

添加物に関する食品健康影響評価指針と平成 8 年厚生省ガイドラインとの比較について

平成 30 年度食品健康影響評価技術研究「課題名：食品添加物のリスク評価手法に関する研究-乳児を対象とした評価手法及び毒性試験全般に関する最新の国際動向等を踏まえた提言-（課題番号 1805）」研究成果報告書において、次のことが示されており、添加物に関する食品健康影響評価指針と平成 8 年厚生省ガイドラインとの比較については、次ページ以降のとおり。

（研究内容・方法）

毒性試験方法の国際的な動向を参照しながら、科学的に適切な試験方法について考察し、「添加物に関する食品健康影響評価指針」への具体的な毒性試験方法の実施上の留意点を提示する。現在は、平成 8 年の厚生省指針を参照することとなっているが、20 年以上の歳月が経っていることから、OECD や ICH をはじめとする国際評価機関における各試験のガイドラインを確認し、現在の添加物指針で示している試験方法の妥当性を検証した。

（研究成果、考察及び今後の課題）

現在の添加物指針と OECD テストガイドラインを比較した結果、各試験の実施方法及び留意事項は OECD テストガイドラインに詳細に規定されており 13-24)、国際的な動向に合致するものであると考えられた。従って、現行の添加物指針のうち、「第 2 安全性に係る知見」における「体内動態試験」、「亜急性毒性試験及び慢性毒性試験」、「発がん性試験」、「1 年間反復投与毒性／発がん性併合試験」、「生殖毒性試験」、「出生前発生毒性試験」、「遺伝毒性試験」に関しては、それぞれ対応する OECD テストガイドラインを基本として各試験の実施方法並びに留意点をまとめることが妥当であると考えた。

