidigt utvärderas alla utvalda F₁-djur dagligen avseende om balanopreputial separation eller vaginal öppning för hanar respektive honor inleds före den beräknade dagen för dessa endpoints. Eventuella missbildningar i könsorganen, såsom långlivad vaginal tråd, hypospadi eller kluven penis, bör noteras. Könsmognad hos F₁-djur jämförs med fysisk utveckling genom bestämning av ålder och kroppsvikt vid balanopreputial separation eller vaginal öppning för hanar/honor var för sig (se hänvisning 13).

Bedömning av potentiell utvecklingsneurotoxicitet (kohorter 2A och 2B)

47. 10 hanar och 10 honor i kohort 2A och 10 hanar och 10 honor i kohort 2B från varje behandlingsgrupp (för varje kohort: 1 hane eller 1 hona per kull; alla kullar representeras av minst 1 unge; slumpmässigt urval) ska användas för bedömning av neurotoxicitet. Kohort 2A-djur genomgår ett test med plötsliga ljud, ett testbatteri för funktionsobservation samt bedömningar av motorisk aktivitet (se punkterna 48–50) och neuropatologi (se punkterna 74–75). Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationerna för samtliga testbetingelser är minimala och inte systematiskt relaterade till behandlingen. Bland de variabler som kan påverka beteendet är ljudnivån (t.ex. intermittent buller), temperatur, luftfuktighet, ljus, lukter, tid på dygnet och miljömässiga distraktioner. Resultaten från neurotoxicitetstesterna ska tolkas i förhållande till lämpliga historiska kontrollreferensintervall. Kohort 2B-djur bör användas för neuropatologisk bedömning på PND 21 eller PND 22 (se punkterna 74–75).
48. Ett test med plötsliga ljud ska utföras på PND 24 (± 1 dag) med djur i kohort 2A. Dagen för testningen bör balanseras över behandlings- och kontrollgrupperna. Varje session består av 50 försök. Vid utförandet av test med plötsliga ljud, bör den genomsnittliga reaktionsamplituden på varje block med 10 försök (5 block med 10 försök) bestämmas, med optimerade testförhållanden för att ge tillvänjning inom sessionen. Dessa förfaranden bör vara förenliga med testmetod B.53 (se hänvisning 35).
49. Vid en lämplig tidpunkt mellan PND 63 och PND 75 genomgår kohort 2A-djuren ett testbatteri för funktionsobservation samt ett automatiserat test av motorisk aktivitet. Dessa förfaranden bör vara förenliga med testmetoderna B.43 (se hänvisning 33) och B.53 (se hänvisning 35). Testbatteriet för funktionsobservation innehåller en noggrann beskrivning av djurets utseende, beteende samt funktionella integritet. Detta bedöms genom observationer i buren, efter avlägsnande av en standardarena för observation (öppet fält) där djuret rör sig fritt och genom manipulativa tester. Testning bör utföras från den minst till den mest interaktiva. En lista med mått finns i tillägg 1. Alla djur bör observeras noga av utbildade observatörer som är omedvetna om djurens behandlingsstatus, med hjälp av standardiserade procedurer för att minimera variabiliteten mellan observatörer. Om möjligt är det lämpligt att samma observatör utvärderar djuren för ett givet test. Om detta inte är möjligt, krävs något bevis på tillförlitlighet mellan de olika observatörerna. För varje parameter i det beteendevetenskapliga testbatteriet ska explicita operativa definierade skalor och bedömningskriterier användas. Om möjligt bör objektiva kvantitativa mått utvecklas för observationsendpoints som innebär subjektiv rangordning. Varje djur testas individuellt med avseende på motorisk aktivitet. Testperioden bör vara tillräckligt lång för att visa tillvänjning inom kontrollperioden. Motorisk aktivitet bör övervakas av en automatisk apparat för aktivitetsregistrering som bör kunna upptäcka både ökad och minskad aktivitet, (dvs. det referensvärde för aktivitet som mäts av apparaten bör inte vara så lågt att en upptäckt av minskning förhindras och inte heller så högt att en upptäckt av ökning förhindras). Varje enhet bör testas genom standardförfaranden, för att så långt som möjligt säkerställa tillförlitlighet i driften mellan olika apparater och mellan olika dagar. I den mån det är möjligt bör behandlingsgrupperna balanseras mellan enheterna. Behandlingsgrupperna bör fördelas jämnt över testtiderna för att undvika störning av dygnsrytmer.
50. Om befintlig information visar att det behövs andra typer av funktionstestning (t.ex. sensorisk, social, kognitiv) bör dessa integreras utan att äventyra integriteten för övriga utvärderingar som gjorts i studien. Om denna testning utförs på samma djur som använts för standardtest med plötsliga ljud, testbatteri för funktionsobservation

och test av motorisk aktivitet, bör olika tester planeras för att minimera risken av att äventyra integriteten för dessa tester. Kompletterande förfaranden kan vara särskilt användbara när empirisk observation, förväntade effekter eller mekanismer/tillvägagångssätt indikerar en viss typ av neurotoxicitet.

Bedömning av potentiell utvecklingsimmunotoxicitet (kohort 3)

51. På PND 56 ($\pm$ 3 dagar) ska 10 hanar och 10 honor i kohort 3 från varje behandlingsgrupp (1 hane eller 1 hona per kull, alla kullar representerade av minst 1 unge, slumpmässigt utvald) användas i ett test av T-cellsberoende antikroppsresponser, dvs. den primära IgM-antikroppsresponsen på en T-cellsberoende antigen, såsom röda blodkroppar från får (*Sheep Red Blood Cells*, SRBC) eller hemocyanin från nyckelhålssnäckor (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH), i överensstämmelse med nuvarande immunanalysförfaranden (se hänvisning 14, 15). Responsen kan utvärderas genom att räkna särskilda plackbildande celler (PFC) i mjälten eller genom att bestämma titer av SRBC- eller KLH-specifika IgM-antikroppar i serum med Elisa, vid maximal respons. Maximala responser inträffar vanligtvis fyra (PFC-respons) eller fem (Elisa) dagar efter intravenös immunisering. Om den primära antikroppsresponsen analyseras genom räkning av plackbildande celler, är det tillåtet att utvärdera undergrupper av djur på olika dagar, förutsatt att undergruppsimmunisering och -avlivning är tidsinställda så att PFC räknas vid den maximala responsen, att undergrupperna innehåller lika många hanliga som honliga avkommor från alla dosgrupper, inklusive kontroller, samt att undergrupperna utvärderas vid ungefär samma postnatale ålder. Exponering för testkemikalien ska fortsätta fram till dagen innan insamlingen av mjältar för PFC-respons, eller serum för Elisa-test.

Uppföljande utvärdering av potentiell reproduktionstoxicitet (kohort 1B)

52. Kohort 1B-djur kan hållas på behandling efter PND 90 och avlas för att få fram en F₂-generation, om det behövs. Hanar och honor i samma dosgrupp bör saminhysas (undvik att para ihop syskon) i upp till två veckor, med början på PND 90 eller senare, men senast PND 120. Förfarandena bör vara desamma som för P-djuren. Baserat på en sammanvägd bedömning kan det räcka med att avliva kullarna på PND 4, i stället för att följa dem fram till avvänjningen eller längre.

TERMINALA OBSERVATIONER

Klinisk biokemi/hematologi

53. Systemiska effekter bör övervakas hos P-djur. Blodprov från en definierad plats tas från tio slumpmässigt utvalda fastande P-hanar och -honor per dosgrupp vid avslutningen. De ska förvaras under lämpliga förhållanden och utsättas för partiell eller fullskalig hematologi, klinisk biokemi, test av T4 och TSH eller andra undersökningar som föranleds av testkemikaliens kända biverkningsprofil (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Följande hematologiska parametrar bör undersökas: hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocytantal, totalt och differentierat leukocyntantal, trombocytantal och blodkoagulationstid/-potential. Undersökningar av serum eller plasma bör omfatta glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar verkningar på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatase, gamma-glutamyltranspeptidas och sorbitoldehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information. Dessutom kan man lagra blodet från samtliga djur för eventuell analys vid ett senare tillfälle för att klargöra tvetydiga effekter eller för att generera intern exponeringsdata. Om en andra parning av P-djur inte planeras ska blodprover tas strax innan, eller som en del av, förfarandet vid den planerade avlivningen. I de fall då djuren behålls bör blodprov samlas in några dagar innan djuren paras för andra gången. Om inte befintliga data från studier med upprepad dosering tyder på att parametern inte påverkas av testkemikalien, bör urinanalys genomföras före avslutningen och följande parametrar utvärderas: utseende, volym, osmolaritet eller specifik vikt, pH-värde, protein, glukos, blod och blodkroppar samt cellrester. Urin kan också samlas in för att övervaka utsöndring av testkemikalien och/eller metaboliter.
54. Systemiska effekter bör också övervakas hos F₁-djur. Blodprov från en definierad plats tas från tio slumpvis utvalda fastande kohort 1A-hanar och -honor per dosgrupp vid avslutningen. De ska förvaras under lämpliga förhållanden och utsättas för vanlig klinisk biokemi, inklusive bedömning av serumnivåer för sköldkörtelhormon (T4 och TSH), bedömning av hematologi (totalt och differentierat leukocyntantal samt erytrocytantal) och urinanalys.

55. På PND 4 obduceras överskottungarna och man bör överväga mätning av koncentrationen av serumsköldkörtelhormon (T4). Vid behov kan neonatalt (PND 4) blod slås samman per kull för biokemiska analys och sköldkörtelhormonanalys. Blod samlas också in för T4- och TSH-analyser från avvanda djur som obduceras på PND 22 (F₁-ungar som inte valts ut till kohorter).

Spermieparametrar

56. Spermieparametrar bör mätas i alla P-generationshanar om det inte finns befintliga data som visar att spermieparametrar är opåverkade i en 90-dagarsstudie. Undersökning av spermieparametrar bör utföras på alla kohort 1A-hanar.
57. Vid avslutningen registreras testikel- och bitestikelvikter för alla P- och F₁-hanar (kohort 1A). Minst en testikel och en bitestikel reserveras för en histopatologisk undersökning. Den återstående bitestikeln används för kvantifiering av spermiereserver från cauda epididymis (se hänvisning 16, 17). Dessutom samlas spermier från cauda epididymis (eller sädesledare) in med hjälp av metoder som minimerar skador för utvärdering av spermimotoilitet och -morfologi (se hänvisning 18).
58. Spermimotoilitet kan antingen utvärderas omedelbart efter avlivningen eller registreras för senare analys. Den procentuella andelen av progressivt rörliga spermier kan antingen bestämmas subjektivt eller objektivt genom datorstödd rörelseanalys (se hänvisning 19, 20, 21, 22, 23, 24). För utvärderingen av spermimorfologi bör ett spermieprov från bitestikel (eller sädesledare) undersökas som fast eller vått preparat (se hänvisning 25), och minst 200 spermier per prov ska antingen klassificeras som normala (både huvud och mellanstycke/svans verkar vara normala) eller onormala. Exempel på morfologiska spermieavvikelse kan innefatta fusion, avskilda huvuden och defekta huvuden och/eller svansar (se hänvisning 26). Defekta eller stora spermiehuvuden kan tyda på brister i permiation.
59. Om spermieprover fryses, registreras analysen av fixerade utstryksprov och bilder av spermierörlighet vid tidpunkten för obduktionen (se hänvisning 27), efterföljande analys kan begränsas till kontroll- och högdoshanar. Om behandlingsrelaterade effekter observeras så bör också de lägre dosgrupperna utvärderas.

Obduktion

60. Vid tidpunkten för avslutning eller förtida död obduceras P- och F₁-djuren och undersöks makroskopiskt avseende eventuella strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt organen i reproduktionssystemet. Ungar som avlivas humant i döende tillstånd och döda ungar ska registreras och, när de inte är utmärklade, undersökas avseende eventuella defekter och/eller dödsorsak samt bevaras.
61. På vuxna P- och F₁-honor undersöks vaginala utstryk på dagen för obduktionen, för att fastställa brunstcykelns skede och möjliggöra korrelation med histopatologi i fortplantningsorganen. Livmodern hos alla P-honor (och F₁-honor, om tillämpligt) undersöks avseende förekomst och antal implantationsställen på ett sätt som inte stör den histopatologiska utvärderingen.

Organvikt och vävnadskonservering – vuxna P- och F₁-djur

62. Vid tidpunkten för avslutningen fastställs kroppsvikterna och organens våtvikter som anges nedan från alla P-djur och alla F₁-vuxna från relevanta kohorter (som beskrivs nedan), så snart som möjligt efter dissekeringen för att undvika uttorkning. Dessa organ bör därefter bevaras under lämpliga förhållanden. Om inte annat anges kan pariga organ vägas individuellt eller i kombination, i enlighet med det typiska utförandet för det berörda laboratoriet.

— Livmoder (med äggledare och livmoderhals), äggstockar

— Testiklar, bitestiklar (hela och cauda för de prover som används för spermieräkning)

— Prostata (dorsolaterala och ventrala delar kombinerade). Försiktighet bör iakttas vid putsning av prostatakomp-lexet för att undvika punktion av de vätskefyllda blåsorna. I händelse av en behandlingsrelaterad effekt på total prostatavikt bör de dorsolaterala och ventrala segmenten noggrant dissekeras efter fixering och vägas separat.

- Sädesblåsor med koagulerande körtlar och deras vätskor (som en enhet).
 - Hjärna, lever, njurar, hjärta, mjälte, tymus, hypofys, sköldkörtel (efter fixering), binjurarna och kända målorgan eller vävnader.
63. Förutom de organ som anges ovan, bör prover av perifer nerv, muskel, ryggmärg, öga med synnerv, mag-tarmkanalen, urinblåsa, lunga, luftstrupe (med vidhängande sköldkörtel och bisköldkörtel), benmärg, sädesledaren (hanar), bröstkörtel (hanar och honor) och vagina bevaras under lämpliga förhållanden.
64. För kohort 1A-djur vägs alla organ och bevaras för histopatologi.
65. För utredning av pre- och postnalt inducerade immunotoxiska effekter ska 10 hanar och 10 honor i kohort 1A från varje behandlingsgrupp (1 hane eller 1 hona per kull, alla kullar representerade av minst 1 unge, slumpmässigt utvald) genomgå följande vid avslutningen:
- Vägning av lymfkörtlarna förknippade med och långt ifrån exponeringsvägen (förutom vikten på binjurar, tymus och mjälte, som redan utförts för alla kohort 1A-djur).
 - Analys av mjältlymfocytpopulationer (CD4+ och CD8+ T-lymfocyter, B-lymfocyter och naturliga mördarceller) genom att använda halva mjälten, varvid den andra hälften av mjälten bevaras för histopatologisk utvärdering.
- Analys av mjältlymfocytsubpopulationer i icke-immuniserade (kohort 1A) djur kommer att avgöra om exponeringen är relaterad till en förändring i den immunologiska steady state-distribution av hjälparceller (CD4+) eller cytotoxiska (CD8+) tymus-härledda lymfocyter eller naturliga mördarceller (snabb respons på neoplastiska celler och patogener).
66. Kohort 1B-djur bör få följande organ vägda och motsvarande vävnader bearbetade till blockstadiet:
- Vagina (ej vägd).
 - Livmoder med livmoderhals.
 - Äggstockar.
 - Testiklar (minst en).
 - Bitestiklar.
 - Sädesblåsor och koagulerande körtlar.
 - Prostata.
 - Hypofys.
 - Identifierade målorgan.

Histopatologi i kohort 1B ska genomföras om resultaten från kohort 1A är tvetydiga eller vid misstanke om reproduktions- eller endokrintoxiska ämnen.

67. Kohort 2A och 2B: Testning av utvecklingsneurotoxicitet (PND 21 eller PND 22 och vuxen avkomma). Kohort 2A-djur avlivs efter beteendetestning med registrering av hjärnvikter och en komplett neurohistopatologi i syfte att bedöma neurotoxicitet. Kohort 2B-djur avlivs på PND 21 eller PND 22 med registrering av hjärnvikter samt en mikroskopisk undersökning av hjärnan i syfte att bedöma neurotoxicitet. Perfusionsfixering krävs för kohort 2A-djur och finns som tillval för kohort 2B-djur, i enlighet med testmetod B.53 (se hänvisning 35).

Organvikt och vävnadskonservering – avvanda F₁-djur

68. Ungar som inte valts ut till kohorter, inklusive småväxta djur, avlivs efter avvänjningen på PND 22, om inte resultaten visar ett behov av ytterligare undersökningar i levande djur. Avlivade ungar obduceras vilket inkluderar en bedömning av reproduktionsorganen, såsom beskrivs i punkterna 62 och 63. På upp till 10 ungar per kön per grupp, från så många kullar som möjligt, bör hjärna, mjälte och tymus vägas och bevaras under lämpliga förhållanden. Dessutom kan bröstvävnaderna från dessa han- och honungar bevaras för ytterligare mikroskopisk analys ⁽¹⁾ (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Alla större avvikelser och målvävnader bör sparas för eventuell histologisk undersökning.

