

食品添加物リスク評価ガイドラインを構築するための
基礎的調査

報告書

平成20年3月

財団法人 国際医学情報センター

目次

要旨	6
I. 調査概要.....	9
1. 事業名	10
2. 調査の目的.....	10
3. 調査の項目	10
4. 調査方法	10
(1) 検討会の設置	10
(2) 海外ガイドライン等の収集・翻訳・整理	12
(3) 資料の整理.....	12
II. 我が国における食品添加物のリスク評価の現状	13
1. 背景	14
2. 食品添加物のリスク評価とは	16
3. 我が国におけるリスク評価の現状	17
III. リスク評価ガイドラインの構築	19
1. 背景	20
2. 方法	20
3. 調査のまとめ ～原則～	20
(1) 参考とするガイドライン	20
(2) 適用範囲	20
(3) リスク評価のステップ	20
4. 調査のまとめ ～有害性確認～.....	21
(1) 動物を対象とした安全性に関する試験	21
(2) ヒトを対象としたデータの収集.....	21
(3) 必要とされるデータセットの範囲	25
(4) 規格の設定	32
(5) 最終評価病変(毒性のエンドポイント)の選定	33
(6) 安全性に関する試験における統計学の利用	36
5. 調査のまとめ ～用量反応評価～	38
(1) 適切な用量設定.....	38
(2) NOAEL の決定	39
6. 調査のまとめ ～曝露評価～	41

(1)	食品添加物全般の曝露評価	41
(2)	香料の曝露評価	41
7.	調査のまとめ ～リスク判定～	42
(1)	遺伝毒性発がん物質の評価	42
(2)	動物種差の考慮	45
(3)	ハイリスク集団への配慮	46
(4)	食品とともに摂取される場合の考慮	48
(5)	複合影響の評価	49
(6)	新技術に由来する問題	49
(7)	ADI の特定	50
IV.	「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の見直すべき事項について	57
1.	背景	58
2.	調査方法	59
3.	調査のまとめ ～原則～	65
(1)	方針	65
(2)	原則	65
(3)	参考資料	65
4.	調査のまとめ ～各安全性に関する試験項目について～	66
(1)	共通項目	66
(2)	単回投与毒性試験、反復投与毒性試験（28 日間、90 日間、1 年間）	69
(3)	繁殖（生殖）試験、催奇形性（発生毒性）試験	72
(4)	発がん性試験	74
(5)	1 年間反復投与毒性/発がん性併合試験	74
(6)	抗原性試験	75
(7)	変異原性（遺伝毒性）試験	78
(8)	一般薬理試験	80
(9)	体内動態試験	81
(10)	免疫毒性試験	84
(11)	神経毒性試験	86
(12)	その他の試験（子宮内曝露相における試験）	88
V.	食品添加物のリスク評価に参考となる海外ガイドラインの翻訳	89
VI.	食品添加物のリスク評価に関する学術文献調査	92
1.	学術論文の調査・編集方法	93

(1) 商用データベースによる食品添加物リスク評価に関する学術文献情報の収集	93
(2) 検索結果のフィルタリング、および、参考文献の整理	93
2. 学術文献の調査結果	95
VII. データベースの使用方法	105
VIII. 参考資料	109

略語表

ADI	Acceptable Daily Intake	一日摂取許容量
CAC	Codex Alimentarius Commission	Codex 委員会
EFSA	European Food Safety Authority	欧州食品安全機関
EPA	Environmental Protection Agency	米国環境保護庁
FAO	The Food and Agriculture Organization of the United Nations	国連食糧農業機関
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品庁
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米欧医薬品規制 ハーモナイゼーション国際会議
JECFA	The FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家 会議
JMPR	The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家会 議
LOAEL	Lowest-Observed-Adverse-Effect Level	最小影響量
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level	無毒性量
NOEL	No-Observed Effect Level	無作用量
NTP	National Toxicology Program	米国国家毒性プログラム
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake	暫定週間耐容摂取量
WHO	World Health Organization	世界保健機関

要旨

■背景・目的■

我が国では食品添加物を特段に嫌う傾向があり、食品添加物は体に悪いというイメージが先行し、無添加の食品がより好ましいという意識が国民に深く根付いている。しかしながら、食品添加物は飲料や菓子、豆腐といった、人が日常摂取する食品にも含まれており、何かしらの食品を通じて全国民が摂取するものである。そこで、多くの国民が摂取することになる食品添加物の安全性を保証し、食品添加物の安全性評価を最新の科学に基づいて中立公正に、かつ透明な形で行うことが重要となる。リスク評価は通常、有害性確認、用量反応評価、曝露評価、リスク判定の4段階で行われる。我が国では有害性確認に関しては、1996年より「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針（試験法ガイドライン）」に基づいて安全性試験を実施しており、その他の段階においては現状、JECFAをはじめとする国際機関の評価や原則を考慮して評価を行っている。しかしながら、試験法ガイドラインは刊行されてから既に10年以上が経過しており、JECFAの原則についても各国・各機関で議論が分かれる部分もあることから、わが国としての指針を示すべきと考えられる。そこで、既存の試験法ガイドラインを踏まえながら、我が国独自の「食品添加物リスク評価ガイドライン（リスク評価ガイドライン）」を構築するにあたり必要な情報を収集すべく、基礎的な調査を行った。

■方法■

海外の主要国および主要国際機関における食品添加物に関連する15のガイドラインおよび文献を翻訳した。試験法ガイドラインについては、翻訳した資料を基に、我が国と海外の試験法を比較した資料を作成し、各毒性の専門家に各毒性試験に関して見直すべき事項の聞き取り調査を行った。その後、調査結果を検討会で議論して意見をまとめた。また、リスク評価ガイドラインについては、主にJECFAの「食品添加物の安全性評価の原則」を軸として、構築にあたり盛り込むべき事項を検討会で議論した。さらに、ガイドラインの構築に重要と思われる文献を商用データベースから検索し、専門家より個別に紹介された文献、調査を進めていく過程で重要と判断された文献とともに適宜収集し、抄録を作成した。

■構築に向けての提言■

リスク評価ガイドラインの構築：

原理・原則として、JECFAの「食品添加物の安全性評価の原則」を基本とし、天然・合成を区別せず、香料、酵素などの微生物由来物質も含め、定義に当てはまるもの全てについて適用を考慮すべきである。また、ナノ粒子など新技術に由来する物質にも今後適用が考えられる。リスク

評価のステップは有害性確認、用量反応評価、曝露評価、リスク判定とする現行の4段階を踏襲すべきである。最終評価病変（毒性のエンドポイント）は JECFA の原則を踏襲すべきであるが、現状に即して追加・修正することが望ましい。基本的には、NOAEL を算出し、ADI を特定するのが原則であるが、正確な NOAEL が決定できない場合や LOAEL しかわからなかった場合にベンチマークドーズを用いるという動きがあり、日本でも使用を検討すべきである。遺伝毒性発がん物質に関しては、閾値がないとするのが今までの原則であったが、近年、閾値が存在するという報告が散見される。アメリカやヨーロッパでは不純物や製造過程での副生成物、工場の排気など規制が困難な物質に関しては、我が国では採用していない実質安全用量(virtual safe dose;VSD)や曝露マージン(margin of exposure;MOE)、ベンチマークドーズという概念を用いて数値レベルで実質的に規制している。今後 VSD を導入するのか、ベンチマークドーズを用いた MOE の概念は考慮しないのかといった点を検討していく必要がある。また、遺伝毒性発がん性が疑われた際、その詳細な確認のために *gpt* delta や Big Blue などの遺伝子改変動物を用いることがあり、その適用の是非についても検討が必要である。動物を対象とした毒性試験では、種特異的な腫瘍が確認される場合があり、ヒトに外挿する際に考慮が必要である。複合影響に関しては、理論的な可能性の推定にとどまり、実際に起こる可能性は極めて低いとされ、個々の添加物を慎重に評価していくことが重要と考えられる。

有害性確認における試験法ガイドラインの見直し：

現行のガイドラインを基本とするが、FDA の Redbook をはじめ、ICH 医薬品ガイドライン、EPA の農薬ガイドライン、農林水産省による「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」など、より新しく、試験方法などに関してより詳細に記述されているガイドラインも公表されていることから、これらを参考にし、必要に応じて加筆・修正することが望ましい。また、国際的に試験法を標準化することは重要であり、我が国の医薬品、農薬、動物薬、一般化学品の試験ガイドラインにも反映されている。したがって、食品添加物においても最新の国際的な動向を反映すべきと考える。ただし、ICH、EPA、農林水産省のガイドラインはいずれも医薬品、農薬と食品添加物とは用途、使用状況が異なるものである。また、現行のガイドラインと比べて一部のガイドラインは非常に詳細であり、我が国の実施には実用的でない可能性もある。例えば、動物数、試験期間、飼育方法、検査項目など試験条件がより細かく、あるいはより厳しくなっている部分があるが、無駄な動物試験は極力減らすという動物愛護の観点、費用対効果、検査可能な機関からみた実施可能性、といった点も考慮する必要がある。動物愛護の観点に配慮すると代替法の適用も重要であるが、現段階において *in vitro* 試験により動物を用いた安全性試験を完全代替することは不可能である。他のガイドラインにおいて、免疫毒性試験や神経毒性試験は1章として取り扱われていることが多く、このような情勢も念頭に置くべきである。ただし、1章と

して設ける場合は、反復投与毒性試験などの他の試験と重複した内容を記述するのは避けるべきであり、反復投与毒性試験で何らかの所見が認められた場合に追加の試験を実施するなどの段階的アプローチについても考慮する必要がある。免疫毒性試験や抗原性試験は、近年の国内外の動向を踏まえて、十分に検討することが望ましい。ヒトを対象とした試験は、アレルギーや個人差における安全性を見る上で有用であるが、費用面や倫理的側面を考慮した場合、すべての食品添加物に関して実施するようにガイドラインに盛り込むのは不可能である。食物不耐容性や食物アレルギーが疑われる場合や、特定の疾患を有する患者への影響が懸念される場合など、必要に応じてヒトでの試験を行うのが実行性のある方法と思われる。

■結論■

食品添加物のリスク評価を行うにあたり、科学的根拠に基づいて一定の基準で実施するためにガイドラインの作成は有用と思われる。ガイドラインに基づいて評価を行うことで、評価手順にぶれがなくなり、評価の中立性、透明性がより高まるからである。それに伴って消費者や事業者の理解が深まり、不安も払拭されるであろう。しかしながら、極端に実行可能性が低く、費用対効果の悪いガイドラインを構築するのでは、添加物の評価も進まず、逆に消費者、事業者に不利益をもたらすことにもなりかねない。そのようなバランスにも配慮した、柔軟なガイドラインを構築していくことが望まれる。

I. 調査概要

I. 調査概要

1. 事業名

「食品添加物リスク評価ガイドラインを構築するための基礎的調査」

2. 調査の目的

我が国における「食品添加物リスク評価ガイドライン」を構築するため、食品添加物等に係る海外の主要国および主要国際機関の健康評価ガイドライン及び関連する文献の収集・翻訳・整理を行い、基礎資料を整備するとともに、リスク評価ガイドラインの構築に必要な諸情報等を整理することを調査の目的とする。

3. 調査の項目

- (1) 検討会の設置
- (2) 海外ガイドライン等の収集・翻訳・整理
- (3) 資料の整理

4. 調査方法

(1) 検討会の設置

情報収集を円滑に行いかつその内容を担保するため、一般毒性、生殖発生毒性、発がん性、遺伝毒性、一般薬理・代謝、曝露評価等の有識者で構成される検討会を設置した。

検討会メンバー

委員	西島 基弘	実践女子大学 生活科学部
委員	三森 国敏	東京農工大学大学院 共生科学技術研究院
委員	井部 明広	東京都健康安全研究センター 食品化学部
委員	西川 秋佳	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
委員	江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
委員	棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部
委員	佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部
委員	斎藤 嘉朗	国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
アドバイザー	澤田 純一	国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
アドバイザー	中木 敏夫	帝京大学医学部 薬理学講座
アドバイザー	太田 敏博	東京薬科大学 生命科学部
アドバイザー	小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 新規試験法評価室
オブザーバー	蛭田 浩一	内閣府 食品安全委員会事務局評価課
オブザーバー	大竹 詠子	内閣府 食品安全委員会事務局評価課
事務局	本庄 修	(財)国際医学情報センター東京分室 渉外担当
事務局	小林 仁	(財)国際医学情報センター受託サービス部安全性情報課
事務局	清水 暢子	(財)国際医学情報センター受託サービス部受託サービス課
事務局	塚本 晶子	(財)国際医学情報センター受託サービス部受託サービス課
事務局	大久保 舞子	(財)国際医学情報センター受託サービス部受託サービス課
事務局	武田 真貴子	(財)国際医学情報センター受託サービス部受託サービス課

(2) 海外ガイドライン等の収集・翻訳・整理

海外ガイドラインの収集、整理については第 III 章、第 IV 章、海外ガイドラインの翻訳については第 V 章、引用文献、参考文献の収集、整理については第 VI 章、第 VII 章を参照。

(3) 資料の整理

資料を整理するため、ファイルメーカーを使用し、検索可能なデータベースを作成した。資料の整理については第 VII 章を参照。

II. 我が国における食品添加物のリスク評価の現状

II. 我が国における食品添加物のリスク評価の現状

1. 背景

我が国では食品添加物を特段に嫌う傾向があり、食品添加物は体に悪いというイメージが先行し、無添加の食品がより好ましいという意識が国民に深く根付いている。しかしながら、食品添加物は飲料や菓子、豆腐といった、人が日常摂取する食品にも含まれており、何かしらの食品を通じて全国民が摂取するものである。医薬品と異なり、多くの人々が日常の食生活を通じて無意識に摂取するという性質上、食品添加物に対する漠然とした不安は高く、食品安全委員会が平成 15 年 9 月に実施した食品安全モニター・アンケート調査「食の安全性に関する意識調査」でも、食品の安全性の観点からより不安を感じているものとして、農薬（66.7%）、輸入食品（66.4%）について食品添加物（64.4%）が挙げられている。

そこで、多くの国民が摂取することになる食品添加物の安全性を保証し、食品添加物に対する消費者の漠然とした不安を払拭するためには、食品添加物の安全性評価を最新の科学に基づいて中立公正に、かつ透明な形で行うことが重要となる。海外では、各国の規制の国際的整合化を図り、食品添加物の安全性、有効性、規格を評価するための国際組織として 1955 年に JECFA が設立され、Codex 委員会（CAC）に対して助言等を行っている（図 1）。

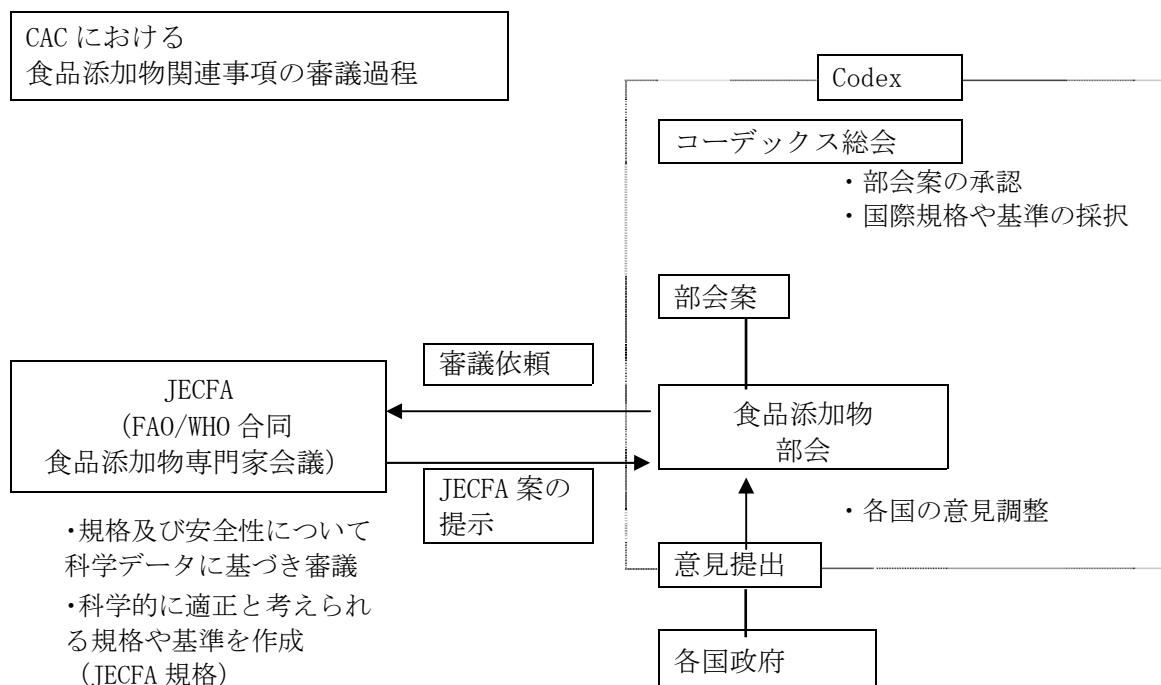


図 1 CAC における食品添加物関連事項の審議過程

食品添加物の安全性評価については、JECFA は 2 つの原則 (Truhaut の原則) を提唱しており、原則 1 は毒性試験による安全性評価の科学的手法の確立、原則 2 は安全な使用のための科学的指標となる ADI 設定の基礎となっている。

原則 1：添加物について絶対的に有害性がないという証拠を示すことは不可能だが、科学的立場から慎重に企画された試験によって、特定の用量で使用する添加物の安全性の評価は可能である。

原則 2：添加物は必要最低量を用いるべきであり、そのためには使用の上限量を設定すべきである。

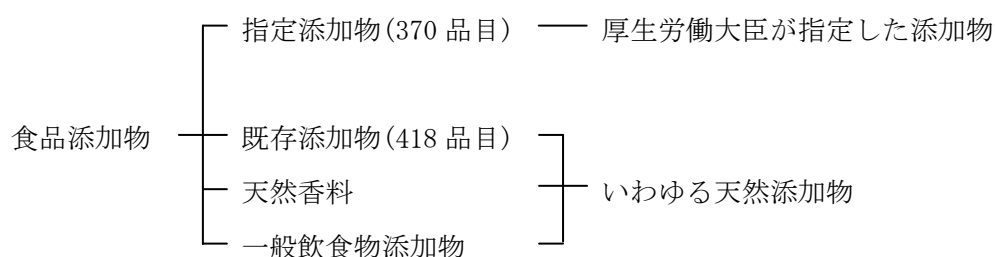
また、リスク評価には透明性、中立性、妥当性が求められるため、JECFA は 1995 年にリスクアセスメント、リスクマネジメント、リスクコミュニケーションによる消費者保護を優先した総合的リスク対策としてリスク分析手法を提唱し、我が国でも平成 15 年に交付された食品安全基本法の中でこの考え方が盛り込まれることとなった。さらにこの食品安全基本法に基づき、管理行政機関とは独立した形で食品健康影響評価を実施する食品安全委員会が内閣府に設置され、厚生労働省等の管理機関からの要請を受けて専門的にリスク評価を行い、食品健康影響評価結果を厚生労働省等に通知している。

このような形で導入されたリスク評価ではあるが、その評価をより適正に行うには、最新の科学的知見や海外の動向を収集し、整理することが重要である。

まず、本章ではこの食品添加物のリスク評価について概説するとともに、我が国における現状についてまとめる。

2. 食品添加物のリスク評価とは

食品添加物のリスク評価について考える際にはこれらの言葉についての理解が必要である。食品添加物は食品衛生法上添加物と呼ばれ、「食品の製造の過程において、または食品の加工もしくはは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用するもの」と定義されている。また、食品衛生法では図2に示すように厚生労働大臣が指定した「指定添加物」、長年の使用実績がある品目が定められている「既存添加物」、その他「天然香料」、「一般飲食物添加物」の4つに分類される。



(平成19年12月28日現在)

図2 食品添加物の分類

一方リスク評価は、食品安全委員会発行の「食品の安全性に関する用語集」(改訂版追補)において、食品中に含まれるハザードを摂取することによって、どのくらいの確率でどの程度の健康への悪影響が起きるかを科学的に評価することとされている。ここで言うハザードとは、健康に悪影響をもたらす原因となる可能性のある食品中の物質または食品の状態で、有害性要因とも呼ばれる。また、リスクとは、食品中にハザードが存在する結果として生じる健康への悪影響が起きる可能性とその程度(健康への悪影響が発生する確率と影響の程度)とされている。

3. 我が国におけるリスク評価の現状

厚生労働省の要請を受け、食品安全委員会がリスク評価を行っていることは前述したが、食品安全委員会の添加物専門調査会では、JECFA など海外の評価結果なども参考にしながら、動物を用いた安全性に関する試験の結果などの科学的データに基づき審議を行い、食品添加物毎に ADI を設定している。この審議結果を受けて、厚生労働省薬事・食品衛生審議会において審議・評価され、成分・物理化学的性状・純度などについての規格、使用できる食品の種類や量についての基準などが設定される（図 3）。

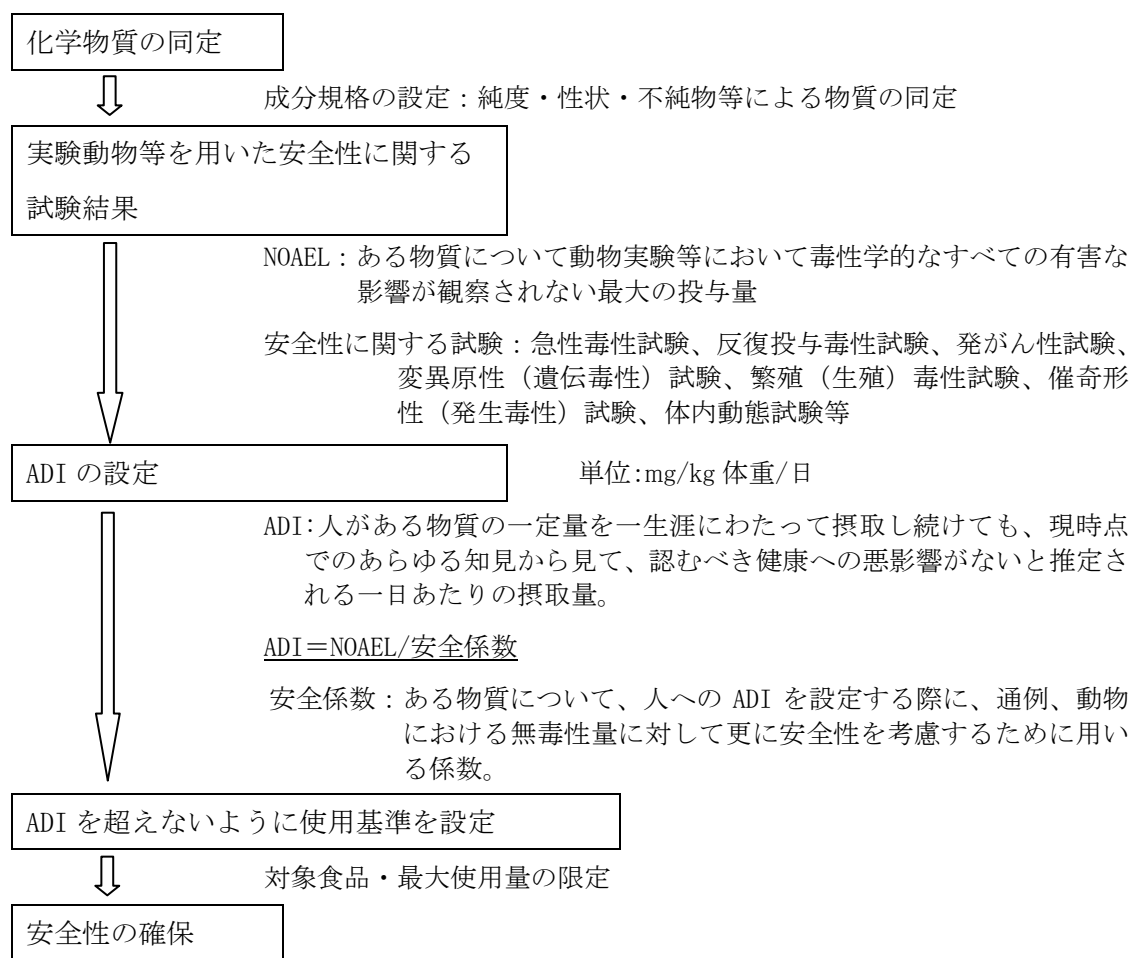


図 3 安全性確保の流れ

リスク評価に関わるガイドラインとして、添加物の指定および使用基準改正については、平成 8 年に厚生労働省より通達された「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」(以下平成 8 年ガイドラインとする)が準用されている。この平成 8 年ガイドラインでは必要な試験成績などの資料の範囲や資料作成のために必要な試験の標準的实施方法については記述されているが、リスク評価全体に関わる指針が示されているわけではない。しかし、安全性への関心が高まる今、リスク評価の信頼性、透明性を担保するには、リスク評価全体を視野に入れたガイドラインの構築が必要である。

現在、我が国のリスク評価で導入されている評価段階は、動物実験等における有害性確認、用量反応評価、曝露評価、リスク判定の 4 段階であることから、本調査事業ではこの 4 段階を軸にガイドライン構築に必要と思われる情報を収集した。中でも動物実験等における有害性確認では安全性試験データの収集が中心となることから、基本的には平成 8 年ガイドラインを適用することを想定し、平成 8 年ガイドラインに記載されている各種安全性試験についても情報を収集した。

III. リスク評価ガイドラインの構築

III. リスク評価ガイドラインの構築

1. 背景

我が国における食品添加物のリスク評価は、JECFA 等の動向を踏まえながら食品安全委員会の専門調査会で行われている。この専門調査会は各分野の専門家で構成されており、十分な審議を経て評価が下されるが、現行の平成 8 年ガイドラインではリスク評価の考え方については網羅されておらず、今後はリスク評価の考え方を含むガイドラインを構築し、評価の手順と基準を明示することが重要である。

本調査事業では、我が国における「食品添加物リスク評価ガイドライン」を構築する際に検討、留意すべき点について、リスク評価の 4 段階（有害性確認、用量反応評価、曝露評価、リスク判定）に添って国内外の情報を収集した。

2. 方法

JECFA の「食品添加物の安全性評価の原則」および WHO technical report series (TRS)の中から重要と思われる項目を抽出し、検討会にて討議を行った。検討会で議論された内容については、今後の検討事項または検討会からの提言として以下調査のまとめ欄にまとめた。

3. 調査のまとめ ～原則～

(1) 参考とするガイドライン

原理・原則は JECFA の「食品添加物の安全性評価の原則」を基本とし、JECFA の会議で議論された内容も反映すべきである。また、試験法などの詳細は FDA の RedBook を参考にすべきである。

(2) 適用範囲

天然・合成を区別せず、香料や酵素などの微生物由来物質も含め定義に当てはまるものの全てについて適用を考慮すべきである。また近年 JECFA の会議でも話題となっているナノ粒子など新技術に由来するものにも適用できるか検討すべきである。

(3) リスク評価のステップ

リスク評価のステップは、有害性確認、用量反応評価、曝露評価、リスク判定とする現行の 4 段階を踏襲すべきである。

4. 調査のまとめ ～有害性確認～

(1) 動物を対象とした安全性に関する試験

動物を対象とした試験についての詳細については、平成 8 年ガイドラインが適用されると考えられるため、IV 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の見直すべき事項についてを参照のこと。

(2) ヒトを対象としたデータの収集

① ヒトを対象とした試験

国内の現状：

in vitro や動物の安全性に関する試験などで得られた所見をヒトに外挿するのが困難な場合には、ヒトでのデータが有効となる。また、アレルギーや個人差に関しては、それらの反応を考慮して安全係数 10 を設定しているが、実際のアレルギー反応や個人における特異な反応といったものは、ヒト、あるいは特定の個人が摂取した場合に初めて確認できるものである。しかしながら、費用面や倫理的側面を考慮した場合、食品添加物の臨床試験をすべての添加物について実施することとしてガイドラインに盛り込むのは事実上不可能である。さらに、食品添加物は、少量を長期的に不特定多数の消費者が摂取するという意味で医薬品とは異なっており、販売後に健康への悪影響が発生した場合に早急に対処できる体制を組むことが大切であるが、医薬品の市販後調査のように市販後常に監視するというのは困難である。

海外の状況：

FDA はヒトでの臨床試験を想定し、Redbook II の中で「比較的高濃度でヒトに消費される場合など特定の状況下でヒトを対象とした臨床試験の実施を選択することができる」と明示している。具体的には、「chapter VI Human Studies A. Clinical Evaluation of Foods and Food Additives」において、ヒトを対象に臨床試験を行う場合の実施手順、プロトコール、被験者集団、統計解析等についての指針が提示されている。ただし依然としてドラフトの段階であり、最終化はされていない。また、JECFA でも「食品添加物の安全性評価の原則」の 5.4 章で「安全性評価におけるヒトを対象とした研究の利用」という項目を設けている。そこには「ヒトを対象とした研究は、JECFA が新しい食品添加物をレビューするデータ集には通常含まれない。しかしながら、ヒトでのデータの価値を認め、ヒトのデータが存在する場合にはそのようなデータを要求している、入手できたときには評価にそれらを常に利用している。」と記載されている。なお、規定はないが、実際、JECFA がメー

カーに要求して実際に試験を行ったショ糖脂肪酸エステル(WHO Food Additives Series 40:The forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives(JECFA), World Health Organization, Geneva 79-81,1998)やステビア抽出物の事例はある。

参考

【ショ糖脂肪酸エステルの事例】

ヒトに対する耐性を追試するため、二重盲検クロスオーバー法により、健常人 20 名（男 10 女 10、21-35 歳）を対象に、S-1170(モノエステル、ジエステル、トリエステルを含むショ糖脂肪酸エステル製剤)0.75g を含有するパンを 1 日 2 回、5 日間摂取させる試験が実施された。その結果、摂取しない期間と摂取した期間で排便の頻度に差はみられず、以前のヒト試験で疑われた影響は確認できなかったことから、暫定的 ADI 0-20 mg/kg を取り消し、0-30 mg/kg の ADI が設定された（1997 年）。

【ステビア抽出物の事例】

実施中の毒性試験・臨床試験データ、特に正常血圧・低血圧のヒトや糖尿病患者に対する薬理学的影響について JECFA で提出が求められており、最終的な試験成績が得られるまで、暫定的に 0-2mg/kg の ADI が設定されている（2008 年まで）。

対応案：

食物不耐容性や食物アレルギーが疑われる場合や、特定の疾患を有する患者への影響が懸念される場合など、必要に応じてヒトでの試験を行うのが実行性のある方法と思われる。しかし、実際のところは、あまり事例がない。

② 疫学調査

ヒトでの臨床試験は実施が困難であるため、症例報告や疫学データは非常に有益な情報となる。FDA は疫学データを「研究の進行状況の指標として、また、さらにヒトの研究を進める上で今後最も成果の見込まれる指標として用いてきた」としており、Redbook 2000 でも1つの章としてとり上げられている（この Redbook 2000 では、「chapter VI Human Studies B. Epidemiology」の中で、記述疫学研究と分析疫学研究の特徴について述べられている）。したがって既に公表されているデータなどは、海外のものも含め積極的に収集する必要がある。しかし、酵素など成分が特定されているものは良いが、既存添加物は成分も特定されていないものも多く、また摂取期間も長期にわたるため、本当にその添加物による影響なのかを判断するのは困難である。JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」5.4.1 章ではそのような疫学的研究の性質や価値について述べられている。