1 体内動態試験

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p>
<p>1 体内動態試験 平成8年厚生省ガイドラインの「体内動態試験」に準 じるほか、以下のとおりとする。</p>	<p>体内動態試験 本試験は、被験物質を動物に投与してその吸収、分布、代謝及び排泄等体内動態に関する情報を得ることを目的とする。本試験の資料は毒性試験あるいはその結果の評価に資する。本試験は以下に述べる原則を参考にして行う。ただし、被験物質の性質に応じて適切な方法を考慮し、試験の目的に沿うように、適宜取舍選択、又は他の方法に置き換えても差し支えない。また、被験物質の体内動態に関する適切なデータが毒性試験から得られた場合には、これを利用して良い。</p>
<p>（1）被験物質には、添加物又はその同位元素標識体を使用する。なお、同位元素標識体にあつては、標識核種、標識位置等を明確にする。</p>	<p>1.被験物質 食品添加物、食品添加物として開発を意図する化合物又はそれらの同位元素標識体を使用する。なお、同位元素標識体にあつては、入手先、合成法、純度、標識核種、標識位置、比放射能、安定性等を明確にしておく。</p>
<p>（2）げっ歯類1種以上（通常、ラット）及び非げっ歯類1種以上（通常、イヌ）の合計2種以上で実施することが望ましい。</p>	<p>2.動物種、性 げっ歯類1種以上（通常、ラットが用いられる。）及び非げっ歯類1種以上（通常、イヌが用いられる。）の合計2種以上について実施することが望ましい。毒性試験との対応を考えて、適切な動物を選定する。なお、毒性試験に用いたもの同一の系統であることが望ましい。また、原則として雌雄の動物について検討する。必要に応じて、幼若動物についても検討する。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>3.動物数 動物数は、個体差、各観察・測定時点での必要検体数等を考慮して試験目的にあった適切な数とする。</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p>
<p>（3）投与経路は、原則として経口投与とする。単回投与及び反復投与を行った上、体内での吸収、分布、代謝及び排泄を推定する。なお、正確な吸収率算出等のため、必要に応じて、静脈内投与等による試験を補足する。</p>	<p>4.投与経路 原則として経口投与とする。なお、必要に応じて、静脈内投与等による試験を補足する。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>5.投与回数 単回投与及び反復投与を行う。反復投与の場合には、動物試験における被験物質の体内での定常状態、蓄積性等を推定し得るに足る投与間隔と期間で投与する。なお、反復投与については、他の毒性試験によって得られる体内動態に関する情報を利用してよい。</p> <p>6.用量段階 2段階以上とする。 2段階の用量設定に当たっては、反復投与毒性試験の最高用量及び何ら毒性影響が認められない用量（無毒性量；NOAEL）を目安とする。なお、低用量段階の設定に当たっては、可能ならば食物経由により摂取することが推定される量を考慮する。</p> <p>7.定量法 定量の方法及びその感度、精度、特異性等を明確にする。</p>
<p>（4）吸収、分布、代謝、排泄の各段階についての検討に当たっては、有効成分の血中濃度、尿・糞等への排泄量、各臓器内濃度の経時的変化、生体内代謝産物、各段階に影響する要因等についての試験資料が必要である。</p> <p>（5）吸収、分布、代謝及び排泄の結果（最高血漿中濃</p>	<p>8.検討項目 吸収、分布、代謝、排泄の各段階における検討項目は、通常、次のとおりである。なお、生物学的半減期（もしくはこれに準ずる定数）、クリアランス、分布容積及び生物学的利用能等の体内動態に関するパラメータを必要に応じて求めるとともに、体内動態の非線形性の有無を検討する。また、生体内で代謝等を受ける場合においては、代謝物についても検討する。</p> <p>(1)吸収</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
<p>度、各臓器内濃度の経時的変化、消失半減期等）から、毒性試験において標的となり得る臓器を推定する。その際、動物種差及び種特異性を考慮し、ヒトへの外挿可能性について考察する必要がある。</p>	<p>被験物質の吸収量及び吸収速度に関する情報を求める。これらは、血中濃度－時間曲線又は累積排泄量曲線等の解析から求められる。</p> <p>A. 血中濃度（血清中濃度、血漿中濃度又は全血中濃度）－時間曲線による方法</p> <p>吸収の程度と速度は、投与後の最高血中濃度（C max）、そのときの時間（T max）、血中濃度－時間曲線下面積（AUC）等を解析することにより求めることができる。</p> <p>また、これらのパラメータと、静脈内投与又はその他基準となる投与方法により得た同様のパラメータとを比較することにより、吸収の程度と速度をより明確に推定することができる。</p> <p>B. 累積排泄量曲線による方法</p> <p>尿、糞、胆汁、呼気等への排泄量を測定し、これらにより総排泄量を求める。これらは吸収量のよい尺度となることが多い。また、必要に応じて、吸収に影響する次の要因も検討する。</p> <p>(1)食物中での存在形態 (2)吸収部位 (3)消化管内での代謝、安定性 (4)食餌、消化管内 pH</p> <p>(2)分布</p> <p>被験物質の各種器官及び組織への分布、その経時的変化及び蓄積性に関する情報を求める。なお、体内動態を適切に反映する数時点での測定が望ましい。</p> <p>(1)器官内及び組織内濃度</p> <p>反復投与により高濃度分布又は蓄積のみられた器官及び組織、有害反応に関わる器官及び組織については、その存在形態についても検討することが望ましい。なお、全身オートラジオグラフィーは器官及び組織を摘出して測定</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
	<p>する方法では明らかにし難い部位への被験物質の分布に関する情報を得るためには有効な手段である。</p> <p>(2)胎盤、胎児、乳汁への移行性</p> <p>(3)血漿中の蛋白との結合、血球への分配</p> <p>(3)代謝 被験物質及びその主要な代謝物の同定と定量を行い、代謝経路及び代謝の程度と速度に関する情報を求める。 本試験は、通常、血液、尿、胆汁及び糞等の生体試料中の未変化体と代謝物を分離定量することによって行われる。代謝に関与する器官のスライス、ホモジネート、細胞懸濁液、細胞分画等の試料を用いた <i>in vitro</i> 試験は、<i>in vivo</i> 試験とともに代謝試験として有用である。</p> <p>(4)排泄 被験物質及びその主要な代謝物の排泄経路及び排泄の程度と速度に関する情報を求めるため、次の経路について検討する。</p> <p>(1)尿、糞、呼気 放射同位元素標識体を単回投与した場合には、投与後 7 日間又は投与した放射能の少なくとも 95% が回収されるまで測定することが望ましい。</p> <p>(2)胆汁 主要排泄経路が胆汁の場合には、腸肝循環についても検討する。</p> <p>(3)乳汁</p> <p>(4)必要に応じて、排泄に影響する次の要因も検討する。 ア) 腎機能 イ) 尿 pH 等</p>
<p>(6) 被験物質がラセミ体である場合には、それぞれの光学異性体の体内動態についても、毒性との関連にお</p>	<p>(5) 一般的留意点 以上の結果を総合し、また、類似の化学物質の既報文献とも比較考察する等</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成 8 年厚生省ガイドライン</p>
<p>いて必要があれば検討することが望ましい。</p> <p>（7）原則として、ヒトで特徴的に生じる代謝物の有無を検討し、必要に応じて、その毒性試験を行う。</p>	<p>幅広く検討する。なお、被験物質がラセミ体である場合には、毒性との関連において必要があれば、それぞれの光学異性体についても体内動態を検討することが望ましい。</p>
<p><u>【試験方法の例】</u></p> <p><u>・OECD テストガイドライン 417（トキシコキネティクス）</u></p>	