⁽¹⁾ Forskning har visat att bröstkörteln, framför allt i bröstkörtelns tidiga utveckling, är en känslig endpoint för östrogen verkan. Det rekommenderas att endpoints som involverar ungarnas mjölkkörtlar hos båda könen bör ingå i denna testmetod, när den har validerats.

Histopatologi – P-djur

69. En fullständig histopatologisk undersökning av de organ som anges i punkterna 62 och 63 genomförs för alla högdos- och P-kontrolldjur. Organ som visar behandlingsrelaterade förändringar bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna för att hjälpa till att fastställa ett Noel-värde. Dessutom bör reproduktionsorganen hos alla djur som misstänks ha minskad fertilitet, t.ex. de som misslyckats med att para sig, bli dräktiga, befrukta eller leverera frisk avkomma, eller för vilka brunstcykeln eller spermiantalet, rörligheten eller morfologin påverkas, samt alla större skador utvärderas histopatologiskt.

Histopatologi – F₁-djur*Kohort 1-djur*

70. En fullständig histopatologisk undersökning av de organ som anges i punkterna 62 och 63 genomförs för alla högdos- och vuxna kohort 1A-kontrolldjur. Alla kullar bör representeras av minst 1 unge per kön. Organ och vävnader som visar behandlingsrelaterade förändringar samt alla större skador bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna som hjälp för att fastställa ett Noel-värde. För utvärdering av pre- och postnatalt inducerade effekter på lymfoida organ bör också histopatologin på de insamlade lymfkörtlarna och benmärgen utvärderas hos 10 hanar och 10 honor i kohort 1A vid sidan av en histopatologisk utvärdering av bräss, mjälte, och binjuror som redan har utförts för alla 1A-djur.
71. Reproduktiva och endokrina vävnader från alla kohort 1B-djur bearbetade till blockstadiet som beskrivs i punkt 66, bör undersökas beträffande histopatologi vid misstanke om reproduktions- eller endokrintoxiska ämnen. Även kohort 1B bör genomgå histologisk undersökning, om resultaten från kohort 1A är tvetydiga.
72. Äggstockarna hos vuxna honor bör innehålla primordiala och växande folliklar samt gulkroppar, och därför bör en histopatologisk undersökning syfta till att göra en kvantitativ utvärdering av primordiala och små växande folliklar, liksom gulkroppar, hos F₁-honor. Antalet djur, äggstockssnittsval och snittprovstorlek ska vara statistiskt lämpliga för det utvärderingsförfarande som används. Follikelräkning kan först utföras på kontroll- och högdosdjur och i händelse av en negativ effekt på de senare bör lägre doser undersökas. Undersökningen bör innefatta räkning av antalet primordiala folliklar, vilken kan kombineras med små växande folliklar, för jämförelse av äggstockar från behandling och kontroll (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Gulkroppsbedomningen bör ske parallellt med brunstcykeltestningen så att cykelns stadium kan tas i beaktande vid bedömningen. Äggledare, livmoder och vagina undersöks för lämplig organotypisk utveckling.
73. Detaljerade testikelhistopatologiska undersökningar genomförs på F₁-hanar för att identifiera behandlingsrelaterade effekter på testiklarnas differentiering och utveckling samt på spermatogenesis (se hänvisning 38). Om möjligt bör delar av rete testis undersökas. Bitestiklarnas caput, corpus och cauda samt sädesledaren undersöks för lämplig organotypisk utveckling, liksom de parametrar som krävs för P-hanarna.

Kohort 2-djur

74. Neurohistopatologi utförs för alla högdos- och kontrollkohort 2A-djur av varje kön efter avslutad neurobeteendetestning (efter PND 75, men inte efter PND 90). Hjärnhistopatologi utförs för alla högdos- och kontrollkohort 2B-djur av varje kön på PND 21 eller PND 22. Organ som visar behandlingsrelaterade förändringar bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna som hjälp för att fastställa ett Noel-värde. För kohort 2A- och 2B-djur granskas flera avsnitt från hjärnan för att möjliggöra undersökning av luktbulberna, hjärnbarken, hippocampus, basala ganglierna, talamus, hypotalamus, mitthjärnan (thecum, tegmentum och hjärnstjälkarna), hjärnstammen och lillhjärnan. Enbart för kohort 2A undersöks ögon (nåthinnan och synnerven) och prover från perifer nerv, muskel och ryggmärg. Alla neurohistologiska förfaranden bör vara förenliga med testmetod B.53 (se hänvisning 35).
75. Morfometriska (kvantitativa) utvärderingar bör utföras på representativa områden av hjärnan (homologa snitt väljs omsorgsfullt baserat på tillförlitliga mikroskopiska markörer) och kan inkludera linjära mätningar och/eller arealmätningar på specifika delar av hjärnan. Minst tre på varandra följande snitt bör tas vid varje markör (nivå) för att välja det mest homologa och representativa snittet för det specifika hjärnområde som ska utvärderas. Neuropatologen bör kunna bedöma om beredda snitt för mätning är homologa med andra i provuppsättningen, och

därmed lämpar sig för integration, eftersom linjära mätningar i synnerhet kan förändras över en relativt kort sträcka (se hänvisning 28). Icke-homologa snitt bör inte användas. Även om målet är att ta prover från alla djur som är reserverade för detta ändamål (10/kön/dosnivå), kan ett mindre antal vara fullt tillräckligt. Dock anses prover från färre än 6 djur/kön/dosnivå generellt inte vara tillräckligt för tillämpning av denna testmetod. Stereologi kan användas för att identifiera behandlingsrelaterade effekter på parametrar såsom volym eller cellantal i specifika neuroanatomiska regioner. Under alla moment i prepareringen av vävnadsprover, från vävnadsfixering till dissektion av vävnadsprover, vävnadsbehandling och färgning av utstryksglas bör man använda sig av en balanserad utformning, så att varje sats innehåller representativa prover från varje dosgrupp. När morfometriska eller stereologiska analyser används bör hjärnvävnaden ingjutas i lämpligt medium samtidigt på alla dosnivåer för att undvika krympning av artefakter i samband med långvarig förvaring i fixativ.

RAPPORTERING

Data

76. Data rapporteras individuellt och sammanfattas i tabellform. I förekommande fall bör, för varje testgrupp och varje generation, följande rapporteras: antal djur i början av testet, antal djur som påträffats döda under testet eller som avlivats av humana skäl, tidpunkt för varje dödsfall eller avlivning, antal fertila djur, antal dräktiga honor, antal honor som föder en kull och antal djur som uppvisar tecken på toxicitet. En beskrivning av toxicitet, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och allvarlighetsgrad bör också rapporteras.
77. Numeriska resultat ska utvärderas genom en lämplig och accepterad statistisk metod. De statistiska metoderna bör väljas som en del av studieutformningen och bör på lämpligt sätt hantera icke-normala data (t.ex. beräkningsdata), censurerade data (t.ex. begränsad observationstid), icke-oberoende (t.ex. kulleffekter och upprepade mätningar) samt olika varianser. Generaliserade linjära blandade modeller och dos-responsmodeller täcker en bred klass av analytiska verktyg som kan vara lämpade för de data som genereras inom ramen för denna testmetod. Rapporten bör innehålla tillräckligt med information om analysmetoden och det datorprogram som används, så att en oberoende granskare/statistiker kan utvärdera/omvärdera analysen.

Utvärdering av resultaten

78. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen omfattar sambandet, eller brist på samband, mellan dosen och förekomst, frekvens och svårighetsgrad för missbildningar, inklusive större skador. Målorgan, fertilitet, kliniska abnormiteter, reproduktions- och kullresultat, kroppsviktsförändringar, dödlighet och andra toxiska och utvecklingsmässiga effekter bör också bedömas. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt könsspecifika förändringar. Testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper och TK-data, när de är tillgängliga, inklusive överföring via placenta och mjölkutsöndring, bör beaktas vid utvärdering av testresultaten.

Testrapport

79. Testrapporten bör innehålla följande information som erhålls i den nu aktuella studien från P-, F₁- och F₂-djur (i tillämpliga fall):

Testkemikalie:

- All relevant och tillgänglig information om testkemikaliens kemiska, toxikokinetiska och toxikodynamiska egenskaper.
- Identifikationsuppgifter.
- Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall):

- Motivering för val av vehikel om annan än vatten.

Försöksdjur:

- Art och stam som används.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, foder, bomaterial etc.
- Djurens individuella vikt vid testets början.
- Vaginalutstryksdata för P-honor innan behandlingen inleds (om uppgifterna samlas in vid den tidpunkten).
- Parningsregister för P-generationen som anger hanliga och honliga partner för en parning och parningens framgång.
- Uppgift om ursprungskull för vuxna F₁-generationsdjur.

Testbetingelser:

- Grund för val av dosnivå.
- Uppgifter om testkemikalies sammansättning/foderberedning och uppnådda koncentrationer.
- Beredningens stabilitet och homogenitet i vehikeln eller bäraren (t.ex.foder, dricksvatten) i blodet och/eller mjölken i enlighet med villkoren för användning och förvaring mellan användningarna.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till uppnådd dos (mg/kg kroppsvikt/dag), om tillämpligt.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet fodersammansättning, om tillgängligt).
- Detaljerad beskrivning av randomiseringsförfaranden för att välja ungar för avlivning och för att anvisa ungar till testgrupper.
- Miljöförhållanden.
- Förteckning över personal som utför undersökningen, inklusive yrkesutbildning.

Resultat (sammanfattning och individuella data för respektive kön och dos):

- Foderkonsumtion, vattenförbrukning om tillgänglig, fodereffektivitet (kroppviktsökning per gram foder som konsumeras, med undantag av samhysningsperioden och under laktationen) samt testkemikalieförbrukning (för administration via foder/dricksvatten) för P- och F₁-djur.
- Absorptionsdata (om tillgängliga).
- Kroppviktsdata för P-djur.
- Kroppviktsdata för de valda F₁-djuren efter avvänjningen.
- Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.
- Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).
- Hematologi, urinanalys och kliniska kemiska data inklusive TSH och T4.
- Fenotypisk analys av celler från mjälte (T-, B-, NK-celler).
- Benmärgens cellularitet.
- Uppgifter om toxiska reaktioner.
- Antal P- och F₁-honor med normal eller onormal brunstcykel samt cykelns varaktighet.
- Tid för parning (precoitalt intervall, antal dagar mellan hopparning och parning).
- Toxiska eller andra effekter på reproduktionen, inklusive antal och procentsatser för djur som parat sig, dräktighet, förlossning och laktation, för haninducerad dräktighet, för honor med tecken på dystoki/långvarig eller svår förlossning.
- Dräktighetstid och, om uppgift finns, förlossningens varaktighet.
- Antalet implantationer, kullstorlek och procentandelen hanungar.

- Antal och procentandel av postimplantationsförlust, levande födda och dödfödda.
- Data om kullvikt och ungvikt (hanar, honor och i kombination), antalet småväxta ungar om det fastställs.
- Antal ungar med grava synliga missbildningar.
- Toxiska eller andra effekter på avkomman, postnatal tillväxt, levnadsduglighet, etc.
- Uppgifter om fysiska markörer hos ungar och andra postnatala utvecklingsdata.
- Uppgifter om könsmognad hos F_1 -djur.
- Uppgifter om funktionsobservationer av ungar och vuxna, i tillämpliga fall.
- Kroppsvikt vid avlivning och absoluta och relativa organviktsdata för P- och vuxna F_1 -djur.
- Obduktionsfynd.
- En detaljerad redogörelse av alla histopatologiska fynd.
- Totalt spermieantal i cauda epididymis, procentandel progressivt rörliga spermier, procentandel morfologiskt normala spermier, och procentandel av spermier med varje identifierad abnormitet för P- och F_1 -hanar.
- Antal och mognadsstadier för de folliklar som finns i äggstockarna hos P- och F_1 -honor, i förekommande fall.
- Uppräkning av gulkroppar i äggstockarna hos F_1 -honor.
- Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Kohort 2 parametrar:

- Detaljerad beskrivning av de förfaranden som används för att standardisera observationer och förfaranden, samt operationella definitioner för att bedöma observationer.
- Förteckning över samtliga testförfaranden, samt motivering för deras användning.
- Närmare uppgifter om de beteendemässiga/funktionella, neuropatologiska och morfometriska förfaranden som används, inklusive information och detaljer om automatiserade enheter.
- Rutiner för kalibrering och säkerställande av likvärdiga enheter och balansen mellan behandlingsgrupperna i testförfarandena.
- Kort motivering som förklarar eventuella beslut som inbegriper en yrkesmässig bedömning.
- Detaljerad beskrivning av alla beteendemässiga/funktionella, neuropatologiska och morfometriska resultat från respektive kön och dosgrupp, omfattande både ökning och minskningar från kontroller.
- Hjärnvikt.
- Eventuella diagnoser som härrör från neurologiska symtom och skador, inklusive naturligt förekommande sjukdomar eller tillstånd.
- Bilder på typiska exempel på fynd.
- Lågupplösta bilder för att bedöma homolog i snitt som används för morfometri.
- Statistisk bearbetning av resultaten, inklusive statistiska modeller som används för att analysera data, och resultaten, oavsett om de var signifikanta eller ej.
- Samband med eventuella toxiska effekter till en slutsats om testkemikaliens neurotoxiska potential, efter kön och dosgrupp.
- Påverkan av eventuell toxikokinetisk information på slutsatserna.
- Data som stöder testmetodens tillförlitlighet och känslighet (dvs. positiva och historiska kontrolldata).
- Eventuella samband mellan neuropatologiska och funktionella effekter.
- Noel eller referensdos för moderdjur och avkomma, för respektive kön och dosgrupp.
- Diskussion om den övergripande tolkningen av data baserat på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida kemikalien orsakat utvecklingsneurotoxicitet samt Noel.

Kohort 3 parametrar:

- IgM-antikroppstitrar i serum (sensibilisering mot SRBC eller KLH) eller IgM PFC-enheter i mjälte (sensibilisering mot SRBC).
- TDAR-metodens prestanda bör därför bekräftas som en del av optimeringsprocessen av laboratorier som inför testet för första gången, och med jämna mellanrum (t.ex. årligen) hos alla laboratorier.
- Diskussion om den övergripande tolkningen av data baserat på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida kemikalien orsakat utvecklingsimmunotoxicitet samt Noael.

*Diskussion av resultaten**Slutsatser, inbegripet Noael-värden för effekter på föräldrar och avkomma*

All information som inte erhållits under studien men som är användbara för tolkningen av resultaten (t.ex. likheter med effekter från alla kända neurotoxiska ämnen) bör också lämnas.

Tolkning av resultaten

80. En utökad engenerationsstudie av reproduktionstoxicitet ger information om verkningarna av upprepade exponering för en kemikalie under alla faser av reproduktionscykeln, vid behov. I synnerhet ger studien information om reproduktionssystemet och om utveckling, tillväxt, överlevnad och funktionella endpoints hos avkomma upp till PND 90.
81. Tolkning av studiens resultat bör ta hänsyn till all tillgänglig information om kemikalien, inklusive fysikalisk-kemiska, TK och toxikodynamiska egenskaper, tillgängliga relevanta uppgifter om strukturella analoger, samt resultat från toxicitetsstudier som tidigare genomförts med testkemikalien (t.ex. akut toxicitet, toxicitet efter upprepade applikationer, mekanistiska studier och studier som bedömer om det finns betydande kvalitativa och kvantitativa artskillnader för metaboliska egenskaper *in vivo/in vitro*). Obduktions- och organviktsresultat bör bedömas i samband med observationer gjorda i andra studier med upprepade dosering, när så är möjligt. Minsknings i avkommans tillväxt kan övervägas i relation till en påverkan av testkemikalien på mjölkens sammansättning (se hänvisning 29).

Kohort 2 (utvecklingsneurotoxicitet)

82. Neurobeteendemässiga och neuropatologiska resultat bör tolkas mot bakgrund av samtliga resultat, med hjälp av en metod som bygger på evidensvärde och som involverar expertbedömning. Mönster hos beteendemässiga eller morfologiska fynd bör, om sådana finns, diskuteras, liksom belägg för dos-respons. Bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet, inklusive mänskliga epidemiologiska studier eller fallrapporter, samt experimentella djurstudier (t.ex. toxikokinetiska data, struktur-aktivitetsinformation, data från andra toxicitetsstudier) bör ingå i denna karakterisering. Utvärderingen av data bör omfatta en diskussion om både den biologiska och statistiska signifikansen. Utvärderingen bör omfatta eventuella samband mellan observerade neuropatologiska och beteendemässiga förändringar. För vägledning om tolkningen av utvecklingsmässiga neurotoxiska resultat, se testmetod B.53 (se hänvisning 35) och Tyl et al., 2008 (se hänvisning 31).