検討会としては、疫学的データが入手できる場合は、参考にすべきと考える。

参考

【JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」5.4.1章 疫学的研究】

ほとんどのヒト集団における食品添加物の影響の研究は、添加物が市場に出された後で実施される。ヒトで実施される食品添加物の研究の誘因はほとんどすべての場合、それが使用されるとき安全性になんらかの理由で疑問が生じたときである。例えばコバルト塩に曝露されて起こった“ビール摂取時における心筋症”の例のように、遡及的な研究により影響が明らかにされている。これらの研究において副作用的な所見があった場合、その添加物の安全性の再評価のために JECFA へ回付されることになるであろう。

食品添加物の安全性を評価するために計画された疫学的研究は種々の場合に実施されるが、そのような研究は敏感でないこと、および対照群集団を明確にする上での問題があることから、一般に決定的な結果は得られない。例えば、長期間にわたる低濃度の亜硝酸への曝露のような場合、亜硝酸は多くの食品に含まれるもので、全くあるいはほとんど曝露されない小集団を見つけることが難しいことから疫学的に研究することが非常に困難である。サッカリンでは、遡及的疫学的研究および症例・対照研究を含む大規模なデータベースが確立された。このデータベースは、異なった地理的部位に位置した異なった小集団を用いて得られたもので、ヒトでの膀胱癌についての結果は陰性であった。

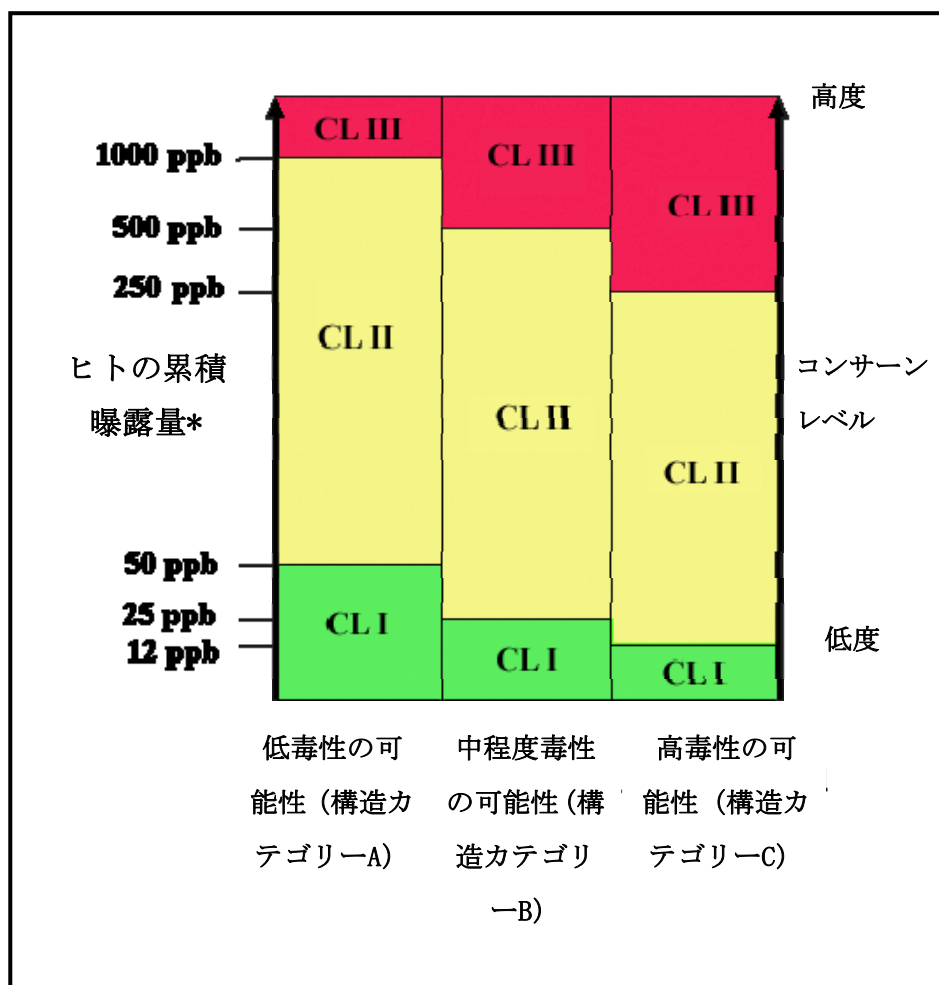
疫学研究の目的は多くの例では、動物で観察された陽性所見をヒトで確認することにある。このように食品添加物が広範に用いられるとき、さらに、曝露されたあるいは曝露されていない集団がはっきりしない時には、陰性結果は本来の目的として大きな価値がないように思われる。このことは疫学的研究がよく計画された動物の経口投与試験に比べ、概して鋭敏でないことによるものである。しかしながら、検討された個体の数が非常に多い場合には、このような感度上の欠陥は改善され、安全性の判断はヒトでの研究を基にしてなされることになる。例えば、サッカリンの場合には、疫学的研究で陰性結果であったことが重要視され、JECFA では引続いて使用することを容認した。

もちろん、特に疫学的研究では陰性結果よりも陽性結果の方がはるかに多くの示唆を与えるが、通常それほど感度の良いものではない。数千人を対象にした研究で検出できなかった有害作用が、何億という大規模な人々の集団に影響を与えることもあろう。

(3) 必要とされるデータセットの範囲

① 香料以外の物質

全ての物質で全ての試験を一律に行う必要があるのかどうかについては議論が必要である。FDA では、「Summary table of recommended toxicological testing for additives used in food June 2006」(<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opatxgui.html>、翻訳ガイドライン 2-1. (2)) に記載されているとおり、添加物の摂取量と化学構造に基づくコンサーンレベルで物質を 3 クラスに分類し、クラスのレベルごとに行うべき試験を設定している(図 4)。FDA のコンサーンレベルは他国で用いられているわけではなく、根拠としている文献が 1970 年代のもので構造活性相関に関して信頼できるか不明である。また、JECFA でも香料の最初のステップ以外には取り入れていない。よって検討会としては、我が国において全ての物質をこのようにクラス分けし、行うべき試験を決定するのは、現在ではまだ尚早と考えるが、海外ではそのような動向があることに注目したい。



* ヒトの累積曝露量は、添加物の1日摂取量の10億分の1 (ppb、食事1 kg 中に含まれる μ g 数に等しい) として示す。ppb を体重1 kg 当たりの μ g 数に換算し、20 で除す。1日の食事量を3 kg と仮定 [1日食事量3 kg を体重60 kg のヒトが摂取すると、体重あたり1/20の摂取量となり、 $\text{ppb} \times 1/20 = 1 \text{ 日摂取量 } (\mu \text{ g/kg 体重})$]。

図4 摂取量及び化学構造からのコンサーンレベル (CL) の決定
(FDA による)

② 香料

日本の評価法：

国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法については、平成 14 年から 15 年にかけて、香料安全性評価法検討会において検討が行われた。その結果、「香料についてはその使用量がおのずと限られているなどの特性を有すること、今回の安全性評価においては、JECFA における評価が終了し、かつ米国及び EU でも使用が認められているものを対象とすることなどから、国際的に汎用されている香料の評価については、JECFA 法を参考としつつ、新たに国内で使用できる香料の指定の可否を検討するものであることから、一部変更を加えたものを採用することが適当であると考え」として、現在、我が国では JECFA 法を参考としつつも、遺伝毒性試験と反復投与毒性試験をもとめ、総合的に評価を行っている（図 5）。

JECFA の評価法：

JECFA では香料に関して、ディシジョンツリーを用いて物質をクラス分類しており、要求されるデータもクラス分類ごとに異なる（図 6）。JECFA の評価法は、最初のクラス分類の部分で Cramer の論文を基にしている点で FDA のコンサーンレベルと同じであるが（Food Cosmet Toxicol. 16 (3) : 255-276, 1978、抄録番号 339）、それ以外の手順はかなり異なっている。

日本と JECFA の評価法の比較：

日本の場合、必ず最初に遺伝毒性試験と反復投与試験が必要であるのに対し、JECFA 法はディシジョンツリーに基づいて評価を行い、基本的に試験を必要としない（図 6）。よって、各国、各機関で必要に応じ、データを集めるなど適宜対応していることも予測されるものの、日本の評価法の方が JECFA 法と比べるとはるかに厳しいものとなっている。また、日本では JECFA における摂取量 $1.5 \mu\text{g}/\text{日}$ を閾値とする概念も採用されていない。本検討会としては、上述のとおり平成 14 年から 15 年にかけて香料安全性評価法検討会で検討を重ねて得られた考え方を支持し、現在はこの「国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について」に従って評価するのが妥当と考える。

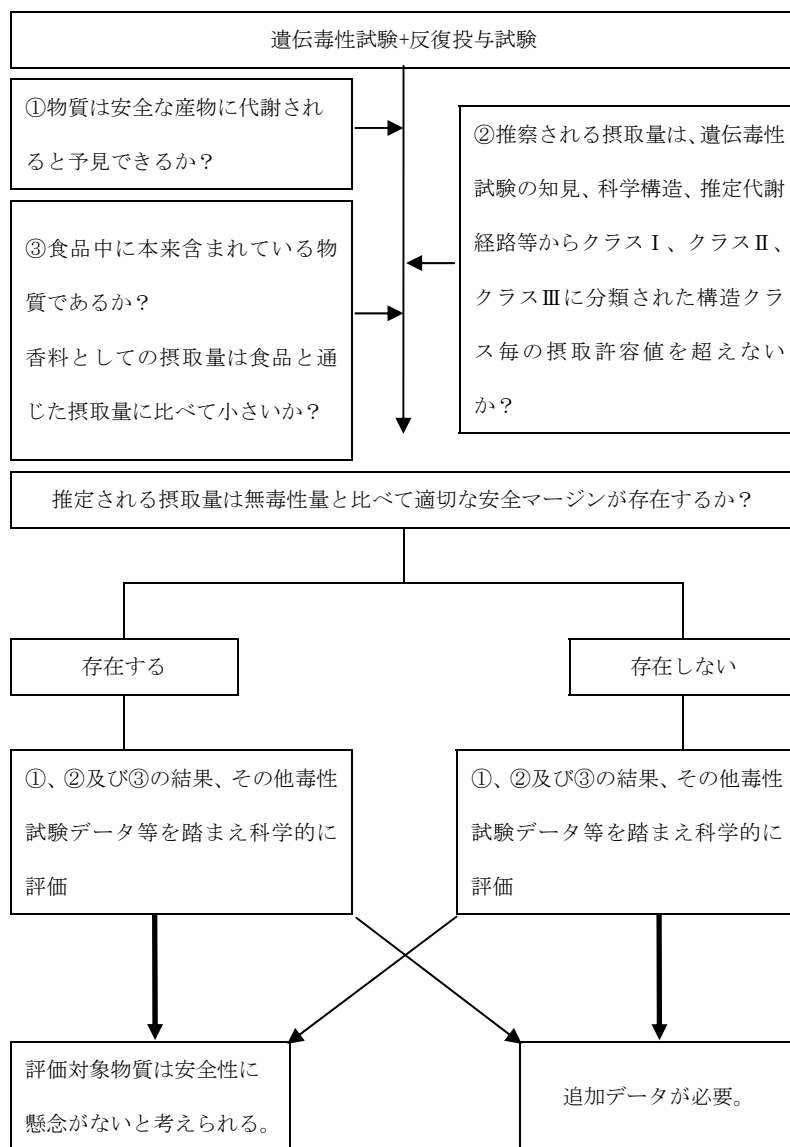


図5 国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法
 (平成15年11月4日 香料安全性評価法検討会
 「国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について」)

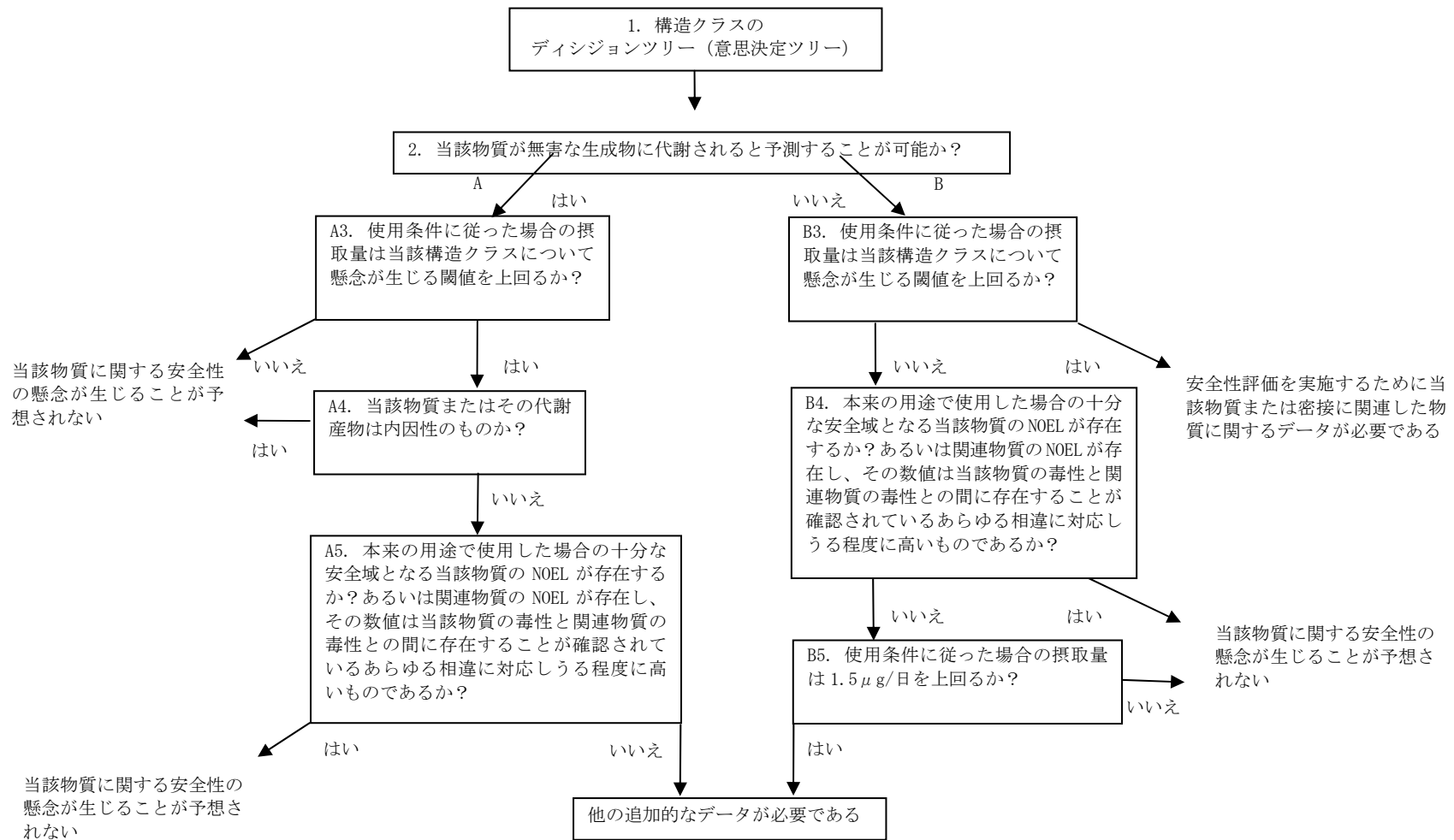


図 6 香料の安全性評価実施手順（JECFA 法）

参考

【レポート 751：香料（第 30 回会議、1986 年）】（general considerations より抜粋）

注：レポート番号は JECFA の会議報告書番号を示す

天然香料ならびにコーデックス国際食品規格では天然香料と同一の合成された香料の使用をコーデックス委員会食品添加物・汚染物質部会が暫定的に承認していたことが JECFA に報告された。JECFA はこの措置を考慮して、第 20 回会議報告で表明した「『天然であること』自体が安全性を保証するものではない」との見解を再度述べ、香料を含む食品添加物の試験および評価の優先順位を定めるために、JECFA の以前の報告における勧告を再確認した。JECFA は今後の会議における検討のためにコーデックス委員会食品添加物・汚染物質部会が香料の消費パターンを提供して優先順位設定プログラムを始動するよう勧告した。JECFA は十分な毒性データが存在する物質についてのみ評価が可能であることも強調し、まだ評価が行われていない香料に関するデータを歓迎すると述べた。

【レポート 828：香料（第 39 回会議、1991 年）】（general considerations より抜粋）

JECFA は香料に関連する特別の問題に鑑みてこのグループの化合物の安全性評価について再検討したが、これらは該当する化合物が多数であることならびに化合物の化学的多様性による問題であり、多くの場合は少量の使用にも起因している。これらの特別の考慮事項により弾力性の幅がある程度決定される。

食品香料の安全性評価に関する一般原則は食品中の食品添加物および汚染物質の安全性評価原則に記載されており、JECFA の第 35 回会議および第 37 回会議において検討された。これらの物質を評価する弾力的な方法の開発のためには最低限の量のデータが必要であることが第 35 回会議において強調された。JECFA は第 37 回会議において、これらの物質の安全性評価において考慮すべき要素には以下のものが含まれることに言及した。動物を対象とした毒性試験のデータならびに変異原性および染色体異常誘発能に関する短期試験のデータ、代謝および構造活性相関に関する試験の結果、使用量、全摂取量に対する食品添加物の使用の相対的寄与、香料の原料、ヒトの曝露の範囲および頻度に関するデータ。

JECFA は本会議において、他の団体が同様の原則に基づいた弾力的な方法を探求していることに言及した。JECFA は、該当する化合物または密接に関連している物質に関する最低限の量のデータがこれらの原則ならびに安全性評価に必要であるという結論を再度述べた。必要となるデータの正確な量は化学物質の性質および曝露に関する情報により決まることとなる。JECFA はまた、構造的に関連している一群の化合物の 1 つについて得られたデータはその群の他の化合物の評価に役立つことがあるので、そのような化合物は同時に評価するのが望ましいと注意を促した。

香料の評価に関する優先順位の設定方式の根拠となっている構造活性相関および曝露に関するデータはそのような化合物の安全性評価において重要であるが、そうしたデータのみでは評価に十分ではない。安全性評価を目的とした構造活性相関は開発が比較的遅れているが、この領域が発展することにより構造活性相関の価値も高まるかもしれない。

原則が策定されたことにより香料の安全性評価の弾力的な取り組みに関する適切な枠組みが提供されたと JECFA は判断した。

(4) 規格の設定

規格は安全性評価や製造操作規範に直接関係するため、重要である。JECFA も「食品添加物の安全性評価の原則」4.3 章の中で、食品中の不純物を制限する、安全性に関する試験に使われた物質との同等性を確認する、試験された添加物が実際に使用されている添加物であることを確かめるなどの必要性により、規格を設定すべきと勧告している。JECFA 会議でも、酵素剤、香料、微量金属、残留溶媒、天然由来物質などの規格について討議が行われている。

これらを考慮すると、規格を定めた上で安全性評価を行う必要があり、規格が設定されないものは安全性が確認できていないことと同等であるという意識を持つことが大切である。

(5) 最終評価病変(毒性のエンドポイント)の選定

エンドポイントに何を選定するかは、NOAEL を決定する上でも重要な要素であるため、注意深い考察が必要である。JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」5.1 では、実験的毒性研究におけるエンドポイントに関して、機能的変化、形態変化を伴う非腫瘍変化、腫瘍、生殖・発生毒性に分けて述べられている。要約すると表1のとおりである。

表1 エンドポイント一覧

機能的変化	体重増加抑制	他の病変が認められない場合、各種の経験的指数の決定に用いられる。最大耐容量の決定にも用いられる。
	瀉下作用	通常生理的なもので共通に認められる。
	不耐容性	考慮すべきではあるが、そのような反応の試験は含まれておらず、疑う知見がみられても因果関係の確定は困難である。
非腫瘍性の形態変化	非特異的な肝肥大	毒性と評価した時期もあったが、現在は被験物質の投与を中止すると元に戻ることが知られている。
	膀胱の結石形成	げっ歯類でしばしば認められ、場合によって特定の代謝変化に伴う変化と考えられる。
	盲腸の腫大	無菌状態で標準飼料により飼育されたげっ歯類における正常像。
	皮髄境界部位の腎石灰化	ラットにおいて、標準飼料にマグネシウムが欠乏すると増加する。
	精巣の萎縮	摂取困難な物質を飼料や水に添加した場合には、カロリー摂取が低下する結果、起こる場合がある。
	ビタミン(脂溶性ビタミン)欠乏症	脂溶性溶媒で腸管からの吸収が極めて悪い物質の場合に認められることがある。
	ホルモン関連変化	このような変化をもたらす物質の毒性評価には、同様の作用を持つ天然物質の組織内レベルについての知識が必要である。
腫瘍性変化	発がん性の事実が知られている化学物質はいかなる量でも食品添加物として使用すべきではないという考え(デラニー条項)を、JECFAは公式に採用しているわけではないが、最終判断にあたり委員会の考え方に影響を与えている。この考えが発表されてから50年が経過するが、この問題を解決するには多くの検討が必要である。化学物質の発癌性についての評価はJECFAの重要課題であり、新しいエンドポイントが次々に現れ、研究が詳細になるに従って結果の解釈が困難となっている。 げっ歯類では無処置でも様々な腫瘍が高率に発生するため、自然発生か被験物質によるものか見極めるのが難しい。例として、肝腫瘍、ラットの褐色細胞腫、マウスのリンパ腫と肺腺腫、ラットの膵腺腫と胃乳頭腫、ラットとマウスに見られる下垂体、乳腺、甲状腺等の腫瘍を含む内分泌系関連腫瘍が挙げられる。 発がん性が問題となっている例を個別的に調査し、関係のあるすべての要因を考慮に入れるならば、現在でも信頼性のある決定を行うことが可能である。	
生殖・発生影響	生殖への悪影響	形態学的、生化学的、生理学的障害に起因する両親またはその子孫の妊娠能力の低下や不妊。
	発生への悪影響	突然変異あるいは生化学的、生理学的障害に起因する身体の構造および機能の異常。雌雄の生殖細胞に起こる突然変異は最も長期的で重篤な潜在性影響とみなすことができる。
	早期と遅発性のものがある。	

検討会としては、「食品添加物の安全性評価の原則」で明示されているこれらの病変は基本的な原則であるため、日本のガイドライン構築においても踏襲すべきであるが、約 20 年近く前のものであるため、現状に即して追加・修正することが望ましいと考える。評価事例に関しては、一つ一つ例を挙げるときりがないが、細胞増殖活性や、酸化ストレス、腫瘍プロモーション作用の検査に関しては実施されることが多くなっている。そのような検査で発がん性を示唆する所見が認められた場合は、今後メカニズム解析が重要となるであろう。また、最近の JECFA 専門家会議において、認められた腫瘍を評価した事例があるので以下に引用する。

参考

【レポート 837：コーンオイル経口強制投与（第 41 回会議、1993 年）】

(general considerations より抜粋)

JECFA において、コーンオイル経口強制投与により物質が投与された試験について検討し、これらの試験の 1 件では膵腫瘍の発生率がすべてのグループにおいて予想を上回ったことについて言及した。コーンオイル経口強制投与により投与される物質の発がん性の可能性に関する評価は、投与方法が腫瘍発生率に単独で影響を及ぼす可能性があるため困難を伴う。NTP が実施した 37 件の長期試験の結果に基づいた最近の報告において、コーンオイル経口強制投与の実施と雄 F-344 ラットにおける膵臓腺房細胞の過形成および腺腫の発生率上昇との関連が明らかにされた。コーンオイル強制投与群におけるこれらの疾患の全体的な発生率は投与を受けていない群の約 5 倍であった。同様に、NTP が実施した 88 件の長期試験に関する最近の分析により、コーンオイル経口強制投与と雄ラットにおける膵腺房細胞腫瘍の発生率上昇との関連が明らかになった。また、コーンオイル強制投与群は投与を受けていない対照群と比べて白血病の発生率が低く、体重が重く、生存率が高かった。

JECFA はこれらの知見に基づいて、コーンオイル経口強制投与が腫瘍の発生率に影響を及ぼす可能性について評価するために、この方法で投与される物質を用いた試験の評価は慎重に行わなければならないと結論づけた。食品添加物の発がん性ならびに媒体や投与方法に関連した汚染を評価するために今後の試験のデザインに細心の注意を払うべきである。

参考

【レポート 837：長期試験におけるラットの生存率（第 46 回会議、1996 年）】

(general considerations より抜粋)

JECFA はアリテームに関するデータの妥当性を評価する際に遭遇した問題を受けて、実験動物を対象とした最新の長期試験の生存率に関する全般的な問題について検討した。JECFA は過去 5～10 年間に実施された長期試験におけるラットの生存率が徐々に低下しているとの認識を示した。さらに、一部の腫瘍の背景発生率が上昇したが、これは一般的に用いられる系統のラットの体重増加との関連が認められており、選抜育種が原因となっている可能性がある。これらの要素は特に発がん性に関して長期試験の解釈を複雑なものにし、場合によっては解釈を混乱させる傾向があった。以上の事実は、従来の発がん性プロトコールの実施が次第に困難になりつつあり、既存対照のデータを用いる場合には注意すべきであることを示している。最新の試験の結果を解釈する際にこれらの要素を考慮すべきであるが、それらの要素によって試験の価値が必ずしも否定されるわけではないと JECFA では判断した。生存率または期間あるいはその両方に関して任意に設定された基準を満たさない試験でも、当該物質の発がん性の可能性を評価する上で有用なデータとなる場合がある。

(6) 安全性に関する試験における統計学の利用

統計の手法は様々であり、必ずこの手法を用いなければならないというものはないが、データの分布を検討し、正規性があり等分散であると判定された場合はパラメトリック法を用いる、これ以外の場合はノンパラメトリック法を用いる、といった原則的な考え方は重要である。また、統計解析において標準的に使用すべきソフトウェアなどがあれば、その利用が推奨される。このような基本的事項に関しては、ガイドラインに盛り込む必要があると思われる。安全性に関する試験における統計学の利用に関しては、JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」、Redbook 2000 でも章を設けて記載されており、ガイドラインにこれらの点を考慮しながら記載する必要があるか検討する必要がある。

表 2 に、JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」で推奨されている具体的手法を例示する。

表 2 推奨される統計学的手法

		動物間の比較	同一動物内の比較	変数の間の相関
影響の有・無データ	個別の群間の比較	Fisher の直接法(非層別化データ)2×2 修正カイ二乗検定(層別化、または非層別化データ)	McNemar の検定、または符号検定	
	不均一性	2×k カイ二乗検定(層別化、または非層別化データ)	Cochran の検定	
	用量相関の傾向	Armitage 法(層別化、または非層別化データ)		
	変数の間の連関		Fisher の直接法	
		層別化検定の詳細、および層間にわたる連関性の定常性の検定についてはBreslow らの文献[IARC Sci Publ. 1980;(32):5-338]を参照。検定における加齢による調整についてはPeto らの文献[IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum Suppl. 1980;(2 Suppl):311-426]を参照。	2×2 修正カイ二乗検定	
順位データ	個別の群間の比較	Mann-Whitney の U 検定	Wilcoxon の対応のある場合の符号順位検定	
	不均一性	Kruskal-Wallis の一元配置分散分析	Friedman の二元配置分散分析	
	用量相関傾向	Marascuilo らの文献[Psychol Bull. 1967 Jun;67(6):401-12]を参照。	Page の検定	
	変数の間の関連		Spearman の順位相関係数	
連続性データ		正規性と群間の等分散性を仮定した方法。この方法を用いる前に外れ値の検定についてはBarnett らの文献[Outliers in statistical data, New York, John Wiley and Sons(1978)]を参照。 等分散性の検定：Bartlett の検定 もし、もとのデータが等分散性を示さないならば、対数、および、もしくは平方根にデータを変換することを考慮する。もし、変換後も等分散性が確保できないならば、順位データの方法を用いる。		
	個別の群間の比較	Student の t 検定	対応のある 2 群の t 検定	全群間についての特定の変数の間の連関の変動時系列：Pearson の相関係数、共分散分析：第二の時点における変化を第一の時点に合わせて変数を調整した後に、分散分析を行う。
	不均一性	一元配置分散分析	二元配置分散分析	
	用量相関傾向	線形回帰分析	線形回帰分析	

5. 調査のまとめ ～用量反応評価～

(1) 適切な用量設定

NOAEL を決定できるかどうかは、投与量の適正な選択に依存するため、用量の設定は非常に重要なポイントとなる。JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」5.5.1 章では、最高投与量は最小投与量において観察されない有害な影響をもたらされる投与量、中間投与量は通常最小毒性影響量を解明するのに十分な高い投与量もしくは高投与量と低投与量との中間の量、最小投与量は、形態、発育、成長もしくは寿命に影響を与える量であってはならず、また有害な機能上の変化をもたらすものであってもならないとされている。検討会としては、これらは今後も基本的な原則となると考える。また、平成8年に厚生省（当時）から通達された「医薬品のがん原性試験のための用量選択のガイダンスについて (http://www.pmda.go.jp/ich/s/slc_96_8_6.htm)」では、高用量選択の基準として下記の指標が列挙されており、こちらも参考となると考える。

- 1) 毒性学的指標すなわち MTD
- 2) 薬物動態学的指標すなわち 25 倍の AUC 比(げっ歯類：ヒト)
- 3) 用量を制約する薬力学的作用
- 4) 吸収の飽和する量
- 5) 投与可能最大量
- 6) その他の指標

安全性に関する試験で使用されている投与量については、通常摂取する量と大きく乖離しているとの指摘もあるため、用量選択の際はこの点にも配慮する必要がある。

(2) NOAEL の決定

① 無毒性量 (NOAEL) の使用

JECFA ではこれまで無影響量 (NOEL) を採用していたが、JMPR など他機関のリスク評価との整合性を図るため、今後は NOAEL を使用していくことが 2007 年の会議で決定された。ただし、最高用量で毒性影響のない場合は NOEL を使用し、香料の評価には適用しないこととなっている。日本は既に NOAEL を基本に ADI を決定しており、検討会としては今後もこの方針を踏襲すべきと考える。

参考

【JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」5.5.1 章 無影響量の決定】

異なる動物種での 2 つ以上の実験が行われている場合には、おのおの実験から無影響量が計算される。ADI を計算するための無影響量は、最も低い投与量で毒性影響を示した動物実験からの無影響量である。この実験が行われた動物種は、したがって最も感受性の高い動物種であると考えられる。

ある実験が明らかにその他の実験よりも質的にすぐれており、それらの実験期間が異なっている（短期に対する長期試験）場合には、全体としての無影響量を決定する際には、より長期の、より質の高い実験に特別な比重を掛けて考えるべきである。代謝および薬物動力学的データが利用できる場合には、最も感受性の高い動物種よりも、むしろ毒性影響に関してヒトに最も似ている動物種を、全体としての無影響量の計算に用いるべきである。