(4) 生殖毒性試験

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p>
<p>平成8年厚生省ガイドラインの「繁殖試験」に準じるほか、以下のとおりとする。</p>	<p>[4] 繁殖試験 本試験は、被験物質を二世代（第一世代（F₀）及び第二世代（F₁））にわたって投与し、発情、交尾、受胎、分娩、哺育等の生殖機能、離乳及び出産後の新生児の生育に及ぼす影響に関する情報を得ることを目的とする。また、本試験から、胎児の死亡及び奇形発生に関する予備的な情報が得られ、関連する試験を実施するにあたっての参考に資することができる。</p>
<p>① げっ歯類1種以上（通常、ラットが用いられる。）で実施する。雌雄の動物を原則として同数用いる。</p>	<p>1. 動物種 げっ歯類1種以上（通常、ラットが用いられる。）について実施する。雌雄の動物を原則として同数用いる。なお、使用する雌は未経産のものでなければならない。 種及び系統の選択に当たっては、産児数の少ない系統は避け、一般毒性試験あるいは繁殖試験に繁用されているものを選ぶ。 ラットについては、1週間以上の馴化期間を経た動物で雄は通常5～7週齢動物を、雌は通常8～10週齢の動物を用いる。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>2. 動物数 試験に用いる動物数は、ラットでは交配時点に1群あたり20組以上が得られるだけの数の雌雄とする。各群への動物の割り付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。 ラット以外の動物を用いる場合には、評価に耐える知見が得られると期待される動物数とする。</p>
<p>② 被験物質は経口により週7日投与することを原則とする。混餌投与又は飲水投与により行い、困難である場合は強制経口投与を行うことも差し支えない。</p>	<p>3. 投与経路 被験物質の投与経路は、経口投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、被験物質が飼料（飲水）中で不安定である場合、飼料（飲水）中からの被験物質の分析が困難である場合又は飼料（飲水）が忌避される場合</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成 8 年厚生省ガイドライン</p>
	<p>等混餌（飲水）投与が困難な場合には強制投与を行うことも差し支えない。 この場合、各動物に対する投与量は各週の個体体重に基づいて計算する。妊娠期の雌動物については、妊娠 0 日及び妊娠 6 日の体重に基づいて投与量を決定してもよい。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>4. 投与期間 被験物質の投与期間は、次のとおりである。 (1) 第一世代 (F₀) の雌動物 8～10 週齢から投与を開始し、2 週間以上投与した後、交配する。交配期間、妊娠期間及び哺育期間を通じ、出生児 (F₁) が離乳するまで連日投与する。 (2) 第一世代 (F₀) の雄動物 5～7 週齢から投与を開始し、8 週間以上投与した後、交配する。交配期間中も連日投与する。 (3) 第二世代 (F₁) 離乳時から投与を開始し、雌動物については次の出生児 (F₂) が離乳するまで、雄動物については交配が終了するまで投与する。</p>
<p>③ 用量段階は、対照群のほかに少なくとも 3 段階の投与群を設定する。設定した投与群についてはその根拠を明確にするとともに、その公比は適切な NOAEL が求められるものにする。</p> <p>④ 混餌投与の場合は、栄養障害が起こらないように配慮し、通常、飼料添加濃度 5% (W/W) を超える投与量で実施する必要はない。また、強制投与の場合には、通常、技術的に投与できる最大量又は 1,000 mg/kg 体</p>	<p>5. 用量段階と対照群 (1) 用量段階 対照群の他に少なくとも 3 段階の投与群を設ける。 用量段階は被験物質の毒性の全容を明らかにし、無毒性量 (NOAEL) を推定することができるように設定する。したがって、最高用量は母動物に体重増加抑制等何らかの毒性影響が認められるが死には至らしめない用量、最低用量は親動物及び子動物のいずれにも何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
<p>重で何ら毒性影響が認められないときはそれ以上の投与量で実施する必要はない。</p>	<p>なお、混餌投与の場合は、栄養障害が起こらないよう十分配慮し、通常、飼料添加濃度 5 % (W/W) を超える投与量で実施する必要はない。また、強制投与の場合には、通常、1000mg/kg 又は技術的に投与できる最大量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。</p> <p>(2) 対照群 対照群としては、被験物質の投与を行わない以外すべての点で被験物質投与群と同一条件の群を設ける。 被験物質の投与に媒体等を使用する場合には、投与媒体量の最も多い用量群と同量の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない媒体等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>6. 