Kohort 3 (utvecklingsimmunotoxicitet)

83. Undertryckning eller förstärkning av immunfunktion bedömd genom TDAR (T-cellsberoende antikropsrespons) bör utvärderas mot bakgrund av samtliga iakttagelser som gjorts. Betydelsen av resultatet från TDAR kan stödjas av andra effekter på immunologiskt relaterade indikatorer (t.ex. benmärgens cellularitet, lymfvävnadens vikt och histopatologi, lymfocytdelmängdsfördelning). Effekter som fastställts genom TDAR kan vara mindre meningsfulla vid annan toxicitet som observerats vid lägre exponering.
84. OECD:s vägledning 43 bör användas som stöd vid tolkningen av reproduktions- och neurotoxicitetsresultaten (se hänvisning 26).

HÄNVISNINGAR

1. Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers och K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

2. Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, och D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.
3. Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
4. Moser, V.C., I. Walls och T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87–94.
5. Conolly, R.B., B.D. Beck och J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.
6. Ulbrich, B. och A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.
7. Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.
8. Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara och Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.
9. Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408–415.
10. Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell och R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84–97.
11. Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston och R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
12. Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp och V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.
13. Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi och R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.
14. Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.
15. Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat och D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.
16. Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott och J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.
17. Robb, G.W., R.P. Amann och G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103–107.
18. Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray och J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*, 5, 39–44.
19. Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni och L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.
20. Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell och S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.
21. Klinefelter, G.R., N.L. Roberts och J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

22. Slott, V.L., J.D. Suarez och S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.
 23. Slott, V.L. och S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida, s. 319–333.
 24. Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick och M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.
 25. Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott och J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.
 26. OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 27. Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330–337.
 28. Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.
 29. Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, och R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.
 30. Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant och D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717–1726.
 31. Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets och T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.
 32. OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 33. Kapitel B.43 i denna bilaga, Test avseende neurotoxicitet på gnagare.
 34. OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 35. Kapitel B.53 i denna bilaga, Studie av utvecklingsneurotoxicitet.
 36. Kapitel B.54 i denna bilaga, Uterotrof bioassay på gnagare: Ett korttidsscreeningtest för östrogena egenskaper.
 37. Kapitel B.55 i denna bilaga, Hershbergers bioassay på råtta: Ett korttidsscreeningtest för (anti-)androgena egenskaper.
 38. OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 39. OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Kanada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 40. OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

Tillägg 1

Mått och observationer som ingår i testbatteriet för funktionsobservation (kohort 2A)

Bur & öppet område	Manipulation	Fysiologi
Hållning	Enkelt avlägsnande	Temperatur
Ofrivilliga kloniska & toniska rörelser	Lätthanterlighet	Kroppsvikt
Ögonlocksstängning	Muskeltonus	Pupillrespons
Piloerektion	Respons på närmande	Pupillstorlek
Salivavsöndring	Respons på beröring	
Tårbildning	Auditiv respons	
Läten	Respons på nyp i svans	
Ungvårdnad	Upprättningsrespons	
Gångrubbningar	Fotspridning vid landning	
Upphetsning	Frambenggreppstyrka	
Stereotypi	Bakbenggreppstyrka	
Bisartt beteende		
Fläckar		
Respiratoriska avvikelser		

Tillägg 2

DEFINITIONER

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

B.57 H295R STEROIDOGENESTEST

INLEDNING

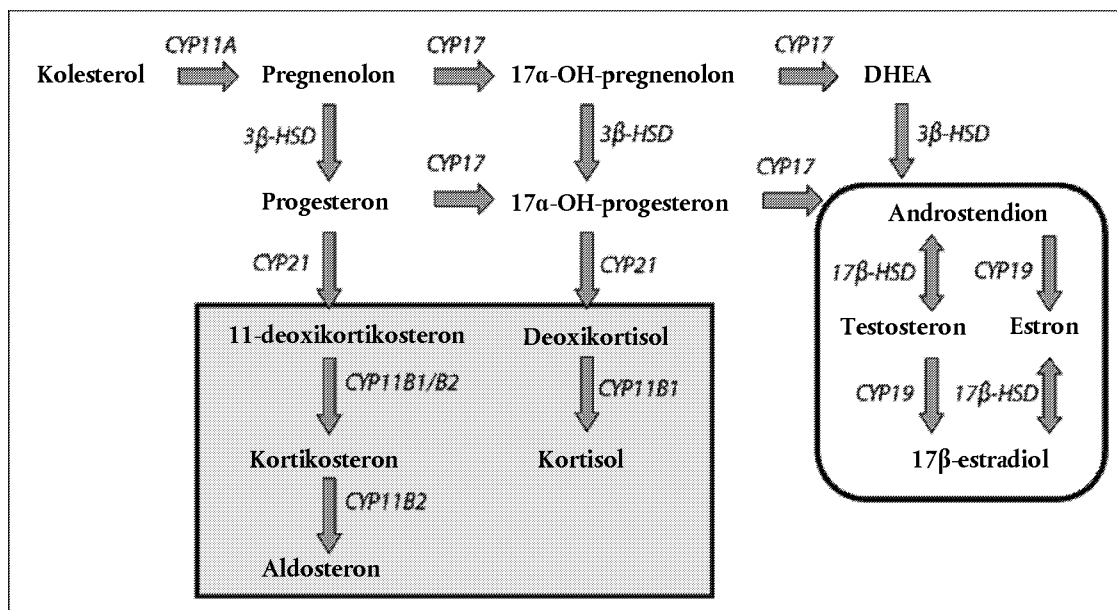
1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 456 (2011). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga, och ta fram nya, testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier från 2002 består av fem nivåer, varje nivå motsvarar en annan nivå av biologisk komplexitet (se hänvisning 1). H295R steroidogenestestet *in vitro* (H295R) som beskrivs i denna testmetod använder en mänsklig adreno-karcinomcellinje (NCI-H295R-celler) och utgör ett *in vitro*-test på nivå 2 som ger mekanistiska data och som ska användas för screenings- och prioriteringsändamål. Utvecklingen och standardiseringen av testet som en screening av kemiska effekter på steroidogenes, särskilt produktionen av 17 β -östradiol (E2) och testosteron (T), genomfördes i en flerstegsprocess. H295R-testet har optimerats och validerats (se hänvisning 2, 3, 4, 5).
2. Syftet med H295R-steroidogenestestet är att upptäcka kemikalier som påverkar produktionen av E2 och T. H295R-testet är avsedd att identifiera xenobiotika som har som sitt mål de endogena komponenter som utgör den intracellulära biokemiska väg som börjar med sekvensen av reaktioner från kolesterol till produktionen av E2 och/eller T. H295R-testet syftar inte till att identifiera kemikalier som påverkar steroidogenes beroende på effekter på hypotalamus-hypofys-gonad (HPG) axeln. Målet med testet är att ge svaret JA eller NEJ när det gäller en kemikalies potential att inducera eller hämma produktionen av T och E2, dock kan kvantitativa resultat erhållas i vissa fall (se punkterna 53 och 54). Testresultaten uttrycks som relativa förändringar i hormonproduktionen jämfört med kontroller med lösningsmedel. Testet syftar inte till att tillhandahålla specifik mekanistisk information om interaktionen av testkemikalien med det endokrina systemet. Forskning har bedrivits med användning av cellinjen för att identifiera effekter på specifika enzymer och intermediära hormoner såsom progesteron (se hänvisning 2).
3. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägget. Ett detaljerat protokoll, inklusive anvisningar om hur man bereder lösningar, odlar celler och utför olika aspekter av testet finns som tillägg I–III till OECD:s dokument *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (se hänvisning 4).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Fem olika enzymer som katalyserar sex olika reaktioner är involverade i biosyntesen för könssteroidhormon. Enzymatisk omvandling av kolesterol till pregnenolon med cytokrom P450 (CYP)-kolesterol-sidokedjeklyvningsenzym (CYP11A) utgör det första steget i en serie av biokemiska reaktioner som kulminerar i syntesen av steroidslutprodukter. Beroende på ordningsföljden för de följande två reaktionerna klyvs den steroidogena syntesvägen i två banor, Δ^5 -hydroxisteroidvägen och Δ^4 -ketosteroidvägen, som konvergerar i produktionen av androstendion (figur 1).
5. Androstendion omvandlas till testosteron (T) av 17 β -hydroxisteroid-dehydrogenas (17 β -HSD). Testosteron är både en intermediär och en hormonslutprodukt. Hos hanar kan T omvandlas till dihydrotestosteron (DHT) av 5 α -reduktas som finns i cellmembran, kärnhölje och endoplasmatiskt retikulum hos målvävnaderna för androgen verkan, såsom prostata och sädesblåsor. DHT är signifikant mer potent som en androgen än T och anses också vara en hormonslutprodukt. H295R-testet mäter inte DHT (se punkt 10).
6. Enzymet i den steroidogena vägen som omvandlar androgenkemikalier till östrogena kemikalier är aromatashämmare (CYP19). CYP19 konverterar T till 17 β -östradiol (E2) och androstendion till östron. E2 och T anses vara hormonslutprodukter för den steroidogena vägen.
7. Specifiteten hos CYP17:s lyasaktivitet skiljer sig för de intermediära substraten bland arterna. Hos människor gynnar enzymet substraten enligt Δ^5 -hydroxisteroid-reaktionsvägen (pregnenolon), medan substraten i Δ^4 -ketosteroidvägen (progesteron) gynnas hos råttor (se hänvisning 19). Sådana skillnader i CYP17:s lyasaktivitet kan förklara vissa artberoende skillnader i reaktioner på kemikalier som förändrar steroidogenes *in vivo* (se hänvisning 6). H295-celler har visat sig bäst reflektera mänskliga vuxna adrenalenzymuttryck och hormonproduktionsmönster (se hänvisning 20) men är kända för att uttrycka enzymer för både Δ^5 -hydroxisteroid- och Δ^4 -ketosteroidvägarna för androgensyntesen (se hänvisning 7, 11, 13, 15).

Figur 1

Steroidogen väg i H295R-celler



Anmärkning:

Enzymer är kursiverade, hormoner i fetstil och pilar anger riktningen för syntesen. Grå bakgrund indikerar kortikosteroidvägar/-produkter. Könsteroidvägar/-produkter är inringade. CYP = cytokrom P450, HSD = hydroxisteroiddehydrogenas, DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Den mänskliga H295R-adreno-karcinom-cellinjen är en användbar *in vitro*-modell för undersökning av effekter på steroidhormonsyntesen (se hänvisning 2, 7, 8, 9, 10). H295R-cellinjen uttrycker gener som kodar för alla viktiga enzymer för steroidogenes som nämns ovan (se hänvisning 11, 15) (figur 1). Detta är en unik egenskap, eftersom *in vivo*-uttryck hos dessa gener är vävnads- och utvecklingsstadiespecifika, och det är normalt ingen enskild vävnad eller enskilt utvecklingsstadium som uttrycker alla gener som är inblandade i steroidogenes (se hänvisning 2). H295R-celler har fysiologiska egenskaper som zonala odifferentierade humana fetala adrenala celler (se hänvisning 11). Cellerna representerar ett unikt *in vitro*-system genom att de har förmågan att producera alla de steroidhormoner som finns i den vuxna binjurebarken och könskörtlarna, vilket medger testning av effekter på såväl kortikosteroidsyntesen och produktionen av könsteroidhormoner såsom androgener och östrogener. Testet validerades dock endast för att detektera T och E2. Förändringar som registrerats av testsystemet i form av förändringar i produktionen av T och E2 kan vara resultatet av en mängd olika interaktioner av testkemikalier med steroidogena funktioner som uttrycks genom H295R-celler. Dessa inkluderar uttrycksmodulering, syntes eller funktion hos enzymer som är involverade i produktion, omvandling eller eliminering av steroidhormoner (se hänvisning 12, 13, 14). Hämmning av hormonproduktion kan bero på direkt konkurrerande bindning till ett enzym i syntesvägen, påverkan av samfaktorer som NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfat) och cAMP (cykliskt adenosinmonofosfat), och/eller ökning av steroidmetabolism eller undertryckande av genuttrycket hos vissa enzymer i steroidogenesens syntesväg. Även om inhibition kan vara en funktion av både direkta och indirekta processer involverade i hormonproduktionen, är induktion typiskt av en indirekt karaktär, genom att till exempel påverka samfaktorer såsom NADPH och cAMP (som i fallet med forskolin), minskande steroidmetabolism (se hänvisning 13) och eller uppreglering av ett steroidogent genuttryck.
9. H295R-testet har flera fördelar:
 - Den möjliggör detektion av både ökning och minskning i produktionen av både T och E2.
 - Den gör det möjligt att direkt bedöma de potentiella effekterna av en kemikalie på cellviabilitet/cytotoxicitet. Detta är en viktig egenskap eftersom den gör det möjligt att skilja mellan effekter som beror på cytotoxicitet och effekter som beror på direkt interaktion av kemikalier via steroidogena syntesvägar, vilket inte är möjligt i vävnadsexplantatsystem som består av flera celltyper med olika känslighet och funktioner.

- Den kräver inte användning av djur.
 - H295R-cellinjen finns kommersiellt tillgänglig.
10. De principiella begränsningarna för testet är följande:
- Dess metaboliska kapacitet är okänd men förmodligen ganska begränsad. Därför kommer kemikalier som metaboliskt måste aktiveras troligen att saknas i detta test.
 - Eftersom H295R-enzymen härrör från adrenal vävnad har de förmågan att producera glukokortikoider såväl som könshormoner och därför kan effekter på produktionen av glukokortikoider påverka nivåerna av T- och E2 som observeras i testet.
 - Den mäter inte DHT och förväntas därför inte detektera kemikalier som hämmar 5 α -reduktas, i de fallen kan Hershbergers bioassay (se hänvisning 16) användas.
 - H295R-testet detekterar inte kemikalier som stör steroidogenes genom att påverka hypotalamus-hypofysgonad-axeln (HPG) eftersom detta endast kan studeras hos intakta djur.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. Syftet med testet är att upptäcka kemikalier som påverkar T- och E2-produktionen. T är också en mellanprodukt i syntesvägen för E2. Testet kan detektera kemikalier som normalt hämmar eller inducerar enzymerna i steroidogenesens reaktionsväg.
12. Testet utförs vanligtvis under standardcellodlingsbetingelser i odlingsplattor med 24 hål. Alternativt kan andra plattstorlekar användas för att genomföra testet, men ympning och experimentella förhållanden bör justeras i enlighet därmed för att upprätthålla prestandakriteriernas efterlevnad.
13. Efter en aklimatiseringsperiod på 24 timmar på flerhålsplattor exponeras cellerna under 48 timmar för sju koncentrationer av testkemikalien i minst tre replikat. Lösningssmedel och en känd inhibitor och inducerare av hormonproduktion körs vid en bestämd koncentration som negativ och positiv kontroll. Vid slutet av exponeringsperioden avlägsnas mediet från varje hål. Cellviabiliteten i varje hål analyseras omedelbart efter att mediet tagits bort. Koncentrationer av hormoner i mediet kan mätas med många olika metoder inklusive kommersiellt tillgängliga hormonmätningssystem och/eller instrumentella metoder, som till exempel vätskekromatografimasspektrometri (LC-MS). Data uttrycks som X-faldig förändring i förhållande till lösningssmedelskontrollen och den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC). Om testet är negativt, rapporteras den högsta testade koncentrationen som nolleffektkoncentration (NOEC). Slutsatser om en kemikalies förmåga att påverka steroidogenes bör baseras på minst två oberoende testomgångar. Den första testomgången kan användas för att bestämma dos med efterföljande justering av koncentrationer för omgång 2 och 3, i tillämpliga fall, om löslighets- eller cytotoxicitetsproblem påträffas eller kemikalies aktivitet verkar vara i slutet av det testade koncentrationsintervallet.

ODLINGSFÖRFARANDE

Cellinje

14. NCI-H295R-celler finns kommersiellt tillgängliga från *American Type Culture Collections* (ATCC) efter ett undertecknande av ett avtal om materialöverföring (*Material Transfer Agreement*, MTA) ⁽¹⁾.