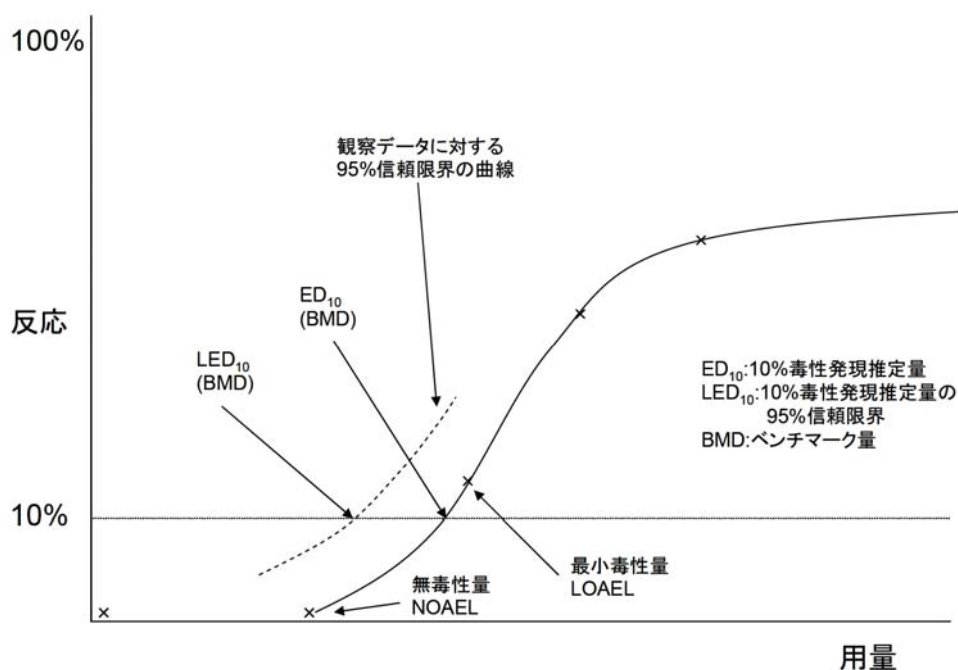
② ベンチマークドーズの使用

一番低い用量でも毒性が発現した場合はその用量が LOAEL となる。LOAEL から NOAEL へと外挿する場合は、安全係数を最低 10 倍乗じて評価するのが一般的である。最近、用量の設定が適切でなかった時に正確な NOAEL が決定できないという場合や、LOAEL しか得られなかった場合に、ベンチマークドーズを用いる手法が採用される動きがある。ベンチマークドーズは、毒性試験での NOAEL を統計学的に求めたもので、バックグラウンドに比較して有害な影響の反応率に所定の変化を生じる用量のことである(図 7)。NOAEL と比較して、用量反応曲線が考慮されているなど多くの長所があり、JECFA や EPA でも LOAEL の代わりにベンチマークドーズを用いて評価している事例がある。EPA ではベンチマークドーズの使用についてガイドライン(The Use of the Benchmark Dose Approach in Health Risk Assessment)が作成されており、ベンチマークドーズを求めるためのソフトウェアが開発され、公表されている。そのソフトウェアは EPA の下記のページより入手できる。

<http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=42601> (ガイドライン)

<http://www.epa.gov/ncea/bmds/> (ソフトウェア)

検討会としては、このような情勢を考慮すると、日本のガイドライン構築においても、LOAEL から NOAEL の外挿におけるベンチマークドーズの使用に関して検討が必要であると考える。



(関沢純、花井荘輔、毛利哲夫 共訳、化学物質の健康リスク評価、丸善株式会社、2001 年)

6. 調査のまとめ ～曝露評価～

(1) 食品添加物全般の曝露評価

JECFA が採用している曝露量の推定手法として、一人当たりの推定量、食品摂取量調査からの算出、マーケット・バスケット/総摂取量調査からの分析値の3種類がある。日本は現在、マーケット・バスケット方式を中心に食事由来の添加物の摂取量を調査しているが、陰膳方式などの手法もある。マーケット・バスケット方式は、一般に販売されている食品を購入し、分析した添加物の濃度と、厚労省が行っている国民健康栄養調査にて得られた各食品の平均摂取量から計算して推定する手法で、JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」3.1.1章では「分析が困難であり、普通は選ばれた特定の集団についての摂取量ではなく、その国の一般的国民の平均的食習慣を代表する試料中の汚染物質の平均摂取量の算出にとどまってしまう。」と問題点が指摘されている。また、陰膳方式は、いくつかの世帯が何日間か実際に作って食べた食事から分析するものであるが、世帯数が限定され、何万家族といった規模で依頼するのが難しいことや、依頼したとしても普段より豪華な食事になりがちで、実際に日々摂取されているものが反映されないといった問題点がある。いずれも平均値をとるものであるため、同じ食品を好んで摂取する人の摂取量は想定されていない。いずれも完璧な方法とは言いがたいが、ほかに適切な手法がないことから、検討会としては、現状どおりこれらの手法を用いて評価していくのが妥当であると考ええる。

(2) 香料の曝露評価

特に香料のリスク評価においては摂取量の評価が重要となる。JECFA は生産量を10%の人口が消費すると仮定して摂取量を評価する maximized survey-derive intake (MSDI) 法を用いていたが、2007年のJECFA会議では新たに single portion exposure technique (SPET) 法について検討された。MSDI法では、生産量に基づいて推計を行うため、特定の食品に含まれる特定の香料を大量消費するリスクを適正に評価できない可能性があるのに対し、SPET法は香料の添加量と、添加する食品を考慮した使用量に基づく評価法であるため、特定の食品を定期的に消費する長期間の曝露評価に適している可能性がある。JECFAでもバリデーションは終了していないが、検討会としては、今後も動向を見守り、SPET法の導入も検討する必要があると考える。

7. 調査のまとめ ～リスク判定～

(1) 遺伝毒性発がん物質の評価

一般に発がん物質は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質の2種類に分類される。遺伝毒性発がん物質はDNAに対する直接的な傷害作用が発がんに関係しており、非遺伝毒性発がん物質と比較するとはるかに発がんリスクが高い。前提条件として、遺伝毒性発がん物質は発がんの閾値がなく、非遺伝毒性発がん物質では閾値があるとされており、両者でリスク評価の方法も異なる。

① 非遺伝毒性発がん物質の評価

非遺伝毒性発がん物質では、通常NOAELを算出し、ADIが特定される。このプロセスはJECFAでも我が国でも共通しており、検討会としては今後も踏襲すべきと考える。

② 遺伝毒性発がん物質の評価

遺伝毒性発がん物質と判定されたものについては、閾値がとれないことから、安全性を担保するためにも認可しないのが、JECFAならびに我が国におけるこれまでの原則であり、農薬や動物用医薬品でも同様である。検討会としては、今後もこの原則を基本とすることに変更はないが、近年遺伝毒性発がん物質にも実質的な閾値は存在するとの福島らの報告もあり、注目すべきと考える。

(化学生物総管理, 1(3), 441-444, 2005、http://www.cbims.net/doc/pdf/1_441.pdf、Toxicol Pathol 31(1), 80-86, 2003;抄録番号 339、Arch Toxicol 80(6), 305-309, 2006;抄録番号 340)

③ 副生成物やコンタミナントとしての遺伝毒性発がん物質の評価

VSDの適用：

アメリカやヨーロッパでは、不純物や工場の排気など規制が困難な物質に関しては、実質安全用量(virtual safe dose;VSD)や曝露マージン(margin of exposure;MOE)、ベンチマークドーズという概念を用いて数値レベルで実質的に規制している。VSDは発がん性などのリスクのレベルが低い場合には、容認できるとした時の対応する用量であり、MOEは曝露量がヒト又は環境中の生物のNOAELに対してどれだけ離れているかを示す係数で、NOAEL/曝露量により算出する。ベンチマークドーズはⅢ.5(2)のNOAELの決定の項でも記載したとおりであるが、用量-反応関係の曲線から計算されるある割合の有害影響を発現する用量であり、NOAELやLOAELの代わりに用いる。EPAでは、発がん性試験成績から得られた用量反応曲線の低用量域への外挿により、VSDを算出する、すなわち許容できるリスク

レベルを 10^{-5} または 10^{-6} と設定するという手法が採用されている。EPAでは実際的な対応としてVSDを取り入れているが、現在の我が国の食品中に含まれる化学物質の評価では基本的に用いられていない。

日本においてVSDを用いて評価した事例：

製造過程で副生成する遺伝毒性発がん物質については、ポリビニルピロリドン、ポリソルベート、加工デンプンといった添加物の副生成物に関して、日本の食品安全委員会でもVSDを適用した討議が行われた。ポリソルベートの評価に際しては、製造時の不純物として1,4-ジオキサンとエチレンオキシドが残留する可能性が指摘されており、1,4-ジオキサンは非遺伝毒性発がん物質、エチレンオキシドは遺伝毒性発がん物質であると考えられる。よってそれらの不純物に関して、VSDを適用してリスク評価を行った結果、VSDが一般に遺伝毒性発がん物質の無視し得るレベルとされている100万分の1のレベルを下回ったことから、そのリスクは極めて低いと考えられるとの結論に至った。なお、ポリビニルピロリドンでは、最終結論は得られていないが、VSDを用いて評価したところ、リスクレベルは約7万分の1のレベルとなった。

食品添加物へのVSD適用は慎重にならざるを得ないが、副次的に生成する不純物については避けて通ることができないため、本検討会としてはVSD適用もやむを得ないとする。

MOEの適用：

遺伝毒性発がん物質、特にコンタミナントの評価の選択肢として、発がん性のリスクの大きさを表すMOEを示すという方法もあり、今後議論が必要である。EUではMOEを用いて評価しており、その考え方も考慮する必要がある。MOEに関しては国際化学安全性計画(IPCS)において用量反応モデル作成プロジェクトとして議論がなされており、IPCSのサイトでその報告書のドラフトが公開されている。

[Principles for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals (Draft)
WHO 2004

http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/draft_document_for_comment.pdf]

また、「Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonized Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic EFSA 2005」(翻訳ガイドライン3-1)に、「動物実験における高用量からヒトで曝露される場合の低用量に外挿する際に、複数のモデルが用いられており、同じ物質でも選択するモデルによって結果が異なったり、選択したモデルが生物学的過程を正しく

反映しているかどうかは明らかでないことから、EFSAのscientific committeeはMOEの手法を推奨している」と記載されている。また、MOEの算出にはベンチマークドーズの使用を推奨している。このような情勢を鑑み、検討会としては今後MOEの適用の是非を検討すべきと考える。

④ *in vivo*での遺伝子改変動物を用いた評価

遺伝子改変動物を用いた評価：

リスク評価にあたっては、専門調査会の判断により新たな*in vivo*データを要求するといった場合も想定される。*in vitro*での遺伝毒性試験にはAmes試験、染色体異常試験等が、*in vivo*での遺伝毒性試験としては小核試験があるが、近年遺伝子改変動物を用いて同じ臓器レベルで遺伝毒性発がん性を検出する系が使用されることがある。遺伝子改変動物を用いた試験では、肝臓に発がん性がみられる場合に実際に肝臓で遺伝毒性がみられるかを検討することが可能である。動物の作成に関し受託サービスはあり、環境は整備されつつあり、実際に我が国で検討を行った事例もある。検討会としては、遺伝子改変動物を用いた評価も選択肢の1つとして視野に入れるべきではあるが、デメリットについても慎重に検討する必要があると考える。

遺伝子改変動物の使用に関する海外の動向：

遺伝子改変動物はJECFAでもまだほとんど利用されていない。また、OECDでは、MutaTM Mouse、*gpt* delta、Big Blueなど5種類程度のラット、マウスを用いて、全身諸臓器における突然変異を検討する方法が紹介されているが、いずれも遺伝毒性発がん性があるかどうかを確認するスクリーニング目的で用いられている段階である。

日本で遺伝子改変動物を用いた事例：

コウジ酸の発がん性が問題となった際、コウジ酸を含有する医薬部外品および化粧品の製造・輸入を一時見合わせる事となったが、その追加試験として遺伝子改変動物(MutaTM Mouse)を用いた試験が行われ、肝臓での遺伝子突然変異誘発性が検討された。コウジ酸の場合は最終的にその結果が陰性であったことなどから、医薬部外品としての安全性に特段の懸念はないとのことで使用が許可された。

(2) 動物種差の考慮

動物を対象とした毒性試験では、ヒトなどではみられない種特異的な腫瘍が確認される場合があり、ヒトへの外挿時に問題となる。

例として、JECFA でも 1963 年の第 7 回会議以降、ポリオールおよびその他の難消化性炭水化物を給餌されたラットに発生した副腎髓質の増殖性病変の毒性学的意義が何度も協議事項となっており、1996 年の第 46 回会議でも検討されている。

検討会としては、このような海外の動向に注目しながら、ケース・バイ・ケースで慎重に対応していくことが望ましいと考える。

参考

【レポート 868：ポリオールおよびその他の難消化性炭水化物を給餌されたラットに発生した副腎髓質の増殖性病変の毒性学的意義（第 46 回会議、1996 年）】

(general considerations より改変)

ラットの副腎髓質とヒトを含む他の種の副腎髓質との機能的差異が特定されており、ラットの場合にはポリオールまたは乳糖の摂取によりカルシウム吸収量が増加するが、ヒトではこの現象は認められない。カルシウム吸収量の増加によりラットに褐色細胞腫が発症する実際の機構は現在もなお不明である。ポリオールまたは乳糖を給餌されたラットにおける副腎髓質の増殖性疾患の発症はこれらの物質の高用量の投与とのみ関連が認められている。試験が実施されたそれらの化合物はマウスやイヌにこのような疾患を誘発しない。さらに、ポリオールおよび乳糖のいずれについても反応中間体に代謝されることが示唆されず、これらの物質やその代謝産物のいずれかが遺伝毒性を有することを示唆するエビデンスも存在しない。

このようなデータを検討し、ラットの副腎髓質に固有の特定の特徴について言及した後、ポリオールおよび乳糖を給餌されたラットにおける副腎髓質の増殖性疾患の発生は種特異的な現象であり、ヒトにおけるこれらの物質の毒性評価のためにこの現象を用いることは適切ではないという以前の会議で示した見解を確認した。ポリオールに関する以前の評価は維持され、毒性に関するモノグラフは作成されなかった。

(3) ハイリスク集団への配慮

① 乳幼児

JECFA は、12 週齢以下の幼児用食品にはいかなる添加物も混入しないようにする慎重な配慮が必要と考えている（「食品添加物の安全性評価の原則」5.1.4 章）。その結果、乳幼児に与える食物に添加物を使用する必要があると考える場合には、「生後 12 週までの新生児のための特別な毒性学的検討がより精力的になされ、幼若動物での安全性の証明を含む研究がなされるべきである」と結論している（「食品添加物の安全性評価の原則」5.3.1 章）。また、1997 年の JECFA 会議では「乳児における添加物の摂取および作用に関する明確なデータが存在しない場合には、乳児専用の食品における添加物の使用について慎重に取り組むべきである」という記述がある。

検討会としては、基本的に ADI の範囲内であれば問題はないと考えられるが、感受性の高い集団であることに配慮して、国際的な動向を注視していく必要があると考える。

② 妊婦・胎児

現行の「平成 8 年ガイドライン」では、次世代繁殖毒性試験の中で親動物の母乳中に含まれる添加物の影響を仔でみており一部観察できるが、それをパラメータ化して行うことはしていない。現状でも一部評価は可能であるが、検討会としては、何か毒性を示唆する所見がみられたときにケースバイケースで追加の試験を行うなどの対応を求めるのが妥当と考える。また、Redbook では VI.C.8「In-Utero Exposure Phase for Addition to Carcinogenicity Studies or Chronic Toxicity Studies with Rodents（子宮内曝露相を加えたげっ歯類のがん原性試験あるいは慢性毒性試験）」で乳幼児への曝露の影響を見るような試験が設定されており、参考になると考える。

妊産婦、授乳婦に関しても、「食品添加物の安全性評価の原則」5.3.1.2 章の「体内曝露に関する研究の有用性」で述べられているが、その安全性に関しては、生殖発生毒性試験を行うことで評価可能であるというのが、検討会としての見解である。

③ 高齢者

「食品添加物の安全性評価の原則」5.3.1.3 章の「加齢要因の複雑性」で触れられている。安全性に関する試験で用いる動物についてであるが、「老化による複雑性が起こる前に毒性試験を実施しておくことがよい」と結論付けている一方で、老齢の動物は肝や腎といった重要な臓器の機能が減退しており、若い動物に見られない作用が起こる、また発生までに長期間の曝露を必要とする場合は老齢の動物にのみ見られるといった点から、老齢

動物を日常的に使用し、この分野での研究をさらに深める必要があるとしている。

しかし、老齢の動物を何年かかけて飼育して、それから一般毒性試験、薬理試験等を行うとすれば、飼育の費用・期間の点から実施はまず困難である。現在、発がん性試験は2年間行うこととなっており、ラット、マウスの終生に近い期間曝露して安全性を評価しているため、食品添加物が医薬品とは異なりある薬効を有するものではないことも考慮すると、検討会としては高齢者の安全性は現行の試験で評価が可能であると考ええる。

参考

【レポート 759：乳児食品の食品添加物（第31回会議、1987年）】

(general considerations より抜粋)

JECFA では、第17回会議において懸念が表明されたグルタミン酸ナトリウム (MSG) に関連して、また多量の硝酸塩を含有していることがある着色料のビートレッドに関連して、これら食品添加物を乳児食品に使用すべきか否かという問題が生じた。JECFA は「乳児食品の添加物」に関する FAO/WHO 会議報告に言及し、乳児における添加物の摂取および作用に関する明確なデータが存在しない場合には乳児専用の食品における添加物の使用について慎重に取り組むべきであるとの見解を再度示した。乳児におけるグルタミン酸ナトリウムの摂取および作用に関する情報は、健康リスクを懸念する必要があることを証明するものだったため、JECFA はこの情報に安堵した。しかしながら、乳児とは異なる成人の味覚嗜好を満たすためだけに乳児食品に添加物を利用すべきでないと JECFA は結論づけた。また、ビートレッドに関しては、乳児食品におけるビートレッドの使用により生じる硝酸の量は懸念に値すると JECFA は結論づけた。

注：我が国では硝酸塩の NO_3 量として 0.27% と規格が定められている。

(4) 食品とともに摂取される場合の考慮

JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」:

「4.2 食品添加物と汚染物質の食品中における反応と運命」の章において、「ある種の食品添加物は好ましくない食品成分と反応し、あるいは反応によって食品成分を変化させるなどして機能的効果を示す。」「加工助剤は不完全な除去により非意図的に食品の一部となる可能性がある。」などと述べられている。JECFAの専門委員会はそういった点から反応性に関して、必要に応じて以下4種類のデータの提出を要請しており、これらのデータは生物試験データを添加物の食品中の実際の使用と関連させるために重要であるとしている。

- (a) 食品添加物の一般的な化学反応性
- (b) 貯蔵中における安定性、およびモデル系での反応
- (c) 実際の食品系中における添加物の反応
- (d) 生体内での添加物の運命

最近の JECFA における事例 :

第30回の JECFA では食品の天然成分に関して、世界の一部の地域では伝統的に食品として消費されているウコン色素ならびに増粘剤で処理したユーケマ藻類のような物質は、食品と食品添加物のどちらであるかを判断するガイドラインを制定できるほど一般化できる問題ではないと結論づけており、各物質について個別に検討すべきであるとしている。また第63回会議では栄養素との相互作用に関して、ビタミンK反応性出血を誘発する α -トコフェロールおよびブチルヒドロキシトルエン (BHT) の作用を考慮して、ビタミンKなどの必須栄養素と相互作用する化合物の試験を実施することを勧告している。

(5) 複合影響の評価

食品添加物の種類は多種多様であるが、個々の食品添加物は安全性評価を経た上で使用が認められているため、指定された方法に従って使用される限り、有害な影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断されている。また、複数の食品添加物を摂取した場合のいわゆる「複合影響」についても、個々の食品添加物の安全性が確認されていることから、それらを複合的に摂取しても健康への影響は考えにくい。しかし、その組み合わせは無数にあるため、食品添加物を複合的に摂取したときのデータがほとんど存在しないことなどを理由に複合影響について不安視する意見があった。

2006 年度に食品安全委員会の食品安全確保総合調査事業で実施された「食品添加物の複合影響に関する情報収集調査」の報告書では、その複合影響に関して、「食品添加物の複合曝露による健康影響については、多数の添加物が使用されていても、実際に起こりうる可能性は極めて低く、現実的な問題ではなく、理論的な可能性の推定にとどまるものである。ただちにリスク評価を超えた複合的な影響が顕著に出ている事例は見出されなかった。現在、食品添加物は ADI の考え方を基本として個別に安全性が審査されているが、複合影響の可能性を検討する際にもこのアプローチは有効であり、個々の食品添加物の評価を十分に行うことで、食品添加物の複合影響についても実質的な安全性を十分確保することが可能であると考えられた。」と結論付けている。

JECFA や FDA でも添加物の複合影響評価についてのガイドラインは作成されていないが、JECFA では「食品添加物の安全性評価の原則」5.5.4 章にもあるとおり、同様の毒性を示すいくつかの化合物を食品添加物として使用することを考える場合においてグループ ADI の設定を推奨している（グループ ADI の詳細については報告書Ⅲ.7.（1）③を参照）。本検討会としては、個々の評価を十分に行うことが安全性を担保するために重要と考える。

(6) 新技術に由来する問題

JECFA では、2007 年の第 67 回の会議で、初めてナノ粒子状の食品添加物を取り上げている。小さな粒径の粒子は、同じ物質でも粒子の大きいものと比べて物理化学的性状が大幅に異なり、毒性も異なる可能性がある。現時点で、食品添加物として使用が検討されているナノ粒子状物質はないが、今後課題となることが予想されるため、検討会としては今後も JECFA などの動向に注意すべきと考える。

(7) ADI の特定

JECFA は「動物種間の感受性の違い、実験動物母集団の動物数とヒトの母集団の人数との違い、ヒトの母集団では合併する疾患のプロセスにより大きな多様性があること、ヒトの摂取量の見積が難しいこと、ならびに食品添加物の間に相乗作用のある可能性があることから、ある程度の安全域があることが望ましい」（「食品添加物の安全性評価の原則」5.5 章）との観点から、ADI の特定を行っている。ADI は NOAEL を安全係数で除することにより算出され、これは我が国でも既に採用されている。また、長期の毒性試験に基づいて ADI を設定する際には、伝統的に動物種差 10×個体差 10 とする安全係数が使用されており、検討会としても今後これらは踏襲すべきと考える。近年は、100 という値を安全係数として一律に適用するのではなく、種間・個体間のトキシコキネティクスやトキシコダイナミクスの差異に関する詳細な情報を収集し、種差による外挿およびヒトの個体差の幅の推定を精密化し、不確実性を減らす試みが行われており、ガイドライン作成の際に考慮する必要がある。この chemical-specific adjustment factors (CSAF) を利用する場合、実際のトキシコキネティクスやトキシコダイナミクスデータがあればその比重により CSAF を算出して適用するが、データがない場合には種差 10 を分割してトキシコキネティクスに対して 4、トキシコダイナミクスに対して 2.5 を割り振り、個体差 10 に関してはそれぞれに 3.16 を割り振ることにより、分割した数値をデフォルトとして用いることとしている。

<http://www.inchem.org/documents/harmproj/harmproj/harmproj2.pdf>

(Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: Guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment, 2005, WHO)

① より高い安全係数をとる場合

JECFA 「食品添加物の安全性評価の原則」:

5.5.2 章では、安全係数を考慮すべき事項として、下記の項目が挙げられている。

- ・ データが不十分な場合
- ・ 胎仔毒性試験において観察される作用が可逆的である場合
- ・ 生殖試験において加齢に関連のある作用がみられる場合
- ・ 発がん性の所見がみられる場合

対応案:

検討会としては、JECFA の列挙されている項目に加え、下記のような場合には最大 10 の安全係数を追加することが望ましいと考える。

- ・ NOAEL 設定の根拠となったエンドポイントが、肝細胞壊死、胎児毒性など重篤な所見の場合
- ・ LOAEL しか得られていない場合
- ・ 長期反復投与毒性試験のデータがなく、短期反復投与毒性試験のデータのみの場合
- ・ データが不十分な場合の補足説明として、動物数が少ない、実験条件が統制されていない、データの信頼性が低いなど毒性試験の質に問題がある場合

② より低い安全係数をとる場合

JECFA「食品添加物の安全性評価の原則」:

5.5.2 章および 6.2.3 章では、下記のような場合には通常 100 の安全係数より小さい安全係数の検討が許容されている。

- ・ 一部の香料など伝統的食品と同様のものであり、代謝されて正常な生体成分となるものかつ明白な毒性を示さないもの
- ・ 加工デンプンなど、ヒトによる消費量が多い場合や、混餌試験で有害な影響がなかった場合（過剰量や親水度など添加物の物理的性質による影響は除く）、あるいは栄養的には問題のない範囲で最大限の量が食品に加えられたような場合

対応案:

検討会としては、JECFA で列挙されている項目については今後も配慮すべきと考える。

③ グループ ADI について

JECFA では、同様の毒性を示すいくつかの化合物を食品添加物として使用することを考える場合には、それらの累積摂取量を制限するために、その化合物群としての ADI を設定するのが適切であるとしている（「食品添加物の安全性評価の原則」5.5.4 章）。たとえば、香料として用いられるエステル類の安全性（消化管で加水分解されて、酸、アルコールになる）は代謝の情報に基づいて、化学的に非常に密接な関係のある一連の化合物（たとえば脂肪酸）は構造活性相関を考慮して、また、化学的に関連性はないが加算的な生理的・毒性作用を生ずる化合物（吸収されずに下痢を引き起こす膨張性の甘味剤）は、グループ ADI を設定することが適切である。JECFA 第 35 回会議（レポート 789）では、緩下作用を有する他の増粘剤や安定剤のグループの作用は相加的なものである可能性があるため、緩下作用を有する化合物にはグループ ADI を設定すべきであると判断している。

参考

【レポート 733：酵素剤（第 29 回会議、1985 年）】（general considerations より抜粋）

評価のために JECFA に提出された微生物由来酵素剤の大部分は固定化された状態で使用される。したがって、JECFA は酵素そのもの、固定化剤、両者の組み合わせについて検討する必要があるとの認識のもと、固定された状態の酵素を評価するための全般的な原則を定めることが適切であると判断した。

JECFA は微生物由来酵素剤の安全性を確認する目的で以前に定めた原則について検討し、基質に直接添加される微生物由来酵素剤の取り扱いに関する原則を承認したが、製造管理および品質管理に関する基準（GMP）が遵守された場合にはこれらの酵素は製品のその後の加工において通常は除去される。固定化酵素系を利用した製造工程は酵素が基質と結合して失われることを可能な限り阻止することを目的としている。したがって、JECFA は酵素剤について必要とされる安全性データの種類について検討した際、処理された食品中に検出される可能性がある少量の酵素を考慮に入れた。遊離した状態の酵素と固定化した状態の酵素の両者について ADI を設定することも検討した。

① 試験要件

GMP を遵守して使用される固定化酵素は食品に通常存在する残留量が少ないため、試験要件は遊離酵素より緩いことがある。しかしながら、生産菌が生育しない場合や、毒素を産生しない場合を考慮したすべての固定化酵素に関する適切な化学的・微生物学的規格を設けるべきである。酵素成分の安全性を評価するために固定化酵素剤の毒性試験を実施することは妥当であると考えられるが、固定化剤の安全性を確認するためにも試験を実施する必要がある。

② 微生物由来酵素剤の評価：

JECFA は、酵素の安全性を評価するためのガイドラインのカテゴリー4 および 5 に記載されている酵素に関して 3 つの異なる状況を考慮しなければならないことと認識した。その状況を以下に示す。

- (a) 食品に直接添加され、除去されない酵素剤
- (b) 食品に添加されるが、GMP により最終製品から除去される酵素剤
- (c) 食品との接触が加工中に限られる固定化酵素剤

JECFA は上記 (a) に関して、食品中に存在する酵素剤の量が安全であることを保証するために ADI を設定すべきであると結論づけた。また、本会議は (b) に関して、発生する残留量と摂取許容量の間の安全域が広ければ ADI を「特定しない」と定めることができると結論づけた。(c) に関しては、固定化した酵素を使用したことにより食品中に存在している可能性がある残留酵素の ADI は設定する必要があるとすることができると結論づけた。JECFA は固定化酵素を食品加工の目的で使用することは容認されるとの考えを支持した。

食品加工に使用される一部の酵素剤の生産において遺伝子工学の新しい手法を用いることが可能であることを JECFA は認識していた。修飾遺伝子複合体により生産された酵素を含む酵素剤の評価により、JECFA が第 26 回会議報告において表明した原則の一部が必然的に拡大される可能性がある。このような酵素剤は専門家会議の注目の的となっているため新ガイドラインが作成されることとなる。

注:なお、新ガイドラインは、作成中のため公表されていない(2008 年 3 月現在)。

③ 固定化剤

酵素を固定化するためにさまざまな化学物質を用いた多くの方法が行われていることが専門家会議に報告された。そのような方法としては、マイクロカプセル化(例:ゼラチンへの捕捉)、グルタルアルデヒド添加、多孔質セラミック担体への捕捉、ジエチルアミノエチルセルロースやポリエチレンイミンなどの物質との複合体の形成といったものが挙げられる。固定化の過程で数種類の物質を使用することがある。

最終食品が不純物を含んでいたり、固定化酵素系が崩壊したりした場合、固定化剤に由来する物質が最終食品中に検出される可能性があるが、残留物の量は通常きわめて低い。固定化剤の安全性データが必要となるが、データの種類は物質の化学的性質により異なる。固定化酵素系を構成するために用いられる物質の一部は毒性がきわめて高い。最終食品に存在することが許容されているこれらの物質やその毒性汚染物質の量は技術的に可能な限り低い水準に抑えるべきであり、毒性に関する懸念が生じる量より低くなければならない。固定化剤の ADI は設定しない。

参考

【レポート 733：無機酸および有機酸ならびにそれらの塩（第 29 回会議、1985 年）】

(general considerations より抜粋)

JECFA はコーデックス委員会食品添加物・汚染物質部会から受領した食品中の塩のリストの評価を実施した。

JECFA は過去に食品中の多数の酸および塩の評価を行っており、イオン化可能な塩の ADI は成分の陽イオンおよび陰イオンに関して以前に受け入れられていた勧告に基づいて設定すべきであるとの立場を取っていた。したがって、JECFA はイオン化可能な塩の今後の評価を助けるために表 3 を作成したが、これは陽イオンと陰イオンの多数の組み合わせに関する ADI を示すものである。

表 3 の ADI 一覧は主な種類の塩の安全性に関する一般的な水準を示したものである。特定の塩について評価した結果が、ADI が表に示す数値とは異なる可能性がある。そのような場合には、個々の塩の評価の結果は主な種類の塩の ADI に優先する。例えば、検討されている特定の塩が生産中であるか否か、食品グレードの材料として使用されているか否かについての見解を示す根拠となる情報を JECFA は保持しておらず、そのためこれらの化学物質が属する種類の塩の ADI（表 4 に示す）が設定されている場合でも特定の塩の ADI を設定することはできなかった。