交配並びに第二世代 (F₁) の選抜</p> <p>(1) 第一世代 (F₀) 同じ用量群の雌雄を 1 対 1 で同居させ交尾が確認されるまで交配させる。同居期間は 3 週間を限度とする。 雌動物については、毎朝膣垢内の精子又は膣栓の検査を行い、交尾の有無を確認し、精子又は膣栓が認められた日を妊娠 0 日とする。</p> <p>(2) 第二世代 (F₁)</p> <p>(1) 同腹児数の調整 生後 4 日に、各同腹児が雄雌各 4 匹になるように、余分な新生児を無作為に取り除く。なお、1 腹当たり雌雄各 4 匹に調整することができない場合には、総数 8 匹 (例えば雄 5 匹と雌 3 匹) に調整すればよい。また、同腹児の匹数が 8 匹以下の場合には調整を行わない。</p> <p>(2) 交配用 (F₁) の選抜 F₁ の離乳時に、各群ともできるだけ多くの母動物から、雌雄各 20～25 匹 (通常は各母動物から雌雄各 1～2 匹) の F₁ を交配用として選抜する。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
	<p>(3) 交配 雌雄とも10～13週齢で同腹児の交配を避けて第一世代と同様に行う。</p>
該当する記載なし	<p>7. 観察及び検査 次の(1)～(5)の項目について実施する。 必要に応じて親動物、子動物の免疫系及び神経系に対する影響について検査を行う。</p> <p>(1) 一般状態 全試験動物(F₀, F₁, F₂)について、一般状態及び妊娠・分娩状態を毎日観察する。 F₀及び離乳後のF₁動物の一般状態としては、生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を観察する。妊娠・分娩状態としては、流産・早産、分娩遅延等を観察する。 新生児については、発達の身体的指標（耳介の展開、切歯の萌芽、体毛の出現、開眼、生殖器の発育等）及び発達の機能的指標（正向反射、運動性、聴覚性驚愕反応等）等を観察又は検査する。</p> <p>(2) 体重、摂餌（摂水）量 F₀動物及び交配用F₁動物について、定期的に体重、摂餌量及び摂水量を測定する。体重及び摂餌（摂水）量の測定の頻度は、通常、次のとおりである。 体重： 投与開始前及び投与開始後は少なくとも週1回。 摂餌（摂水）量： 投与開始前及び投与開始後は少なくとも週1回。</p> <p>(3) 妊娠、出産について 交尾動物数、妊娠動物数（及び妊娠させ得た雄数）、出産母体数及び離乳児数をもとにして、以下のパラメータを算出する。 交尾率 = (交尾動物数 / 交配に用いた動物数) × 100 妊娠率 = (妊娠動物数 / 交尾した雌動物数) × 100</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
	<p> $\text{出産率} = (\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$ $\text{離乳時の生存率} = (\text{離乳時の生存児数} / \text{生後 4 日に調整した児数}) \times 100$ </p> <p> 交尾が成立しなかった雌雄動物については、他の雄又は雌動物との再交配、発情周期及び精子形成の検査及び生殖器の組織学的検査等を行う。また、妊娠が成立しなかった場合の精子形成検査は、屠殺時における精子の数、運動性及び形態等に関して実施すること。 </p> <p> (4) 新生児 母動物ごとに、出産後できる限り早い時期に産児数、死児数、生存児数を数え外表異常の有無及び性別を調べる。 また、死児及び生後 4 日に屠殺した F₁ については、剖検を行う。生存児については、出産直後又は出産後の早い時期及び生後 4 日、7 日（任意）、14 日、21 日にそれぞれ匹数を調べ、体重を測定する。 </p> <p> (5) 剖検 (1) F₀ 動物及び交配に用いた F₁ 動物は、それぞれの出生児の離乳後速やかに、交配用に選抜されなかった F₁ 動物及び F₂ 動物は離乳後速やかに屠殺、剖検し、特に生殖器系の器官に注意を払いながら、肉眼的観察を行う。試験期間中の死亡例又は試験期間中に死に瀕した例は速やかに屠殺、剖検し、同様の観察を行う。 (2) 被験物質投与の影響と考えられる肉眼的異常が認められた器官及び組織については、病理組織学的検査を行う。また、反復投与毒性試験の結果を参考にする。 </p>
該当する記載なし	<p>8. 結果の解析</p> <p>(1) 得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p> <p>した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。</p> <p>（2）データの統計学的分析に際しては、離乳期までは各児を独立した標本として扱わず、1腹児を標本単位とすることが望ましい。</p> <p>（3）考察には、当該試験における親動物の生殖及び次世代の発生における無毒性量（NOAEL）についての見解を含めること。</p>
<p>⑤ 神経毒性又は免疫毒性が疑われた場合には、必要に応じ、OECDテストガイドライン、ICHガイドライン等に準拠した追加の試験を検討する。</p> <p><u>【試験方法の例】</u></p> <p>・OECDテストガイドライン416（二世世代生殖毒性試験）</p> <p>・OECDテストガイドライン443（拡張一世世代生殖毒性試験）</p>	