Inledning

15. På grund av förändringar i den E2-producerande förmågan hos cellerna med ökande ålder/passager (se hänvisning 2) bör cellerna odlas efter ett särskilt protokoll innan de används och antalet passager sedan cellerna tinades såväl som passagenumret då cellerna frystes och placerades i förvaring i flytande kväve ska noteras. Den första siffran anger det faktiska cellpassagenumret och den andra siffran beskriver passagenumret då cellerna frystes och placerades i lager. Till exempel ska celler som frysts efter passage fem och tinats och sedan delats tre gånger (4 passager om man räknar de nyligen upptinade cellerna som passage 1) efter att de odlats igen märkas passage 4.5. Ett exempel på ett numreringschema återfinns i tillägg I till valideringsrapporten (se hänvisning 4).
16. Lagringsmediet används som bas för det berikade mediet och frysmediet. Berikat medium är en nödvändig komponent för odling av celler. Frysmediet är särskilt utformat för att medge opåverkad frysning av celler för

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, Förenta staterna, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>

långtidsförvaring. Före användning bör Nu-serum (eller ett jämförbart serum med samma egenskaper som har visat sig ge data som uppfyller testprestanda- och kvalitetskontrollkraven (QC)), som är en beståndsdel i berikade medier, analyseras för bakgrundskoncentrationer av T och E2. Beredningen av dessa lösningar beskrivs i tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

17. Efter inledandet av en H295R-celldodling från en ursprunglig ATCC-sats, bör celler odlas i fem passager (dvs. cellerna delas 4 gånger). Passagefem-celler fryses sedan ner i flytande kväve för lagring. Innan cellerna fryses ner, körs ett urval av tidigare passagefyra-celler på en QC-platta (se punkt 36 och 37) för att kontrollera om den basala produktionen av hormoner och responsen på positiva kontrollkemikalier uppfyller kvalitetskontrollkriterierna för testet enligt definitionen i tabell 5.
18. H295R-celler måste odlas, frysas och lagras i flytande kväve för att säkerställa att det alltid finns celler för lämplig passage/ålder för odling och användning. Det maximala antalet passager efter att ha tagit en ny ⁽¹⁾ eller fryst ⁽²⁾ sats av celler till odling som är godtagbart för användning i H295R-testet bör ej överstiga 10. Till exempel skulle godtagbara passager för odlingar av celler från ett parti fryst vid passage 5 vara 4.5 till 10.5. För celler som startades från dessa frysta partier bör det förfarande som beskrivs i punkt 19 följas. Dessa celler ska odlas i minst fyra (4) ytterligare passager (passage 4.5) innan de används för testning.

Utgångsceller från fryst lager

19. Förfarandet för att starta celler från fryst lager ska användas när en ny sats av celler avlägsnas från lagringen i flytande kväve för odling och testning. Detaljer för detta förfarande framgår av tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4). Celler tas ut ur lagret med flytande kväve, tinas snabbt, placeras i berikat medium i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, återsuspenderas i berikat medium och överförs till en odlingskolv. Mediet bör bytas påföljande dag. H295R-cellerna odlas i en apparat för odling av bakterier vid 37 °C med 5 % CO₂ i luftatmosfär och mediet förnyas 2–3 gånger per vecka. När cellerna når ca 85–90 % konfluens bör de delas. Uppdelning av cellerna är nödvändig för att säkerställa cellernas hälsa och tillväxt och för att bibehålla celler till bioassayer. Cellerna sköljs tre gånger med fosfatbuffrad saltlösning (PBS, utan Ca²⁺ Mg²⁺) och släpps fria från odlingskolven genom tillsats av ett lämpligt lösgörande enzym, t.ex. trypsin i PBS (utan Ca²⁺ Mg²⁺). Omedelbart efter att cellerna har lossats från odlingskolven bör enzymaktiviteten stoppas med tillsats av berikat medium med ett förhållande på 3 gånger den volym som använts vid enzymbehandlingen. Cellerna placeras i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, supernatanten avlägsnas och pelleten av celler återsuspenderas i berikat medium. Lämplig mängd av celllösningen placeras i den nya odlingskolven. Mängden cellösning bör justeras så att cellerna är utväxta inom 5–7 dagar. Det rekommenderade sub-odlingsförhållandet är 1:3 till 1:4. Plattan ska märkas nogga. Cellerna är nu redo för att användas i testet och överskottet av celler bör frysas i flytande kväve, såsom beskrivs i punkt 20.

Frysning av H295R-celler (förberedning av celler för förvaring i flytande kväve)

20. För att förbereda H295R-celler för frysning, bör det ovan beskrivna förfarandet för att dela celler följas fram till steget för återsuspendering av pelleten av celler i botten av centrifugröret. Här återsuspenderas pelleten av celler i frysmediet. Lösningen överförs till ett kryorör, märkt på lämpligt sätt, och fryses vid – 80 °C under 24 timmar, varefter kryoröret överförs till flytande kväve för lagring. Detaljer för detta förfarande framgår av tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Utstrykning och förinkubation av celler för testning

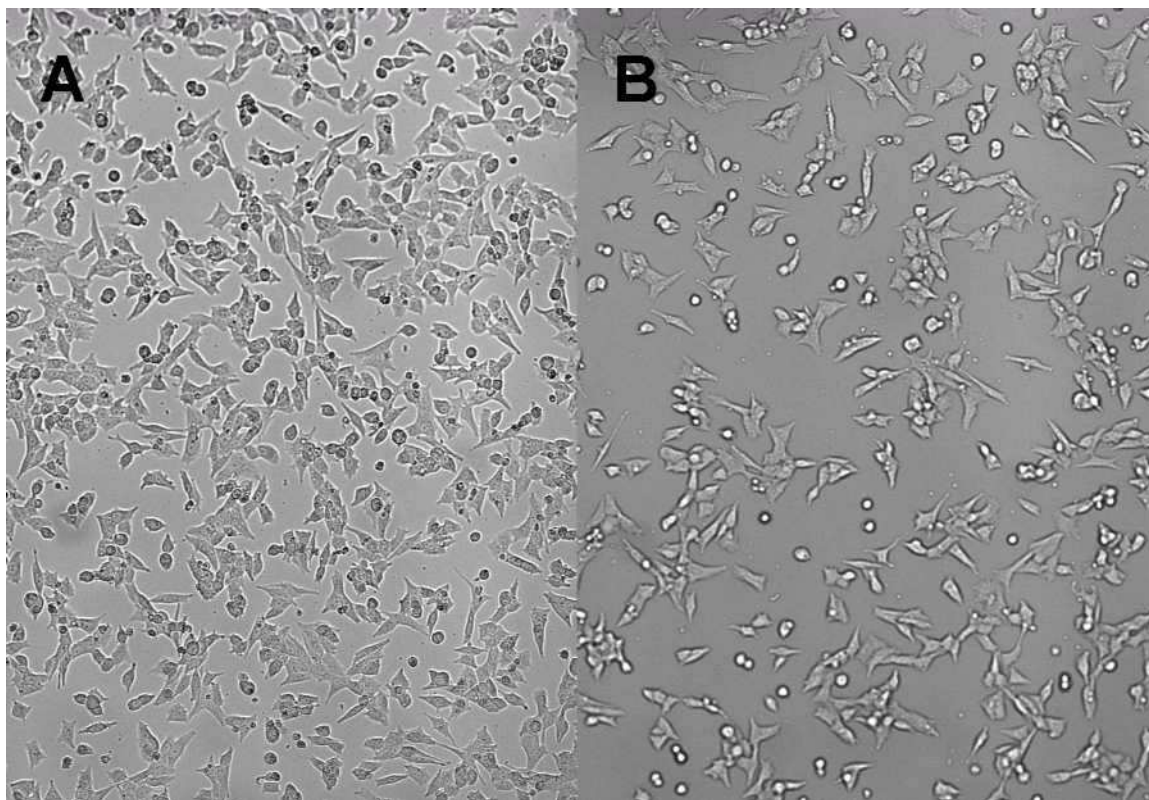
21. Antalet 24-hålsplattor, preparerade i enlighet med punkt 19, som kommer att behövas beror på hur många kemikalier som ska testas och cellernas konfluens i odlingskålarna. Som en allmän regel, tillhandahåller en odlingskolv (75 cm²) med 80–90 % konfluanta celler tillräckligt många celler för 1–1,5 (24-håls) platta med en måldensitet på 200 000 till 300 000 celler per ml medium som leder till cirka 50–60 % konfluens i hålen efter 24 timmar (figur 2). Detta är vanligtvis den optimala celldensiteten för hormonproduktion i testet. Vid högre densiteter förändras produktionsmönstret för T såväl som för E2. Innan man genomför testet för första gången, rekommenderas det att man testar olika ympningsdensiteter på mellan 200 000 och 300 000 celler per ml och densiteten som resulterar i 50–60 % konfluens i hålen efter 24 timmar väljs för ytterligare försök.

⁽¹⁾ Med ny sats avses en ny sats av celler erhållna från ATCC.

⁽²⁾ Med fryst sats avses celler som tidigare har odlats och sedan frysts vid ett annat laboratorium än ATCC.

Figur 2

Mikrofoto av H295R-celler med en odlingstäthet på 50 % i en 24-håls odlingsplatta efter 24 timmar som tagits vid kanten (A) och centrum (B) av ett hål



22. Mediet pipetteras från odlingskolven och cellerna sköljs 3 gånger med steril PBS (utan $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$). En enzymlösning (i PBS) tillsätts för att lösgöra cellerna från odlingskolven. När det gått en lämplig tid för cellerna att lossna bör enzymverkan stoppas med tillsats av berikat medium med ett förhållande på 3 gånger den volym som används för enzymbehandlingen. Cellerna placeras i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, supernatanten avlägsnas och pelleten av celler återsuspenderas i berikat medium. Celldensiteten beräknas med t.ex. en hemocytometer eller cellräknare. Cellösningen späds till önskad plattodlingsdensitet och blandas noggrant för att säkerställa en homogen celltäthet. Cellerna sprids ut med 1 ml cellösning per hål och plattorna och hålen märks. De ympade plattorna inkuberas vid 37 °C med 5 % CO_2 i luftatmosfär under 24 timmar för att tillåta cellerna att fästa i hålen.

KRAV PÅ KVALITETSKONTROLL

23. Det är viktigt att exakta volymer av lösningar och prover fördelas i hålen vid doseringen eftersom dessa volymer bestämmer de koncentrationer som används vid beräkningarna av testresultaten.
24. Före inledning av cellodling och eventuell efterföljande testning, bör varje laboratorium visa känsligheten hos sitt hormonmätssystem (punkterna 29–31).
25. Om antikroppsbaseade hormonmätningstester ska användas bör testkemikalierna, innan testningen inleds, analyseras för sin potential att störa det mätsystem som används för att kvantifiera T och E2 enligt beskrivningen i punkt 32.

26. DMSO är det rekommenderade lösningsmedlet för testet. Om ett alternativt lösningsmedel används, ska följande fastställas:
- Lösligheten av testkemikalien, forskolin och prokloraz i lösningsmedlet samt
 - cytotoxiciteten som en funktion av koncentrationen av lösningsmedlet.
- Det rekommenderas att den maximalt tillåtna koncentrationen lösningsmedel inte bör överskrida 10 gånger spädningen av den minst cytotoxiska koncentrationen av lösningsmedlet.
27. Innan testet genomförs för första gången, bör laboratoriet genomföra ett kvalificerande experiment som visar att laboratoriet kan bibehålla och uppnå lämpliga betingelser för cellodling och försök som krävs för kemisk provning enligt punkterna 33–35.
28. Vid inledning av testning med ett nytt parti, bör en kontrollodlingsplatta köras innan man använder en ny sats celler för att utvärdera prestandan hos de celler som beskrivs i punkterna 36 och 37.

Prestandan hos hormonmätssystemet

Metodens känslighet, noggrannhet, precision och korsreaktivitet med provmatris

29. Varje laboratorium kan själva välja ett hormonmätssystem för analysen av produktionen av T och E2 med H295R-celler så länge det uppfyller prestandakriterierna, inklusive kvantifieringsgränsen (LOQ). Nominellt är dessa 100 pg/ml för T och 10 pg/ml för E2, vilket grundas på de basala hormonnivåer som observerats i valideringsstudierna. Emellertid kan högre eller lägre nivåer vara lämpliga beroende på de basala hormonnivåer som uppnåtts i det utförande laboratoriet. Innan starten av QC-platta och provomgångar bör laboratoriet visa att hormontestet som ska användas kan mäta hormonhalter i berikat medium med tillräcklig noggrannhet och precision för att uppfylla de QC-kriterier som anges i tabellerna 1 och 5, genom att analysera berikat medium som spikats med en intern hormonkontroll. Berikat medium bör spikas med minst tre koncentrationer av varje hormon (t.ex. 100, 500 och 2 500 pg/ml T; 10, 50 och 250 pg/ml av E2, eller de lägsta möjliga koncentrationerna baserade på detektionsgränserna för det valda hormonmätssystemet kan användas för de lägsta spikkoncentrationerna av T och E2) och analyseras. Uppmätta hormonkoncentrationer för icke-extraherade prover ska ligga inom 30 % av de nominella koncentrationerna, och variationen mellan upprepade mätningar av samma prov bör inte överstiga 25 % (se även tabell 8 för ytterligare QC-kriterier). Om dessa QC-kriterier uppfylls antas det att den valda hormonmätningstestet är tillräckligt noggrann och exakt och inte korsreagerar med komponenter i mediet (provmatrisen) så att en betydande påverkan på testresultatet kan förväntas. I detta fall krävs ingen extraktion av proverna före hormonmätningarna.
30. I fall QC-kriterierna i tabell 1 och 8 inte uppfylls, kan en betydande matriseffekt förekomma och ett experiment med extraherat spikat medium bör genomföras. Ett exempel på ett extraktionsförfarande beskrivs i tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4). Mätningar av hormonkoncentrationer i de extraherade proverna bör göras med tre replikat (¹). Om man efter extraktionen kan påvisa att komponenterna i mediet inte stör hormondetekteringsmetoden såsom definieras av QC-kriterierna, bör alla ytterligare försök utföras med de extraherade proverna. Om QC-kriterierna inte kan uppfyllas efter extraktionen, är det använda hormonmätssystemet inte lämpligt för H295R-steroidogenestestet, och en alternativ hormondetekteringsmetod bör användas.

Standardkurva

31. Hormonkoncentrationerna i lösningskontrollerna (SC) bör ligga inom den linjära delen av standardkurvan. Företrädesvis bör SC-värdena ligga nära mitten av den linjära delen för att säkerställa att induktion och inhibering av hormonsyntesen kan mätas. Utspädningar av medium (eller extrakt) som ska mätas ska väljas i enlighet därmed. Det linjära förhållandet ska bestämmas med en lämplig statistisk metod.

Kemiskt interferenstest

32. Om antikroppsbaseade analyser såsom enzymkopplade immunadsorberande analyser (Elisa) och radioimmunanalyser (RIA) ska användas för att mäta hormoner, bör varje kemikalie testas för potentiell störning av det hormonmätssystem som ska användas före starten av den faktiska kemikaliestetningen (tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4]), eftersom vissa kemikalier kan störa dessa tester (se hänvisning 17). Om störningar inträffar som är ≥ 20 % av den basala hormonproduktionen av T och/eller E2 som bestämts genom hormonanalys, bör *Chemical Hormone Assay Interference*-testet (som beskrivs i tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4] avsnitt 5.0) utföras för alla utspädningar av testkemikaliestamlösning för att identifiera den tröskeldos vid

(¹) Anm.: Om extraktion krävs, utförs tre upprepade mätningar för varje extrakt. Varje prov extraheras endast en gång.

vilken betydande ($\geq 20\%$) interferens uppträder. Om interferensen är mindre än 30% kan resultaten korrigeras avseende interferens. Om interferensen överstiger 30% är data ogiltiga och ska kasseras vid dessa koncentrationer. Om betydande interferens av en testkemikalie med ett hormonmätssystem uppträder vid mer än en icke-cytotoxisk koncentration, bör ett annat hormonmätssystem användas. För att undvika störningar från förorenande kemikalier rekommenderas att hormoner extraheras från mediet med hjälp av ett lämpligt lösningsmedel, möjliga metoder finns i valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Tabell 1

Prestandakriterier för hormonmätssystem

Parameter	Kriterium
Mätmetodens känslighet	Kvantifieringsgränsen (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Hormonextraktionseffektivitet (endast när extraktion behövs)	De genomsnittliga återvinningsnivåerna (baserat på mätning i tre replikat) för de spikade mängderna av hormon bör inte avvika mer än 30% från den mängd som tillsatts
Kemisk interferens (endast antikropps-baserade system)	Ingen betydande ($\geq 30\%$ av basal hormonproduktion av respektive hormon) korsreaktivitet med någon av de hormoner som produceras av cellerna ska inträffa ^(b) ^(c)

^(a) Anm.: Metodens mätgränser baseras på de basala hormonproduktionsvärden som anges i tabell 5, och är prestationsbaserade. Om man kan uppnå ökad basal hormonproduktion så kan gränsen vara större.

^(b) Vissa T- och E2-antikroppar kan korsreagera med androstendion och östron, respektive, vid en större procentandel. I sådana fall är det inte möjligt att exakt fastställa effekterna på 17β -HSD. Däremot kan data fortfarande ge användbar information om effekterna på östrogen eller androgen produktion i allmänhet. I sådana fall bör data uttryckas som androgen/östrogen respons snarare än E2 och T.

^(c) Dessa inkluderar: kolesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxikortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α -pregnenolon, 17α -progesteron, deoxikortisol, kortisol, DHEA, androstendion, östron.