JECFA は、陽イオンのアンモニウム、カルシウム、カリウム、ナトリウムに関して、食物に対するこれらの関与について評価を行い、容認可能であると判断される場合には使用制限を設けないという点で第 9 回会議報告に同意した。カルシウム塩に関しては、第 26 回会議報告に従って栄養的に正常な食物中のカルシウム／リン比を維持することの望ましさが強調された。JECFA はまた、第 15 回会議報告における乳児食品中の塩化ナトリウムおよびリン酸カルシウムの使用に関する勧告に同意した。

JECFA は後述のようにアルミニウム塩およびマグネシウム塩の使用に関する特定の条件を設けた（表 4）。

表3 各種陰イオンおよび陽イオンの ADI¹

陽イオン	陰イオン	ADI
アルミニウム ^a	アセテート ^g	特定しない
	アジピン酸塩 ^g	0～5mg/kg 体重
	カプリン酸塩	特定しない
	カプリル酸塩	特定しない
	炭酸塩	特定しない
アンモニウム ^b	塩化物 ^{d, g}	特定しない
	クエン酸塩 ^g	特定しない
カルシウム ^{c, d}	フマル酸塩 ^g	0～6mg/kg 体重
	グルコン酸塩 ^g	0～50mg/kg 体重
鉄 ^e	グアニル酸塩 ^g	特定しない
	炭酸水素塩	特定しない
マグネシウム ^f	イノシン酸塩 ^g	特定しない
	ラウリン酸塩	特定しない
カリウム ^b	DL-リンゴ酸塩 ^{g, h}	特定しない
	ミリスチン酸塩	特定しない
ナトリウム ^{b, d}	オレイン酸塩	特定しない
	パルミチン酸塩	特定しない
	リン酸塩 ^{d, g}	70mg/kg 体重 ^e
	ケイ酸塩 ^g	特定しない ^j
	ソルビン酸塩 ^g	0～25mg/kg 体重
	ステアリン酸塩	特定しない
	コハク酸塩	特定しない
	硫酸塩 ^f	特定しない
	亜硫酸塩 ⁱ	0～0.7mg/kg 体重

¹ この表は JECFA が受領した化合物に関する情報ならびに以前の報告で発表した情報を統合したものである。この表は JECFA が規格を制定している化合物にのみ適用される。

- ^a リン酸アルミニウムナトリウムの暫定 ADI (0～6mg/kg 体重) の適用範囲を拡大して、追加されたすべてのアルミニウム塩に適用されるようにするとともに、その ADI はアルミニウム含有量 (0～0.6mg/kg) に基づいた数値とすべきである。
- ^b 食品への関与について評価を行い、容認可能であると判断される場合には制限を設けない。
- ^c 設定された最大耐容一日摂取量は 70mg/kg 体重 (リンとして) であり、これは食品中のリン酸塩およびポリリン酸塩の総量に対して適用される。JECFA はかつてカルシウム塩に関して、食物中のカルシウム／リン比についての懸念、ならびに栄養的に正常な比率を維持することの望ましさを表明していた。
- ^d 乳児食品における使用。
- ^e 鉄の暫定最大耐容摂取量 (1 日あたり 0.8mg/kg 体重) は、着色料として使用される酸化鉄、妊娠中および授乳中の鉄分補充、特定の臨床的必要性による鉄分補充を除くすべての原料に由来する鉄に適用される。
- ^f 緩下作用のため摂取量が制限されている。
- ^g 遊離酸も含む。
- ^h きわめて幼い乳児の食物には添加しないこと。
- ⁱ JECFA が第 17 回会議報告および第 27 回会議報告において示した亜硫酸塩に関する勧告を参照のこと。
- ^j これらの塩は水に不溶性であり、有意な量のケイ酸塩が食物中に存在することは予想されないため ADI は設定しなかった。アスベスト様繊維については特別の検討を要する。

表 4 各種陰イオン/陽イオンについての評価結果一覧

陽イオン	アルミニウム	JECFA はかつてアルミニウム塩の使用に関する懸念を表明していた。その内容は、(a) 食物中のアルミニウム含有量に関する情報の不足、(b) ヒトを対象とした吸収試験および代謝試験ならびに（実験動物での）短期給餌試験、多世代生殖試験などのさらなる安全性データの必要性であった。食物中のアルミニウム量に関する情報は不十分であることが JECFA に報告された。報告された数値は数 mg/日～100mg/日の範囲に及んでいる。しかしながら、分析方法の改良に伴い、以前と比べて意味のあるデータが得られるようになりつつある。 限定的なものではあるが、摂取されたアルミニウムの吸収に関する新たな情報が発表された。試験の食物中のアルミニウム量を食品中のアルミニウム量と同等にして実施した最近の臨床試験では若干の吸収が認められ、そのため血清アルミニウム値がごくわずかに上昇し、尿中排泄量が増加した。投与したアルミニウム全量が尿・糞便中に回収されたため、組織内蓄積は報告されなかった。JECFA は以下の 3 点に言及した。(a) 慢性腎疾患患者はアルミニウムイオンの蓄積が増加しており、そのためこれらの患者はアルミニウム摂取量を減らすべきである、(b) アルミニウムは特定の神経毒性疾患の病因に関与していると考えられているが、食物とこれらの疾患との関連を示す決定的な試験は行われていない、(c) クエン酸塩、リン酸塩、フッ化物などの食物中の他の要素はアルミニウムの吸収に影響を及ぼす。JECFA が 1982 年に要請した試験は提出されていなかった。JECFA は、1986 年に見直されるまでリン酸アルミニウムナトリウムについて設定されていた暫定 ADI である 0～6mg/kg 体重（アルミニウムとして 0～0.6mg/kg 体重と同等）を食品に添加されるすべてのアルミニウム塩に適用すべきであると結論づけた。 注：アルミニウムに関しては 2006 年第 67 回 JECFA 会議で情報がさらに更新されている。暫定週間耐容摂取量（provisional tolerable weekly intake ; PTWI）の設定に用いたよりも低い用量で生殖発生毒性が懸念されるところから、それまでに定めたすべてのアルミニウム化合物に関する ADI 及び PTWI を撤廃し、以降、添加物を含む全てのアルミニウム化合物に対して PTWI 1 mg/kg/week（アルミニウムとして）を設定した。さらにバイオアベイラビリティに関する試験、発生毒性試験、神経系への影響をエンドポイントとした多世代繁殖毒性試験などのデータが新たに要求された。
	マグネシウム	マグネシウムは広範囲の食品に存在する必須のイオンである。推定一日摂取量は 180～480mg/日である。推奨一日食事摂取量は、乳児は 50～250mg/日、成人は 200～350mg/日である。 JECFA は、マグネシウム塩を食品添加物として使用することにより緩下作用が生じる可能性があることを懸念していた。この作用は浸透圧による腸内腔への水の吸収によって生じることが考えられるが、消化管ホルモンであるコレシストキニン・パンクレオザイミンの放出により胃腸管の運動および分泌の活動性が亢進したことが原因である可能性の方が高い。最小有効量はマグネシウム塩のマグネシウム成分約 1,000mg である。しかしながら、緩下作用が生じるのはマグネシウム塩を一度に投与した場合に限られており、これより低用量の場合にホルモン活性にその他の影響が生じるか否かは不明である。また、乳児はマグネシウム塩の鎮静作用に対する感度が特に高く、慢性腎機能障害患者では投与されたマグネシウムの 15%～30%が貯留され、それにより毒性問題が生じる場合があることについても言及された。JECFA は、上記の注意事項を考慮する限り、マグネシウム塩の食品添加物としての使用は容認できると結論づけた。
	鉄	鉄化合物については JECFA が 1983 年に検討し、鉄の暫定最大耐容一日摂取量を 0.8mg/kg 体重と設定した。JECFA は「この評価は着色料として使用される酸化鉄および水和酸化鉄、妊娠中および授乳中の鉄分補充、特定の臨床的必要性による鉄分補充を除くすべての原料に由来する鉄に適用される」との見解を再度述べた。
陰イオン（酸）	脂肪酸	JECFA は以前、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸の ADI を「特定しない」と定めていた。専門家会議はカプリン酸、カプリル酸、ラウリン酸、オレイン酸も容認される脂肪酸のリストに含まれるようにリストを拡大した。これらの脂肪酸の安全性は、長期にわたって食品または食品成分として使用されている食用油脂に存在する量に基づいている。また、C₄ から C₁₈ までの偶数鎖脂肪酸は酸化されてアセト酢酸およびケトン体を生成することが証明されている。これらの代謝産物は利用されて排泄される。
	コハク酸塩	コハク酸は食品として一般的に使用される動植物の天然成分である。実験動物は食物中の高濃度のコハク酸に対する忍容性を示している。コハク酸は代謝において正常な役割を果たすため、食品添加物として使用される可能性がある量では危害をもたらさない。コハク酸塩成分の ADI は「特定しない」と定められた。
	硫酸塩	硫酸塩は食物の天然成分であり、動物の硫黄代謝産物である。食品添加物としての硫酸塩の使用に関して通常の食事による曝露で何らかの毒性作用が生じることを示唆する情報は存在しない。硫酸塩成分の ADI は「特定しない」と定められた。
※表 4 に示した他の酸は以前に検討されており、ADI が設定されている。JECFA は表 4 に示す情報に基づくこれらの酸の使用は安全であると結論づけた。		

IV. 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針 について」の見直すべき事項について

IV. 「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の見直すべき事項について

1. 背景

厚生労働省は、食品添加物の指定及び使用基準改正の要請手続き、要請に必要な安全性試験成績等の資料の範囲、安全性試験の標準的実施方法について規定するため、平成8年に「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」を定めた。このガイドラインでは、食品添加物の安全性および有効性は科学的に評価されており、評価に際しては JECFA の基準などを参考にするとともに我が国の食品摂取状況などを勘案することが基本とされている。この平成8年ガイドラインは、リスク評価の際、有害性を確認する上で重要な参照資料となると考えられる。

このガイドラインでは、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験（28日間、90日間、1年間）、繁殖毒性試験、催奇形性試験、発がん性試験、1年間反復投与毒性/発がん性併合試験、抗原性試験、遺伝毒性試験、一般薬理試験、体内動態試験の各試験について、標準的な実施方法が明示されており、試験法ガイドラインとして使用されている。しかし、刊行されてから既に10年以上が経過しており、この間に FDA の Redbook をはじめ、ICH 医薬品ガイドライン、OECD の化学物質評価ガイドライン、我が国の農林水産省による「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」や医薬品毒性試験法ガイドライン（以下、医薬品ガイドラインとする）などが相次いで改訂・追加されている。食品添加物と医薬品、農薬などでは用途や使用状況が異なり、また国によっても考え方が異なるが、これらのガイドラインの中には新規の試験方法が追加されたり、試験方法が詳細に記載されているものもあり、食品添加物の安全を担保するにはこれらを参考にした上で食品添加物の試験法ガイドラインも随時見直していく必要がある。

また、リスク評価ガイドラインを構築するにあたり、平成8年ガイドラインは有害性確認の際の重要な指針となるため、国内外の食品添加物の安全性評価に係るガイドラインを収集するとともに、「平成8年ガイドライン」の特に安全性に関する試験の標準的実施方法を中心に、見直すべき点について情報収集を行った。

2. 調査方法

海外で安全性に関するどのような試験が実施されているのか明らかにするため、仕様書ならびに関連資料等から、参考となる海外ガイドラインを収集した（表 5）。また、海外ガイドラインで行われている試験法を比較するため、検討会での意見を踏まえ、「平成 8 年ガイドライン」および各国のガイドラインで実施されている試験法を安全性に関する試験ごとに一覧表にした（Ⅷ. 参考資料）。

比較したガイドラインは、5.（表 5 中の番号）平成 8 年ガイドライン（厚労省の現行のガイドライン）、7. Redbook I（食品添加物の安全評価のための毒性学的原則）、2-1. (1). Redbook 2000、8. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals、11. 医薬品ガイドライン、3-1. EFSA Reports of the Scientific Committee for Food の 6 つを基本とし、必要に応じて農薬のガイドライン等を追加検討した。

さらに、このガイドライン比較表をもとに、検討会委員およびアドバイザーの個別訪問によりヒアリングを行った。ヒアリング実施前にガイドラインの本文を添えて各専門家に送付し、訪問時には、それらの資料をもとに現行のガイドラインで不足している点、改訂した方が望ましい点、新規に追加した方がよい点についてご意見を頂戴した。

後日、ヒアリングで得られた情報を資料として検討会で討議を行った。討議で議論された内容については、今後の検討事項または検討会からの提言として以下にまとめた。

表 5 参考ガイドライン一覧

*基本の6つのガイドラインは網がけで示す。

-
1. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)

[<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/en/index.html>]

 - (1) WHO technical report series (TRS) 中の「General considerations」
(会議開催が1986年以降のもの)
[<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/en/index.html>]
[<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/guidelines/en/index.html>]
 - (2) Guidelines for the preparation of toxicological working papers on food additives.
(December 2002)
 - (3) Guidelines for the preparation of working papers on the intake of food additives.
(January 2001)
 - (4) Guidelines for the preparation of working papers (monographs) on flavouring agents.
(November 2002)
 - 2-1. U.S. Food and Drug Administration

[<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/guidance.html#add>]

 - (1) **Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000)**
(July 2000; Updated October 2001, November 2003, April 2004, February 2006)
 - (2) Summary Table of Recommended Toxicological Testing for Additives Used in Food (June 2006)
 - (3) Estimating Dietary Intake of Substances in Food (August 2006)
 - 2-2. U.S. Environmental Protection Agency
 - (1) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001B March 2005.
Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
[<http://www.epa.gov/IRIS/cancer032505.pdf>]
 - (2) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. EPA/630/R-95/001F April 1998. Risk Assessment Forum (Published on May 14, 1998, Federal Register 63(93):26926-26954)
[<http://www.epa.gov/ncea/raf/pdfs/neurotox.pdf>]
 - (3) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. EPA/630/R-96/009 October 1996.
Published on October 31, 1996, Federal Register 61(212):56274-56322.
[<http://www.epa.gov/nceawww1/raf/pdfs/repro51.pdf>]
 - 3-1. **European Food Safety Authority**

[http://www.efsa.europa.eu/en/about_efsa.html]

Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised

Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic.

{Opinion, Summary, Explanatory}

[http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc_committee/sc_opinions/1201.html]

3-2. Scientific Committee on Food

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/index_en.html]

(1) Guidance on submissions for food additive evaluations by the scientific committee on food

(Opinion expressed on 11 July 2001). SCF/CS/ADD/GEN/26 Final 12 July 2001

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out98_en.pdf]

(2) Reports of the Scientific Committee for Food (Tenth series)

Guidelines for the safety assessment of food additives.

(Opinion expressed 22 February 1980).

(3) Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-ninth series)

Guidelines for the evaluation of flavourings for use in foodstuffs:

1. Chemically defined flavouring substances. (Opinion expressed on 10 December 1991).

4.

Moolenaar RJ: Carcinogen risk assessment: International comparison. Regul Toxicol

Pharmacol 20: 302-336, 1994.

5.

厚生省生活衛生局食品化学課監修：「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」，

日本食品添加物協会，東京，1996年

6. JECFA

林 裕造，小島 康平，竹中 祐典，関澤 純：「食品添加物の安全性評価の原則」，薬事日報社，東京，

1989年

7. FDA Redbook I

米国食品医薬品庁食品局：「食品添加物の安全評価のための毒性学原則」，

厚生省生活衛生局食品化学課，1984年

8. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4:

Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents

Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents

Test No. 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents

Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study

Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study

Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity

Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents

Test No. 452: Chronic Toxicity Studies

Test No. 451: Carcinogenicity Studies

Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies

Test No. 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test

Test No. 476: *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test

Test No. 477: Genetic Toxicology: Sex-Linked Recessive Lethal Test in *Drosophila melanogaster*

Test No. 478: Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test

Test No. 479: Genetic Toxicology: *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells

Test No. 480: Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay

Test No. 481: Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Mitotic Recombination Assay

Test No. 482: Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells *in vitro*

Test No. 483: Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test

Test No. 484: Genetic Toxicology: Mouse Spot Test

Test No. 485: Genetic toxicology, Mouse Heritable Translocation Assay

Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *in vivo*

[<http://caliban.sourceoecd.org/vl=432231/cl=34/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/vln4/contpl-1.htm>]

9.

農林水産省園芸局:農薬の登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産 第8147号農林水産省農産園芸局長通知) 別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」

[<http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/12-8147.pdf>]

[<http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/TG8147.pdf>]

10. ICH Harmonised Tripartite Guideline

(1) Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing) S4 Current Step 4 version dated 2 September 1998

(2) Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals S1A Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 29 November 1995

(3) Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals S1B Recommended for Adoption at Step 4 of the

ICH Process on 16 July 1997

- (4) Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose S1C(R1) Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Addendum on a Limit Dose dated 17 July 1997 incorporated in November 2005)
- (5) Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2) Current Step 4 version Parent Guideline dated 24 June 1993 (Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005)
- (6) Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals S2A Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 19 July 1995
- (7) Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 16 July 1997
- (8) Immunotoxicology Studies for Human Pharmaceuticals S8 Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 15 September 2005
- (9) Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 8 November 2000

[<http://www.pmda.go.jp/ich/safety.htm>]

11. 医薬品毒性試験法ガイドライン

- (1) 「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」 薬新薬第 88 号 平成 5 年 8 月 10 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s4_93_8_10.pdf]
- (2) 「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」 医薬審第 655 号 平成 11 年 4 月 5 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s4a_99_4_5.pdf]
- (3) 「医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について」 薬審第 316 号 平成 9 年 4 月 14 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s5a_s5b_97_4_14.pdf]
- (4) 「医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について」 医薬審第 1834 号
平成 12 年 12 月 27 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s5bm_00_12_27.pdf]
- (5) 「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインについて」 医薬審第 1607 号 平成 11 年 11 月 1 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/Carcinogenicity_99_11_1.pdf]
- (6) 「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」 医薬審第 1604 号 平成 11 年 11 月 1 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/Genotoxicity_99_11_1.pdf]
- (7) 「安全性薬理試験ガイドラインについて」 医薬審発第 902 号 平成 13 年 6 月 21 日
[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s7a_01_6_21.pdf]
- (8) 「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて」 薬食審査発第 0418001 号

平成 18 年 4 月 18 日

[http://www.pmda.go.jp/ich/s/s8_06_4_18.pdf]

(9) 「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」 医薬審第 496 号 平成 10 年 6 月 26 日

[<http://www.nihs.go.jp/mhlw/tuuchi/1998/980626/980626.pdf>]

3. 調査のまとめ ～原則～

(1) 方針

基本的には現行の「平成8年ガイドライン」に記載されている試験法を踏襲するが、国際的標準化や動物愛護の観点、我が国の実情や実行可能性などを考慮し、見直すべき事項を検討すべきである。

(2) 原則

現行の「平成8年ガイドライン」は、天然・合成を区別せず、香料、酵素などの微生物由来物質も含め定義に当てはまるもの全てについて適用を考慮すべきである。また近年 JECFA の会議でも話題となっているやナノ粒子など新技術に由来するものにも適用できるか検討すべきである。

(3) 参考資料

原理・原則は JECFA の評価法を基本とし、試験法などの詳細は FDA の Redbook を参考にするべきである。

4. 調査のまとめ ～各安全性に関する試験項目について～

(1) 共通項目

① 動物種

毒性試験と代謝試験で同じ動物種を使用したほうがよいとの見方もあるが、試験が1つの動物種に偏る可能性もあるため、ヒトへの外挿可能性なども考慮し総合的に判断する必要がある。

② 動物数

動物実験の原則 3Rs（動物実験の非動物実験への置換 replacement、実験動物数の削減 reduction、実験動物が被る苦痛の軽減 refinement）へ配慮し、必要最低限に留めるべきである。

③ 飼育方法

現行のガイドラインでは、1 ケージあたりの匹数は定められておらず、飼育場所に限りのある日本では、複数飼いが日常的に行われている。しかし、Redbook I では基本的にグループ飼育が推奨されていたが、Redbook 2000 では動物愛護と摂取量などを正確に測定するといった点から1 ケージあたり1 匹という個別飼育に変更された。今後、欧米のガイドラインなどとのハーモナイズが求められるようになれば、国際的基準に合わせていかざるを得ない可能性はあるが、現時点では我が国で個別飼育するのは現実的ではなく、またグループ飼育の方がより自然な状態であるとの見方もあり、基本的にはグループ飼育が妥当と考えられる。海外に申請する場合は既に個別飼育が行われている例もあるが、日本のガイドラインで指定されていない旨や1 匹飼いが妥当とは限らないという点を説明すると概ね海外でも認められている。ただし、グループ飼育すると体温が上昇し、それによって毒性の発現が変化するという神経毒性での報告もあり、特殊な例ではケースバイケースで個別飼育を検討する必要がある。

④ 屠殺方法

近年、日本でも動物実験施設の第三者評価の機運が高まっており、動物実験の計画や結果は第三者評価に耐えうるものでなくてはならない。従って屠殺の際はできるだけ苦痛を軽減する必要があるが、さらに具体的に「麻酔下にて瀉血する」などと明記すべきである。また、瀕死動物は定義と処分方法を記載すべきである。

⑤ 質の担保

十分な質を確保するために、剖検、病理組織学的評価は原則として「十分な経験者、有資格者による実施を推奨する」といった記述を追加する必要がある。

⑥ *in vitro* 試験の導入

最近の状況：

昨今、新規試験法の公定化のためには、開発、バリデーション、第三者評価の手順を経ることが国際的なルールとなっており、日米欧の CVAM (Centre for the Validation of Alternative Methods；動物実験代替法バリデーションセンター) において、主に欧州の化粧品規制や REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals；欧州における化学物質の総合的な登録・評価・認可・制限の制度) に対応できる新しい動物実験代替法のバリデーション、専門家による第三者評価（以後、第三者評価）が進められている。動物実験代替試験法として、既に光毒性、皮膚感作性、腐食性試験については OECD ガイドラインが成立し、内分泌かく乱物質スクリーニングにおいても OECD においてガイドラインの作成が検討中である。その他の肝毒性、生殖毒性、神経毒性などの試験法に関しては、製薬企業がスクリーニングに利用している例はあるが、まだガイドライン化の動きはない。

JECFA の「食品添加物の安全性評価の原則」：

5.1.5 章で *in vitro* 試験の評価について「種々の *in vitro* 試験の結果の間の関連、短期 *in vitro* 試験の組み合わせの結果と *in vivo* 発がん性試験の結果の間の関連はいずれも決して高くない」、「現状、特定の毒性を検出する手段としての *in vitro* 試験の有用性について実験上の不確定性と意見の不一致が多く存在するので、(一部省略) 定められた毒性試験の一環として *in vitro* 試験を一律に要求することは適切でないと考えられる。」と記載されているが、この状況に大きな変化はないようである。

in vitro 試験による完全代替

専門家によると、現段階では、スクリーニングに用いることは可能であるが、*in vitro* 試験は毒性の一面をみているにすぎず、*in vitro* 試験で動物を用いた安全性試験を完全代替することは不可能とのことである。また、*in vitro* 試験では長期毒性は評価できず、偽陽性も多い。*in vitro* 試験のみによる判断では誤った結果を導く恐れがあり、*in vitro* 試験を行った場合でも、リスク評価のためにはその後動物試験も行うことは必要と考えられる。2007 年 5 月にブリュッセルで開かれた ICH 会議の CVAM グループの会合においても、

in vitro 試験のみで医薬品の安全性を判断するのはまだ早急であるとの意見で一致している。

対応策：

現段階では原則として *in vivo* 試験の実施を基本とするが、動物実験の 3Rs への配慮から、動物数の削減や実験動物の苦痛の軽減に努めるとともに、公的なガイドラインで採用された *in vitro* 試験をスクリーニングとして使用することを心掛けることが望ましい。また各安全性に関する試験項目において、その手法を紹介することは重要である。

(2) 単回投与毒性試験、反復投与毒性試験（28 日間、90 日間、1 年間）

① 動物数

28 日間反復投与毒性試験については、日本および OECD ガイドラインでは動物数が 1 群雌雄 5 匹とされているが、FDA では Redbook I、Redbook 2000 とともに 1 群雌雄 10 匹と多い。同様に 90 日間反復投与毒性試験についても、日本および OECD では 1 群雌雄 10 匹となっているが、Redbook では 1 群雌雄 20 匹となっている。Redbook で動物数が多い根拠を調べる必要はあるが、日本における現行の動物数で問題はないと思われ、また動物愛護の観点からも動物数を増やすことには疑問が残る。

② 試験期間

現行のガイドラインにおいて、慢性毒性試験の投与期間は原則として週7日、1年以上とされている。しかし、米国でも Redbook I で少なくとも1年となっていたのが、Redbook 2000 では12ヶ月間と実質短縮された記載に変更されている。また ICH での「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」(M3) および「動物を用いた慢性毒性試験の期間についてのガイドライン」(S4) の合意をうけて、厚生労働省の医薬品ガイドラインにおいても平成11年4月5日付の通知により、慢性毒性試験の期間がげっ歯類に関しては12ヶ月から6ヶ月に短縮された。この背景は1991年に開かれた ICH の第 1 回会議において、3極（日本、米国、EU）での慢性毒性試験の方法について評価がなされ、げっ歯類については、6ヵ月というハーモナイズされた投与期間を支持するとの科学的合意が得られたことにある。詳細は「動物を用いた慢性毒性試験の投与期間について」

http://www.pmda.go.jp/ich/s/s4a_99_4_5.pdfを参考にされたい。このような動きを考慮すると、食品添加物に関しても、げっ歯類に関しては、慢性毒性試験の投与期間の短縮を検討してもよいと考えられる。

参考

【動物を用いた慢性毒性試験の投与期間について】

1991年に開かれた第1回日米EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）において、3極（EU、日本、米国）での慢性毒性試験の方法について評価がなされ、げっ歯類については、6ヵ月というハーモナイズされた投与期間を支持するとの科学的合意が得られた。しかし、非げっ歯類を用いた慢性毒性試験の投与期間に関しては合意に達しなかった。

投与期間がハーモナイズされていないために、製薬会社は新しい医薬品を開発する際に、一部で6ヵ月と12ヵ月の両方の試験の実施を余儀なくされている。ICH の目的としては、医薬品の開発において人々の健康を守るための保護的役割を維持する一方、試験の重複を避けるか、あるいは減らして、物的資源および動物、ヒトを含めた生物資源のより経済的な使用を確保することにあるので、さらなる科学的評価がなされた。

EU、日本、米国の行政当局の各々が、非げっ歯類の慢性毒性試験について単一の投与期間を設定できるかどうかを決めるための再評価を行った。その分析結果から、16事例において6ヵ月と12ヵ月のデータをさらに詳細に評価すべきことが判明した。

この評価は、3極の当局側担当委員の合同審議・評価の形で実施された。

3極の会議において解析に供せられたいくつかの事例で、12ヵ月において追加すべき所見は得られなかった。他のいくつかの事例では、投与期間の差のみにより6ヵ月と12ヵ月の所見に差が生じたと結論できるかどうか、試験のデザインと内容の比較に関して、行政担当者間で完全な一致が得られなかった。

多くの事例において、12ヵ月で観察されたが6ヵ月では観察されなかった所見があった。それらの所見は9ヵ月の試験では検出できていたであろうと結論された。異なった投与期間の試験でみられた所見の違いについていろいろな見解があることが明らかとなった。これらの所見の臨床上的意義については意見の一致をみるには至らなかった。

12ヵ月間の試験は通常必要ではなく、9ヵ月よりも短い期間の試験でも十分な場合もある。

EU においては、改訂された Council Directive 75/318/EEC に基づいて、非げっ歯類では、6ヵ月間の試験でもよい。重複をさけるため、それよりも長い期間の試験が実施されている場合には、6ヵ月の試験を実施する必要はない。

③ 一般状態

現行のガイドラインでは、体重および摂餌量の測定は「投与開始前および投与開始後 3 ヶ月までは少なくとも週 1 回、その後は少なくとも 4 週に 1 回」とされているが、Redbook I、Redbook 2000 ともに「試験期間中は少なくとも週 1 回」となっており、参考にすべきである。

④ 血液検査、血液生化学的検査

現行のガイドラインでは、「げっ歯類では剖検前に、非げっ歯類では投与開始前、投与開始後 3 ヶ月ごとおよび試験終了時に採血して検査」となっている。一方、Redbook I では「被験物質の投与前、試験開始後 3 ヶ月毎及び試験期間の終了時」とあるのに対し、Redbook 2000 では「試験の最初の 2 週間、ならびに 3、6 および 12 カ月目に実施する。」と検査回数が増加している。検査項目も、たとえば肝機能障害の評価であれば「アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ (AST)、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸」の 5 項目のうち、少なくとも 3 項目は検査する、などにより細かく規定されている。ガイドラインの改訂にあたっては、日本でもより詳細にする必要があるのか検討が必要である。

⑤ 免疫系影響評価

免疫毒性試験欄を参照。

⑥ 神経系影響評価

神経毒性試験欄を参照。

(3) 繁殖（生殖）試験、催奇形性（発生毒性）試験

生殖発生毒性試験に関しては、現行の食品添加物のガイドラインは現実的なものとなっている。FDA の Redbook は催奇形性試験と繁殖毒性試験を組みあわせて同時に実施するような複雑な試験となっており、試験自体の規模が大きくなる。この手法は個別の試験を一つ一つ行うよりも費用が安くなる可能性もあるが、現実的には特定のエンドポイントに対して非常に強い毒性を惹起する被験物質の場合には投与量設定が難しくなることも想定される。農薬のガイドラインのように個別に試験を行う方が現実的と思われる。

実際に Redbook に記載されている試験について試験費用、試験経験の有無等について調査して、試験実施可能な受託機関の数、得られたデータの信頼性等について調査する必要がある。経験の少ない試験を新たに採用するのであればその導入については慎重に検討する必要がある。

① 催奇形性試験

催奇形性試験に関する試験法はほぼ確立されており、検査項目について変更する必要はないと考えられる。ただし最新の OECD のガイドラインでは、内分泌攪乱による生殖器系への影響をみるため投与期間が器官形成期だけでなく妊娠末期までに延長されており、農薬についてはすでにこの投与期間で実施されているため参考となる。奇形、変異及び発育遅延の分類基準については、議論のあるところであるが、用語の統一が図られているため、これらの情報は収集しておく必要がある[Teratology 55, 249-292, 1997;抄録番号 312、Reprod toxicol 13, 77-82, 1999;抄録番号 313、Reprod toxicol 15, 713-721, 2001;抄録番号 314、Reprod toxicol 17, 625-638, 2003;抄録番号 315]。

② 繁殖試験

現行のガイドラインでは「繁殖試験」という用語が使用されているが、「繁殖毒性試験」への変更を検討することが望ましい。

③ 二世世代繁殖試験

F0 動物の交配前投与期間について、食品添加物に関する試験では雌で2週間以上、雄で8週間以上となっている。農薬の試験ガイドラインおよび OECD ガイドラインでは雌雄で10週間以上となっている。交配前投与期間について、農薬、OECD ガイドラインと合わせる必要がないか否かについては検討の必要がある。また、OECD の二世世代繁殖試験では、F1 の離乳時に原始卵胞数を検査するなどが追加されているので、原始卵胞の測定について情報収集をしておく必要がある。場合によってホルモンの測定が必要となることがあるが、その