（5）出生前発生毒性試験

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p> <p>平成8年厚生省ガイドラインの「催奇形性試験」に準じて以下のとおり行うが、投与期間は、少なくとも着床日から出産予定日の前日までとし、妊娠動物に連日投与することとする。</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p> <p>[5] 催奇形性試験</p> <p>本試験は、妊娠中の母動物が被験物質に暴露された場合の胎児の発生、発育に対する影響、特に催奇形性に関する情報を得ることを目的とする¹⁾。</p> <p>注1) 本試験は、繁殖試験において交配に用いたF₁をその出生児（F_{2a}）の離乳後に屠殺せず、被験物質の投与を続けて、再度交配して得た胎児（F_{2b}）を用いて催奇形性の</p>
---	---

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
	<p>観察を行うことができる。ただし、催奇形性試験を繁殖試験に併合して行なう場合は、次の2条件を満たした場合とする。</p> <p>(1) 被験物の一般毒性や生体内動態等の知見からみて、催奇形性試験で最高投与量とすべき量による親動物と胎児への毒性影響が、繁殖試験の最高投与量による毒性影響に比べ、大きな差でないとみなされるとき。</p> <p>(2) 催奇形性試験と対比して、繁殖試験の長期投与による雌動物への影響（薬物代謝酵素の誘導、肝毒性等）が大きく変化していないとみなされるとき。</p>
<p>① げっ歯類1種以上（通常、ラットが用いられる。）及び非げっ歯類（通常、ウサギが用いられる。）の合計2種以上で実施する。</p>	<p>1. 動物種 げっ歯類1種以上（通常、ラットが用いられる。）及び非げっ歯類（通常、ウサギが用いられる。）の合計2種以上について実施する。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>2. 動物数 一群あたりの雌雄動物数は、データの意味のある解釈が十分できる数とする²⁾。</p> <p>注2) 極めて稀な場合を除いて、げっ歯類及びウサギについては、母体数が16～20匹の評価で、ある程度の整合性が試験間で得られている。母体数が16匹以下になると試験間の一貫性を欠き、20～24匹以上でも整合性及び精度が大きく向上することはない。</p>
<p>② 被験物質は経口により強制投与する。</p>	<p>3. 投与経路 被験物質の投与経路は、経口投与とし、強制投与する。1回で投与できない場合には、数回に分けて投与してもよいが、すべての投与を6時間以内に行うこと。各動物に対する投与量は、投与開始日の体重に基づいて計算する。血中濃度のデータや摂餌状況等より、一定の投与量が確保できることが確認できる場合には、飼料又は飲水に添加して投与を行っても差し支えない。</p>
<p>投与期間は、少なくとも着床日から出産予定日の前日までとし、妊娠動物に連日投与することとする。</p>	<p>4. 投与期間 被験物質の投与期間は、胎児の器官形成期を含む期間とし、連日投与を行う。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
<p>③ 用量段階は、対照群のほかに少なくとも 3 段階の投与群を設定する。設定した投与群についてはその根拠を明確にするとともに、その公比は適切な NOAEL が求められるものにする。</p>	<p>5. 用量段階及び対照群</p> <p>(1) 用量段階</p> <p>対照群の他に少なくとも 3 段階の投与群を設ける。</p> <p>用量段階は被験物質の毒性の全容を明らかにし、無毒性量（NOAEL）を推定することができるように設定する。したがって、最高用量は母動物に摂餌量の低下、体重増加の抑制等何らかの毒性影響が認められる量、最低用量は母動物、胎児のいずれにも何ら毒性影響が認められない用量とし、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。</p> <p>なお、混餌投与の場合には、栄養障害が起こらないよう十分配慮し、通常、飼料添加濃度 5 % (W/W) を超える投与量で実施する必要はない。また、強制投与の場合には、通常、1000mg/kg 又は技術的に投与できる最大量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。</p> <p>(2) 対照群</p> <p>対照群としては、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一条件の群を設ける。</p> <p>被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与媒体量の最も多い用量群と同量の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない媒体等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>6. 観察及び検査</p> <p>次の (1) ~ (2) の項目について実施する。</p> <p>(1) 一般状態、体重、摂餌（摂水）量</p> <p>母動物のすべてについて、一般状態及び妊娠状態を毎日観察し、体重、摂餌（摂水）量を定期的に測定する。</p> <p>一般状態としては、生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を観察する。妊娠状態としては、流産・早産等を観察する。</p> <p>なお、体重及び摂餌（摂水）量の測定の頻度は、通常、次のとおりである。</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成8年厚生省ガイドライン</p>
	<p>体重： 妊娠0日及び被験物質の投与開始後は、剖検まで毎日。 摂餌（摂水）量： 少なくとも、投与開始前1回、投与期間中2回、投与終了後1回。</p> <p>(2) 剖検</p> <p>(1) 母動物</p> <p>ア) 流産や早産の徴候を示した動物は速やかに屠殺し、子宮を摘出したのち、器官・組織の肉眼的観察を行うほか、必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行う。死亡動物及び死に瀕した動物についても、同様な検索を行う。摘出した子宮については、(2)の検査を行う。</p> <p>イ) 出産予定日の前日にすべての動物を屠殺し、子宮を摘出したのち、すべての器官・組織の肉眼的観察を行うほか、必要に応じ、器官の重量の測定、病理組織学的検査を行う。摘出した子宮については、(2)の検査を行う。</p> <p>(2) 胎児</p> <p>ア) 母動物より摘出した子宮を切開し、胚死亡、胎児死亡及び生存胎児数を検査する。死亡胎児については、死亡時期を推定する根拠となる所見をできる限り記録する。ラット及びウサギでは黄体数も検査する。胎児の性別判定を行い、胎児体重を個別に測定、記録し、各群雌雄の平均胎児体重を算出する。</p> <p>イ) 摘出したすべての胎児について外表異常の検査を行った後、ラットでは、同腹胎児の1/3～1/2について骨格異常の検査を、残りについて内臓異常の検査を行い、ウサギでは、すべての胎児について内臓異常、骨格異常の検査を行う。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>7. 結果の解析</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
	<p>(1) 得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。</p> <p>(2) データの統計学的分析に際しては、1腹児を標本単位とすることが望ましい。</p> <p>(3) 考察には、当該試験における親動物及び胎児に対する無毒性量(NOEL)についての見解を含めること。</p>
<p>【試験方法の例】 <u>・OECD テストガイドライン 414（出生前発生毒性試験）</u></p>	