Kvalifikationsprövning av laboratorium

33. Före testning av okända kemikalier bör ett laboratorium visa att det kan uppnå och bibehålla de lämpliga cellodlings- och testbetingelser som krävs för ett framgångsrikt genomförande av testet, genom en kvalifikationsprövning av laboratoriet. Eftersom resultatet av ett test är direkt kopplat till den laboratoriepersonal som utför testet bör dessa förfaranden delvis upprepas om en förändring av laboratoriepersonal sker.
34. Kvalifikationsprövningen ska genomföras med samma förutsättningar som anges i punkterna 38 till 40 genom att exponera celler för 7 ökande koncentrationer av starka, måttliga och svaga inducerare och hämmare samt en negativ kemikalie (se tabell 2). Specifikt ska de kemikalier som testas inkludera den starka induceraren forskolin (CAS-nr 66575-29-9), den starka hämmaren prokloraz (CAS-nr 67747-09-5), den måttliga induceraren atrazin (CAS-nr 1912-24-9), den måttliga hämmaren aminoglutetimid (CAS-nr 125-84-8), den svaga induceraren (E2-produktion) och den svaga hämmaren (T-produktion) bisfenol A (CAS-nr 80-05-7) samt den negativa kemikalien mänskligt korioniskt gonadotropin (HCG) (CAS-nr 9002-61-3), såsom visas i tabell 2. Separata plattor odlas för alla kemikalier med användning av det format som visas i tabell 6. En QC-platta (tabell 4, punkterna 36–37) bör inkluderas vid varje daglig odling av kvalifikationskemikalierna.

Tabell 2

Kvalifikationskemikalier och exponeringskoncentrationer

Kvalifikationskemikalie	Testkoncentrationer [μ M]
Prokloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Kvalifikationskemikalie	Testkoncentrationer [μM]
Atrazin	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HKG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Lösningsmedel (DMSO)-kontroll (0), 1 μl DMSO/hål.

Exponering av H295R för kvalifikationskemikalier bör utföras på 24-håls odlingsplattor vid laboratoriets kvalifikationsprövning. Doseringen är i μM för samtliga testkemikaliedoser. Doserna ska administreras i DMSO med 0,1 % v/v per hål. Alla testkoncentrationer bör testas i tre hål (tabell 6). Separata plattor odlas för varje kemikalie. En QC-platta inkluderas för varje daglig omgång.

35. Cellviabilitets- och hormonanalys genomförs i enlighet med punkterna 42 till 46. Tröskelvärdet (lägsta koncentration med observerad effekt, LOEC) och klassificeringsbeslut bör redovisas och jämföras med värdena i tabell 3. Uppgifterna anses godtagbara om de uppfyller LOEC och klassificeringsbeslut i tabell 3.

Tabell 3

Tröskelvärden (LOEC) och klassificeringsbeslut avseende kvalifikationskemikalier

	CAS-nr	LOEC [μM]		Klassificeringsbeslut	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (inhibition)	+ (inhibition)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (induktion)	+ (induktion)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induktion)	+ (induktion)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibition)	+ (inhibition)
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibition)	+ (induktion)
HKG	9002-61-3	inte tillämpligt	inte tillämpligt	Negativ	Negativ

^(a) +, positiv

inte tillämpligt : inte tillämpligt eftersom inga ändringar inträffar efter exponering av icke-cytotoxiska koncentrationer för negativ kontroll.

Kvalitetskontrollplatta

36. Kvalitetskontrollplattan (QC) används för att kontrollera prestanda hos H295R-celler under standardodlingsbetingelser, och för att upprätta en historisk databas för hormonkoncentrationer i lösningsmedelskontroller, positiva och negativa kontroller, samt andra QC-mått över tiden.
- H295R-cellprestandan bör bedömas med hjälp av en QC-platta för varje nytt ATCC-parti eller efter användningen av ett tidigare fryst lager av celler för första gången, om inte laboratoriets kvalifikationsprövning (punkterna 32–34) har genomförts med denna sats av celler.
 - En QC-platta ger en fullständig bedömning av de testförhållanden (t.ex. cellviabilitet, lösningsmedelskontroller, negativa och positiva kontroller, samt variation mellan och inom tester) när man testar kemikalier och bör ingå i varje testomgång.
37. QC-provningen ska utföras på en 24-hålsplatta och följer samma förfaranden som för inkubation, dosering, cellviabilitet/cytotoxicitet, hormonextraktion och hormonanalys som beskrivs i punkterna 38 till 46 för testning av kemikalier. QC-plattan innehåller blankämnen, lösningsmedelskontroller och två koncentrationer av en känd

inducerare (forskolin, 1 µM, 10 µM) och hämmare (prokloraz, 0,1 µM, 1 µM) av E2- och T-syntes. Dessutom används MeOH i vissa hål som en positiv kontroll för viabilitets-/cytotoxicitetstestet. En detaljerad beskrivning av plattans utformning ges i tabell 4. De kriterier som ska uppfyllas för QC-plattan anges i tabell 5. Den minsta basala hormonproduktionen för T och E2 ska uppfyllas i både lösningsmedelskontrollen och blankhålen.

Tabell 4

Kvalitetskontrollplattans utformning för att testa prestandan hos oexponerade H295R-celler och celler som utsätts för kända hämmare (PRO = prokloraz) och stimulatorer (FOR = forskolin) av E2- och T-produktion. Efter avslutning av exponeringsexperimentet och avlägsnande av mediet, tillsätts en 70 % metanollösning i samtliga MeOH-hål för att fungera som en positiv kontroll för cytotoxicitet (se cytotoxicitetstest i tillägg III till valideringsrapporten [hänvisning 4])

	1	2	3	4	5	6
A	Blank ^(a)	Blank ^(a)	Blank ^(a)	Blank ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Blank ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Blank ^(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

^(a) Celler i blankhål får endast medium (dvs. inget lösningsmedel).

^(b) Metanol (MeOH) tillsätts efter att exponeringen har avslutats och mediet avlägsnas från dessa hål.

^(c) DMSO-lösningsmedelskontroll (1 µl/hål).

Tabell 5

Prestandakriterier för kvalitetskontrollplatta

	T	E2
Basalproduktion av hormonet i lösningsmedelskontrollen (SC)	≥ 5 gånger LOQ	≥ 2,5 gånger LOQ
Induktion (10 µM forskolin)	≥ 1,5 gånger SC	≥ 7,5 gånger SC
Inhibition (1µM prokloraz)	≤ 0,5 gånger SC	≤ 0,5 gånger SC

KEMISKT EXPONERINGSFÖRFARANDE

38. De förinkuberade cellerna ska avlägsnas från inkubatorn (punkt 21) och kontrolleras i mikroskop för att säkerställa att de är i gott skick (fastsättning, morfologi) före doseringen.
39. Cellerna placeras i ett biosäkerhetsskåp och det berikade mediet avlägsnas och ersätts med ett nytt berikat medium (1 ml/hål). DMSO är det lösningsmedel som föredras för denna testmetod. Men om det finns skäl att använda andra lösningsmedel bör den vetenskapliga grunden beskrivas. Cellerna exponeras för testkemikalien genom att 1 µl av lämplig stamlösning tillsätts DMSO (se tillägg II till valideringsrapporten [hänvisning 4]) per 1 ml berikat medium (hålvolum). Detta resulterar i en slutlig koncentration av 0,1 % DMSO i hålen. För att säkerställa adekvat

blandning föredras i allmänhet att den lämpliga stamlösningen av testkemikalien i DMSO blandas med berikat medium för erhållande av den önskade slutkoncentrationen för varje dos, och blandningen tillsätts varje hål omedelbart efter borttagandet av gammalt medium. Om detta alternativ används bör koncentrationen av DMSO (0,1 %) vara oförändrat för alla hål. De hål som innehåller de största två koncentrationerna bedöms visuellt, avseende bildning av fällningar eller grumlighet som en indikation på ofullständig löslighet av testkemikalien, med hjälp av ett stereomikroskop. Om sådana tillstånd (grumlighet, fällningsformationer) observeras, granskas också de hål som innehåller de närmaste lägre koncentrationerna (och så vidare) och koncentrationer som inte helt löser sig undantas från vidare utvärdering och analys. Plattan återförs till inkubatorn vid 37 °C med 5 % CO₂ i luftatmosfär under 48 timmar. Testkemikalieplattans utformning visas i tabell 6. Block 1–7 visar placering av ökande doser av testkemikalien.

Tabell 6

Doseringsschema för exponeringen av H295R-celler för att testa kemikalier i en 24-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Block 4	Block 4	Block 4
B	Block 1	Block 1	Block 1	Block 5	Block 5	Block 5
C	Block 2	Block 2	Block 2	Block 6	Block 6	Block 6
D	Block 3	Block 3	Block 3	Block 7	Block 7	Block 7

40. Efter 48 timmar tas exponeringsplattorna ut ur inkubatorn och varje hål kontrolleras i mikroskop avseende celltillstånd (fastsättning, morfologi, grad av konfluens) och tecken på cytotoxicitet. Mediet från varje hål delas i två lika stora mängder (cirka 490 µl vardera) och överförs till två separata rör märkta på lämpligt sätt (dvs. en aliquot för att ge ett extraproov för varje hål). För att förhindra cellerna från att torka ut, tas mediet bort en rad eller kolumn i taget och ersätts med mediet för cellviabilitets-/cytotoxicitetstestet. Om cellviabilitet/cytotoxicitet inte ska mätas direkt tillsätts 200 µl PBS med Ca²⁺ och Mg²⁺ till varje hål. Mediet fryses vid – 80 °C tills vidare bearbetning för analys av hormonkoncentrationer (se punkterna 44–46). Medan T och E2 i medium som lagras vid – 80 °C i allmänhet är stabila i minst 3 månader bör hormonstabiliteten under lagringen dokumenteras på varje laboratorium.
41. Omedelbart efter avlägsnande av mediet bestäms cellviabilitet/cytotoxicitet för varje exponeringsplatta.

Cellviabilitetsbestämning

42. Ett valfritt cellviabilitets-/cytotoxicitetstest kan användas för att bestämma den testkemikaliens potentiella effekt på cellernas livskraft. Testet bör kunna ge ett sant mått på andelen livsdugliga celler i ett hål eller det bör visas att det är direkt jämförbart med (en linjär funktion av) Live/Dead®-testet (se tillägg III till valideringsrapporten [hänvisning 4]). Ett alternativt test som har visat sig fungera lika bra är MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid]-testet (se hänvisning 18). Bedömningen av cellviabiliteten med hjälp av ovanstående metoder är ett relativt mått som inte nödvändigtvis uppvisar linjära samband med det totala antalet celler i ett hål. Därför bör en subjektiv parallell visuell bedömning av varje hål genomföras av analytikern och digitala bilder av lösningsmedelskontroller och de två högsta icke-cytotoxiska koncentrationerna ska tas och arkiveras för att senare kunna bedöma sann celltäthet om det skulle krävas. Om det genom visuell inspektion eller om det framgår av viabilitets-/cytotoxicitetstestet att det tycks finnas en ökning av antalet celler måste den eventuella ökningen verifieras. Om en ökning av cellantalet verifieras bör detta anges i testrapporten. Cellernas livsduglighet uttrycks i förhållande till den genomsnittliga responsen i lösningsmedelskontroller, som anses vara 100 % viabla celler och beräknas som lämpliga för det cellviabilitets-/cytotoxicitetstest som används. För MTT-testet kan följande formel användas:

% viabla celler = (respons i hål – genomsnittlig respons i MeOH-behandlade [= 100 % döda] hål) ÷ (genomsnittlig respons i SC-hål – genomsnittlig respons i MeOH-behandlade [= 100 % döda] hål)

43. Hål med viabilitet lägre än 80 %, i förhållande till den genomsnittliga viabiliteten i SC (= 100 % viabilitet), bör inte ingå i den slutliga dataanalysen. Inhibering av steroidogenes som uppträder i närvaro av nästan 20 % cytotoxicitet bör utvärderas noggrant för att säkerställa att cytotoxiciteten inte är orsaken till inhibitionen.

Hormonanalys

44. Varje laboratorium kan använda ett valfritt hormonmätssystem för analysen av T och E2. Restalikvoter av medium från varje behandlingsgrupp kan användas för att bereda spädningar, för att hålla koncentrationen inom den linjära delen av standardkurvan. Som anges i punkt 29, bör varje laboratorium påvisa överensstämmelsen mellan sitt hormonmätssystem (t.ex. Elisa, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) och QC-kriterierna genom att analysera berikat medium spikat med en intern hormonkontroll innan QC-omgångarna eller testningen av kemikalierna genomförs. För att säkerställa att komponenterna i testsystemet inte stör mätningen av hormoner kan hormonerna behöva extraheras från mediet innan de mäts (se punkt 30 för de omständigheter under vilka en extraktion krävs eller ej). Det rekommenderas att man utför extraktion enligt förfarandena i tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).
45. Om ett kommersiellt testkit används för att mäta hormonproduktionen bör hormonanalysen utföras enligt de manualer som tillhandahålls av testkitttillverkaren. De flesta tillverkare har ett unikt förfarande för hur hormonanalyserna ska genomföras. Spädning av prover behöver anpassas så att förväntade hormonkoncentrationer för lösningsmedelskontroller ligger inom mitten i det linjära området för standardkurvan för det enskilda testet (tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4]). Värden utanför den linjära delen av standardkurvan bör avvisas.
46. Slutliga hormonkoncentrationer beräknas enligt följande:

Exempel:

Extraherat:	450 µl medium
Beredd i:	250 µl testbuffert
Utspädning i test:	1:10 (för att hålla provet inom det linjära området för standardkurvan)
Hormonkoncentration i test:	150 pg/ml (redan justerad till koncentration per ml prov som testas)
Återvinning:	89 %
Slutlig hormonkoncentration =	(Hormonkoncentration (per ml) ÷ återvinning) (spädningsfaktor)
Slutlig hormonkoncentration =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Val av testkoncentrationer

47. Minst två oberoende omgångar av testet ska genomföras. Om det inte finns förhandsinformation, t.ex. om löslighetsgränser eller cytotoxicitet, som kan ligga till grund för valet av testkoncentrationer, rekommenderas att testkoncentrationerna för den inledande omgången fördelas med $\log_{10}$ -intervaller med 10^{-3} M som den högsta koncentrationen. Om kemikalien är löslig och inte är cytotoxisk vid någon av de testade koncentrationerna och

den första omgången var negativ för alla koncentrationer, ska detta bekräftas i ytterligare en omgång med samma betingelser som i den första omgången (tabell 7). Om resultaten från den första omgången är *tvetydiga* (dvs. den X-faldiga förändringen är statistiskt signifikant från SC vid endast en koncentration) eller *positiva* (dvs. den X-faldiga förändringen för två eller flera intilliggande koncentrationer är statistiskt säkerställd), ska testet upprepas enligt tabell 7 genom förfining av de valda testkoncentrationerna. Testkoncentrationerna i omgång två och tre (i förekommande fall) ska justeras på grundval av resultaten från den inledande omgången, och intervallet ska inkludera de koncentrationer som gav en effekt varvid en 1/2-log koncentrationsfördelning används (t.ex. om den ursprungliga omgången på 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 – 1 000 µM resulterade i induktioner vid 1 och 10 µM, bör de koncentrationer som testas i den andra omgången vara 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 – 100 µM), såvida inte lägre koncentrationer måste användas för att fastställa ett LOEC-värde. I det senare fallet bör åtminstone fem koncentrationer under den lägsta testade koncentrationen i den första omgången ingå i den andra omgången, med användning av en 1/2-logskala. Om den andra omgången inte bekräftar den första omgången (dvs. statistisk signifikans inträffar inte vid den tidigare positivt testade koncentrationen ± 1 koncentrationsökning), ska ett tredje försök utföras under de ursprungliga testbetingelserna. Tvetydiga resultat i den första omgången betraktas som negativa om den observerade effekten inte kunde bekräftas i någon av de två efterföljande omgångarna. Tvetydiga resultat betraktas som positiva responser (effekt) när svaret kan bekräftas i ytterligare minst en omgång med en koncentrationsökning inom ± 1 (se avsnitt 55 beträffande datatolkning).

Tabell 7

Beslutsmatris för möjliga utfallsscenarioer

Omgång 1	Omgång 2		Omgång 3		Beslut	
Scenario	Beslut	Scenario	Beslut	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekräfta ^(a)	Negativ	Stoppa			X
Negativ	Bekräfta ^(a)	Positiv	Förfina ^(b)	Negativ		X
Tvetydig ^(c)	Förfina ^(b)	Negativ	Bekräfta ^(a)	Negativ		X
Tvetydig ^(c)	Förfina ^(b)	Negativ	Bekräfta ^(a)	Positiv	X	
Tvetydig ^(c)	Förfina ^(b)	Positiv			X	
Positiv	Förfina ^(b)	Negativ	Bekräfta ^(a)	Positiv	X	
Negativ	Bekräfta ^(a)	Positiv	Förfina ^(b)	Positiv	X	
Positiv	Förfina ^(b)	Positiv	Stoppa		X	

^(a) Bekräfta tidigare omgång med användning av samma experimentella upplägg.