測定には高額な費用がかかる。最近の論文で、繁殖毒性試験におけるこれまで調べられている指標により、ホルモンへの影響が検出可能であることが報告されており、参考にすべきである (J Toxicol Sci, 30 Special issue, 163-188, 2005;抄録番号 338)。調べられている指標には、肛門・生殖結節間距離、乳頭発育、性成熟、性周期、精子形成、血中ホルモン濃度、器官重量がある。

最近、2世代繁殖試験で検出される毒性指標は1世代繁殖試験で検出可能であり、1世代繁殖試験は2世代繁殖試験に代替可能であるとの論文が公表され (Reprod Toxicol, 24, 97-102, 2007;抄録番号 322)、2008年のSociety of Toxicologyにおいても話題となっており、引き続きこの点について情報収集をする必要がある。

2007年11月にOECD 426 発生神経毒性試験ガイドラインが最終化された。2世代繁殖毒性試験、神経毒性試験の結果次第では当該試験を実施する必要性が生じられる。当該試験についての情報を収集しておく必要がある。

(4) 発がん性試験

① 動物種

現行のガイドラインでは、げっ歯類 2 種以上（通常ラット、マウスまたはハムスターが用いられる）とされているが、FDA や OECD ではハムスターの記載はなく、削除を検討してもよいと思われる。

② 用量段階

現行のガイドラインにおいて、最高用量は「腫瘍以外の原因で対照群に比して有意に死亡率が増加せず、毒性影響が認められる用量」とされている。しかし、医薬品ガイドラインでは 90 日間反復投与毒性試験の最大耐量 (MTD) 以外の根拠も記載されており、参考となる。平成 8 年に通達された「医薬品のがん原性試験のための用量選択のガイダンスについて (http://www.pmda.go.jp/ich/s/slc_96_8_6.htm)」では、高用量選択の基準として、1) 毒性学的指標すなわち MTD、2) 薬物動態学的指標すなわち 25 倍の AUC 比 (げっ歯類: ヒト)、3) 用量を制約する薬力学的作用、4) 吸収の飽和する量、5) 投与可能最大量、その他の指標が列挙されている。

③ 血液検査、血液生化学的検査、尿検査

現行のガイドラインでは血液検査のみ定められているが、「医薬品のがん原性試験ガイドライン」では、必要に応じて採血するということになっており、このような動向も参考になる。また血液生化学的検査や尿検査も「必要に応じて」という形で盛り込むとよいと思われる。

(5) 1 年間反復投与毒性/発がん性併合試験

併合試験は、同時に 2 つの毒性を確認できるといった利点もあり、今後にも必要に応じて行うとよいと思われる。

(6) 抗原性試験

Redbook 2000 には、アレルギー性のことや即時型アレルギーのことは触れられておらず、ごく一部しか掲載されていない。しかし、抗原性試験に関しては 20 年前から大きな進歩はないのが現状であり、新たに追記できることがあるか検討する程度にとどまると思われる。表示等、リスク管理の範囲で対応しているのが現状と考えられる。

① 用語

現行のガイドラインでは抗原性という言葉が使用されているが、医薬品ガイドラインなどではアレルゲン性という言葉が使用されている。また、「高分子または蛋白質と結合すると考えられる食品添加物」という表現も、「高分子または蛋白質との付加体を生成する食品添加物」の方が適しているとの専門家の意見であり、今後、どちらを採用するかについて検討が必要である。

② 即時型アレルギー試験

現行のガイドラインでは、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) ウサギまたはモルモットにおける同種受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応試験、3) 感作マウス血清におけるラット PCA 反応試験の 3 試験が列挙されているが、現在のところ即時型アレルギーを判定する予測率の高い方法は確立されていないとのことである。検討会において、即時型試験は実施しても意味がないのであればやらないほうがよいという意見と、有効な方法がないからといって全く実施しないというわけにはいかないという意見があったが、いずれの場合も消費者を納得させられる説明が必要であり、今後議論が必要である。

③ 遅延型アレルギー試験

遅延型アレルギー試験の方法としては、現在 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またはリンパ節反応試験が挙げられている。モルモットにおける接触皮膚反応試験とマウスにおけるリンパ節反応試験は validate されているため現行のままでよいが、足蹠反応については削除を検討してもよいと思われる。マウス局所リンパ節試験は、通常モルモットを用いる接触皮膚反応試験をマウスで行う代替法で、リンパ節反応試験とほぼ同義である。国際的なバリデーションが既に行われており、海外のガイドラインで採用されているため、導入を検討してもよいと思われる。

④ 光毒性試験

光毒性試験としては皮膚光感作性試験があるが、医薬品でも外用剤のみ行うこととなっており、食品添加物の場合は経口が基本であるため、さらに追加する必要があるかについては議論の余地があると思われる。

⑤ ヒトでの試験

動物実験には限界があり、特にタンパク質によるアレルギーは動物試験では予測不可能なため、ヒトで臨床試験を行うのが一番よい方法である。しかし実際には、食品添加物のヒトでの臨床試験は実施困難と思われるため、記載する場合は「疫学調査やその他のデータなどでアレルゲン性が疑われた場合などに限って試験する」などの限定した記載に留めるのが適切と考えられる。

タンパク質によるアレルギーの評価に関しては、遺伝子組換え食品に導入された新たなタンパク質のアレルゲン性の予測に用いられる手法が参考となる。

参考

【遺伝子組み換え食品に導入されたタンパク質のアレルゲン性予測に用いられる手法】

遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準より抜粋

4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（抗生物質耐性マーカー遺伝子を用いている場合にはその遺伝子産物（抗生物質代謝酵素）についても評価すること。）

次の（１）から（４）までの事項から総合的に判断して安全性が確認されること。なお、（１）から（４）までの事項で判断できない場合には、（５）の事項を含め、総合的に判断して安全性が確認されることが必要である。また、合理的な理由がある場合には、一部を省略することができる。

（１）挿入遺伝子の供与体（抗生物質耐性マーカー遺伝子供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかにされていること。

（２）遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること。

（３）遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

以下の①から③の処理によって、遺伝子産物（タンパク質）の分子量、酵素活性、免疫反応性等が変化するかどうか明らかにされていること。分子量は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって示されていること。免疫反応性は処理前の遺伝子産物（タ

ンパク質) に対するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティング法及び ELISA法あるいはこれらと同等の方法によって示されていること。

- ① 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理
- ② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理
- ③ 加熱処理; 加熱条件はヒトが経口摂取する際に処理される場合と同等の条件で行う。

(4) 遺伝子産物 (タンパク質) と既知のアレルゲン (グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む。以下アレルゲン等。) との構造相同性に関する事項

遺伝子産物 (タンパク質) について、既知のアレルゲン等と一次構造を比較し、既知のアレルゲン等と構造相同性を有しないこと (抗原決定基 (エピトープ) を示す可能性のある配列を明らかにするためには、アミノ酸配列に関する相同性検索などを実施する必要がある。)。その際、用いたアレルゲンデータベースの名称、検索条件、検索方法、検索結果を明らかにすること。

(5) 遺伝子産物 (タンパク質) の IgE 結合能の検討

(1) から (4) までの事項等により、ヒトの健康を損なう恐れがないと判断できない時は、遺伝子産物 (タンパク質) の IgE 結合能を検討すること。

使用するアレルギー患者血清の選択は、下記の①から④のいずれかで行う。

- ① 挿入遺伝子の供与体がアレルギー誘発性を持つ場合はその供与体に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清、
- ② 既知アレルゲンとの構造相同性が認められた場合は当該アレルゲンを含む生物に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清、
- ③ 既知のアレルゲンとの構造相同性が示されないが、上記 (1) ~ (3) の項目で、アレルギー誘発性を否定しきれない場合は、遺伝子供与体の近縁種生物に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清、
- ④ ①から③で適切な血清が得られない場合は、主要なアレルゲン (卵、ミルク、大豆、米、小麦、そば、たら、えび及びピーナッツ) に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清を用いる。

挿入遺伝子の供与体がアレルギー誘発性を持つ場合で、遺伝子産物 (タンパク質) に対するアレルギー患者血清を用いた IgE 結合能の検討で陰性結果が得られたものの、なお安全性の証明が十分ではないと考えられた場合は、皮膚テストや経口負荷試験などの臨床試験データが必要とされる。

(7) 変異原性（遺伝毒性）試験

現行のガイドラインでは、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、3)げっ歯類を用いる小核試験を実施することが明記されている。これらの試験を補足する場合の試験法として、1)遺伝子突然変異を指標とする試験、2)染色体異常を指標とする試験、3)DNA 損傷を指標とする試験について例示されている。

① 基本となる *in vitro* 試験

in vitro 試験は復帰突然変異試験（塩基レベルでの異常をみるため）と染色体異常試験（染色体レベルでの異常をみるため）の2つは必須である。復帰突然変異試験では推奨される菌株の組み合わせは決まっており、ICH(S2A、医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンスについて、http://www.pmda.go.jp/ich/s/s2a_96_7_2.pdf)に従う形で問題ないと考えられる。染色体異常試験の代わりにマウスリンフォーマ試験でもよい。検出効率に大きな差はないと考えられている。また、*in vitro* 小核試験について OECD でもガイドライン化が進んでおり、ICH でも染色体異常試験の代替が認められようとしている。

② 追加の *in vitro* 試験

上記2試験のいずれかで陽性であった場合には、コメットアッセイまたは不定期 DNA 合成試験を行って哺乳動物細胞での DNA 損傷性の有無を確認することも重要であると考えられる。これは、特に染色体異常試験では DNA に直接作用しない（染色体分離に関与するタンパクに作用）ものが知られているためである。

③ 基本となる *in vivo* 試験

in vivo で染色体異常を調べるには小核試験が重要である。小核試験は農薬・医薬品では必須であるが、全ての食品添加物で実施する必要があるかは議論の余地がある。*in vitro* の2試験で変異原性がなければ一般的に小核試験はなくても問題ないと思われる。「*in vitro* 試験のいずれかで陽性になったら *in vivo* 小核試験を行う」といった指針も、実験動物の削減の観点から不要な *in vivo* 試験を回避できるという意味で考慮に値する。

④ 追加の *in vivo* 試験

in vivo 不定期 DNA 合成試験やコメットアッセイなども DNA 損傷性を確認する試験として有用である。遺伝毒性の指標、標的組織等を考慮することも必要であろう。塩基レベルでの変化（遺伝子突然変異）を *in vivo* でみる簡便な試験は今のところないが、トランスジェニックマウスやトランスジェニックラットを用いた試験も広がりつつあり、適用可能性

について議論していく必要がある。

(8) 一般薬理試験

一般薬理試験に関しては、現行のガイドラインで比較的網羅されており、大きく変更する必要はないと思われる。平成 8 年に厚労省より通達された医薬品の「安全性薬理試験ガイドライン」(http://www.pmda.go.jp/ich/s/s7a_01_6_21.pdf)が参考となるが、平成 8 年ガイドラインでは、「安全性薬理試験ガイドライン」よりも必須項目が多く、より安全と考えられるため、これ以上の試験項目の追加は必要ないと考えられる。

① コアバッテリー試験

平成 8 年ガイドラインでは、「A. 原則としてすべての被験物質について行う項目で、生体機能に及ぼす影響の全体的な把握を目指した試験」として下記の項目が挙げられている。

- (a) 一般症状及び行動に関する試験
- (b) 中枢神経に関する試験
- (c) 自律神経系及び平滑筋に関する試験
- (d) 呼吸・循環器系に関する試験
- (e) 消化器系に関する試験
- (f) 水及び電解質代謝に関する試験
- (g) その他の重要な作用に関する試験

このうち、(a)、(b)および(d)については、「安全性薬理試験ガイドライン」でも必須として実施されており、生命の維持に必須の機能を検討する試験のため、このまま A とすることが望ましい。(c)、(e)、(f)は「安全性薬理試験ガイドライン」では実施されていないが、経口で投与されるという食品添加物の性質上、消化器系及び平滑筋に関わる(c)と(e)はこのまま A として良いと考えられる。しかし(f)は、「安全性薬理試験ガイドライン」でも補足的試験に含まれており、食品添加物に関して医薬品よりも厳しくする理由が見あたらないため、フォローアップ試験への移行を検討する必要がある。

② フォローアップ試験

平成 8 年ガイドラインでは、「B. A の試験結果より判断して、必要に応じて行う試験」として項目が設けられているが、コアバッテリー試験の(f)をフォローアップ試験に移行するか否かという点以外は、大きな変更は必要ないものと考えられる。

(9) 体内動態試験

体内動態試験に関しては、現行のガイドラインで比較的網羅されており、大きく変更する必要はないと思われる。FDA でも 1993 年の Redbook II から変更はなく、Redbook 2000 でも 1993 年のガイドラインが準用されている。必要な体内動態試験は被験物質の性質により異なるため、適切な方法を取捨選択して行うという現行の原則で差し支えない。

① 被験物質

現行のガイドラインでは、放射性同位元素について「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」と記載されているが、FDA Redbook I、OECD 417 Toxicokinetics 試験を考慮し、「放射性同位元素(できれば ^{14}C)による標識位置は、被験物質の生体内運命に最も多くの情報が得られる位置にする。」というところまで記載するかどうか検討する必要がある。また、FDA では「Summary table of recommended toxicological testing for additives used in food June 2006」(<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opatxgui.html>、翻訳ガイドライン 2-1. (2))に記載されているとおり、添加物の摂取量と化学構造に基づくコンサーンレベルで物質を 3 クラスに分けており、このようにレベルによって行うべき試験の範囲を検討する必要がある。生体内成分として存在し、かつ曝露量の少ないものについては、試験項目の軽減も一案と考えられる。ただし、その際判断を伴う部分については基準を明確にしておく必要がある。

② 投与経路

現行のガイドラインでは、「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」と記載されているが、FDA Redbook I、II、OECD 417 Toxicokinetics 試験では静脈内投与等の前に「正確な吸収率算出等のため」と記載されており、目的を明示するかどうか検討する必要がある。

③ 投与回数

反復投与も基本的には行うべきであるが、明らかに蓄積性がなく、生体内成分として存在するものの一部については不要と思われる。投与期間については、代謝の試験の結果が毒性試験の結果の解釈にも用いられるため、毒性試験の試験デザインを考慮して柔軟に対応する必要がある。

④ 検討項目

現行のガイドラインでは、「生物学的半減期、クリアランス、分布容積および生物学的利用能などの体内動態に関するパラメータを必要に応じて求める」とされているが、パラメータとして最高血中濃度 (C_{max})、最高血中濃度到達時間 (T_{max})、血中濃度一時間曲線下面積 (AUC)、平均滞留時間 (MRT) についても考慮が必要である。AUC、MRT は FDA Redbook II に記載、それ以外は非臨床薬物動態試験ガイドラインに記載されている。また、FDA Redbook I、II では反復投与試験で、吸収、分布、代謝、排泄の誘導及び阻害が検討されており、参考となる。

⑤ 主要代謝物の扱い

現行のガイドラインでも代謝、排泄の項に記載されているが、主要代謝物については試験を行うように記載したほうがよいと思われる。その際の主要代謝物とする基準として、被験物質の投与量の 10%以上となる物質とすることが妥当かどうかは議論の余地がある。Redbook II では投与量の 1%以上となる主要代謝物について動態試験を行うことが推奨されている。また、医薬品ガイドラインでは、ヒトで実験動物より生成量が多い主要代謝物で 10%以上となるものについては試験を行うとされている。反応性代謝物の生成を推定するためには、被験物質投与前後で内因性チオール化合物（グルタチオン等）濃度を測定することや被験物質の蛋白質、DNA 等生体高分子への共有結合能を測定することが有用とされており（FDA Redbook I、OECD 417 Toxicokinetics 試験）、参考となる。

⑥ 検討項目（代謝）

主要代謝物に関する記載例として「主要代謝物についても AUC、分布容積、消失半減期、等の基本的なパラメータを算出する（特に、下記の場合）

- 1) 代謝の程度が著しく、代謝物の測定が曝露評価の唯一実地的な手段である場合
- 2) 代謝物の消失速度が遅く、蓄積性が懸念される場合
- 3) 代謝物に毒性が懸念される場合」などが挙げられる。

⑦ 検討項目（*in vitro*試験）

海外ガイドラインを参考に、*in vitro* 試験を独立の項目として設けるかどうか議論を要する。記載の一例として、「ヒト及び動物の器官、ホモジネート、細胞懸濁液、細胞画分（S9 やミクロソーム等）の試料を用いた *in vitro* 試験は、以下の情報を得るために有用である。腸管（腸内細菌を含む）での分解、代謝経路及び関与する酵素分子種の同定、酵素活性への影響、細胞膜透過性、蛋白質等への結合性、生体高分子への付加体形成、等。

特に代謝酵素のミカエリス定数 (K_m)、最大代謝速度 (V_{max}) を求め固有クリアランスを算出するのに有用である。また、ヒト及び動物間で代謝の程度及び代謝物を比較することは、ヒトへの外挿性や毒性発現機構の解明に有用である。」などが挙げられる。FDA Redbook II では同様の項目が設定されており、*in vitro* 試験の有用性については EFSA、OECD 417 Toxicokinetics 試験で記載されている。

⑧ 検討項目（その他代替法）

近年、ヒト型の代謝様式を示すヒト肝キメラマウスが開発されており、医薬品開発分野をはじめ期待が大きい。ただし、まだ実験用マウスの安定的な作成段階であり、試験委託サービスはあるもののコストは非常に高いものと思われる。将来的には体内動態試験での使用を検討する必要があると考えられる。ヒトや動物間の代謝の程度、代謝物の比較は、ヒトへの外挿性や毒性発現機構の解明に有用である。

(10) 免疫毒性試験

免疫毒性に関してはEPA TSCAのガイドラインをはじめとして様々なガイドラインがあるが、ICH 医薬品ガイドライン（S8）は昨年まとまったばかりで一番新しく、今までのガイドラインの内容が集約されているので参考となる。Redbook II では免疫毒性試験が細かく規定されているが、詳細すぎると思われる。現行の「平成8年ガイドライン」では、個別の項目を設けず28日間試験、90日間試験、1年間試験で免疫系の検査について記載されている（血液検査、病理組織学的検査）。免疫毒性に関するパラメータとしては特に洩れているものはないが、免疫毒性が注目され始めたばかりの頃に作成されており、記述もRedbook Iをそのまま採用しているため、現実に沿う形で改訂が必要である。抗原性と同様免疫毒性については関心が高まっており、今後より厳しい基準が求められる可能性があるため、慎重に議論しなければならない。

① 免疫学的評価

現行のガイドラインでは反復投与毒性試験（28日間試験、90日間試験）の欄に「胸腺、脾臓とリンパ節／リンパ様組織については必要により免疫組織化学検査を行い、免疫毒性が疑われた時は、更に、骨髓構成細胞比、脾リンパ球組成、NK細胞活性についても検査することが望ましい。」とあるが、「適切な免疫機能試験等を追加して行うことが望ましい。」程度の記述でよいのではとの見方もある。骨髓、リンパ球の試験は大体行うが、NK細胞は必要な場合とそうでない場合がある。医薬品ガイドラインでは抗体産生試験が盛り込まれており、通常の場合の第一選択になっている。ただし、抗体産生試験の方は抗原による免疫が必要となる。他の記述に関しては現在のままで特に変更する必要はないと思われる。

② 生殖発生毒性試験における免疫学的評価

生殖発生毒性試験で免疫系への影響を評価しなくても、何らかの影響がある場合は反復投与毒性試験の高用量投与時に評価できると思われる。感度は高まるが、ICHでも記述されていないことから、現時点では特に生殖発生毒性試験で評価する必要はないと考えられる。

③ 段階的アプローチ

ICH 医薬品ガイドラインでは、2.1.2 薬理学的性質、2.1.3 適応患者集団、2.1.4 構造類似性、2.1.5 薬物の分布の項で、これらの項目から免疫毒性が懸念される場合にも、免疫毒性試験（追加の免疫機能試験）を行うといった記述になっている。最初の段階で全ての免疫毒性試験を行う必要はないと考えられるため、「通常の亜急性毒性試験のパラメータで、

異常がみられた場合はさらに精査すべき試験を行う」といった文章を追記するかどうか検討が必要である。精査に必要な試験について反復投与毒性試験の欄に記述するのか、別に章を設けて記載するのかについては議論の分かれるところであるが、Redbook II や医薬品ガイドラインでも 1 つの章として取り扱われており、このような情勢を念頭に置く必要があると思われる。ただし、独立した 1 章を設ける場合は、反復投与毒性試験の章と重複した内容を記述するのは避けるべきである。

(11) 神経毒性試験

現行のガイドラインでは、個別の項目を設けず 28 日間試験、90 日間試験、1 年間試験で神経系の検査について記載されている（一般状態、病理組織学的検査、その他の機能検査）。海外のガイドラインとしては Redbook 2000、OECD 424 Neurotoxicity Study in Rodents が参考となるが、Redbook 2000 では原則が述べられているのに対し、OECD 424 では各論が述べられておりタイプが異なる。Redbook は裁量が認められているという点では柔軟性があるが、逆に日本での運用には向かない可能性がある。OECD では曖昧さが排除されマニュアル的であり、ユーザーにとっては使いやすい。実務的で日本に向いていると思われるが、すべての化合物に関してこれだけの試験を行うのは大変な部分もある。いずれも長所と短所があるので、日本のガイドラインを作成するにあたりどちらの様式をとるか、両方盛り込んでいくのかといった点については今後検討していく必要がある。

① 神経学的評価

現在のガイドラインでは反復投与毒性試験（28 日間試験、90 日間試験）の欄に「被験物質の投与によると考えられる神経症状の発現がみられた場合、一部の動物に対して灌流固定法により固定を行い、前脳、大脳中央部、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄（頸、胸、腰部）、背根神経節、背根、腹根、近位坐骨神経、腓腹筋について神経病理学的検査を行う」となっており、反復投与毒性試験で神経学的評価を行うことは重要と思われる。OECD 424 では、1 年間の反復投与毒性試験で解析を行うことも選択肢の 1 つとなっている。

② 動物種

ラットのゲノムでは神経疾患関連遺伝子が高度に保存されているため、神経毒性を明らかにするには、マウスよりもラットの方が遺伝子的にも合理性が高いと考えられる。Redbook 2000、OECD 424 ではラットが用いられているので参考にすると良い。通常、反復投与毒性試験ではラットが用いられることが多いので、その場合は特に問題がない。

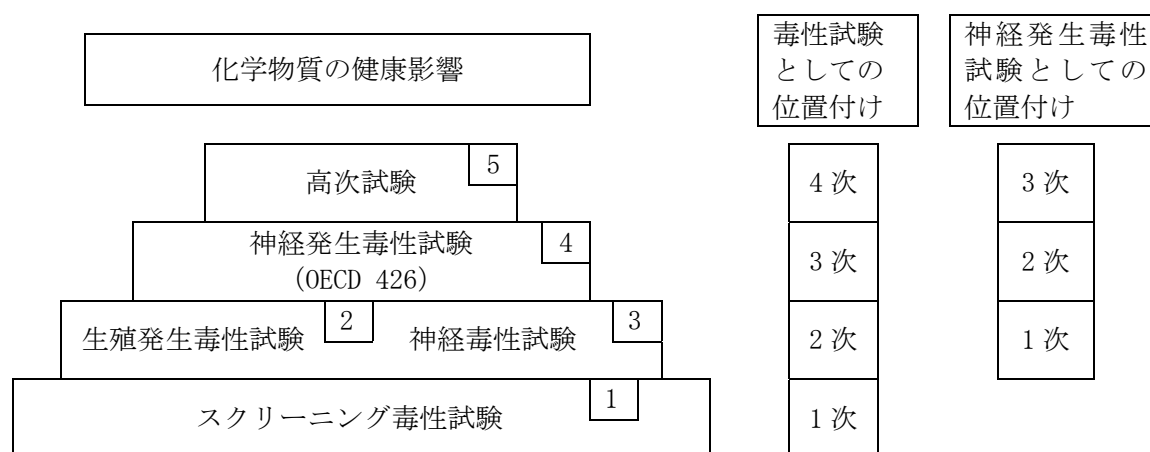
③ 観察方法

医薬品ガイドラインでは、行動学的側面、神経学的側面、自律生理学的側面を観察する方法として Irwin の変法が例示されている (Psychopharmacologia (Berl.) 13,

222-257, 1968;抄録番号 329)。Irwin の変法は一般的に用いられる多次元観察法で、健康状態や行動のスコア化の方法が記載されており、参考になる。

④ 段階的アプローチ

Redbook 2000 の場合、ある物質に関して毒性があるかどうかをスクリーニングし、異常が疑われる場合は詳細に調査する手順となっている。OECD では反復投与試験と併合して実施しても、独立して試験を行ってもよいということになっているが、実際のところ OECD 424 は反復投与毒性試験後の二次的試験と位置づけられているようである（図 8）。我が国においても、最初から全ての検査を網羅的に行うのは現実的ではないため、検討会としては反復投与毒性試験で異常が認められた場合にさらに精査する形が望ましいと考える。精査するために必要な検査項目については、Redbook II では追加すべき試験項目とされていたのが、Redbook 2000 や OECD ガイドラインでは神経毒性試験として 1 つの章が設けられ詳細に記載されていることから、反復投与試験とは別の章に具体的な試験方法などを記述するのが適当と考えられる。なお、本アプローチの採用に当たっては、どのようなフローに基づいて次の段階に進むのかについて、十分に検討する必要がある。



- 1 : 28 日反復投与毒性試験 (OECD 407) + 遺伝毒性試験 (OECD 471, 472, 473)
 2 : 出生前発生毒性試験 (OECD 414) + 2 世代繁殖毒性試験 (OECD 416)
 3 : げっ歯類の神経毒性試験 (OECD 424)
 4 : 神経発生毒性試験 (OECD 426)
 5 : より高次の発生神経毒性試験

谷村 孝、第 45 回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム（2005 年 7 月）を改変

図 8 OECD ガイドラインにおける神経発生毒性試験の位置付け

(12) その他の試験（子宮内曝露相における試験）

FDA は、コンサーンレベルが最高のものについては（例えば、累積曝露量が 1 ppm あるいはそれ以上の直接食品添加物、食品接触物質）、げっ歯類で実施するがん原性試験あるいは慢性毒性試験に子宮内曝露相を含めることを勧告している。それを反映して、FDA の Redbook 2000 では「子宮内曝露相を加えたげっ歯類のがん原性試験あるいは慢性毒性試験」という項が新たに設けられた。ここでは、試験する食品材料をこの試験動物に所定の試験期間、規則的に反復経口投与したとき、がんの発現頻度および/あるいは慢性病変（例えば、グルコース耐性の変化、糖尿病、心血管性障害）を増加させる発達早期の作用を試験食品材料が有するかを決定するためにデザインされている。ハイリスク集団への配慮（p46、Ⅲ(3)②妊婦・胎児の項を参照）とも関連して、今後我が国でもこのような試験を採用する必要があるのかどうか検討する必要がある。試験の詳細については FDA Redbook 2000 の翻訳を参照されたい。

V. 食品添加物のリスク評価に参考となる海外ガイドラ インの翻訳

V. 食品添加物のリスク評価に参考となる海外ガイドラインの翻訳

海外ガイドラインに関しては、仕様書に基づき、指定の 15 ガイドラインおよび文献を翻訳した（表 6）。なお、1(1)の JECFA general considerations については、検討会での検討に基づき、動物用医薬品と contaminants に関連するレポートおよびレポートの一部は翻訳の対象外とした。また、2-1(1)の FDA Redbook については、Redbook 2000 でファイナライズされていない一部の章に関して、1993 年のドラフト版「Redbook II」を翻訳した。翻訳は事務局内部で検証した上で、委員、アドバイザーをはじめとする各毒性分野の専門家に監修をお願いした。翻訳物については別添とする。

表 6 翻訳ガイドライン一覧

-
1. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)
[<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/en/index.html>]
 - (1) WHO technical report series (TRS) 中の「General considerations」
(会議開催が 1986 年以降のもの) 【以下文献検索データベース上のガイドライン番号 : G1】
[<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/en/index.html>]
[<http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/guidelines/en/index.html>]
 - (2) Guidelines for the preparation of toxicological working papers on food additives.
(December 2002) 【G2】
 - (3) Guidelines for the preparation of working papers on the intake of food additives.
(January 2001) 【G3】
 - (4) Guidelines for the preparation of working papers (monographs) on flavouring agents.
(November 2002) 【G15】
 - 2-1. U. S. Food and Drug Administration
[<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/guidance.html#add>]
 - (1) Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000)
(July 2000; Updated October 2001, November 2003, April 2004, February 2006) 【G4】
 - (2) Summary Table of Recommended Toxicological Testing for Additives Used in Food (June 2006)
【G5】
 - (3) Estimating Dietary Intake of Substances in Food (August 2006) 【G6】
 - 2-2. U. S. Environmental Protection Agency
 - (1) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001B March 2005.

Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 【G7】

[<http://www.epa.gov/IRIS/cancer032505.pdf>]

- (2) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. EPA/630/R-95/001F April 1998. Risk Assessment Forum (Published on May 14, 1998, Federal Register 63(93):26926-26954) 【G8】

[<http://www.epa.gov/ncea/raf/pdfs/neurotox.pdf>]

- (3) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. EPA/630/R-96/009 October 1996. Published on October 31, 1996, Federal Register 61(212):56274-56322. 【G9】

[<http://www.epa.gov/nceawww1/raf/pdfs/repro51.pdf>]

3-1. European Food Safety Authority

[http://www.efsa.europa.eu/en/about_efsa.html]

Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic.

{Opinion, Summary, Explanatory} 【G10】

[http://www.efsa.europa.eu/en/science/sc_committee/sc_opinions/1201.html]

3-2. Scientific Committee on Food

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/index_en.html]

- (1) Guidance on submissions for food additive evaluations by the scientific committee on food (Opinion expressed on 11 July 2001). SCF/CS/ADD/GEN/26 Final 12 July 2001 【G11】

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out98_en.pdf]

- (2) Reports of the Scientific Committee for Food (Tenth series)

Guidelines for the safety assessment of food additives.

(Opinion expressed 22 February 1980). 【G12】

- (3) Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-ninth series)

Guidelines for the evaluation of flavourings for use in foodstuffs:

1. Chemically defined flavouring substances. (Opinion expressed on 10 December 1991). 【G13】

4.