(6) 遺伝毒性試験

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
<p>平成8年厚生省ガイドラインの「変異原性試験」に準 じるが、狭義の「変異原性」に限定されることなく、遺伝毒性全般に係る試験結果を基に評価を行うこととする。</p>	<p>[9] 変異原性試験 本試験は、被験物質がDNAに影響を与え、その結果、遺伝子突然変異あるいは染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるかどうかを明らかにすることを目的とする。</p>
<p>なお、標準的組合せ（「微生物を用いる復帰突然変異試験」、「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及び「げっ歯類を用いる小核試験」）を構成する試験のうち「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」については、マウスリンフォーマTK試験（MLA）又はin vitro小核試験をもって代えることができる。また、標準的組合</p>	<p>変異原性試験としては、「1. 微生物を用いる復帰変異試験」、「2. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」、及び「3. げっ歯類を用いる小核試験」を実施する。なお、上記の試験結果を補足する必要がある場合には、適切な変異原性試験を追加して実施する。以下に追加試験を例示する。</p> <p>(1) 遺伝子突然変異を指標とする試験 (1)哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
<p>せの結果を補足するための追加試験としては、<u>以下平成 8 年厚生省ガイドライン</u>に例示されているもののほか、単細胞ゲル電気泳動試験（コメット試験）、in vivo トランスジェニック動物突然変異試験が例として挙げられる。<u>これらの試験手順は OECD テストガイドラインなど国際的に認められたガイドラインに準拠するものとする。</u></p> <p><u>【遺伝子突然変異を指標とする試験】</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験</u> ・ <u>ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験</u> ・ <u>げっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験</u> <p><u>【染色体異常を指標とする試験】</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験</u> ・ <u>げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験</u> ・ <u>げっ歯類を用いる優性致死試験</u> <p><u>【DNA 損傷を指標とする試験】</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <u>微生物を用いる DNA 修復試験</u> ・ <u>哺乳類の細胞を用いる不定期 DNA 合成（UDS）試験</u> ・ <u>哺乳類の細胞を用いる姉妹染色分体交換（SCE）試験</u> <p>ただし、標準的組合せを構成する試験のいずれかにおいて、技術的な制約から実施できないような場合においては、その理由について科学的な根拠に基づき説明を受けた上で、国際的にもバリデーションが行われ妥当性が確認されている試験を代替試験として評価を行う。</p>	<p>(2) ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験 (3) げっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験</p> <p>(2) 染色体異常を指標とする試験 (1) げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験 (2) げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験 (3) げっ歯類を用いる優性致死試験</p> <p>(3) DNA 損傷を指標とする試験 (1) 微生物を用いる DNA 修復試験 (2) 哺乳類の細胞を用いる不定期 DNA 合成（UDS）試験 (3) 哺乳類の細胞を用いる姉妹染色分体交換（SCE）試験</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
<p><u>これらの試験手順は OECD テストガイドラインなど国際的に認められたガイドラインに準拠するものとする。</u></p>	<p>1. 微生物を用いる復帰突然変異試験</p> <p>微生物を用いる試験が不適切と考えられる場合（抗菌性の強い物質や哺乳類細胞に特異的に作用する物質等）には、微生物を用いる試験の代わりに、哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験を行うことが望ましい。</p> <p>（1）菌株</p> <p>ネズミチフス菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) の TA98, TA100, TA1535, {TA1537 あるいは TA97 あるいは TA97a} 及び {大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) の WP2 uvrA あるいは WP2 uvrA pKM101 あるいはネズミチフス菌 TA102} の 5 菌株を用いる。</p> <p>（2）用量段階</p> <p>5 段階以上の試験用量群を設定する。</p> <p>（3）最高用量</p> <p>予備試験を行って抗菌作用の有無を求め、被験物質の溶解性にかかわらず、明らかな抗菌性を示す用量を最高用量とする。</p> <p>抗菌作用あるいは変異原性が認められない場合は、5 mg / プレート又は最低析出用量を限度とする。</p> <p>（4）対照</p> <p>陰性対照は溶媒対照とする。陽性対照としては、既知変異原物質（S 9 mix）を必要としない物質と必要とする物質）を用いる。</p> <p>（5）代謝活性化</p> <p>S 9 mix を加えた試験を並行して行う。哺乳類（通常はラット）に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S 9 を調製する。この S 9 に補</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成 8 年厚生省ガイドライン</p>
	<p>酵素等を加えた S 9 mix を用いる。</p> <p>(6) 試験方法 プレインキュベーション法又はプレート法とする。 用量当り 2～3 枚のプレートを用いる。</p> <p>(7) 結果 復帰変異コロニー数の実測値とその平均値を表示する。</p>
<p><u>これらの試験手順は OECD テストガイドラインなど国際的に認められたガイドラインに準拠するものとする。</u></p>	<p>2. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験</p> <p>(1) 細胞 哺乳類の初代又は樹立培養細胞株を用いる。チャイニーズ・ハムスター培養細胞株（CHL、CHO等）やヒト培養リンパ球等が汎用されている。</p> <p>(2) 用量段階 3段階以上の試験用量群を設定する。</p> <p>(3) 最高用量 予備試験を行って細胞毒性の現れる用量を求める。被験物質の溶解性にかかわらず、単層培養細胞株では細胞増殖が50%以上抑制される用量、ヒト培養リンパ球では分裂頻度が50%以上抑制される用量を最高用量とする。 細胞毒性が認められない場合は、10 mM、5 mg / ml 又は最低析出用量のいずれか低い濃度を限度とする。</p> <p>(4) 対照 陰性対照は溶媒対照とする。陽性対照としては、既知染色体異常誘発物質（S 9 mix を必要としない物質と必要とする物質）を用いる。</p>