^(b) Ny testomgång med 1/2-log koncentrationsindelning (med ett intervall som inkluderar den koncentration som testades signifikant annorlunda i föregående experiment).

^(c) X-faldig förändring vid en koncentration är statistiskt signifikant annorlunda jämfört med SC.

Kvalitetskontroll av testplattan

48. Förutom att uppfylla kriterierna för QC-plattan bör andra kvalitetskriterier som gäller för acceptabel variation mellan likadana hål, replikatexperiment, linjäritet och känslighet hos hormonmätssystem, variation mellan replikata hormonmätningar för samma prov samt procentuella utbyte av hormontoppar efter extraktion av medium (om tillämpligt, se punkt 30 om extraktionskrav) uppfyllas, och de anges i tabell 8. Data bör falla inom acceptabla gränser som definierats för varje parameter som ska beaktas för vidare utvärdering. Om dessa kriterier inte uppfylls, ska det på kalkylbladet noteras att QC-kriterierna inte uppfylldes för provet i fråga och provet ska analyseras på nytt eller tas bort från datamängden.

Tabell 8

Acceptabla områden och/eller variationer (%) för H295R-testplattans parametrar

(LOQ: kvantifieringsgränsen för hormonmätssystemet. CV: Variationskoefficient. SC: Lösningssmedelskontroll. DPM: Sönderfall per minut)

	Jämförelse mellan	T	E2
Basal hormonproduktion i SC	X-faldig högre än LOQ	≥ 5-faldig	≥ 2,5-faldig
Exponeringsexperiment – inom plattans CV för SC (replikathål)	Absoluta koncentrationer	≤ 30 %	≤ 30 %
Exponeringsexperiment – inom plattans CV för SC (replikathål)	X-faldig förändring	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonmätssystem – känslighet	Detekterbar X-faldig minskning i förhållande till SC	≥ 5-faldig	≥ 2,5-faldig
Hormonmätssystem – replikata mätningar CV för SC ^(a)	Absoluta koncentrationer	≤ 25 %	≤ 25 %
Mediumextraktion – återvinning av intern 3H-standard (om tillämpligt)	DPM	≥ 65 % nominell	

^(a) Avser replikata mätningar för samma prov.

DATAANALYS OCH RAPPORTERING

Dataanalys

49. För att utvärdera den relativa ökningen/minskningen av en kemiskt förändrad hormonproduktion, bör resultaten normaliseras mot medelvärdet av SC-värdet för varje testplatta och resultaten bör uttryckas som förändringar i förhållande till SC för varje testplatta. All data är ska uttryckas som medelvärde ± 1 standardavvikelse (SD).
50. Endast hormondata från hål där cytotoxiciteten var mindre än 20 % bör ingå i dataanalysen. Relativa förändringar bör beräknas på följande sätt:

Relativ förändring = (hormonkoncentration i varje hål) ÷ (medelvärde för hormonkoncentration i alla lösningssmedelskontrollhål).

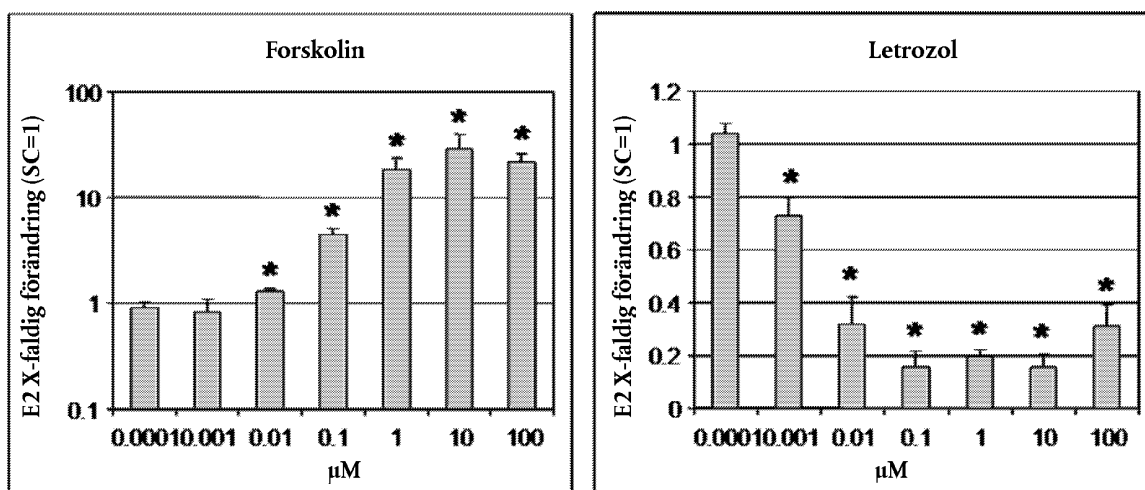
51. Om en visuell inspektion av hålet eller det viabilitets-/ cytotoxicitetstest som beskrivs i punkt 42 tyder på en ökning av antalet celler, måste den eventuella ökningen verifieras. Om en ökning av cellantalet verifieras bör detta anges i testrapporten.
52. Innan statistiska analyser genomförs, bör antaganden om normalitet och varianshomogenitet utvärderas. Normalitet bör utvärderas med hjälp av standardsannolikhetsplotter eller annan lämplig statistisk metod (t.ex. Shapiro-Wilks-test). Om data (X-faldig förändring) inte är normalfördelade bör man pröva att transformera data för att approximera en normalfördelning. Om data är normalfördelade, eller approximerar en normalfördelning, bör skillnaderna mellan kemiska koncentrationsgrupper och SC analyseras med hjälp av ett parametriskt test (t.ex. Dunnetts test) med *koncentration* som den oberoende och *respons* (X-faldig förändring) som den beroende variabeln. Om data inte är normalfördelade bör ett lämpligt icke-parametriskt test användas (t.ex. Kruskal Wallis, Steel's Many-one rank test). Skillnaderna anses signifikanta vid $p \leq 0,05$. Statistiska utvärderingar görs baserade på medelvärden för varje hål som representerar oberoende replikata datapunkter. Det förväntas att, på grund av det stora mellanrummet mellan doserna i den första omgången ($\log_{10}$ -skala), det i många fall inte kommer att vara möjligt att beskriva tydliga koncentration-respons-samband där de två största doserna kommer att vara i den linjära delen av sigmoidkurvan. Därför kommer, för den första omgången eller andra datauppsättningar där detta inträffar (t.ex. där ingen maximal effekt kan uppskattas), fast rörlig statistik av typ I enligt ovan att tillämpas.

53. Om fler än två datapunkter ligger på den linjära delen av kurvan och där maximal verkningsgrad kan beräknas – som förutses för några av de andra omgångarna som utförs med hjälp av ett semi-log avstånd mellan exponeringskoncentrationer – bör en probit-, logit- eller annan lämplig regressionsmodell användas för att beräkna effektiva koncentrationer (t.ex. EC50 och EC20).
54. Resultaten bör ges både i grafiskt format (stapeldiagram som representerar medelvärdet ± 1 SD) och i tabellform (LOEC/NOEC, effektriktning och styrka för maximal respons som är en del av dos-responsdelen för data) (se figur 3 för ett exempel). Databedömning anses endast giltig om den har baserats på minst två oberoende genomförda omgångar. Försök eller omgångar anses vara oberoende om de har genomförts på en annan dag med en ny uppsättning lösningar och kontroller. Det koncentrationsintervall som används i försök 2 och 3 (om det behövs) kan skräddarsys utifrån resultaten från försök 1 för att bättre definiera dos-responsområdet som innehåller LOEC (se punkt 47).

Figur 3

Exempel på presentation och utvärdering av data som erhållits under genomförandet av H295R-testet i grafisk form och i tabellform

(Asterisker indikerar statistiskt signifikanta skillnader jämfört med lösningsmedelskontrollen ($p < 0,05$). LOEC: lägsta koncentration med observerad effekt. Maxförändring: maximal styrka hos responsen observerad vid någon koncentration i förhållande till den genomsnittliga SC-responsen (= 1))



Kemikalie	LOEC	Maxförändring
Forskolin	0,01	0,15-faldig
Letrozol	0,001	29-faldig

Datatolkning

55. En testkemikalie bedöms vara positiv om den X-faldiga induktionen är statistiskt skild ($p \leq 0,05$) från lösningsmedelskontrollen vid två intilliggande koncentrationer i åtminstone två oberoende försök (tabell 7). En testkemikalie bedöms vara negativ efter två oberoende negativa försök, eller i tre försök, som består av två negativa försök och en tvetydig eller ett positivt försök. Om de data som genereras i tre oberoende försök inte uppfyller de beslutskriterier som anges i tabell 7, är de experimentella resultaten inte tolkningsbara. Resultat från koncentrationer som överstiger gränserna för löslighet eller vid cytotoxiska koncentrationer bör inte ingå i tolkningen av resultaten.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testanläggning

- Namn på anläggning och adress.
- Försöksledaren och annan personal samt deras studieansvar.
- Datum då studien började och slutade.

Testkemikalie, reagens och kontroller

- Identitet (namn/CAS-nr i förekommande fall), ursprung, partinummer, renhet, leverantör och karakterisering av testkemikalien, reagens och kontroller.
- Testkemikaliens fysikaliska form och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.
- Förvaringsförhållanden samt metoden och frekvensen för beredningen av testkemikalier, reagenser och kontroller.
- Testkemikaliens stabilitet.

Celler

- Ursprung och celltyper.
- Antalet cellpassager (cellpassageidentifikator) för celler som används i testet.
- Beskrivning av förfarandena för underhåll av cellkulturer.

Förundersökningskrav (om tillämpligt)

- Beskrivning av och resultat från den kemiska hormoninterferenstest.
- Beskrivning av och resultat från mätningar av hormonextraktionseffektivitet.
- Standard- och kalibreringskurvor för alla analystester som ska genomföras.
- Detektionsgränser för de valda analystesterna.

Testbetingelser

- Mediets sammansättning.
- Testkemikaliens koncentration.
- Celldensitet (beräknade eller uppmätta cellkoncentrationer vid 24 timmar och 48 timmar).
- Testkemikaliens löslighet (löslighetsgräns, om fastställd).
- Inkubationstid och villkor.

Testresultat

- Rådata för varje hål för kontroller och testkemikalier – varje mätresultat från replikat i form av de ursprungliga uppgifterna från det instrument som används för att mäta hormonproduktion (t.ex. OD, fluorescensenheter, DPM, etc.).
- Validering av normalitet eller beskrivning av datatransformation.
- Responsmedelvärde ± 1 SD för varje hål som mäts.
- Cytotoxicitetsdata (testkoncentrationer som orsakade cytotoxicitet).
- Bekräftelse på att QC-kraven uppfylldes.
- Relativ förändring jämfört med lösningsmedelskontroll korrigerad för cytotoxicitet.
- Ett stapeldiagram som visar relativ (X-faldig förändring) vid varje koncentration, SD och statistisk signifikans som anges i punkt 49–54.

Tolkning av data

- Tillämpa datatolkningsförfarandet på resultaten och diskutera iakttagelser.

Diskussion

- Finns det några indikationer i studien beträffande möjligheten att T/E2-data kan påverkas av indirekta effekter på glukö- och mineral-kortikosteroidbindande vägar?

Slutsatser

LITTERATUR

1. OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, se tillägg 2 till kapitel B.54 i denna bilaga.
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 steroidogenesis 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. Finns på: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
5. 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. Finns på: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
6. Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, finns på: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvts/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf
7. Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. och 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.
8. Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. och 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.
9. Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. och 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.
10. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. och Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137–1148.
11. 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. och 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.
12. He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. och 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.
13. 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. och 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.
14. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. och Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137–1148.
15. Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. och Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731–737.
16. Kapitel B.55 i denna bilaga: Hershbergers bioassay på råttor: Ett korttidsscreeningstest för (anti)androgena egenskaper.
17. Shapiro, R. och Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222–231.
18. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.

-
19. 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.
 20. 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.
-

Tillägg

DEFINITIONER

Konfluens: avser täckningen eller spridningen för att cellerna tillåts över eller under hela odlingsmediet.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

CV: avser variationskoefficienten, och definieras som kvoten mellan standardavvikelsen för en distribution till sitt aritmetiska medelvärde.

CYP: står för cytokrom P450 monooxygenaser, en familj av gener och enzymer som framställs från de som är involverade i katalysering av ett stort antal biokemiska reaktioner, inklusive syntes och metabolism av steroidhormoner.

DPM: sönderfall per minut. Det är antalet atomer i en given mängd radioaktivt material som upptäcks ha avklingat under en minut.

E2: 17 β -östradiol, det viktigaste östroget hos däggdjur.

H295R-celler: humana adreno-karcinomceller som har fysiologiska egenskaper som zonalt odifferentierade humana fetala adrenala celler och som uttrycker alla enzymer i steroidogenesens syntesväg. De är tillgängliga genom ATCC.

Frysmedium: används för att frysa och lagra frysta celler. Det består av lagermedium samt BD NuSerum och dimetylsulfoxid.

Linjärt område: det område inom den standardkurva för ett hormonmätssystem där resultaten är proportionella mot koncentrationen av analyten i provet.

LOQ: står för *kvantifieringsgränsen*, och är den lägsta mängd av en kemikalie som kan särskiljas från avsaknaden av denna kemikalie (ett tomt värde) inom ett angivet konfidensintervall. Vid tillämpning av denna metod definieras LOQ typiskt av tillverkaren av testsystemen, om inte annat anges.

LOEC: lägsta koncentration med observerad effekt, den lägsta koncentrationsnivå vid vilken testsvaret är statistiskt skilt från det för lösningsmedelskontrollen.

NOEC: nolleffektkoncentrationen, som är den högsta koncentration som testats om testet inte ger ett positivt svar.

Passage: det antal gånger som cellerna uppdelas efter initiering av en kultur från fryst lager. Den inledande passagen som startades från det frysta lagret tilldelas nummer ett (1). Celler som delas 1 gång märks passage 2 etc.

PBS: Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning.

Kvalitetskontroll: förkortat QC, avser de mått som behövs för att säkerställa giltiga data.

Kvalitetskontrollplatta: en 24-hålsplatta innehållande två koncentrationer av de positiva och negativa kontrollerna för att övervaka prestandan hos en ny sats celler, eller för att tillhandahålla positiva kontroller för testet vid testning av kemikalier.

Omgång: ett oberoende experiment som kännetecknas av en ny uppsättning av lösningar och kontroller.

Lagermedium: basen för beredning av andra reagenser. Den består av en 1:1-blandning av Dulbecco's Modified Eagle's Medium och Ham's F-12 Nutrient mixture (DMEM/F12) i 15 mM HEPES-buffert utan fenolrött eller natriumbikarbonat. Natriumbikarbonat tillsätts som bufferten, se tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Berikat medium: består av lagermedium samt BD Nu-Serum och ITS+ premiummix, se tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Steroidogenes: den syntetiska reaktionsvägen som leder från kolesterol till de olika steroidhormonerna. Flera mellanprodukter i steroidsyntesvägen, såsom progesteron och testosteron, är viktiga hormoner i sig själva, men fungerar också som föregångare till hormoner senare i syntesvägen.

T: står för testosteron, en av de två viktigaste androgenerna hos däggdjur.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Testplatta: den platta på vilken H295R-celler exponeras för testkemikalien. Testplattor innehåller lösningsmedelskontrollen och testkemikalien vid sju koncentrationer i tre replikat.