Moolenaar RJ: Carcinogen risk assessment: International comparison. Regul Toxicol

Pharmacol 20: 302-336, 1994. 【G14】

VI. 食品添加物のリスク評価に関する学術文献調査

VI. 食品添加物のリスク評価に関する学術文献調査

1. 学術論文の調査・編集方法

(1) 商用データベースによる食品添加物リスク評価に関する学術文献情報の収集

学術文献より有益な情報を収集するため、「データベース: MEDLINE (1950-2006 年)、ToxFile (1965-2007 年)、AGRICOLA (1970-2006 年)、FOODLINE (1972-2006 年)、Food Sci. & Tech. Abs. (1969-2006 年)、EMBASE (1974-2006 年)」の計 7 データベースを用いて検索した。

「食品添加物(検索用語: food additive、food adjunct、food affix、food annex、food augment、food conditioner)」および「リスク評価、安全性評価(検索用語: risk assessment、safety assessment など)」のキーワードを含む総説的文書について、「毒性(検索用語: metabolism、toxicokinetics、immunotoxicity、subchronic toxicity、genotoxicity、chronic toxicity、carcinogenicity、reproduction、developmental toxicity、allergenicity、neurotoxicity、human volunteer、*in vitro* toxicity (genotoxicity 除く) など)」ごとに検索をおこなった(検索式については「図 9 検索式」を参照)。結果は書誌事項と抄録を出力し、一覧表を作成した。検索結果の中から、特に必要と思われた文献については、原報を入手した。

(2) 検索結果のフィルタリング、および、参考文献の整理

検索により得られた内容を査読し必要と思われた文献、および、委員より推奨された文献について抄録を作成し、データベースに参考文献として収載した。

(i)	[食品添加物 (検索用語 : food additive、 food adjunct、 food affix、 food annex、 food augment、 food conditioner)]
and	
(ii)	[総説 (検索用語 : review)] or [ガイドライン (検索用語 : guideline)]
and	
(iii)	[リスク評価 (検索用語 : risk assessment、 risk evaluation など)] or [安全性評価 (検索用語 : safety assessment、 safety evaluation など)]
and	
(iv)	[1997 年以降発行]
and	
(v)	[毒性 (検索用語 : metabolism、 toxicokinetics、 immunotoxicity、 subchronic、 genotoxicity、 chronic toxicity、 carcinogenicity、 reproduction、 developmental toxicity、 allergenicity、 neurotoxicity、 human volunteer、 <i>in vitro</i> toxicity) など]

図 9 検索式

2. 学術文献の調査結果

商用データベースからの食品添加物リスク評価に関する学術文献情報の収集・整理

検索結果として計 504 件の検索結果が得られた。この検索結果の中から重要と思われるものについて検討会委員に採択していただき、検討会委員の推奨する文献も含めて必要に応じて原報を入手した。特に重要または必要と思われる 106 件を抄録作成の対象とした。検索結果、採択結果の詳細については表 7、抄録を作成した 106 件については表 8 に一覧した。なお、著者名は紙面の都合上第一著者のみを記載した。これらの文献については、抄録を作成した（抄録はデータベース収載）。

表 7 検索・採択結果

(単位：件数)

毒性	検索結果	採択
metabolism/toxicokinetics (代謝、トキシコキネティクス)	108	11
subchronic toxicity (亜慢性毒性)	17	4
genotoxicity (遺伝毒性)	58	6
chronic toxicity or carcinogenicity (反復投与毒性 or 発がん性)	82	7
reproduction or developmental toxicity (生殖発生毒性)	39	2
immunotoxicity (免疫毒性)	18	6
allergenicity (アレルゲン性)	10	0
neurotoxicity (神経毒性)	12	3
human volunteer (ヒトでの試験)	3	1
<i>in vitro</i> toxicity (<i>in vitro</i> 毒性試験、genotoxicity 除く)	8	8
Others (その他)	149	39

表 8 採択論文リスト（注：文献 ID は検索結果、採択文献等に順に付与した番号）

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
1	human volunteer	Precision of estimates of an ADI (or TDI or PTWI).	Speijers GJ	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S87-S93
4	in vitro toxicity (genotoxicity 除く)	Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements.	Schilter B, Andersson C, Anton R, Constable A, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG, Korver O, Smit F, Walker R	Food Chem Toxicol	2003	41	12	1625-1649
5	in vitro toxicity (genotoxicity 除く)	Methods of <i>in vitro</i> toxicology.	Eisenbrand G, Pool Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J	Food Chem Toxicol	2002	40	2-3	193-236
6	in vitro toxicity (genotoxicity 除く)	The application of <i>in vitro</i> data in the derivation of the acceptable daily intake of food additives.	Walton K, Walker R, van de Sandt JJ, Castell JV, Knapp AG, Kozianowski G, Roberfroid M, Schilter B	Food Chem Toxicol	1999	37	12	1175-1197
12	neurotoxicity	Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review.	Carere A	Ann Ist Super Sanita	2006	42	2	144-155
17	neurotoxicity	Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment.	Kroes R, Kozianowski G	Toxicol Lett	2002	127	1-3	43-46
19	neurotoxicity	Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing.	Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran L, Walker R, Wurtzen G	Food Chem Toxicol	2000	38	2-3	255-312
35	immunotoxicity	Ethical review of regulatory toxicology guidelines involving experiments on animals: the example of endocrine disrupters.	Purchase IF	Toxicol Sci	1999	52	2	141-147
36	immunotoxicity	Incidence and severity in relation to magnitude of intake above the ADI or TDI: use of critical effect data.	Renwick AG	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S79-S86
39	immunotoxicity	Regulatory aspects of immunotoxicology.	Schulte A, Ruehl Fehlert C	Exp Toxicol Pathol	2006	57	5-6	385-389
41	immunotoxicity	Safety assessment of gamma-cyclodextrin.	Munro IC, Newberne PM, Young VR, Bar A	Regul Toxicol Pharmacol	2004	39 Suppl 1		S3-13
42	immunotoxicity	Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt.	Soni MG, Burdock GA, Preuss HG, Stohs SJ, Ohia SE, Bagchi D	Food Chem Toxicol	2004	42	9	1513-1529
43	immunotoxicity	Toxicology databases and the concept of thresholds of toxicological concern as used by the JECFA for the safety evaluation of flavouring agents.	Renwick AG	Toxicol Lett	2004	149	1-3	223-234
46	subchronic toxicity	The significance of excursions above the ADI: duration in relation to pivotal studies.	Walker R	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S114-S118
47	subchronic toxicity	Duration of intake above the ADI/TDI in relation to toxicodynamics and toxicokinetics.	Renwick AG	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S69-S78

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
54	subchronic toxicity	Toxicological review of inorganic phosphates.	Weiner ML, Salminen WF, Larson PR, Barter RA, Kranetz JL, Simon GS	Food Chem Toxicol	2001	39	8	759-786
57	subchronic toxicity	Food and Drug Administration proposed testing guidelines for developmental toxicity studies. Revision Committee. FDA Guidelines for Developmental Toxicity and Reproduction, Food and Drug Administration.	Collins TF, Sprando RL, Shackelford ME, Hansen DK, Welsh JJ	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	1	39-44
58	reproduction or developmental toxicity	Food and Drug Administration proposed testing guidelines for reproduction studies. Revision Committee. FDA Guidelines for Developmental Toxicity and Reproduction, Food and Drug Administration.	Collins TF, Sprando RL, Shackelford ME, Hansen DK, Welsh JJ	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	1	29-38
62	reproduction or developmental toxicity	A tiered approach to threshold of regulation.	Cheeseman MA, Machuga EJ, Bailey AB	Food Chem Toxicol	1999	37	4	387-412
75	genotoxicity	Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet.	Ferguson LR	Mutat Res	1999	443	1-2	1-10
86	genotoxicity	Risk assessment of chemicals in European traditional foods.	Larsen, J. C.	Trends in Food Science & Technology	2006	17	9	471-481
87	genotoxicity	Criteria for the safety evaluation of flavoring substances. The Expert Panel of the Flavor and Extract Manufacturers Association.	Smith RL, Cohen SM, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, Marnett LJ, Munro IC, Portoghese PS, Waddell WJ, Wagner BM, Adams TB	Food Chem Toxicol	2005	43	8	1141-1177
92	genotoxicity	The use of structure-activity relationship analysis in the food contact notification program.	Bailey AB, Chanderbhan R, Collazo Braier N, Cheeseman MA, Twaroski ML	Regul Toxicol Pharmacol	2005	42	2	225-235
93	genotoxicity	Setting limits for genotoxic impurities in drug substances: Threshold-based and pragmatic approaches	Kirkland D.//Snodin D.	International Journal of Pharmaceutical Medicine (INT. J. PHARM. MED.)	2004	18	4	197-207
100	genotoxicity	Application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceutical manufacturing operations.	Dolan DG, Naumann BD, Sargent EV, Maier A, Dourson M	Regul Toxicol Pharmacol	2005	43	1	1-9
106	chronic toxicity or carcinogenicity	Thresholds of carcinogenicity of flavors.	Waddell WJ	Toxicol Sci	2002	68	2	275-279
110	chronic toxicity or carcinogenicity	Susceptibility of nonhuman primates to carcinogens of human relevance.	Schoeffner DJ, Thorgeirsson UP	In Vivo	2000	14	1	149-156

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
112	chronic toxicity or carcinogenicity	U.S. Food and Drug Administration perspective of the inclusion of effects of low-level exposures in safety and risk assessment.	Gaylor DW, Bolger PM, Schwetz BA	Environ Health Perspect	1998	106 Suppl 1		391-394
113	chronic toxicity or carcinogenicity	In utero phase carcinogenicity testing.	Hattan, D. G.	Int J Toxicol	1998	17	3	337
122	chronic toxicity or carcinogenicity	Pharmaceuticals in the aquatic environment – The German Environmental Advisory Council: Need for action: <ORIGINAL> ARZNEIMITTEL IN DER AQUATISCHEN UMWELT – DER RAT VON SACHVERSTÄNDIGEN FÜR UMWELTFRAGEN: HANDLUNGSBEDARF	Salomon M.	Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung (UMWELTWISSENSCHAFTEN UND SCHADSTOFF-FORSCH.)	2005	17	1	50-53
125	chronic toxicity or carcinogenicity	Health risk assessment practices in the U.S. Food and Drug Administration.	Gaylor DW, Axelrad JA, Brown RP, Cavagnaro JA, Cyr WH, Hulebak KL, Lorentzen RJ, Miller MA, Mulligan LT, Schwetz BA	Regul Toxicol Pharmacol	1997	26	3	307-321
128	chronic toxicity or carcinogenicity	Toxicology of micronutrients: adverse effects and uncertainty.	Renwick AG	J Nutr	2006	136	2	493S-501S
129	metabolism/toxicokinetics	Use of anatomical and kinetic models in the evaluation of human food additive safety.	Roth WL	AAPS J	2005	7	2	E328-E334
130	metabolism/toxicokinetics	The joint food and agriculture organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives and its role in the evaluation of the safety of veterinary drug residues in foods.	MacNeil JD	AAPS J	2005	7	2	E274-E280
132	metabolism/toxicokinetics	Safety evaluation of food flavorings.	Schrankel KR	Toxicology	2004	198	1-3	203-211
135	metabolism/toxicokinetics	Human variability in the renal elimination of foreign compounds and renal excretion-related uncertainty factors for risk assessment.	Dorne JL, Walton K, Renwick AG	Food Chem Toxicol	2004	42	2	275-298
138	metabolism/toxicokinetics	The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review.	Paustenbach DJ	J Toxicol Environ Health B Crit Rev	2000	3	3	179-291
140	metabolism/toxicokinetics	A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.	Munro IC, Kennepohl E, Kroes R	Food Chem Toxicol	1999	37	2-3	207-232
142	metabolism/toxicokinetics	Background to the ADI/TDI/PTWI.	Herrman JL, Younes M	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S109-S113

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
145	metabolism/toxicokinetics	Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects	Becker, E.M.//Nissen, L.R.//Skibsted, L.H.	European Food Research and Technology = Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. A.	2004	219	6	561-571
147	metabolism/toxicokinetics	Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review.	Dorne JL, Walton K, Renwick AG	Food Chem Toxicol	2005	43	2	203-216
148	metabolism/toxicokinetics	Comparison of estimated daily per capita intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels from animal studies.	Munro IC, Kennepohl E	Food Chem Toxicol	2001	39	4	331-354
159	metabolism/toxicokinetics	Regulating the safety of probiotics—the European approach.	von Wright A	Curr Pharm Des	2005	11	1	17-23
170	others	Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses.	Pauluhn J	Exp Toxicol Pathol	2005	57 Suppl 1		111-128
171	others	Assessment of dietary intake of flavouring substances within the procedure for their safety evaluation: advantages and limitations of estimates obtained by means of a per capita method.	Arcella D, Leclercq C	Food Chem Toxicol	2005	43	1	105-116
173	others	Contact allergy to food.	Brancaccio RR, Alvarez MS	Dermatol Ther	2004	17	4	302-313
177	others	Issues and challenges in the safety evaluation of food flavors.	Adams TB, Smith RL	Toxicol Lett	2004	149	1-3	209-213
179	others	Risk characterisation of chemicals in food.	Renwick AG	Toxicol Lett	2004	149	1-3	163-176
180	others	Generally recognized as safe (GRAS): history and description.	Burdock GA, Carabin IG	Toxicol Lett	2004	150	1	3-18
182	others	Risk characterisation of chemicals in food and diet.	Renwick AG, Barlow SM, Hertz Picciotto I, Boobis AR, Dybing E, Edler L, Eisenbrand G, Greig JB, Kleiner J, Lambe J, Muller DJ, Smith MR, Tritscher A, Tuijthelaars S, van den Brandt PA, Walker R, Kroes R	Food Chem Toxicol	2003	41	9	1211-1271
183	others	Safety evaluation of functional ingredients.	Kruger CL, Mann SW	Food Chem Toxicol	2003	41	6	793-805
184	others	Application of uncertainty analysis in assessing dietary exposure.	Hart A, Smith GC, Macarthur R, Rose M	Toxicol Lett	2003	140-141		437-442
185	others	Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective.	Luetzow M	Toxicol Lett	2003	140-141		419-425

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
187	others	International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures.	Feron VJ, Cassee FR, Groten JP, van Vliet PW, van Zorge JA	Environ Health Perspect	2002	110 Suppl 6		893-899
188	others	Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing.	Stokes WS	ILAR J	2002	43 Suppl		S31-S38
190	others	European medicines and feed additives regulation are not in compliance with environmental legislation and policy.	Montforts MH, de Knecht JA	Toxicol Lett	2002	131	1-2	125-136
191	others	Toxicological evaluation of chemical mixtures.	Feron VJ, Groten JP	Food Chem Toxicol	2002	40	6	825-839
193	others	The role of science in Codex standards.	Jun Shi C	Biomed Environ Sci	2001	14	1-2	145-148
194	others	The current status of food additives toxicity testing and the potential for application of the three Rs.	Broadhead CL, Combes RD	Altern Lab Anim	2001	29	4	471-485
200	others	Dependence of dietary intake estimates on the time frame of assessment.	Lowik MR, Hulshof KF, Brussaard JH, Kistemaker C	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S48-S56
201	others	Dietary intake methods for estimating food additive intake.	Gibney MJ	Regul Toxicol Pharmacol	1999	30	2 Pt 2	S31-S33
206	others	The precautionary principle and science-based limits in regulatory toxicology: the human experience, individual protection.	Pugh DM	Arch Toxicol Suppl	1997	19		147-154
207	others	Food and Drug Administration risk assessment--process and toxicologic pathology.	Moch RW, Dua PN, Hines FA	Toxicol Pathol	1997	25	1	61-67
212	others	Physiological actions of preservative agents: prospective of use of modern microbiological techniques in assessing microbial behaviour in food preservation.	Brul S, Coote P, Oomes S, Mensonides F, Hellingwerf K, Klis F	Int J Food Microbiol	2002	79	1-2	55-64
214	others	The contribution of epidemiology.	van den Brandt P, Voorrips L, Hertz Picciotto I, Shuker D, Boeing H, Speijers G, Guittard C, Kleiner J, Knowles M, Wolk A, Goldbohm A	Food Chem Toxicol	2002	40	2-3	387-424
215	others	Assessment of intake from the diet.	Kroes R, Muller D, Lambe J, Lowik MR, van Klaveren J, Kleiner J, Massey R, Mayer S, Urieta I, Verger P, Visconti A	Food Chem Toxicol	2002	40	2-3	327-385
217	others	Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues.	Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick AG, Schlatter J, Steinberg P, Tritscher A, Walker R, Younes M	Food Chem Toxicol	2002	40	2-3	237-282

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
218	others	Hazard identification by methods of animal-based toxicology.	Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJ, Galli CL, Kleiner J, Knudsen I, Koeter HB, Levy LS, Madsen C, Mayer S, Narbonne JF, Pfannkuch F, Prodanchuk MG, Smith MR, Steinberg P	Food Chem Toxicol	2002	40	2-3	145-191
220	others	Effective regulatory approval process for food ingredient technologies.	Kirschman JC	Crit Rev Food Sci Nutr	1998	38	6	465-510
266	others	Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects.	Mortensen, A.	Scandinavian Journal of Food and Nutrition	2006	50	3	104-116
270	others	Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition.	Wright, A. von//Bruce, A.	Trends in Food Science & Technology	2003	14	5-8	264-276
273	others	GRAS flavoring substances.	Smith, R. L.//Cohen, S. M.//Doull, J.//Feron, V. J.//Goodman, J. I.//Marnett, L. J.//Portoghese, P. S.//Waddell, W. J.//Wagner, B. M.//Adams, T. B.	Food Technology	2003	57	5	46-48, 50, 52-54, 56-59
276	others	Application of hazard analysis critical control points (HACCP) to organic chemical contaminants in food.	Ropkins K, Beck AJ	Crit Rev Food Sci Nutr	2002	42	2	123-149
278	others	Food additives. Use, intake and safety.	Ilback, N. G.//Busk, L.	Scandinavian Journal of Nutrition	2000	44	4	141-149
281	others	GRAS flavoring substances 18.	Newberne, P.//Smith, R. L.//Doull, J.//Goodman, J. I.//Munro, J. C.//Portoghese, P. S.//Wagner, B. M.//Weil, C. S.//Woods, L. A.//Adams, T. B.//Hallagan, J. B.//Ford, R. A.	Food Technology	1998	52	9	65-66, 68, 70, 72, 74, 76, 79-92
282	others	Flavouring substances as food additives – their safety and methods of estimating their intake.	Stelmaszczyk-Kusz, A.//Kozłowska, K.//Brzozowska, A.	Przemysł Spożywczy	1998	52	4	24-27
292	others	Beyond the knowledge deficit: recent research into lay and expert attitudes to food risks.	Hansen J, Holm L, Frewer L, Robinson P, Sandoe P	Appetite	2003	41	2	111-121
294	others	Evaluation of exposure to chemical substances through foods – Exposure to pesticides, heavy metals, dioxins, acrylamide and food additives in Japan –	Maitani T.	Journal of Health Science (J. HEALTH SCI.)	2004	50	3	205-209
295	others	FDA statutory authority to regulate the safety of dietary supplements.	Hutt PB	Am J Law Med	2005	31	2-3	155-174

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
297	others	Exposure to combinations of substances: A system for assessing health risks	Feron V.J.//Van Vliet P.W.//Notten W.R.F.	Environmental Toxicology and Pharmacology (ENVIRON. TOXICOL. PHARMACOL.)	2004	18	3 SPEC.ISS	215-222
302	others	Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Regulatory drivers and research needs	Breton R.//Boxall A.	QSAR and Combinatorial Science (QSAR COMB. SCI.)	2003	22	3	399-409
312	others	Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1).	Wise LD, Beck SL, Beltrame D, Beyer BK, Chahoud I, Clark RL, Clark R, Druga AM, Feuston MH, Guittin P, Henwood SM, Kimmel CA, Lindstrom P, Palmer AK, Petrere JA, Solomon HM, Yasuda M, York RG	Teratology	1997	55	4	249-292
313	reproduction or developmental toxicity	Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998.	Chahoud I, Buschmann J, Clark R, Druga A, Falke H, Faqi A, Hansen E, Heinrich Hirsch B, Hellwig J, Lingk W, Parkinson M, Paumgarten FJ, Pfeil R, Platzek T, Scialli AR, Seed J, Stahlmann R, Ulbrich B, Wu X, Yasuda M, Younes M, Solecki R	Reprod Toxicol	1999	13	1	77-82
314	reproduction or developmental toxicity	Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin, 14-16 September 2000.	Solecki R, Burgin H, Buschmann J, Clark R, Duverger M, Fialkowski O, Guittin P, Hazelden KP, Hellwig J, Hoffmann E, Hofmann T, Hubel U, Khalil S, Lingk W, Mantovani A, Moxon M, Muller S, Parkinson M, Paul M, Paumgarten F, Pfeil R, Platzek T, Rauch Ernst M, A, J	Reprod Toxicol	2001	15	6	713-721
315	reproduction or developmental toxicity	Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April 2002.	Solecki R, Bergmann B, Burgin H, Buschmann J, Clark R, Druga A, Van Duijnhoven EA, Duverger M, Edwards J, Freudenberger H, Guittin P, Hakaite P, Heinrich Hirsch B, Hellwig J, Hofmann T, Hubel U, Khalil S, Klaus A, Kudicke S, Lingk W, Meredith T, Moxon M, Muller S, Martin, Francisco	Reprod Toxicol	2003	17	5	625-637
317	reproduction or developmental toxicity	Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals.	Hurt ME, Cappon GD, Browning A	Food Chem Toxicol	2003	41	5	611-619
318	reproduction or developmental toxicity	The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies.	Foote RH, Carney EW	Reprod Toxicol	2000	14	6	477-493

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行年	巻	号	ページ
319	reproduction or developmental toxicity	The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity.	Hass U	Reprod Toxicol	2006	22	2	148-156
320	reproduction or developmental toxicity	Critical aspects in reproductive and developmental toxicity testing of environmental chemicals.	Buschmann J	Reprod Toxicol	2006	22	2	157-163
321	reproduction or developmental toxicity	A retrospective analysis of the added value of the rat two-generation reproductive toxicity study versus the rat subchronic toxicity study.	Janer G, Hakkert BC, Piersma AH, Vermeire T, Slob W	Reprod Toxicol	2007	24	1	103-113
322	reproduction or developmental toxicity	A retrospective analysis of the two-generation study: what is the added value of the second generation?	Janer G, Hakkert BC, Slob W, Vermeire T, Piersma AH	Reprod Toxicol	2007	24	1	97-102
323	metabolism/toxicokinetics	Application of chimeric mice with humanized liver for predictive ADME.	Katoh M, Yokoi T	Drug Metab Rev	2007	39	1	145-157
325	immunotoxicity	US FDA "Redbook II" immunotoxicity testing guidelines and research in immunotoxicity evaluations of food chemicals and new food proteins.	Hinton DM	Toxicol Pathol	2000	28	3	467-478
326	immunotoxicity	Immunotoxicity testing applied to direct food and colour additives: US FDA 'Redbook II' Guidelines.	Hinton DM	Hum Exp Toxicol	1995	14	1	143-145
328	chronic toxicity or carcinogenicity	IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans.	Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W	Crit Rev Toxicol	2006	36	10	781-792
329	neurotoxicity	Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.	Irwin S	Psychopharmacologia	1968	13	3	222-257
330	chronic toxicity or carcinogenicity	Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies. The Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing.	Weingand K, Brown G, Hall R, Davies D, Gossett K, Neptun D, Waner T, Matsuzawa T, Salemink P, Froelke W, Provost JP, Dal Negro G, Batchelor J, Nomura M, Groetsch H, Boink A, Kimball J, Woodman D, York M, Fabianson Johnson E, Lupart M, Melloni E	Fundam Appl Toxicol	1996	29	2	198-201
331	<i>in vitro</i> toxicity (genotoxicity 除く)	Consumer product <i>in vitro</i> digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment.	Brandon EF, Oomen AG, Rempelberg CJ, Versantvoort CH, van Engelen JG, Sips AJ	Regul Toxicol Pharmacol	2006	44	2	161-171
332	<i>in vitro</i> toxicity (genotoxicity 除く)	Comparison of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> screening models for androgenic and estrogenic activities.	Sonneveld E, Riteco JA, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, van der Burg B	Toxicol Sci	2006	89	1	173-187
333	<i>in vitro</i> toxicity (genotoxicity 除く)	Development of an <i>in vitro</i> assay for the screening of substances capable of dissolving calcium oxalate crystals.	Saso L, Valentini G, Leone MG, Grippa E, Silvestrini B	Urol Int	1998	61	4	210-214
334	<i>in vitro</i> toxicity	A proposed model for safety assessment of	Borzelleca JF	Regul Toxicol	1996	23	1 Pt 2	S15-S18

文献 ID	毒性	標題	著者名	雑誌名	発行 年	巻	号	ページ
	(genotoxicity 除く)	macronutrient substitutes.		Pharmacol				
335	<i>in vitro</i> toxicity (genotoxicity 除く)	The isolated perfused porcine skin flap. III. Percutaneous absorption pharmacokinetics of organophosphates, steroids, benzoic acid, and caffeine.	Carver MP, Williams PL, Riviere JE	Toxicol Appl Pharmacol	1989	97	2	324-337
336	others	Estimation of toxic hazard—a decision tree approach.	Cramer GM, Ford RA, Hall RL	Food Cosmet Toxicol	1978	16	3	255-276
338	reproduction or developmental toxicity	Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin.	Matsuura I, Saitoh T, Ashina M, Wako Y, Iwata H, Toyota N, Ishizuka Y, Namiki M, Hoshino N, Tsuchitani M	J Toxicol Sci	2005	30 Spec No.		163-188
339	others	Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work.	Tsuda H, Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Imaida K, Tatematsu M, Hirose M, Wakabayashi K, Moore MA	Toxicol Pathol	2003	31	1	80-86
340	others	Concordance of thresholds for carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine.	Waddell WJ, Fukushima S, Williams GM	Arch Toxicol	2006	80	6	305-309

VII. データベースの使用方法

VII. データベースの使用方法

ガイドライン、引用文献、参考文献についての書誌情報（一部データについては抄録も含む）が参照可能なデータベースを作成したので、本章ではその使用方法について記載した。

データベースは、以下のデータより構成されており、データベース上部のボタンで切り替える。

ガイドライン **ガイドライン**

指定されたガイドライン（V章表6参照）

引用文献 **引用文献**

上記ガイドラインの引用文献

参考文献 **参考文献**

検索結果から採択した学術論文、および、検討会で推奨された学術論文。抄録を参照し概要を確認することが可能。

< 1. ガイドライン一覧画面 >

画面切り替えボタン

ガイドライン、引用文献、参考文献の各画面へ移行。

海外食品添加物リスク評価ガイドライン				
ガイドライン 引用文献 参考文献				
文庫ID	題名	機関名	出典	評価年
G1.	Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)		http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/en/index.htm	引用文献
G1.1	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Twenty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 733, 1986, and	引用文献
G1.2	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Thirtieth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 751, 1987.	引用文献
G1.3	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Thirty-first report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 759, 1987, and	引用文献
G1.4	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Thirty-second report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 763, 1988.	引用文献
G1.5	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 776, 1989.	引用文献
G1.6	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Thirty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 788, 1989.	引用文献
G1.7	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Thirty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 789, 1990, and	引用文献
G1.8	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Thirty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 799, 1990.	引用文献
G1.9	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Thirty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 806, 1991, and	引用文献
G1.10	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Thirty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 815, 1991.	引用文献
G1.11	Evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants	(Thirty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series No. 828, 1992.	引用文献
G1.12	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Fortieth report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 832, 1993.	引用文献
G1.13	Evaluation of certain food additives and contaminants	(Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 837, 1993.	引用文献
G1.14	Evaluation of certain veterinary drug residues in food	(Forty-second report of the Joint FAO/WHO Expert	WHO Technical Report Series, No. 851, 1995.	引用文献

引用文献ボタン

各ガイドライン毎の引用文献リストを表示。

< 2. 引用文献一覧画面 >

引用文献		引用文献	ガイドライン	参考文献
管理番号	書誌事項	TITLE	著者	毒性
10	General principles governing the use of food additives (First report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 15, 1957; WHO Technical Report Series, No. 129, 1957 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
17	Procedures for the testing of intentional food additives to establish their safety for use (Second report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 17, 1958; WHO Technical Report Series, No. 144, 1958 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
17	Specifications for identity and purity of food additives (antimicrobial preservatives and antioxidants) (Third report of the Expert Committee). These specifications were subsequently revised and published as Specifications for identity and purity of food additives, vol. I.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
17	Specifications for identity and purity of food additives (food colours) (Fourth report of the Expert Committee). These specifications were subsequently revised and published as Specification for identity and purity of food additives, vol. II. Food colours, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1963 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
220	Evaluation of the carcinogenic hazards of food additives (Fifth report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 29, 1961; WHO Technical Report Series, No. 220, 1961 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
31	Evaluation of the toxicity of a number of antimicrobials and antioxidants (Sixth report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 31, 1962; WHO Technical Report Series, No. 228, 1962 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
35	Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: emulsifiers, stabilizers, bleaching and maturing agents (Seventh report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 35, 1964; WHO Technical Report Series, No. 281, 1964 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
38	Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: food colours and some antimicrobials and antioxidants (Eighth report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 38, 1965; WHO Technical Report Series, No. 309, 1965 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
38A	Specifications for identity and purity and toxicological evaluation of some antimicrobials and antioxidants. FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 38A, 1965; WHO/Food Add/24.65 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
38B	Specifications for identity and purity and toxicological evaluation of food colours. FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 38B, 1966; WHO/Food Add/66.25.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
40	Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases (Ninth report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 40, 1966; WHO Technical Report Series, No. 339, 1966 (out of print).			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
40A, B, C	Toxicological evaluation of some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases. FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 40A, B, C; WHO/Food Add/67.29, 1967.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
43	Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some emulsifiers and stabilizers and certain other substances (Tenth report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 43, 1967; WHO Technical Report Series, No. 373, 1967.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
44	Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some flavouring substances and non-nutritive sweetening agents (Eleventh report of the Expert Committee). FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 44, 1968; WHO Technical Report Series, No. 383, 1968.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]
44A	Toxicological evaluation of some flavouring substances and non-nutritive sweetening agents. FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 44A, 1968; WHO/Food Add/68.33.			G1.1/G1.2 [G1.3/G1.]