<p>現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）</p>	<p>平成 8 年厚生省ガイドライン</p>
	<p>(5) 代謝活性化 S 9 mix を加えた試験を並行して行う。哺乳類（通常はラット）に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S 9 を調製する。この S 9 に補酵素等を加えた S 9 mix を用いる。</p> <p>(6) 試験方法 S 9 mix 添加及び非添加の条件で、それぞれ被験物質を短時間（例えば 6 時間）処理し、適切な時期（およそ正常細胞周期の 1.5 倍）に染色体標本を作製する。結果が共に陰性の場合には S 9 mix 非添加で長時間の連続処理（正常細胞周期の 1.5 倍あるいは 3 倍）後、直ちに標本を作製する。 用量あたり 1～2 枚のプレートを用いる。用量あたり 200 個の分裂中期像について、染色体の構造異常の出現頻度を求める。構造異常は染色分体異常と染色体異常に分けて、その種類を明記する。 数的異常（倍数体や核内倍加等）が観察された場合には、その出現頻度を求める。</p> <p>(7) 結果 構造異常を持つ細胞の出現頻度あるいは細胞当りの構造異常頻度、並びに数的異常を持つ細胞の出現頻度を表示する。</p>
<p><u>これらの試験手順は OECD テストガイドラインなど国際的に認められたガイドラインに準拠するものとする。</u></p>	<p>3. げっ歯類を用いる小核試験 本試験をげっ歯類の骨髓細胞を用いる染色体異常試験で代行してもよい。</p> <p>(1) 動物 マウス又はラットを用いる。毒性に明かな性差がみられない場合には、一方のみの性で十分である。その場合には雄の使用が望ましい。</p> <p>(2) 動物数 1 群 5 匹以上とする。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成 8 年厚生省ガイドライン
	<p>(3) 投与経路 強制経口投与又は腹腔内投与とする。</p> <p>(4) 用量段階 3 段階以上の試験用量群を設定する。</p> <p>(5) 最高用量 最高用量は、幼若赤血球の減少等骨髄で何らかの細胞毒性の徴候が認められる用量、あるいは同じ投与プロトコルを用いて、それ以上の用量では致死が予想される用量とする。必要があれば予備試験を行う。毒性徴候が認められない場合は、2 g / k g を限度とする。</p> <p>(6) 対照群 陰性対照は溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質を用いる。</p> <p>(7) 投与回数 単回又は複数回投与とする。</p> <p>(8) 試験方法 骨髄又は末梢血の赤血球を用いる。単回投与の場合は被験物質投与後適切な時期に 2 回、複数回投与の場合は最終投与後適切な時期に 1 回、標本を作製する。必要があれば予備試験を行い、最も感受性の高い時期を選択する。 アクリジン・オレンジ蛍光染色法又はギムザ染色法を用いる。 個体当たり 2000 個の幼若赤血球について、小核を有する細胞の出現頻度を求める。同時に全赤血球に対する幼若赤血球の割合 (%) を求める。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
	<p>(9) 結果</p> <p>小核を有する幼若赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の割合(%)を個体別及び群別に表示する。</p>
<p>試験結果の判断手順は以下のとおり。</p> <p>① 「微生物を用いる復帰突然変異試験」で陽性である場合においては、遺伝子突然変異又はDNA損傷を指標とするin vivo試験（コメット試験、in vivoトランスジェニック動物突然変異試験等）の結果を十分考慮し、総合的に判断を行う。</p> <p>② 「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」で陽性であり、その作用が「げっ歯類を用いる小核試験」でも確認された場合においては、遺伝毒性は陽性であると判断することができる。</p> <p>③ 「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」で陽性であっても、高用量まで適切に行われた「げっ歯類を用いる小核試験」（標的臓器がばく露されている証明があることが望ましい。）で陰性であれば、遺伝毒性は陰性であると判断することができる。</p>	