Trypsin 1X: en utspädd lösning av enzymet trypsin, ett pankreatiskt serinproteas, som används för att lossa celler från en cellodlingsplatta, se tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

B.58 GENMUTATIONSTESTER I SOMATISKA CELLER OCH KÖNSCELLER HOS TRANSGENA GNAGARE**INLEDNING**

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 488 (2013). EU-testmetoder finns tillgängliga för ett brett spektrum av *in vitro*-mutationstester som kan detektera kromosom- och/eller genmutationer. Det finns testmetoder för *in vivo*-endpoints (dvs. kromosomförändringar och ej planerlig DNA-syntes) men dessa mäter inte genmutationer. Mutationstester med transgena gnagare (TGR) uppfyller behovet av praktiska och allmänt tillgängliga *in vivo*-tester avseende genmutationer.
2. TGR-mutationstesterna har granskats utförligt (se hänvisning 24, 33). De använder transgena råttor och möss som innehåller flera kopior av kromosomalt integrerad plasmid- eller fagskyttelvektorer. Transgenerna innehåller reportergener för påvisande av olika typer av mutationer inducerade *in vivo* av testkemikalier.
3. Mutationer som uppstår hos en gnagare bedöms genom återvinning av transgenen och analys av reportergenens fenotyp i en värd bakterie som saknar reportergenen. TGR-genmutationstester mäter mutationer som induceras i genetiskt neutrala gener återvunna från praktiskt taget alla vävnader hos gnagare. Dessa tester kringgår därför många av de befintliga begränsningarna i samband med studier av *in vivo*-genmutation i endogena gener (t.ex. begränsade vävnader som är lämpliga för analys, negativ/positiv selektion mot mutationer).
4. Den sammanvägda bedömningen tyder på att transgener svarar på mutagena ämnen på ett liknande sätt som endogena gener, särskilt när det gäller att upptäcka basparsubstitutioner, frameshift-mutationer och små deletioner och insertioner (se hänvisning 24).
5. De internationella seminarierna om genotoxicitetstestning (IWGT) har ställt sig bakom införandet av TGR-genmutationstester för *in vivo*-detektion av genmutationer, och har rekommenderat ett protokoll för deras genomförande (se hänvisning 15, 29). Denna testmetod baseras på dessa rekommendationer. Ytterligare analys som stöder användningen av detta protokoll finns i (se hänvisning 16).
6. I framtiden väntas det bli möjligt att kombinera ett TGR-genmutationstest med en toxikologisk studie med upprepad dosering (kapitel B.7 i denna bilaga). Men data som krävs för att säkerställa att känsligheten i TGR-genmutationstester inte påverkas av den kortare period (en dag) mellan administreringsperiodens slut och provtagningstiden som används i det toxikologiska testet med upprepad dosering, jämfört med de tre dagar som används i TGR-genmutationstester. Data krävs också för att visa att prestandan hos analysen med upprepad dosering inte påverkas negativt av att använda en transgen gnagarstam snarare än traditionella gnagarstammar. När dessa uppgifter är tillgängliga kommer denna testmetod att uppdateras.
7. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägget.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

8. TGR-genmutationstester för vilka det finns tillräckliga data för att stödja användning i denna testmetod är: *lacZ* bakteriofag-mus (MutaTMMouse), *lacZ* plasmid-mus, *gpt*-delta (*gpt* och *Spi*)-mus och -råtta, *lacI*-mus och -råtta (Big Blue®), som utförs under standardbetingelser. Dessutom kan det positiva selektionstestet *cII* användas för att utvärdera mutationer i Big Blue® och MutaMouse-modeller. Mutagenes i TGR-modellerna bedöms normalt som mutantfrekvens om så krävs, dock kan molekyllär analys av mutationer ge ytterligare information (se punkt 24).
9. Dessa *in vivo*-genmutationstest på gnagare är särskilt relevanta för att fastställa mutagena risker, eftersom testernas responser är beroende av *in vivo*-metabolism, farmakokinetik, DNA-reparationsprocesser och DNA-translesions-syntes, även om dessa kan variera mellan olika arter, olika vävnader och olika typer av DNA-skador. Ett *in vivo*-test för genmutationer är användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt detekterat av ett *in vitro*-system, och för att följa upp resultaten från tester med andra *in vivo*-endpoints (se hänvisning 24). Förutom att vara kausalt förknippad med framkallandet av cancer, är genmutation en relevant endpoint för förutsägelsen av mutationsbaserade icke-cancerogena sjukdomar i somatiska vävnader (se hänvisning 12, 13) samt sjukdomar som överförs via könsceller.

10. Om det finns bevis för att testkemikalien eller en relevant metabolit inte kommer att nå några av de aktuella vävnaderna, är det inte lämpligt att utföra ett TGR-genmutationstest.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. I de tester som beskrivs i punkt 8 är målgenen av bakteriellt eller bakteriofagt ursprung, och metoden för återvinning av genomiskt DNA från gnagare är via införlivande av transgenen in i en λ bakteriofag- eller plasmid-skyttelvektor. Proceduren involverar extraktion av genomiskt DNA från gnagarvävnaden, *in vitro*-bearbetning av det genomiska DNA:t (dvs. packning av λ -vektorer eller ligering och elektroporering av plasmider för att återvinna skyttelvektorn) och efterföljande detektion av mutationer i bakterievärdar under lämpliga förhållanden. Testerna använder neutrala transgener som lätt kan återvinnas ur de flesta vävnader.
12. Det grundläggande TGR-genmutationsexperimentet innebär behandling av gnagare med en kemikalie under en tidsperiod. Kemikalien kan administreras på varje sätt som är lämpligt, inklusive genom implantation (t.ex. medicinteknisk provning). Den totala tiden under vilken ett djur doseras kallas administreringsperioden. Administration följs vanligen av en period före avlivning då kemikalien inte administreras och då oreparerade DNA-skador fixeras till stabila mutationer. I litteraturen har denna period omväxlande kallats för manifestationstid, fixeringstid eller uttryckstid, och slutet av denna period är provtagnings tiden (se hänvisning 15, 29). Då djuret har avlivats, isoleras genomiskt DNA från de berörda vävnaderna och renas.
13. Data för en enskild vävnad per djur från flera packningar/ligeringar är vanligtvis aggregerade och mutantfrekvensen utvärderas generellt med hjälp av sammanlagt mellan 10^5 och 10^7 plackbildande eller kolonibildande enheter. Vid användning av positiva selektionsmetoder bestäms de totala plackbildande enheterna med en separat uppsättning icke-selektiva plattor.
14. Positiva selektionsmetoder har utvecklats för att underlätta påvisande av mutationer i både *gpt*-genen (*gpt*-deltamus och -råtta, *gpt*-fenotypen [se hänvisning 20, 22, 28]) och *lacZ*-genen (MutaTMMouse eller *lacZ*-plasmidmus [se hänvisning 3, 10, 11, 30]). *lacI*-genmutationer hos Big Blue®-djur påvisas däremot med en icke-selektiv metod som identifierar mutanter genom bildning av färgad (blå) plack. Positiva selektionsmetoder används också för att påvisa punktmutationer som uppstår i *cII*-genen hos λ -bakteriofagskyttelvektorn (Big Blue®-mus eller -råtta, och MutaTMMouse [se hänvisning 17]) och deletionsmutationer i λ *red*- och *gam*-generna (Spi-val i *gpt*-deltamus och --råtta [se hänvisning 21, 22, 28]). Mutantfrekvens beräknas genom att antalet plack/plasmider som innehåller mutationer i transgenen divideras med det totala antalet utvunna plack/plasmider från samma DNA-prov. I TGR-genmutationsstudier är mutantfrekvensen den rapporterade parametern. Dessutom kan en mutationsfrekvens bestämmas som den fraktion av celler som bär oberoende mutationer. Denna beräkning kräver korrigering för klonal expansion genom sekvensering av de utvunna mutanterna (se hänvisning 24).
15. De mutationer som bedöms i *lacI*-, *lacZ*-, *cII*- och *gpt*-punktmutationstesterna består främst av basparssubstitutioner, frameshift-mutationer och små insertioner/deletioner. Den relativa andelen av dessa mutationstyper bland spontana mutationer liknar den som ses i den endogena *HPRT*-genen. Stora deletioner påvisas endast med Spi-selektionsanalys och *lacZ*-plasmidtester (se hänvisning 24). Mutationer av intresse är *in vivo*-mutationer som uppstår hos mus eller råtta. *In vitro*- och *ex vivo*-mutationer, som kan uppstå under fag-/plasmidåtervinning, replikation eller reparation, är relativt sällsynta och kan i vissa system identifieras specifikt, eller uteslutas av systemet med bakterievärd/positiv selektion.

BESKRIVNING AV METODEN

Förberedelser

Val av djurart

16. En mängd olika transgena genmutationsdetektionsmodeller för möss är tillgängliga och dessa system har i större utsträckning än transgena råttmodeller. Om råttan är en mer lämplig modell än musen (t.ex. när man undersöker mekanismen för carcinogenes för en tumör som endast ses hos råttor, för att korrelera med en toxicitetsstudie för råtta eller om råttmetabolism är känd för att vara mer representativ för människans ämnesomsättning) bör man överväga att använda transgena råttmodeller.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Den ideala temperaturen i djurutrymmet är 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, målet är att upprätthålla en relativ luftfuktighet på 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med en daglig sekvens på 12 timmars ljus, följt av 12 timmars mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med fri tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras via fodret. Djur bör hållas i små grupper (högst fem) av samma kön, om inget aggressivt beteende kan förväntas. Djuren får hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

18. Friska, unga, sexuellt mogna vuxna djur (8–12 veckor gamla vid behandlingsstarten) väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras så att eventuella effekter beroende på deras placering blir så små som möjligt. Vid studiens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida $\pm$ 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

19. Fasta testkemikalier bör lösas upp eller suspenderas i lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationsexponering kan testkemikalier administreras som gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser*Lösningsmedel/vehikel*

20. Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalien. Om annat än välkända lösningsmedel/vehiklar används bör detta stödjas med referensdata som visar deras kompatibilitet. Det rekommenderas att i första hand använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar, om det är möjligt.

Positiva kontroller

21. Jämsides behandlade positiva kontrolldjur bör normalt användas. För laboratorier som har visat kompetens (se punkt 23) och rutinmässigt använder dessa analyser kan dock DNA från djur som i tidigare experiment behandlats som positiv kontroll ingå i varje studie för att bekräfta metodens framgång. Sådant DNA från tidigare experiment bör erhållas från samma art och vävnader av intresse, och bör förvaras på rätt sätt (se punkt 36). När jämsides behandlade positiva kontroller används, är det inte nödvändigt att administrera dem genom samma väg som testkemikalien, men de positiva kontrollerna bör vara kända för att framkalla mutationer i en eller flera vävnader genom testkemikalien. Doserna med de positiva kontrollkemikalierna bör väljas så att de ger svaga eller måttliga effekter som kritiskt bedömer resultaten och testets känslighet. Exempel på positiva kontrollkemikalier och vissa av deras målvävnader finns i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier och vissa av deras målvävnader

Positiv kontrollkemikalie och CAS-nr	Einecs-namn och Einecs-nr	Egenskaper	Mutationsmålvävnaden	
			Råtta	Mus
N-etyl-N-nitrosourea [CAS-nr 759-73-9]	N-etyl-N-nitrosourea [212-072-2]	Direktverkande mutagen	Lever, lunga	Benmärg, kolon, kolo-nepitel, tarm, lever, lunga, mjälte, njure, ovariala granulosa celler, hanliga könseller

Positiv kontrollkemikalie och CAS-nr	Einecs-namn och Einecs-nr	Egenskaper	Mutationsmålvävnaden	
			Råtta	Mus
Etylkarbammat (uretan) [CAS-nr 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, kräver metabolism men producerar bara svaga effekter		Benmärg, förmage, tunntarm, lever, lunga, mjälte
2,4-diaminotoluen [CAS-nr 95-80-7]	4-metyl-m-fenylendiamin [202-453-1]	Mutagen, kräver metabolism, även positiv i Spi-testet	Lever	Lever
Benso[a]pyren [CAS-nr 50-32-8]	Benso[def]krysen [200-028-5]	Mutagen, kräver metabolism	Lever, bukhinnet, nätt,	Benmärg, bröst, kolon, förmage, körtelmage, hjärta, lever, lunga, hanliga könsceller

Negativa kontroller

22. Negativa kontroller, behandlade med lösningsmedel eller endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningsstillfälle. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln, bör obehandlade kontroller också inkluderas för varje provtagningsstillfälle, för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

Kvalifikationsprövning av laboratorium

23. Laboratoriets kompetens att utföra dessa tester bör fastställas genom demonstration av förmågan att reproducera förväntade resultat från publicerade data (se hänvisning 24) för 1) mutantfrekvenser med positiva kontrollkemikalier (inklusive svaga responser) såsom de som anges i tabell 1, icke-mutagener, och vehikelkontroller samt 2) transgen återhämtning från genomiskt DNA (t.ex. packningseffektivitet).

Sekvensering av mutanter

24. För regleringstillämpningar är DNA-sekvensering av mutanter inte nödvändigt, i synnerhet där ett tydligt positivt eller negativt resultat erhålls. Dock kan sekvensdata vara användbara när hög interindividuell variation observeras. I dessa fall kan sekvensering användas för att utesluta möjligheten av jackpot eller klonala händelser, genom att identifiera andelen unika mutanter från en viss vävnad. Sekvensering av cirka 10 mutanter per vävnad per djur bör vara tillräckligt för att enkelt bestämma om klonala mutanter bidrar till mutantfrekvensen, sekvensering av så många som 25 mutanter kan vara nödvändig för att korrigera mutantfrekvensen matematiskt avseende klonalitet. Sekvensering av mutanter kan också övervägas när små ökningar i mutantfrekvens (dvs. som precis överskrider de obehandlade kontrollvärdena) upptäcks. Skillnader i mutantspektrum mellan de mutanta kolonierna från behandlade och obehandlade djur kan ge stöd för en mutagen effekt (se hänvisning 29). Dessutom kan mutationspektrum vara användbara för att utveckla hypoteser om mekanism. När sekvensering ska ingå som en del av studieprotokollet bör särskild försiktighet iakttas vid utformningen av sådana studier, särskilt med avseende på antal mutanter som sekvenseras per prov, för att uppnå tillräcklig effekt enligt den statistiska modell som används (se punkt 43).

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

25. Antalet djur per grupp bör förutbestämmas så att det är tillräckligt för att ge den statistiska effekt som krävs för att upptäcka åtminstone en fördubbling i mutationsfrekvensen. Gruppstorlekarna bör vara på minst fem djur, men om den statistiska effekten är otillräcklig bör antalet djur ökas efter behov. Handjur bör normalt användas. Det kan finnas fall där enbart test av honor är motiverat, t.ex. vid provning av humana kvinnospecifika läkemedel eller vid utredning av specifikt kvinnlig metabolism. Om det finns betydande skillnader mellan könen i fråga om toxicitet eller ämnesomsättning måste både hanar och honor användas.

Administreringsperiod

26. Baserat på observationer att mutationer ackumuleras för varje behandling krävs upprepad dosering med dagliga behandlingar under en period av 28 dagar. Detta anses allmänt acceptabelt, både för att producera en tillräcklig ansamling av mutationer av svaga mutagener och för att ge en tillräcklig exponeringstid för att upptäcka mutationer i långsamt tillväxande organ. Alternativa behandlingsregimer kan vara lämpliga för vissa utvärderingar, och dessa alternativa doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade i protokollet. Behandlingar bör inte vara kortare än den tid som krävs för fullständig induktion av alla relevanta metaboliserande enzymer, och kortare behandlingar kan göra det nödvändigt att ha flera olika provtagningstidpunkter som är lämpliga för organ med olika förökningshastigheter. I varje fall bör all tillgänglig information (t.ex. om allmän toxicitet eller metabolism och farmakokinetik) användas för att motivera ett protokoll, speciellt vid avvikelser från ovanstående standardrekommendationer. Även om det kan öka känsligheten bör behandlingstider längre än 8 veckor förklaras tydligt och motiveras, eftersom långa behandlingstider kan ge en påtaglig ökning i mutationsfrekvensen genom klonal expansion (se hänvisning 29).

Dosnivåer

27. Dosnivåerna bör baseras på resultaten från en dosfinnande studie som mäter allmän toxicitet och som genomförts med samma exponeringsväg, eller på resultaten från befintliga subakuta toxicitetsstudier. Icke-transgena djur av samma gnagarstam kan användas för bestämning av dosintervall. I huvudtestet, för att få dosresponsinformation, bör en fullständig undersökning inkludera en negativ kontrollgrupp (se punkt 22) och minst tre, lämpligt fördelade dosnivåer, utom när gränsdosen har använts (se punkt 28). Den högsta dosen bör vara maximal tolererbar dos (MTD). Den högsta dosen definieras som den dos som framkallar tecken på toxicitet på ett sådant sätt att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, förväntas leda till dödsfall. Kemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) och kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till låg eller ingen toxicitet.

Gräns för högsta dos vid testning

28. Om dosfinnande experiment eller befintliga data från besläktade gnagarstammar tyder på att en behandlingsregim med minst gränsdosen (se nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet förväntas baserat på data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer. För en administreringsperiod på 28 dagar (dvs. 28 dagliga behandlingar), ligger gränsdosen på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administreringsperioder på 14 dagar eller mindre, ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag (doseringsscheman som skiljer sig från 28 dagliga behandlingar bör vara vetenskapligt motiverade i protokollet, se punkt 26).