< 3. 参考文献一覧画面 >

参考文献		参考文献		引用文献		ガイドライン			
管理番号		書誌事項		TITLE		著者		毒性	
				3rd European Congress of Toxicological Pharmacology.		Femer C			
詳細	41	Regul Toxicol Pharmacol. 39 Suppl 1 :S3-13, 2004		Safety assessment of gamma-cyclodextrin. ケンククロデキストリンの安全性評価		Munro IC, Newberne PM, Youne VR, Bar A		3.2.a)immunotoxicity	
詳細	42	Food Chem Toxicol. 42 (9):1513-1529, 2004		Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt.		Soni MG, Burdock GA, Preuss HG, Stohs SJ.		3.2.a)immunotoxicity	
詳細	43	Toxicol Lett. 149 (1-3):223-234, 2004		Toxicology databases and the concept of thresholds of toxicological concern as used by		Renwick AG		3.2.a)immunotoxicity	
詳細	46	Regul Toxicol Pharmacol. 30 (2 Pt 2):S114-S118, 1999		The significance of excursions above the ADI: duration in relation to pivotal studies.		Walker R		3.1.b)subchronic toxicity	
詳細	47	Regul Toxicol Pharmacol. 30 (2 Pt 2):S69-S78, 1999		Duration of intake above the ADI/TDI in relation to toxicodynamics and toxicokinetics.		Renwick AG		3.1.b)subchronic toxicity	
詳細	54	Food Chem Toxicol. 39 (8):759-786, 2001		Toxicological review of inorganic phosphates. 無機リン酸塩の毒性学的レビュー		Weiner ML, Salmsten WF, Larson PR, Barter		3.1.b)subchronic toxicity	
詳細	57	Regul Toxicol Pharmacol. 30 (1):39-44, 1999		Food and Drug Administration proposed testing guidelines for developmental toxicity studies.		Collins TF, Sprando RL, Shackelford ME.		3.1.b)subchronic toxicity	
詳細	58	Regul Toxicol Pharmacol. 30 (1):29-38, 1999		Food and Drug Administration proposed testing guidelines for reproduction studies. Revision		Collins TF, Sprando RL, Shackelford ME.		3.1.e)reproduction or developmental toxicity	
詳細	61	Food Chem Toxicol. 37 (4):387-412, 1999		A tiered approach to threshold of regulation. 規制閾値に関する段階的アプローチ		Cheeseman MA, Machuga EL, Bailey AB		3.1.e)reproduction or developmental toxicity	
詳細	75	Mutat Res. 443 (1-2):1-10, 1999		Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet.		Ferguson LR		3.1.c)genotoxicity	
詳細	86	Trends in Food Science & Technology. 17(9): 471-481, 2006		Risk assessment of chemicals in European traditional foods.		Larsen, J. C.		3.1.c)genotoxicity	
詳細	87	Food Chem Toxicol. 43 (8):1141-1177, 2005		Criteria for the safety evaluation of flavoring substances. The Expert Panel of the Flavor and		Smith RL, Cohen SM, Doull I, Feron VJ.		3.1.c)genotoxicity	
詳細	92	Regul Toxicol Pharmacol. 42 (2):225-235, 2005		The use of structure-activity relationship analysis in the food contact notification program.		Bailey AB, Chanderbhan R.		3.1.c)genotoxicity	
詳細	93	International Journal of Pharmaceutical Medicine (INT. J. PHARM. MED.). 18(4):197-207, 2004		Setting limits for genotoxic impurities in drug substances: Threshold-based and pragmatic		Kirkland D, // Snodun D		3.1.c)genotoxenty	
詳細	100	Regul Toxicol Pharmacol. 43 (1):1-9, 2005		Application of the threshold of toxicologic concern concept to pharmaceutical		Dolan DG, Naumann ED, Sarzent EV, Maier		3.1.c)genotoxicity	
詳細	106	Food Chem Toxicol. 44 (9):975-989, 2006		Safety assessment of gamma-cyclodextrin. ケンククロデキストリンの安全性評価		Munro IC, Newberne PM, Youne VR, Bar A		3.2.a)immunotoxicity	

詳細ボタン

各参考文献の詳細画面へ移行。

<参考文献詳細画面>

詳細		参考文献	引用文献	ガイドライン
IMIC番号	41	毒性	3.2.a) immunotoxicity	
雑誌名	Regul Toxicol Pharmacol			
ISSN	0273-2300			
発行年	2004	巻	39 Suppl	号
ページ	53	-13		
言語	eng			
洋タイトル	Safety assessment of gamma-cyclodextrin.			
著者	Munro IC, Newberne PM, Young VR, Bar A			
所属	CanTox Inc., Consultants in Toxicology, Health and Environmental Sciences, 2233 Argentina Road, Suite 308, Mississauga, Ont., Canada L5N 2X7.			
タイトル和訳	γ-シクロデキストリンの安全性評価			
抄録作成	γ-シクロデキストリン(γ-CD)のこれまでの毒性試験の結果をまとめ、食品中の使用の安全性を評価した。γ-CDは種々の有機分子と包接錯体を形成する。食品中で匂い、ビタミン、多価不飽和脂肪酸などの担体や安定剤として使用され、食品からの1日平均摂取量は4.1g/人/日と推定される。毒性研究は、標準的な遺伝毒性試験、ラット経口/静注最大3カ月の亜慢性試験、イヌ経口3カ月の亜慢性試験、ラット経口1年の慢性試験、ラットとウサギの胚毒性/催奇形性試験から成る。経口試験では飼料中に最大20%が投与された。γ-CDはこれら全試験で忍容性が良好で、毒性は認められなかった。ラット代謝試験でγ-CDは唾液および肺アミラーゼによって迅速かつほぼ完全に消化された。ヒトにおけるγ-CDまたはマルトデキストリン8gの単回経口試験では消化管忍容性に差がなかった。γ-CDは包接錯体の形成が可逆的で、小腸で容易に消化され、β-CDの試験でビタミン(A, D, E)のバイオアベイラビリティに低下が認められ、脂溶性栄養素の吸収に影響がないと考えられる。これらの結果からγ-CDは食品中の使用に関してGRAS(一般に安全と認められる)と結論される。			

VIII. 参考資料

(ガイドライン比較表)

Short Term Toxicity Studies (28 日間)	試験項目	1	2	3	4	5	6	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 407	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	
Rodent	1 群雌雄各 5 匹試験	○						
	1 群雌雄各 10 匹試験		○	○	○	○		
	投与量換算				○	○		OECD のみの記載
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○		
	一般状態観察注	○	○	○	○	○		5days/week 投与の場合は 5/7 を乗じ 7days 投与量を求める。
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○		
	血液	○	○	○	○	○		
	血液化学	○	○	○	○	○		
	尿	○		○	○	○		
	眼科学的検査	○	○	○		○		
	免疫系影響評価	○						
	神経系影響評価	○		○	○			
	性腺影響評価	○		○				
	その他機能検査	○		○		○		心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○				
	CAS 記載指定			○				CAS No.記載指示は 2000 年より
	動物飼育法指定		○	○	○	○		最近のガイドラインには指示あり
Non-rodent	1 群 3 匹試験					○		医薬品ガイドラインのみ 3 匹/sex/group
	1 群 4 匹試験	○	○	○	○			
	投与量換算			○				5days/week 投与の場合は 5/7 を乗じ 7days 投与量を求める。
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○		
	一般状態観察	○	○	○	○	○		
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○		
	血液	○	○	○	○	○		
	血液化学	○	○	○	○	○		
	尿	○		○	○	○		
	眼科学的検査	○	○			○		
	免疫系影響評価	○		○				
	神経系影響評価	○		○	○			
	性腺影響評価	○						
	その他機能検査	○				○		心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○				
	CAS 記載指定			○				CAS No.記載指示は 2000 年より
	動物飼育法指定		○	○	○	○		最近のガイドラインには指示あり

Subchronic Toxicity Studies (90 日間)	試験項目	1	2	3	4	5	6	参考	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 408, 409	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	VICH ガイドライン	
Rodent	1 群雌雄各 10 匹試験	○				○			
	1 群雌雄各 20 匹試験		○	○	○				
	投与量換算				○	○			5days/week 投与の場合は 5/7 を乗じ 7days 投与量を求める。
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○			
	一般状態観察	○	○	○	○	○			
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○			
	血液	○	○	○	○	○			
	血液化学	○	○	○	○	○			
	尿	○		○	○	○			
	眼科学的検査	○	○	○	○	○			
	免疫系影響評価	○		○					
	神経系影響評価	○		○					
	その他機能検査	○				○			心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○					
	CAS 記載指定			○	○				CAS No.記載指示は 2000 年より
	動物飼育法指定		○	○	○				
	回復性試験				○	○			
Non-rodent	1 群 3 匹試験					○			医薬品ガイドラインのみ 3 匹/sex/group
	1 群 4 匹試験	○	○	○	○				
	投与量換算				○	○		○	5days/week 投与の場合は 5/7 を乗じ 7days 投与量を求める。
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○			
	一般状態観察	○	○	○	○	○		○	
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○		○	
	血液	○	○	○	○	○		○	
	血液化学	○	○	○	○	○		○	
	尿	○		○	○	○		○	
	眼科学的検査	○	○	○	○	○		○	
	免疫系影響評価	○		○					
	神経系影響評価	○		○					
	その他機能検査	○							心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○					
	CAS 記載指定			○	○				CAS No.記載指示は 2000 年より
	動物飼育法指定		○	○	○				
	回復性試験				○	○			

Chronic Toxicity Studies (1年間:ICHは1げっ歯類6ヶ月、非げっ歯類9ヶ月)	試験項目	1	2	3	4	5	6	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 452	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	
Rodent	1 群雌雄各 10 匹試験					○		
	1 群雌雄各 20 匹試験	○	○	○	○			
	投与量換算							
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○		
	一般状態観察	○	○	○	○	○		
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○		
	血液	○	○	○	○	○		
	血液生化学	○	○	○	○	○		
	尿	○		○	○	○		
	眼科学的検査	○	○	○	○	○		
	免疫系影響評価	○						
	神経系影響評価	○		○	○			
	性腺影響評価	○						
	その他機能検査	○				○		心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○				
	CAS 記載指定			○				CAS No.記載指示は 2000 年より
Non-rodent	動物飼育法指定		○	○	○			
	回復性試験				○	○		
	1 群 3 匹試験					○		
	1 群 4 匹試験	○	○	○				
	剖検後肉眼判定	○	○	○		○		
	一般状態観察	○	○	○		○		
	病理組織学的検査	○	○	○		○		
	血液	○	○	○		○		
	血液化学	○	○	○		○		
	尿	○		○		○		
	眼科学的検査	○	○	○		○		
	免疫系影響評価	○						
	神経系影響評価	○		○				
	性腺影響評価	○						
	その他機能検査	○				○		心電図、腎機能、感覚機能検査、自発運動量測定等
	GLP 指定		○	○				
	CAS 記載指定			○				CAS No.記載指示は 2000 年より
	動物飼育法指定		○	○				
	回復性試験					○		医薬品ガイドラインにのみ記載

Reproduction Toxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	4	5	6	参考
		食品添加物の 指定及び使用 基準改正に関 する指針につい て	Redbook I	Redbook 2000	OECD415 (一世代生殖毒 性試験)¶	OECD416 (二世世代生殖毒 性試験)	医薬品ガイドラ イン(ICH 日本語 訳) §	EFSA	VICH ガイドライ ン §
Rodent	F0: 1 群雌雄 20 匹試験	○	○	○	○	○			
	F1: 1 群雌雄 20 匹試験	○	○	○		○			
	F2: 1 群雌雄 20 匹試験		○	○					
	F0: 雌生殖器組織検査			○	○				
	交配前発情周期観察			○	○	○			
	剖検後肉眼判定 (F1, F2)	○	○	○		○	○		
	同上(出生直後)**	○	○	○		○	○		
	一般状態観察 (F1, F2) *	○	○	○		○	○		○
	病理組織検査(F 1, F2)	○	○	○		○			
	雌生殖器成熟度 (F1, F2)	○		○		○	○		
	雌出産率(F1, F2)	○	○	○		○	○		○
	生存出生比	○	○	○	○	○	○		○
	出生児生存比	○	○	○	○	○	○		○
	雌雄比率	○	○	○	○	○	○		○
	生存率	○	○	○	○	○	○		○
	精子数 (F1, F2)	○		○		○	○		
	精子活性、形態	○		○		○	○		
	神経学的スクリーニング			○			○		○
	免疫毒性スクリーニング			○					
	GLP 指定			○					
	CAS 記載指定			○					
	動物飼育法指定		○	○	○	○			

* F1: 性別比、性的成熟、F2: 肛門生殖突起間距離測定を含む

** 臓器異常、構造変化、脳、胸腺、脾臓の秤量

§ 生殖発生毒性として記載

¶ 交配前 8~10 週間投与

Developmental Toxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	4	5	6	参考	参考
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 414	OECD 421	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳) §	EFSA	VICH ガイドライン	農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針
Rodent	1 群 16-20 匹(妊娠)	○		○	○	○	○			
	流産兆候動物の子宮検査	○		○	○					○
	出産予定前日の子宮検査	○	○	○	○	○	○		○	○
	出産予定前日の胎盤検査						○			
	不妊動物の子宮検査	○		○						
	胎児秤量	○	○	○	○	○	○		○	○
	胎児観察(骨格、軟組織)	○	○	○	○	○	○		○	○
	同上顕微解剖						○			○
	胎児病理組織(異常部)		○	○	○	○	○		○	
	GLP 指定			○						
	CAS 記載指定			○						
	動物飼育法指定			○	○	○				

§

生殖発生毒性として記載

*

催奇性試験を含む繁殖試験

In-utero Carcinogenicity /Chronic Toxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6
		食品添加物の 指定及び使用 基準改正に関 する指針につい て	Redbook I	Redbook 2000	OECD	医薬品ガイドラ イン(ICH 日本語 訳)	EFSA
Rodent	1 群雌雄 25 匹試験			○			
	F11 群雌雄 4 匹			○			
	剖検後肉眼判定 (F1)			○			
	一般状態観察 (F1)			○			
	病理組織学的検査 (F1)			○			
	血液 (F1)			○			
	血液化学 (F1)			○			
	尿 (F1)			○			
	眼科学的検査 (F1)			○			
	GLP 指定			○			
	CAS 記載指定			○			
	動物飼育法指定			○			

Carcinogenicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 451	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)	EFSA	
Rodent	1 群雌雄各 50 匹試験	○	○	○	○	○		
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○	○		
	一般状態観察	○	○	○	○	○		
	病理組織学的検査	○	○	○	○	○		
	血液	○	○	○		○		
	血液生化学		○	○				
	尿			○				
	眼科学的検査			○				
	イニシエーション					○		(1) げっ歯類を用いたイニシエーション・プロモーションモデル：肝がん原物質（および肝発がん修飾物質）を検索するためのラットのイニシエーション・プロモーションモデルは、イニシエーターを用い、その後、被験物質を数週間投与する。もう一つの多臓器発がんモデルは、最大 5 種類のイニシエーターを投与し、次いで被験物質を数か月間投与する。
	Tg マウス試験					○		(2) p53+/-欠損モデル、Tg.AC モデル、TgrasH2 モデル、XPA 欠損モデル等を含むいくつかのトランスジェニックマウスの試験。
	GLP 指定		○	○				
	CAS 記載指定			○				
	動物飼育法指定		○	○				

Chronic/Carcinogenicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 453	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA
Rodent	1 群雌雄 50 匹試験(発癌)	○	○	○	○		
	1 群雌雄 10 匹試験(慢毒)	○	○				
	1 群雌雄 20 匹試験(慢毒)			○			
	剖検後肉眼判定	○	○	○	○		
	一般状態観察	○	○	○	○		
	病理組織学的検査	○	○	○	○		
	血液	○	○	○	○		
	血液生化学	○	○	○	○		
	尿	○		○	○		
	眼科学的検査	○		○	○		
	その他の機能試験	○					
	GLP 指定		○	○			
	CAS 記載指定			○			
	動物飼育法指定		○	○			

Allergenicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6	参考	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	NTP Murine LLNA (Draft)	
Rodent	即時型アレルギー試験	○							
	遅延型アレルギー試験	○		○					
	光毒性試験(3T3 NRU)				○(432)				化学物質を原因とする Porphyria がある
	ケラトサイトのサイトカイン産生								皮膚感受性 Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1alpha and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. Toxicology. 2005 Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes.Toxicol Appl Pharmacol. 2001
	ヒト培養細胞活性化試験								皮膚感受性 Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT.Toxicol In Vitro. 2006 Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol.Toxicol In Vitro. 2006
	LLNA				○(406)			○	

Genetic Toxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6	参考	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 473～486	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)	EFSA	VICH ガイドライン	
in vitro	復帰突然変異試験	○		○	○	○			
	遺伝子突然変異試験			○	○			○	
	前進突然変異試験			○					
	遺伝子変換試験			○	○				
	マウスリンフォーマ試験			○	○	○			
	染色体異常試験	○		○	○	○		○	CHL,CHO,ヒトリンパ球等
	姉妹染色分体交換	○						○	
	不定期 DNA 組み換え試験				○			○	
in vivo	染色体異常試験				○			○	
	小核試験	○		○	○	○		○	
	優勢致死試験	○			○			○	
	姉妹染色分体交換				○				
	不定期 DNA 合成試験	○			○				
	マウススポット試験				○				

Pharmacokinetics and Metabolism	試験項目		1	2	3	4	5	6	参考	参考
			食品添加物の安全性評価のための毒性学的原則	Redbook I	Redbook 2000	OECD	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)	EFSA	VICH ガイドライン	非臨床薬物動態試験ガイドライン
	動物数		○	○	○	○				○
	投与経路		○	○	○	○	○			○
	投与回数		○	○	○	○	○			○
	用量段階		○	○	○	○	○			○
	検査対象	吸収	○	○	○	○	○		○	○
		分布	○	○	○	○	○		○	○
		代謝	○	○	○	○	○		○	○
		排泄	○	○	○	○	○		○	○
	In Vitro studies		○		○	○	○	○		○

一般薬理	試験項目		1	5
			食品添加物の安全性評価のための毒性学的原則	医薬品ガイドライン(安全性薬理試験ガイドライン)
	動物数		○	○
	投与経路		○	○
	投与回数		○	○
	用量段階		○	○
	検査対象	一般症状	○	
		中枢神経系	○	○
		循環器系	○	○
		呼吸器系	○	○
		自律神経及び平滑筋	○	○
		消化器系	○	○
		腎・泌尿器系	○	○
	In Vitro studies			○

Immunotoxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6	解説
		食品添加物の 指定及び使用 基準改正に関 する指針につ いて	Redbook I	Redbook 2000 (Redbook II)	OECD	医薬品ガイド ライン(ICH 日 本語訳)	EFSA	
Rodent	T細胞依存性抗体産生			○		○		
	フェノタイピング					○		
	NK 細胞活性			○		○		
	宿主抵抗性			○		○		
	Mφ/Neutro の機能					○		
	病理組織学的検査			○		○		パイエル板、腸間膜リンパ節
	血液			○		○		
	血液生化学					○		

Neurotoxicity Studies	試験項目	1	2	3	4	5	6	参考	解説
		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD 424	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	Guidelines for Neuro-toxicity Risk Assessment (EPA)	
Rodent	健康状態観察				○				
	死亡/病的状態の観察				○				
	Functional tests				○				
	行動観察			○	○	○*		○	*Irwin の変法
	意識・態度観察			○	○			○	
	病理組織検査			○	○			○	
	眼科学的検査			△	○			○	
	血液			△	○			○	
	血液生化学			△	○			○	
	運動機能観察			○		○		○	衰弱、協同運動失調、振戦、ミオクローヌ性痙攣
	知覚機能観察			○				○	聴覚、視覚、体性感覚、痛覚、嗅覚
	認知機能							○	同和性、一般状態(瞬膜等)、器具使用試験
	発生毒性			○				○	
Human	症例報告							○	
	疫学(横断研究)							○	
	症例対照研究							○	
	コホート研究							○	
	人体試験(ボランティア)							○	

Short-term Toxicity			1	3	4	5
試験項目			食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	FDA Redbook 2000	OECD (407)	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)
1	GLP			U.S. FDA good laboratory practice 準拠	GLP 準拠	
2	飼育法他			Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 準拠		
3	動物種及び性	げっ歯類	ラット、マウス:同一週齢の動物、通常 5～6 週齢。	ラット、マウス使用。6～8 週令以下。新環境に移行後少なくとも 6 日以降。 純系、交雑系、交配系を使用。	健康な成獣をコントロール、処置群に任意に振り分け。 ゲージの影響が無きよう考慮。 試験開始前、5 日以上期間を設けること。	試験に使用する動物種は、げっ歯類 1 種以上、ウサギ以外の非げっ歯類 1 種以上の合計 2 種以上。原則として、雌雄の動物を同数使用する。
		非げっ歯類	イヌ:4～6 カ月齢。	イヌを使用する場合には遅くとも 4～6 カ月齢で開始すべきである。		ウサギ以外の非げっ歯類の中から選ぶ
4	動物数	げっ歯類	げっ歯類では 1 群/雌雄各 5 匹以上。	1 群/雌雄各 10 匹以上。	各投与群ごとに 10 匹(5 メス、5 オス)以上を使用。コントロール群にも同数を使用し、最高用量群をさらに 1 群用意し、投与終了後 14 日間観察。	1 群当たり、げっ歯類では雌雄各 10 匹以上
		非げっ歯類	非げっ歯類では 1 群/雌雄各 4 匹以上。	1 群/雌雄各 4 匹以上を使用(NOEL を決定する試験でない場合は、試験群および対照群、共にイヌ 2 匹で可)。		雌雄各 3 匹以上
5	感染			感染無きもの		
6	ケージ			1 ケージに 1 匹	動物舎の室温は 22℃(± 3° C)、湿度 30～70%。12 時間室内灯点灯、12 時間暗。動物は個室もしくは少数の同性での飼育。グループゲージングの際は、1 ケージあたり 4 匹以下。	
7	食餌			通常自由摂取。カロリー、栄養価に配慮。試験物の媒体に注意。	食餌は通常実験室飼育用の飼料、飲水は自由摂取。	
8	死亡率			コントロール群における致死率は、10%を超えぬこと。		
9	死後融解			死後融解にて、組織もしくは臓器の欠損に留意。		
10	剖検		① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精囊、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]	死後融解による組織欠損を最小にするため、剖検は屠殺もしくは死亡確認後、直ちに執り行うこと。		毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を、用量と時間との関連で観察、記録する。観察時間は通常 14 日間とする。 観察期間中の死亡例及びげっ歯類の観察期間終了時の生存例は全例剖検する。 肉眼的に異常の認められた器官・組織については、必要に応じて病理組織学的検査を行う。
11	Identity			CAS Registry Number を記載		
12	組成/純度			主たる成分、夾雑物および不純物の名称および品質を記載。		
13	保存状態			試験終了まで、試験物は品質、純度を考慮し保存。		
14	有効期限			試験物質の使用期限を守ること。		
15	投与経路		経口投与。混餌投与又は飲水投与により行う。等混餌(飲水)投与が困難な場合強制投与、マイクロカプセル使用可。	通常の人における暴露を考慮。 混餌、給水投与。 カプセル、ゾンデ使用可。	試験物質は、強制投与もしくは混餌、飲水投与。物質の物理化学的条件により決定。必要に応じ媒体使用可。	原則として、臨床適用経路とする。
16	投与期間		週 7 日、28 日間	試験期間(連続 2～4 週間)中、7 日/週の投与。	毎日 1 週当たり 7 日間、計 28 日間投与;5 日/週および 14 日間投与は、換算が必要。強制投与の場合は、胃管もしくはゾンデを用いての 1 日 1 回投与。混餌もしくは飲水投与の際には、試験物質が正常な栄養摂取に影響を与えることや水摂取バランスに影響を与えることの無きよう。	週 7 日、1 ヶ月間。

17	用量段階及び対照群	用量段階	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。用量設定の根拠要。飼料添加濃度5%（w/w）を超える投与量で実施する必要なし。強制投与の場合、技術的に投与できる最大量又は1000mg/kg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し。	最低、3投与群を設定。 1)高用量投与群においては、毒性が確認。 2)低用量投与群においては、毒性出てはならない。 3)中間用量投与群では、用量反応関係が判別可能（酵素レベルの変化もしくはわずかな体重減等）。	通常3段階の用量群とコントロール群を用いるが、他のデータから、1000mg/kgbw/dでも影響がないと推察される場合は、limit試験を行う。最高用量は、毒性影響を示し、斃死や激しい苦痛を起こさぬように設定。これより低い用量は、用量相関が観察され、最低用量ではNOAELが設定できるように選定。	少なくとも3段階の投与群を設け、被験物質の毒性像が明らかになるように、毒性変化が認められる用量と毒性変化が認められない用量（無毒性量）を含み、かつ用量反応関係が見られるように設定することが望ましい。その他、被験物質を投与しない（溶媒投与）対照群を設け、さらに必要に応じて、無投与対照群、陽性対照群を加える。
		対照群	対照群：被験物質投与群と同一条件。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。	食餌試験のコントロール群には基礎餌を与える。	Except for treatment with the test substance, animals in the control group should be handled in an identical manner to the test group subjects. If a vehicle is used in administering the test substance, the control group should receive the vehicle in the highest volume used.	
18	上限				1回の投与量が1000 mg/kg body weight/dayか、混餌もしくは飲水投与でこれと同用量がNOELとなるか、毒性が期待できない場合、3段階試験は必要なし。	
19	電算機処理			GLP準拠		
20	観察及び検査	一般状態	体重、摂餌（摂水）量：一般状態を毎日観察、定期的に体重及び摂餌量（飲水投与の場合は摂水量）を測定。一般状態の観察[外観（被毛、皮膚、眼・眼球、耳、鼻、口、肛門周囲及び粘膜等の変化、並びに衰弱、肥満・るいそう、腹部膨満等）、体位・姿勢（腹臥位、はいずり姿勢、円背位等）、意識・態度（興奮、攻撃性、不活発、鎮静、嗜眠等）、行動（探索行動の変化、身づくろいの変化、自発行動の変化、歩行の異常等）、神経系（振戦、けい攣、筋収縮性、各種の反射機能等）、体温、呼吸状態、排泄状態]。体重[少なくとも週1回]摂餌（摂水）量[少なくとも週1回]。	薬理学的/毒性学的効果の一般兆候、運動性、致死性を見るために、全ての実験動物を1～2回/日ゲージ外から観察。 1回/週体重測定。試験期間中、2回/週食餌摂取量（飲水投与の場合は水摂取量）をcheck。	14日間試験を除外し観察期間は28日間。付随試験群は、遅延反応、毒性持続及び毒性からの回復を観察すべく少なくとも14日間の無処置期間を設定すべき。臨床症状観察は少なくとも1回/日、同時に毒性症状のピークをcheck。健康状況の記録。実験動物の運動性と生存状況は少なくとも2回/日観察。兆候は、皮膚、被毛、目、粘膜、分泌、排泄自立運動（流涙、立毛、瞳孔サイズ、異常呼吸パターン）等の変化をも含む。間代性及び剛直性動作の存在、常同姓（過剰毛づくろい、連続旋回）、奇異な振る舞い（自己離断、後方歩）と同様に歩行、体位、接触時反応等の変化も記録。	一般状態、体重、摂餌量、飲水量：全試験動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量を測定する。これらの測定の頻度は、次のようにするのが標準的である。特に必要と思われる場合には、飲水量を測定する。 体重：投与開始前、投与開始後3カ月までは少なくとも毎週1回、その後4週に1回以上 摂餌量：投与開始前、投与開始後3カ月までは少なくとも毎週1回、その後4週に1回以上。ただし、被験物質を混餌で投与する場合は、毎週1回。なお、げっ歯類の場合、この測定は、個別又は群ごとのいずれかによって行ってもよい。
		体重			少なくとも1回/週体重測定。食餌摂取量は1回/週check。試験物が飲水投与の場合は水摂取量を1回/週check。	
		血液検査	げっ歯類[剖検前に少なくとも1回]、非げっ歯類[投与開始前、剖検前に採血]。血液学的検査[赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素、ヘマトクリット、その他必要に応じて網状赤血球、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等]。	1群雌雄10匹の血液学的検査を行う。採血は試験の初めの2週（投与期間中）と試験終了時。最初の採血は、毒性が現れ始めると予測される時期。採血は同時刻に行い、試験は個別に行い、Pool血液を用いてはならない。[ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、総白血球数および白血球分類、血球ヘモグロビン平均量、血球平均容積、血球ヘモグロビン平均量、血液凝固能測定（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、あるいは血小板数）]	試験終了時に次の血液試験を行う：haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte count, total and differential leucocyte count, platelet count and a measure of blood clotting time/potential。殺処分直前か処置の中で、一定の場所より採血し、血液を保存。	赤血球数、白血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット、血液像（白血球型別百分率）、その他網赤血球数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、など

		血液生化学的検査	血清(血漿)総蛋白、アルブミン、A/G 比、蛋白分画*、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ[AST (GOT)、ALT (GPT)、 γ -GTP、アルカリホスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等)等 *:血清総蛋白に異常が認められた場合は免疫グロブリン分画(Ig G、Ig M、Ig E、Ig A)]。	常に同じ動物から採血。1 群雌雄 10 匹の生化学試験を行う。採血は試験の初めの 2 週(投与期間中)と試験終了時。[肝細胞評価:下記 5 項目の少なくとも 3 項目を選択アラニンアミノトランスフェラーゼ(SGPT、ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(SGOT、AST)、ルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸、肝胆能評価:下記 5 項目の少なくとも 3 項目を選択アルカリホスファターゼ、(総)ビリルビン、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、5'ヌクレオチダーゼ、総胆汁酸、その他の細胞変化あるいは細胞機能に関するマーカー、アルブミン、カルシウム、塩素、(総)コレステロール、コリンエステラーゼ、クレアチニン、グロブリン(計算値)、グルコース(絶食動物)、亜リン酸、カリウム、(総)タンパク質、ナトリウム、中性脂肪(絶食)、尿素窒素]	組織における主たる毒性及び特に腎臓と肝臓への影響を、殺処分直前か処置の中で全ての実験動物より採血された血液を用いて臨床生化学試験を行う(斃死と、瀕死のため殺処分したものを除く)。血漿もしくは血清を用いて、sodium, potassium, glucose, total cholesterol, urea, creatinine, total protein and albumin を測定、肝細胞への影響を表す酵素(alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase, and sorbitol ehydrogenase)のなかから少なくとも 2 つ測定。他の酵素活性(肝臓もしくは他の臓器)や胆汁酸の測定は、ある種の状況下では有効な情報を得ることがある。	血清(血漿)蛋白、アルブミン、A/G 比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ(ASAT(GOT)),ALAT(GPT)), アルカリホスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リンなど)、など
		尿検査	投与開始前及び剖検前検査。[尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウム等)]。	げっ歯類では 1 群雌雄 10 匹、非げっ歯類では各群雌雄全動物について試験最終週に採取する。採取した尿量、比重、pH、グルコース、タンパク質を測定し、尿沈渣および血液／血液細胞について顕微鏡検査を行なう。	追加的に次の尿試験試験最終週にが行われることが望ましい: appearance, volume, osmolality or specific gravity, pH, protein, glucose and blood/blood cells.	げっ歯類では各群ごとに一定数の動物を選び、投与期間中 1 回以上、非げっ歯類では各群の全例について、投与開始前と投与期間中 1 回以上、尿検査を行う。尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウムなど)
		眼科学的検査	げっ歯類[最高用量群と対照群について剖検前]、非げっ歯類[全試験動物について投与開始前及び剖検前]。げっ歯類の最高用量群に変化が認められた場合は、その他の用量群についても検査する。検査は、通常、肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼房・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施。	対照群、高用量群の全ての実験動物に対し、試験開始前、終了後に行 投与にかかわる眼変化が認められた場合は、全ての実験動物の検査を行 。		げっ歯類では投与期間中少なくとも 1 回、各群ごとに一定数の動物を選び、眼科学的検査を行 。また、非げっ歯類では投与開始前及び投与期間中少なくとも 1 回、各群の全例について眼科学的検査を行 検査は肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼部・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施する。
		その他の機能検査	必要に応じて、心電図、腎機能、感覚機能検査や自発運動量測定、更により高次の行動変化等の検査を実施。			必要に応じて、心電図、視覚、聴覚、腎機能などの検査を実施する。
		剖検	① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行 、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行 、器官について重量測定を行 重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精囊、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]	重量を測定すべき器官は副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺／副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮である。器官は注意深く解剖し、脂肪や隣接組織を取り除き、乾燥を予防し重量測定への影響を可能な限り少なくするために迅速に重量を測定する。	試験動物は全て剖検。体表部、開口部および 頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察。liver, kidneys, adrenals, testes, epididymides, thymus, spleen, brain and heart of all animals (apart from those found moribund and/or intercurrently killed)は付着組織を取り除いた後、湿重量測定。	投与基間に死に かった例は、いたずらに死を待つより殺処分を行 ほ が多くの知見が得られる。まず、十分 観察を行 , 可能 あれば血液検査のための採血を行った後剖検し、器官・組織の肉眼的観察、病理組織学的検査を行 ほ , 必要に応じて器官重量を測定し、その時点 の毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。 投与期間終了時又は回復試験期間終了時の生存例は、血液検査のための採血を行った後全例剖検し、器官・組織の肉眼的観察、器官重量の測定を行 , 非げっ歯類では全例の、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の器官・組織の病理組織学的検査を行 。また、げっ歯類の他の用量群においても肉眼的に変化の認められた器官・組織のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその群の全例の病理組織学的検査を行う。げっ歯類においても、全例について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。