(7) アレルゲン性試験

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
<p>平成8年厚生省ガイドラインの「抗原性試験」を参考とする。</p>	<p>[8] 抗原性試験</p> <p>化学物質によるアレルギーは時として人体に重篤な障害を惹起することがあり、食品添加物についても、その安全性を確保するために抗原性（アレルギー原性）を検討する必要がある。</p>

現行指針（研究成果報告書を踏まえた修正は見え消し）	平成8年厚生省ガイドライン
<p>化学物質を経口的に摂取した場合のアレルギー誘発能を予測する方法は十分に確立されておらず、特に、即時型アレルギーの誘発性を予測し得る方法は未確立であるが、添加物に係る知見、使用形態等を考慮した上で、専門家が適切と判断した感作及び惹起方法で試験を実施すべきである。当面は、少なくとも遅延型アレルギーを指標とするアレルギー性試験を実施する必要があるが、モルモットを用いた皮膚感作性試験（例：OECD テストガイドライン 406 のうちマキシミゼーション試験（GPMT））又はマウスを用いたリンパ節反応試験（例：OECD テストガイドライン 429（局所リンパ節試験（LLNA）））を利用することができる。</p>	<p>抗原性試験は、通常、次のような手法が用いられているが、化学物質を経口的に摂取した場合のアレルギー誘発能を予測する方法は十分に確立されていない。当面は被験物質の性質、使用形態等を考慮した上で、実験者が適切と判断した感作及び惹起方法で試験を実施すること。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即時型アレルギー試験 <ol style="list-style-type: none"> (1) モルモットにおける能動全身性アナフィラキシー反応試験 (2) ウサギ又はモルモットにおける同種PCA反応試験 (3) 感作マウス血清におけるラットPCA反応試験 2. 遅延型アレルギー試験 <ol style="list-style-type: none"> (1) モルモットにおける接触皮膚反応試験 (2) マウスにおける足蹠反応又はリンパ節反応試験
<p>なお、タンパク質を構成成分とする添加物のアレルギー性の評価については、<u>「添加物（酵素）に関する食品健康影響評価指針」（平成29年7月18日食品安全委員会決定）</u>「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準（平成20年6月26日食品安全委員会決定）」に準じて行うこととする。</p>	<p>なお、高分子又は蛋白質と結合すると考えられる食品添加物では、更に次の点を必要に応じて検討する。</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 感作動物血清の抗体価 (2) 蛋白質との結合性の程度 (3) 類縁化合物との交差反応性 (4) その他
<p>該当する記載なし</p>	<p>また、類似の化学物質で抗原性及びこれに起因すると考えられる作用が既に知られている場合には、それらに用いられた試験方法と同様な方法での検討もなされることが望ましい。</p>
<p>該当する記載なし</p>	<p>なお、報告に際しては、試験方法（使用動物、惹起抗原、対照群等）を明記し、かつ成績についての考察を行なうこと。</p>

※（1）亜急性毒性試験及び慢性毒性試験、（2）発がん性試験、（3）1年間反復投与毒性／発がん性併合試験は、平成8年厚生省ガイドラインに準じていない記載のため省略。また、（8）一般薬理試験は、平成8年厚生省ガイドラインの記載を一部修正して掲載するか検討するため省略。