Administrering av doser

29. Testkemikalien administreras vanligtvis via sondmatning genom en magsond eller en lämplig intubationskanyl. I allmänhet bör den förväntade exponeringsvägen för människor beaktas vid utformningen av ett test. Därför kan andra exponeringsvägar (t.ex. dricksvatten, subkutant, intravenöst, topiskt, inhalation, intratrakealt, foder eller implantation) vara acceptabla där de kan motiveras. Intraperitoneal injektion rekommenderas inte eftersom den inte är en fysiologiskt relevant exponeringsväg för människor. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av större volymer än så bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

Provtagningstid

Somatiska celler

30. Provtagningstiden är en viktig variabel eftersom den bestäms av den period som krävs för att mutationer ska fixeras. Denna period är vävnadsspecifik och förefaller vara relaterad till cellpopulationens omsättningstid, där benmärg och tarm ger en snabb respons och levern en mycket långsammare. En lämplig kompromiss för mätning

av mutantfrekvenser på både snabbt och långsamt växande vävnader är dagliga behandlingar under 28 dagar i följd (såsom anges i punkt 26) och provtagning tre dagar efter den sista behandlingen, även om den maximala mutantfrekvensen kanske inte visar sig i långsamt växande vävnader under dessa förhållanden. Om långsamt växande vävnader är av särskild betydelse, kan en senare provtagningstid på 28 dagar efter 28 dagars administreringsperiod vara lämpligare (se hänvisning 16, 29). I sådana fall kan den senare provtagningstiden ersätta 3-dagars provtagningstiden och kräver vetenskaplig motivering.

Könsceller

31. TGR-tester är väl lämpade för studier av genmutationsinduktion i hanliga könsceller (se hänvisning 7, 8, 27), där tidpunkten och kinetiken för spermatogenes är väldefinierade (se hänvisning 27). De låga antalet ägg tillgängliga för analys, även efter superovulation, och det faktum att det inte finns någon DNA-syntes i oocyten, utesluter bestämning av mutationer i honliga könsceller genom transgentester (se hänvisning 31).
32. Provtagningstiderna för hanliga könsceller bör väljas så att alla exponerade celltyper under könsellsbildningen provtas och så att det stadium som provtagningen är inriktad på har fått tillräcklig exponering. Den tid det tar för könsceller att utvecklas från spermatogoniestamceller till mogna spermier som når sädesledare/cauda epididymis är ca 49 dagar för mus (se hänvisning 36) och ca 70 dagar för råtta (se hänvisning 34, 35). Efter en 28-dagars exponering med en efterföljande tredagars provtagningsperiod kommer de ackumulerade spermier som samlats in från sädesledaren/cauda epididymis (se hänvisning 7, 8) att utgöra en population av celler som exponerats under ungefär den senare hälften av spermatogenesen, vilket inkluderar den meiotiska och postmeiotiska perioden men inte den spermatogonieperioden eller stamcellsperioden. För att adekvat ta prov på celler i sädesledaren/cauda epididymis som var spermatogoniestamceller under exponeringsperioden krävs ytterligare en provtagningstid på minst 7 veckor (möss) eller 10 veckor (råtta), efter avslutad behandling.
33. Celler extruderade från sädeskanalerna efter en period på 28 + 3 dagar utgör en blandad population rik på alla utvecklingsstadier av könsceller (se hänvisning 7, 8). Provtagning av dessa celler för påvisande av genmutationer ger inte en lika exakt bedömning av de stadier där könsellsmutationer induceras som den som kan erhållas genom provtagning av spermier från sädesledaren/cauda epididymis (eftersom det finns flera olika könscellstyper i prov från sädeskanalerna och dessutom somatiska celler som kontaminerar denna cellpopulation). Emellertid ger provtagning av celler från sädeskanalerna utöver spermatozoer från sädesledaren/cauda epididymis efter endast ett 28 + 3 dagars provtagningschema viss täckning av celler som exponerats under flertalet faser i könsellsbildningen, vilket kan vara användbart för att upptäcka vissa könsellsmutagener.

Observationer

34. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt varje dag med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras med avseende på morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricks-vattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas innan slutförandet av testperioden (se hänvisning 23).

Vävnadsinsamling

35. Den logiska grunden för vävnadsinsamlingen bör definieras tydligt. Eftersom det är möjligt att studera mutationsinduktion i praktiskt taget alla vävnader, bör valet av vävnader som ska samlas in baseras på skälet för att genomföra studien och befintliga mutagenitets-, cancerogenitets- eller toxicitetsdata för den undersökta kemikalien. Viktiga faktorer för övervägande bör omfatta administreringsväg (baserat på sannolika mänskliga exponeringsvägar), den förutsagda vävnadsdistributionen och möjlig verkningsmekanism. I avsaknad av bakgrundsinformation, bör flera somatiska vävnader som kan vara av intresse samlas in. Dessa bör representera snabbväxande och långsamt växande vävnader och vävnader på kontaktstället. Dessutom bör spermier från sädesledare/cauda epididymis och växande könsceller från sädeskanalerna (som beskrivs i punkterna 32 och 33) samlas in och lagras om framtida analyser av mutagenitet i könsceller krävs. Organvikter bör inhämtas, och för större organ, bör samma område samlas in på alla djur.

Lagring av vävnader och DNA

36. Vävnader (eller vävnadshomogenat) bör förvaras vid eller under -70°C och ska användas för DNA-isolering inom 5 år. Isolerat DNA, förvarat i kylskåp vid 4°C i lämplig buffert, bör optimalt användas för mutationstest inom 1 år.

Val av vävnader för mutantanalys

37. Valet av vävnader bör baseras på överväganden såsom 1) administrationssättet eller första kontaktstället (t.ex. glandulär magsäck om administrationen är oral, lunga om administrationen sker via inandning eller hud om lokal applikation har använts) och 2) farmakokinetiska parametrar som observerats i allmäntoxicitetsstudier, vilket indikerar vävnadsdisposition, bibehållande eller ackumulation, eller målorgan för toxicitet. Om studier utförs för att följa upp cancerogenitetsstudier bör man överväga målvävnaderna för cancerogenitet. Valet av vävnader för analys bör maximera detekteringen av kemikalier som är direktverkande *in vitro*-mutagena, metaboliseras snabbt, mycket reaktiva eller absorberas dåligt, eller de för vilka målvävnaden bestäms genom administreringsvägen (se hänvisning 6).
38. I brist på bakgrundsinformation och med beaktande av kontaktstället på grund av administreringsvägen, bör levern och minst en snabbt delande vävnad (t.ex. glandulär magsäck, benmärg) utvärderas för mutagenitet. I de flesta fall kan de ovan angivna kraven uppnås genom analyser av två noggrant utvalda vävnader, men i vissa fall skulle tre eller fler behövas. Om det finns särskilda skäl att misstänka könsceffeffer, inklusive positiva effekter på somatiska celler, bör könsceffvävnaderna utvärderas avseende mutationer.

Mätmetoder

39. Standardlaboriemetoder eller publicerade metoder för detektion av mutanter finns tillgängliga för de rekommenderade transgena modellerna: *lacZ*-lambdabakteriofag och -plasmid (se hänvisning 30); *lacI*-mus (se hänvisning 2, 18); *gpt*-deltamus (se hänvisning 22); *gpt*-deltaråtta (se hänvisning 28); *cII* (se hänvisning 17). Ändringar bör motiveras och dokumenteras noga. Data från flera packningar kan läggas samman och användas för att uppnå ett tillräckligt antal plack eller kolonier. Emellertid kan behovet av ett stort antal packningsreaktioner för att uppnå det lämpliga antalet plack vara en indikation på dålig DNA-kvalitet. I sådana fall ska data beaktas med försiktighet eftersom den kan vara opålitlig. Det optimala antalet plack eller kolonier per DNA-prov styrs av den statistiska sannolikheten för att upptäcka tillräckligt många mutanter vid en viss spontan mutationsfrekvens. I allmänhet krävs minst 125 000 till 300 000 plack om den spontana mutationsfrekvens är i storleksordningen 3×10^{-5} (se hänvisning 15). För Big Blue® *lacI*-testet är det viktigt att visa att hela skalan av mutanta färgfenotyper kan detekteras genom införandet av lämpliga färgkontroller som behandlas jämsides med varje plattodling. Vävnaderna och de resulterande proverna (objekt) bör bearbetas och analyseras med hjälp av ett blockutförande, där objekt från vehikel-/lösningsmedelskontrollgruppen, den positiva kontrollgruppen (om den används) eller positivt kontroll-DNA (i förekommande fall) och varje behandlingsgrupp behandlas tillsammans.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultat

40. Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av djuret. Rapporten bör omfatta det totala antalet plackbildande enheter (pfu) eller kolonibildande enheter (cfu), antal mutanter samt mutantfrekvensen för varje vävnad från varje djur. Om det finns flera packnings-/aktiveringsreaktioner, bör antalet reaktioner per DNA-prov rapporteras. Även om data för varje enskild reaktion bör behållas behöver endast total pfu eller cfu rapporteras. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken enligt punkt 34 ska redovisas. Eventuella sekvenseringsresultat ska presenteras för varje mutant som analyseras, och resulterande mutationsfrekvensberäkningar för varje djur och vävnad ska visas.

Statistisk utvärdering och tolkning av resultaten

41. Det finns flera kriterier för att fastställa att ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av mutationsfrekvensen, eller en tydlig ökning av mutationsfrekvensen i enkeldosgruppen jämfört med lösningsmedels-/vehikelkontrollgruppen. Minst tre behandlade dosgrupper bör analyseras för att ge tillräckligt med uppgifter för dos-responsanalysen. Medan den biologiska relevansen för resultaten ska komma i främsta rummet kan lämpliga statistiska metoder användas som en hjälp vid utvärderingen av testresultatet (se hänvisning 4, 14, 15, 25, 26). Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten.

42. En testkemikalie för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier i någon vävnad anses vara icke-mutagen i detta test. För den biologiska betydelsen av ett negativt resultat ska vävnadsexponeringen bekräftas.
43. För DNA-sekvensanalyser, finns ett antal statistiska metoder tillgängliga för att hjälpa till med tolkningen av resultaten (se hänvisning 1, 5, 9, 19).
44. Prövning av om de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollområdet kan ge vägledning för att utvärdera responsens biologiska betydelse (se hänvisning 32).

Testrapport

45. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

- Identifieringsuppgifter och CAS-nr, om det är känt.
- Ursprung, partinummer om sådant finns.
- Fysikalisk form och renhetsgrad.
- Fysikalisk-kemiska egenskaper som är relevanta för genomförandet av studien.
- Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Lösningsmedel/vehikel:

- Motivering för val av vehikel.
- Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.
- Sammansättning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar.
- Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer).

Försöksdjur:

- Art/stam som används och motivering av valet.
- Djurens antal, ålder och kön.
- Ursprung, inhysning, foder etc.
- Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp.

Testbetingelser:

- Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).
- Data från dosfinnande studie.
- Motivering för valet av dosnivå.
- Uppgifter om testkemikalieberedningen.
- Uppgifter om administreringen av testkemikalien.
- Motivering för administrationssätt.
- Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.
- Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen, om negativa resultat erhålls.
- Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) beräknad genom testkemikaliens koncentration (ppm) i foder/dricksvatten samt konsumtionen, i tillämpliga fall.
- Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.
- Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

- Metod för avlivning.
- Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.
- Metoder för isolering av gnagares genomiska DNA, räddning av transgenen från genomiskt DNA och överföring av transgent DNA till en bakterievärd.
- Ursprungs- och partinummer för alla celler, satser och reagenser (i förekommande fall).
- Metoder för räkning av mutanter.
- Metoder för molekylär analys av mutanter och användning för att korrigera klonalitet och/eller beräkna mutationsfrekvenser, i tillämpliga fall.

Resultat:

- Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.
- Kropps- och organvikter vid avlivning.
- För varje vävnad/djur utvärderas antalet mutanter, antalet plack eller kolonier samt mutantfrekvensen.
- För varje vävnad/djurgrupp antalet packningsreaktioner per DNA-prov, totala antalet mutanter, medelvärdet för mutantfrekvensen, standardavvikelsen.
- Dos-responssamband, där detta är möjligt.
- För varje vävnad/djur, antalet oberoende mutanter och genomsnittmutationsfrekvensen där molekylär analys av mutationer utfördes.
- Data från jämsides behandlad och tidigare negativ kontroll med omfång, medelvärden och standardavvikelser.
- Data från jämsides behandlad positiv kontroll (eller data om DNA från tidigare positiv kontroll).
- Analytiska bestämningar, om det finns tillgängligt (t.ex. DNA-koncentrationer som används i packning, DNA-sekvenseringsdata);
- De statistiska analyser och metoder som använts.

Diskussion av resultaten

Slutsats

LITTERATUR

1. Adams, W.T. och T.R. Skopek (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391–396.
2. Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.
3. Boerrigter, M.E., M-E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen och J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659
4. Carr, G.J. och N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.
5. Carr, G.J. och N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405–413.
6. Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.
7. Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen och L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. Förenta staterna*, 92: 7485–7489.

8. Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper och J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2–3): 197–212.
9. Dunson, D.B. och K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.
10. Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook och J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', *Proc. Natl. Acad. Sci. Förenta staterna*, 86(20): 7971–7975.
11. Gossen, J.A. och J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
12. Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.
13. Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.
14. Fung, K.Y., G.R. Douglas och D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.
15. Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall och N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253–259.
16. Heddle, J.A., H.-J. Martus och G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.
17. Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya och S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. Förenta staterna*, 93(17): 9073–9078.
18. Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge och J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.
19. Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott och P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772–778.
20. Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda och T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.
21. Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda och T. Sofuni (1999), 'Spi – Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.
22. Nohmi, T., T. Suzuki och K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.
23. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
24. OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
25. Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant och K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.
26. Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft och N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation. Res.*, 388(2–3): 249–289.
27. Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas och C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598: 164–193.

28. Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa och T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71–78.
 29. Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki och N. Yajima (2003), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141–151.
 30. Vijg, J. och G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo' i: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, Förenta staterna, s. 391–410.
 31. Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster och G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1–2): 117–123.
 32. Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 33. OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 34. Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. *Physiol. Rev.* 52: 198–236.
 35. Robaire, B., Hinton, B.T. och Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., och P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, Nederländerna, s. 1071–1148.
 36. Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25–36.
-

Tillägg

DEFINITIONER

Administreringsperiod: Den totala perioden under vilken ett djur doseras.

Basparsubstitution: En typ av mutation som orsakar ersättning av en enda DNA-nukleotidbas med en annan DNA-nukleotidbas.

Kapsid: Proteinskalet som omger en viruspartikel.

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Klonal expansion: Produktionen av många celler från en enda (mutant) cell.

Kolonibildande enhet (CFU): Ett mått på livskraftigt bakterieantal.

Konkatamer: En lång sammanhängande biomolekyl som består av flera identiska kopior kopplade i serie.

Cos-ställe: Ett 12-nukleotid-segment av enkelsträngat DNA som finns i båda ändarna av den bakteriofaga lambdans dubbelsträngade genom.

Deletion: En mutation i vilken en eller flera (sekventiella) nukleotider går förlorade genom genomet.

Elektroporering: Tillämpning av elektriska pulser för att öka permeabiliteten hos cellmembran.

Endogen gen: En gen med ursprung hos genomet.

Extrabinomial variation: Större variationer i återkommande bedömningar av en populationsandel än vad som skulle förväntas om populationen hade en binomialfördelning.

Frameshift-mutation: En genetisk mutation som orsakas av insertioner eller deletioner av ett antal nukleotider som inte är jämnt delbara med tre inom en DNA-sekvens som kodar för ett protein/en peptid.

Insertion: Tillägg av en eller flera nukleotid-baspar i en DNA-sekvens.

Jackpot: Ett stort antal mutanter som uppstår genom klonal expansion av en enda mutation.

Stora deletioner: Deletioner i DNA av mer än flera kilobaser (som effektivt påvisas med Spi-selektionsanalys och lacZ-plasmidtester).

Ligering: Den kovalenta kopplingen mellan två ändar av DNA-molekyler med hjälp av DNA-ligas.

Mitogen: En kemikalie som stimulerar en cell att påbörja celldelning och utlöser mitos (dvs. celldelning).

Neutral gen: En gen som inte påverkas av positiva eller negativa selektionstryck.

Packning: Syntes av infektiösa fagpartiklar från en beredning av fagkapsid- och svansproteiner och en konkatamer av fag-DNA-molekyler. Används vanligen för att packa DNA klonad på en lambdavektor (åtskilda av cos-ställen) i infektiösa lambdapartiklar.

Packningseffektivitet: Den effektivitet med vilken packade bakteriofager återvinns i värd bakterier.

Plackbildande enhet (pfu): Ett mått på livskraftigt bakteriofagantal.

Punktmutation: En allmän term för en mutation som påverkar endast en liten sekvens av DNA inklusive små insertioner, deletioner och basparsubstitutioner.

Positiv selektion: En metod som endast tillåter mutanter att överleva.

Reporter gen: En gen vars muterade genprodukt lätt upptäcks.

Provtagningsstid: I slutet av den tidsperiod, före avlivningen, under vilken kemikalien inte administreras och under vilka obearbetade DNA-skador fixeras till stabila mutationer.

Skyttelvektor: En vektor som är konstruerad så att den kan breda ut sig i två olika värdarter, i enlighet därmed kan DNA införas i en skyttelvektor och testas eller manipuleras i två olika celltyper eller två olika organismer.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Transgen: Avser en organism vars genom har förändrats genom överföring av en gen eller gener från en annan art.”