		病理組織学的検査	非げっ歯類では全試験動物、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の動物の組織。皮膚、乳腺、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等)、大動脈、唾液腺、骨及び骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸(空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣・精巣上体、卵巣及び卵管、子宮、陰、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄、鼻腔(鼻甲介)、眼球及びその附属器、ジンバル腺、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織]。	副腎、大動脈、骨(大腿骨)、骨髓(胸骨)、脳(少なくとも異なる 3 部位)、盲腸、結腸、子宮体部および頸部、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢(可能であれば)、ハーダー腺(可能であれば)、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺(気管支幹を含む)、リンパ節(投与経路に関連するリンパ節と遠位置にあるリンパ節それぞれ1つ)、乳腺、鼻甲介、卵巣および卵管、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精嚢(可能であれば)、骨格筋、皮膚、脊髄(3 部位:頸部、胸部中央、腰部)、脾臓、胃、精巣、胸腺(あるいは胸腺部位)、甲状腺/副甲状腺、気管、膀胱、陰、ジンバル腺(可能であれば)、異常を示す全ての組織	次の組織を固定し保存 :all gross lesions, brain (representative regions including cerebrum, cerebellum and pons), spinal cord, stomach, small and large intestines (including Peyer's patches), liver, kidneys, adrenals, spleen, heart, thymus, thyroid, trachea and lungs (preserved by inflation with fixative and then immersion), gonads, accessory sex organs (e.g. uterus, prostate), urinary bladder, lymph nodes (preferably one lymph node covering the route of administration and another one distant from the route of administration to cover systemic effects), peripheral nerve (sciatic or tibial) preferably in close proximity to the muscle, and a section of bone marrow (or, alternatively, a fresh mounted bone marrow aspirate)。コントロールと最高用量群の全ての試験動物の臓器及び組織は病理組織検査に供される。	皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、骨及び骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、脳、下垂体、脊髄、眼球及びその附属器、その他肉眼的に変化が認められた器官・組織
		光顕的評価		病変全てを検鏡。対照及び最高用量群の全ての組織を検査。投与による影響が認められた場合は、次の低用量について当該組織の検査を行う。影響が認められなくなるまで順次検査を行う。また投与終了前に死亡した動物がある場合は、毒性影響の可能性を探るべく検鏡。		
		リンパ系の病理組織		リンパ組織の病理組織評価は Chapter V. C を参照。		
		免疫系に対する影響	免疫系[胸腺、脾臓とリンパ節/リンパ様組織については必要により免疫組織化学検査を行い、免疫毒性が疑われた時は、更に、骨髓構成細胞比、脾リンパ球組成、NK 細胞活性についても検査。	免疫毒性(Redbook II Chapter V. C)を参照。		
		神経系及び性腺に対する影響	被験物質の投与によると考えられる神経症状の発現がみられた場合、一部の動物に対して灌流固定法により固定を行い、前脳、大脳中央部、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄(頸、胸、腰部)、背根神経節、背根、腹根、近位坐骨神経、腓腹神経、腓腹筋について神経病理学的検査。性腺[精巣は、通常、プアン固定。]	神経毒性は試験動物の適正年齢を考慮し、(1)brain, spinal cord, and peripheral nervous system の主たる部位を表す組織標本の特異的病理組織試験、(3)定量解析のための観察及び神経学的、行動的及び生理学的機能欠落を示す兆候を観察するに適した試験を行う。		
		その他	げっ歯類の他の用量群についても、肉眼的に変化の認められた器官のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその用量群の全試験動物について病理組織学的検査を行う。 なお、上述の場合のほかにあっても、げっ歯類において、全試験動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。			

Subchronic Toxicity			1	3	4	5
試験項目			食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	FDA Redbook 2000	OECD (408, 409)	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)
1	GLP			U.S. FDA good laboratory practice 準拠	GLP 準拠	
2	飼育法他			Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 準拠		
3	動物種及び性	げっ歯類	ラット、マウス: 同一週齢の動物、通常 5～6 週齢。	ラット、マウス使用。6～8 週令以下。新環境に移行後少なくとも 6 日以降。純系、交雑系、交配系を使用。	健康な成獣をコントロール、処置群に任意に振り分け。ゲージの影響が無きよう考慮。試験開始前、5 日以上期間を設けること。	試験に使用する動物種は、げっ歯類 1 種以上、ウサギ以外の非げっ歯類 1 種以上の合計 2 種以上。原則として、雌雄の動物を同数使用する。
		非げっ歯類	イヌ: 4～6 カ月齢。	イヌを使用する場合には遅くとも 4～6 カ月齢で開始すべきである。		ウサギ以外の非げっ歯類
4	動物数	げっ歯類	げっ歯類では 1 群/雌雄各 10 匹以上。	1 群/雌雄各 20 匹以上。	各投与群ごとに 20 匹(10 メス、10 オス)以上を使用。コントロール群にも同数を使用し、最高用量群をさらに 1 群用意し、投与終了後適当な観察期間を設けること。	1 群当たり雌雄各 10 匹以上。中間屠殺や回復性試験を予定する場合は、そのために必要な数を追加する。
		非げっ歯類	非げっ歯類では 1 群/雌雄各 4 匹以上。	1 群/雌雄各 4 匹以上。	雌雄各 4 匹以上	雌雄各 3 匹以上とする。
5	感染			感染無きもの		
6	ケージ			1 ケージに 1 匹	動物舎の室温は 22°C(± 3° C)、湿度 30～70%。12 時間室内灯点灯、12 時間暗。動物は個室もしくは少数の同性での飼育。	
7	食餌			通常自由摂取。カロリー、栄養価に配慮。試験物の媒体に注意。	食餌は通常実験室飼育用の飼料、飲水は自由摂取。	
8	死亡率			対照群における致死率は、10%を超えぬこと。		
9	死後融解			死後融解にて、組織もしくは臓器の欠損に留意。		
10	剖検		① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精囊、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]。	死後融解による組織欠損を最小にするため、剖検は屠殺もしくは死亡確認後、直ちに執り行うこと。		毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を、用量と時間との関連で観察、記録する。観察時間は 3 ヶ月間。観察期間中の死亡例及びげっ歯類の観察期間終了時の生存例は全例剖検する。肉眼的に異常の認められた器官・組織については、必要に応じて病理組織学的検査を行う。
11	Identity			CAS Registry Number を記載		
12	組成/純度			主たる成分、夾雑物および不純物の名称および品質を記載。		
13	保存状態			試験終了まで、試験物は品質、純度を考慮し保存。		
14	有効期限			試験物質の使用期限を守ること。		
15	投与経路		経口投与。混餌投与又は飲水投与により行う。混餌(飲水)投与が困難な場合強制投与、マイクロカプセル使用可。	通常の人における暴露を考慮。混餌、給水投与。カプセル、ゾンデ使用可。	試験物質は、強制投与もしくは混餌、飲水投与。物質の物理化学的条件により決定。必要に応じ媒体使用可。	原則として、臨床適用経路とする。

16	投与期間		週 7 日、90 日間	7 日/週、90 日(3 ヶ月)間の投与。	毎日 1 週当たり 7 日間、90 日間投与; 5 日/週は、換算が必要。強制投与の場合は、胃管もしくはゾンデを用いての 1 日 1 回投与。混餌もしくは飲水投与の際には、試験物質が正常な栄養摂取に影響を与えることや水摂取バランスに影響を与えることの無きよう。	〔臨床使用予想期間〕〔毒性試験投与期間〕 臨床使用予想期間が単回又は 1 週間以内の連続投与(1 クールの投与が 1 週間以内であり、かつ 1 週間以上の間隔で間歇投与される薬物で、しかも蓄積性の小さい場合は、1 週間以内の投与と考えてよい。): 毒性試験投与期間 1 カ月 臨床使用予想期間が 1 週間を超え、4 週間までの連続投与: 毒性試験投与期間 3 カ月 臨床使用予想期間が 1 カ月(4 週間)を超える長期連続投与: 毒性試験投与期間 6 カ月 臨床使用予想期間の長短にかかわらず、特に必要と認められるもの: 毒性試験投与期間 6 カ月 非げっ歯類にあつては 12 カ月投与試験を考慮する。
17	用量段階及び対照群	用量段階	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。用量設定の根拠要。飼料添加濃度 5% (w/w) を超える投与量で実施する必要なし。強制投与の場合、技術的に投与できる最大量又は 1000mg/kg 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し。	最低、3 投与群を設定。 1) 高用量投与群においては、毒性が確認。 2) 低用量投与群においては、毒性出てはならない。 3) 中間用量投与群では、用量反応関係が判別可能(酵素レベルの変化もしくはわずかな体重減等)。	通常 3 段階の用量群とコントロール群を用いるが、limit 試験が行なわれている場合はこの限りでない。最高用量は、毒性影響を示し、斃死や激しい苦痛を起こさぬように設定。これより低い用量は、用量相関が観察され、最低用量では NOAEL が設定できるように選定。減量間隔は 2~4 倍希釈が適当。	少なくとも 3 段階の投与群を設け、被験物質の毒性像が明らかになるように、毒性変化が認められる用量と毒性変化が認められない用量(無毒性量)とを含み、かつ用量反応関係が見られるように設定することが望ましい。
		対照群	対照群: 被験物質投与群と同一条件。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。	食餌試験の対照群には基礎餌を与える。		被験物質を投与しない(溶媒投与)対照群を設け、さらに必要に応じて、無投与対照群、陽性対照群を加える。
18	上限				1 回の投与量が 1000 mg/kg body weight/day か、混餌もしくは飲水投与でこれと同用量が NOEL となるか、毒性が期待できない場合、3 段階試験は必要なし。	
19	電算機処理			GLP 準拠		
20	観察及び検査	一般状態	体重、摂餌(摂水)量: 一般状態を毎日観察、定期的に体重及び摂餌量(飲水投与の場合は摂水量)を測定。一般状態の観察[外観(被毛、皮膚、眼・眼球、耳、鼻、口、肛門周囲及び粘膜等の変化、並びに衰弱、肥満・るいそう、腹部膨満等)、体位・姿勢(腹臥位、はいずり姿勢、円背位等)、意識・態度(興奮、攻撃性、不活発、鎮静、嗜眠等)、行動(探索行動の変化、身づくろいの変化、自発行動の変化、歩行の異常等)、神経系(振戦、けい攣、筋収縮性、各種の反射機能等)、体温、呼吸状態、排泄状態]。体重[少なくとも週 1 回。]摂餌(摂水)	薬理学的/毒性学的効果の一般兆候、運動性、致死性を見るために、全ての実験動物を 1~2 回/日ゲージ外から観察。 1 回/週体重測定。試験期間中、1 回/週食餌摂取量(飲水投与の場合は水摂取量)を check。	観察期間は 90 日間。付随試験群は、遅延反応、毒性持続及び毒性からの回復を観察すべく適当な無処置期間を設定すべき。臨床症状観察は少なくとも 1 回/日、同時に毒性症状のピークを check。健康状況の記録。実験動物の運動性と生存状況は少なくとも 2 回/日観察。兆候は、皮膚、被毛、目、粘膜、分泌、排泄自立運動(流涙、立毛、瞳孔サイズ、異常呼吸パターン)等の変化をも含む。間代性及び剛直性動作の存在、常同姓(過剰毛づくろい、連続旋回)、奇異な振る舞い(自己離断、後方歩)と同様に歩行、体位、接触時反応等の変化も記録。	一般状態、体重、摂餌量、飲水量全試験動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量を測定する。これらの測定の頻度は、次のようにするのが標準的である。特に必要と思われる場合には、飲水量を測定する。 体重: 投与開始前、投与開始後 3 カ月までは少なくとも毎週 1 回、その後 4 週に 1 回以上 摂餌量: 投与開始前、投与開始後 3 カ月までは少なくとも毎週 1 回、その後 4 週に 1 回以上。ただし、被験物質を混餌で投与する場合は、毎週 1 回。なお、げっ歯類の場合、この測定は、個別又は群ごとのいずれかによって行ってもよい。 毒性変化の可逆性を検討するため、いずれかの試験で回復群を設けることを考慮する。
		体重および摂餌量の測定頻度	投与開始前及び投与開始後少なくとも週 1 回。		少なくとも 1 回/週体重測定。食餌摂取量は 1 回/週 check。試験物が飲水投与の場合は水摂取量を 1 回/週 check。	体重: 投与開始前、投与開始後 3 カ月までは少なくとも毎週 1 回、その後 4 週に 1 回以上。摂餌量: 投与開始前投与開始後 3 カ月までは少なくとも毎週 1 回、その後 4 週に 1 回以上。ただし、被験物質を混餌で投与する場合は、毎週 1 回。なお、げっ歯類の場合、この測定は、個別又は群ごとのいずれかによって行ってもよい。

血液学的検査

げっ歯類[剖検前に少なくとも1回]、非げっ歯類[投与開始前、剖検前に採血]。げっ歯類については、実施上の理由から、各群の一部の動物に限っても差し支えない。

血液学的検査[赤血球数、白血球数、血液像(白血球型別百分率)、血小板数、血色素、ヘマトクリット、その他必要に応じて網状赤血球、凝固能(プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間)等。

1群雌雄10匹の血液学的検査を行う。採血は試験の初めの2週(投与期間中)と試験終了時。最初の採血は、毒性が現れ始めると予測される時期。採血は同時刻に行い、試験は個別に行い、Pool血液を用いてはならない。

[ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および白血球分類、平均血球ヘモグロビン量、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン濃度および血液凝固能の測定(凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、あるいは血小板数]

試験終了時に次の血液試験を行う: haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte count, total and differential leucocyte count, platelet count and a measure of blood clotting time

ビ 殺 別 1

剖検	① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精嚢、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]	試験動物は、体表部、開口部および 頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察することを含め全て剖検に供す。副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、前立腺、甲状腺/副甲状腺、胸腺（存在する場合）、卵巣および子宮等の臓器を秤量。臓器は脂肪及び周囲組織を除いて剖検後乾燥による影響を最小にすべく直ちに秤量。	試験動物は全て剖検。体表部、開口部および 頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察。liver, kidneys, adrenals, testes, epididymides, thymus, spleen, brain and heart of all animals (apart from those found moribund and/or intercurrently killed)は付着組織を取り除いた後、湿重量測定。	投与期間中の死亡例は、すみやかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察のほか、必要に応じ、器官重量の測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう試みる。投与基間中に死にかかった例は、いたずらに死を待つより殺処分を行うほうが多くの知見が得られる。まず、十分な観察を行い、可能であれば血液検査のための採血を行った後剖検し、器官・組織の肉眼的観察、病理組織学的検査を行うほか、必要に応じて器官重量を測定し、その時点での毒性変化の程度を明らかにするよう努める。重量測定の対象として、通常下記の器官・組織が選定されるが、肉眼的所見などからの判断によって、適宜削減又は追加する。重量測定：心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、卵巣、脳及び下垂体については、ほとんど常に測定されている。唾液腺、胸腺、甲状腺、精嚢、子宮についても測定されることが多い。投与期間終了時又は回復試験期間終了時の生存例は、血液検査のための採血を行った後全例剖検し、器官・組織の肉眼的観察、器官重量の測定を行い、非げっ歯類では全例の、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の器官・組織の病理組織学的検査を行う。また、げっ歯類の他の用量群においても肉眼的に変化の認められた器官・組織のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその群の全例の病理組織学的検査を行う。げっ歯類においても、全例について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。
病理組織学的検査	非げっ歯類では全試験動物、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の動物の組織。皮膚、乳腺、リンパ節（頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等）、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸（空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣・精巣上体、卵巣及び卵管、子宮、膈、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髓、鼻腔（鼻甲介）、眼球及びその付属器、ジンバル腺、そのほか肉眼的に変化が認めそのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織。	通常、組織は 10% buffered formalin で固定後切片を作製し EO 染色を行い検鏡。肺は固定前に注空の要あり。[副腎、大動脈、骨（大腿骨）、骨髄（胸骨）、脳（少なくとも異なる 3 部位）、盲腸、結腸、子宮体部および頸部、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢（あれば）、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺（気管支幹とともに）、リンパ節（投与経路に関連するリンパ節と遠位置にあるリンパ節それぞれ1つ）、乳腺、鼻甲介、卵巣および卵管、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精嚢（あれば）、骨格筋、皮膚、脊髓（3 部位：頸部、胸部中央、腰部）、脾臓、胃、精巣、胸腺（あれば）、甲状腺/副甲状腺、気管、膀胱、膈、ジンバル腺及び異常の認められる全ての組織。]	次の組織を固定し保存：all gross lesions, brain (representative regions including cerebrum, cerebellum and pons), spinal cord, stomach, small and large intestines (including Peyer's patches), liver, kidneys, adrenals, spleen, heart, thymus, thyroid, trachea and lungs, aorta, gonads, uterus, accessory sex organs, female mammary gland, prostate, urinary bladder, gall bladder (mouse), lymph nodes peripheral nerve, a section of bone marrow (and/or a fresh bone marrow aspirate), skin and eyes.	皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、卵巣、子宮、膈、脳、下垂体、脊髓、眼球及びその付属器、その他肉眼的に変化が認められた器官・組織
光顕的評価		病変全てを検鏡。対照及び最高用量群の全ての組織を検査。投与による影響が認められた場合は、次の低用量について当該組織の検査を行う。影響が認められなくなるまで順次検査を行う。また投与終了前に死亡した動物がある場合は、毒性影響の可能性を探るべく検鏡。		
リンパ系の病理組織		リンパ組織の病理組織評価は Chapter V. C を参照。		

		免疫系に対する影響	免疫系[胸腺、脾臓とリンパ節／リンパ様組織については必要により免疫組織化学検査を行い、免疫毒性が疑われた時は、更に、骨髓構成細胞比、脾リンパ球組成、NK細胞活性についても検査。	免疫毒性(Chapter V. C)を参照。		
		神経系及び性腺に対する影響	被験物質の投与によると考えられる神経症状の発現がみられた場合、一部の動物に対して灌流固定法により固定を行い、前脳、大脳中央部、中脳、小脳、橋、延髄、脊髓(頸、胸、腰部)、背根神経節、背根、腹根、近位坐骨神経、腓腹神経、腓腹筋について神経病理学的検査。性腺[精巣は、通常、ファン固定。	神経毒性は実験動物の適正年齢を考慮し、(1)脳、脊髓、末梢神経系の主たる部位を表す組織標本の特異的病理組織試験、(2)定量解析のための観察及び神経学的、行動的及び生理学的機能欠落を示す兆候を観察するに適した試験を行う。		
		その他	げっ歯類の他の用量群についても、肉眼的に変化の認められた器官のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその用量群の全試験動物について病理組織学的検査を行う。 なお、上述の場合のほかにあっても、げっ歯類において、全試験動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。			

Chronic Toxicity			1	3	4	5
試験項目			食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	FDA Redbook 2000	OECD (452)	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)
1	GLP			U.S. FDA good laboratory practice 準拠	GLP 準拠	
2	飼育法他			Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 準拠		
3	動物種及び性	げっ歯類	ラット、マウス: 同一週齢の動物、通常 5～6 週齢。	ラット、マウス使用。6～8 週令以下。新環境に移行後少なくとも 5 日以降。 純系、交雑系、交配系を使用。	健康な成獣をコントロール、処置群に任意に振り分け。 ゲージの影響が無きよう考慮。通常ラットを使用。 試験開始前、5 日以上期間を設けること。	試験に使用する動物種は、げっ歯類 1 種以上、ウサギ以外の非げっ歯類 1 種以上の合計 2 種以上。原則として、雌雄の動物を同数使用する。
		非げっ歯類	イヌ: 4～6 カ月齢。	イヌは 4～6 ヶ月齢を使用	犬を使用。	ウサギ以外の非げっ歯類
4	動物数	げっ歯類	げっ歯類では 1 群/雌雄各 20 匹以上。なお、中間屠殺を予定する場合は、そのために必要な数を追加すること。	1 群/雌雄各 20 匹以上。	各投与群ごとに雌雄 20 匹以上を使用。 コントロール群にも同数を使用。	1 群当たり雌雄各 10 匹以上。中間屠殺や回復性試験を予定する場合は、そのために必要な数を追加する。
		非げっ歯類	非げっ歯類では 1 群/雌雄各 4 匹以上。	グループあたり雌雄各 4 匹以上を使用。	各投与群ごとに雌雄 4 匹以上を使用。	雌雄各 3 匹以上とする。
5	感染			感染なきもの		
6	ケージ			1 ケージに 1 匹	動物舎の室温は 22°C(±32° C)、湿度 30～70%。12 時間室内灯点灯、12 時間暗。動物は個室もしくは少数の同性での飼育。グループケージングの際は、1 ケージあたり 4 匹以下。	
7	食餌			通常自由摂取。カロリー、栄養価に配慮。試験物の媒体に注意。	食餌は通常実験室飼育用の飼料、飲水は自由摂取。	
8	死亡率			コントロール群における致死率は、10%を超えぬこと。		
9	死後融解			死後融解にて、組織もしくは臓器の欠損に留意。		
10	剖検		① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。 ② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。 ③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精囊、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]。	死後融解による組織欠損を最小にするため、剖検は屠殺もしくは死亡確認後、直ちに執り行うこと。		毒性徴候の種類、程度、発現、推移及び可逆性を、用量と時間との関連で観察、記録する。観察時間は 6 ヶ月間。 観察期間中の死亡例及びげっ歯類の観察期間終了時の生存例は全例剖検する。 肉眼的に異常の認められた器官・組織については、必要に応じて病理組織学的検査を行う。
11	Identity			CAS Registry Number を記載		
12	組成/純度			主たる成分、夾雑物および不純物の名称および品質を記載。		
13	保存状態			試験終了まで、試験物は品質、純度を考慮し保存。		
14	有効期限			試験物質の使用期限を守ること。		
15	投与経路		経口投与。混餌投与又は飲水投与により行う。等混餌(飲水)投与が困難な場合強制投与、マイクロカプセル使用可。	通常の人における暴露を考慮。 混餌、給水投与。 カプセル、ゾンデ使用可。	試験物質は、強制投与もしくは混餌、飲水投与。物質の物理化学的条件により決定。必要に応じ媒体使用可。	原則として、臨床適用経路とする。
16	投与期間		週 7 日、1 年以上	7 日/週、12 ヶ月間の投与。	毎日 1 週当たり 7 日間、計 28 日間投与; 5 日/週および 14 日間投与は、換算が必要。強制投与の場合は、胃管もしくはゾンデを用いての 1 日 1 回投与。混餌もしくは飲水投与の際には、試験物質が正常な栄養摂取に影響を与えることや水摂取バランスに影響を与えることの無きよう。	げっ歯類: 週 7 日、6 ヶ月間 非げっ歯類: 週 7 日、9 ヶ月間

17	用量段階 及び対照群	用量段階	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(NOAE)を推定することができるように設定する。用量設定の根拠要。飼料添加濃度5%(w/w)を超える投与量で実施する必要なし。強制投与の場合、技術的に投与できる最大量又は1000mg/kg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し。	最低、3投与群を設定。 1)高用量投与群においては、毒性が確認かつ死亡を起こさない量。 2)低用量投与群においては、生物学的に著しい毒性が出てはならない。 3)中間用量投与群では、用量反応関係が判別可能(酵素レベルの変化もしくはわずかな体重減等)。	NOELが設定できるような用量相関が観察できるように設定。すなわち3段階の用量群とコントロール群を用いるが、最高用量は、毒性影響を示し、極端な斃死を起こさぬように設定。低用量は、毒性を示さぬように選定。	少なくとも3段階の投与群を設け、被験物質の毒性像が明らかになるように、毒性変化が認められる用量と毒性変化が認められない用量(無毒性量)とを含み、かつ用量反応関係が見られるように設定することが望ましい。その他、被験物質を投与しない(溶媒投与)対照群を設け、さらに必要に応じて、無投与対照群、陽性対照群を加える。
		対照群	対照群：被験物質投与群と同一条件。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。	食餌試験のコントロール群には基礎餌を与える。		
18	電算機処理			GLP 準拠		
19	観察及び 検査	一般状態、	体重、摂餌(摂水)量：一般状態を毎日観察、定期的に体重及び摂餌量(飲水投与の場合は摂水量)を測定。一般状態の観察[外観(被毛、皮膚、眼・眼球、耳、鼻、口、肛門周囲及び粘膜等の変化、並びに衰弱、肥満・るいそう、腹部膨満等)、体位・姿勢(腹臥位、はいずり姿勢、円背位等)、意識・態度(興奮、攻撃性、不活発、鎮静、嗜眠等)、行動(探索行動の変化、身づくろいの変化、自発行動の変化、歩行の異常等)、神経系(振戦、けい攣、筋収縮性、各種の反射機能等)、体温、呼吸状態、排泄状態]。摂餌(摂水)	薬理学的/毒性学的効果の一般兆候、運動性、致死性を見るために、全ての実験動物を1~2回/日ゲージ外から観察。 1回/週体重測定。試験期間中、1回/週食餌摂取量(飲水投与の場合は水摂取量)をcheck。 腫瘍が発生した場合は、投与期間、部位、用量、形状、進行状況を記録。	臨床症状観察は少なくとも1回/日、死亡状況と同様、神経症状および目変化を記録。毒性の発現時期と腫瘍の発生が疑われた時期を記録。	一般状態、体重、摂餌量、飲水量全試験動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量を測定する。これらの測定の頻度は、次のようにするのが標準的である。特に必要と思われる場合には、飲水量を測定する。 体重：投与開始前、投与開始後3カ月までは少なくとも毎週1回、その後4週に1回以上摂餌量：投与開始前、投与開始後3カ月までは少なくとも毎週1回、その後4週に1回以上。ただし、被験物質を混餌で投与する場合は、毎週1回。なお、げっ歯類の場合、この測定は、個別又は群ごとのいずれかによって行ってもよい。 毒性変化の可逆性を検討するため、いずれかの試験で回復群を設けることを考慮する。
		体重	投与開始前及び投与開始後3カ月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回。		最初の13週間、少なくとも1回/週、その後は1回/4週、体重測定。食餌摂取量は最初の13週間、1回/週check。	
		血液検査	げっ歯類では剖検前に、非げっ歯類では投与開始前、投与開始後3カ月ごと及び試験終了時に採血して検査。血液学的検査[赤血球数、白血球数、血液像(白血球型別百分率)、血小板数、血色素、ヘマトクリット、その他必要に応じて網状赤血球、凝固能(プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間)等]。	全ての実験動物に対し、2週内、3、6、12月に検査。12ヶ月時の検査でパラメータの変化の傾向かもしくは顕著な変化が認められ、それが12ヶ月目の検査で重要であり試験がさらに延長される場合には試験終了時に血液検査の追加を行うべし。 採血は試験の初めの2週(投与期間中)と試験終了時。最初の採血は、毒性が現れ始めると予測される時期。採血は同時刻に行い、試験は個別に行い、Pool血液を用いてはならない。[ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および白血球分類、平均血球ヘモグロビン量、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン濃度および血液凝固能の測定(凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、あるいは血小板数)]	3ヶ月、6ヶ月その後6ヶ月毎に次の血液試験を行う：haemoglobin content, packed cell volume, total red blood cells, total white blood cells, platelets, or other measures of clotting potential)。試験終了時に全てのグループよりイヌは全て、ラットは10匹/群より採血。	血液学的検査：赤血球数、白血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット、血液像(白血球型別百分率)、その他網赤血球数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、など 血液化学的検査：血清(血漿)蛋白、アルブミン、A/G比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ(ASAT(GOT)),ALAT(GPT)), アルカリフォスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リンなど)、など

血液生化学的検査	血清(血漿)総蛋白、アルブミン、A/G比、蛋白分画*、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ[AST(GOT)、ALT(GPT)、γ-GTP、アルカリホスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等)等。	全ての実験動物に対し、2週内、3、6、12月に検査。12ヶ月時の検査でパラメータの変化の傾向かもしくは顕著な変化が認められ、それが12ヶ月目の検査で重要であり試験がさらに延長される場合には試験終了時に血液性化学検査の追加を行うべし。常に同じ動物から採血。1群雌雄10匹の生化学試験を行う。採血は試験の初めの2週(投与期間中)と試験終了時。肝細胞の影響は次の5の試験の中から最低3行[アラニンアミトランスフェラーゼ(SGPT, ALT)、アスパラギン酸 アミトランスフェラーゼ(SGOT, AST)、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸、肝胆道系評価(下記5項目の少なくとも3項目)、アルカリフォスファターゼ、(総)ビリルビン、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GG transferase)、5'ヌクレオチダーゼ、総胆汁酸、その他の細胞変化あるいは細胞機能に関するマーカー、アルブミン、カルシウム、塩素、(総)コレステロール、コリンエステラーゼ、クレアチニン、グロブリン(計算値)、グルコース、無機リン、カリウム、(総)たん白質、ナトリウム、トリグリセリド、尿素窒素]	6ヶ月毎と終了時に、ラットでは10匹/群、イヌでは全てに検査。total protein concentration; albumin concentration; liver function tests (such as alkaline phosphatase activity, glutamic-pyruvic transaminase* activity and glutamic oxalacetic transaminase** activity), gamma glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase; carbohydrate metabolism such as fasting blood glucose; kidney function tests such as blood urea nitrogen.	
尿検査	げっ歯類では各群ごとに一定数の動物(少なくとも10匹)を選び、非げっ歯類では各群の全試験動物について、血液検査と同時期に。[尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウム等)]。	尿経時回収は、試験最終週に行う。1群雌雄10匹の試験を行う。投与開始前、ならびに投与3、6および12カ月目に、尿沈渣および血液/血球の顕微鏡検査とともに採取した尿量、尿比重、pH、糖、たん白の測定が推奨されている。	採血時に検査。ラットでは全ての群で10匹/群について。可能であれば個々のラットについて。: appearance, volume, osmolality or specific gravity, pH, protein, glucose ketones, occult blood (semi-quantitatively); and microscopy of sediment (semi-quantitatively)	げっ歯類では各群ごとに一定数の動物を選び、投与期間中1回以上、非げっ歯類では各群の全例について、投与開始前と投与期間中1回以上、尿検査を行う。尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウムなど)
眼科学的検査	げっ歯類では必要に応じて、投与期間中少なくとも1回(終了時)、雌雄各群ごとに一定数の動物(少なくとも10匹)。非げっ歯類では投与開始前及び投与期間中少なくとも1回及び剖検前に、各群の全試験動物について。	コントロール群、高用量群の全ての実験動物に対し、試験開始前、終了後に行う。投与にかかわる眼変化が認められた場合は、全ての実験動物の検査を行う。	投与期間中、眼変化について観察。	げっ歯類では投与期間中少なくとも1回、各群ごとに一定数の動物を選び、眼科学的検査を行う。また、非げっ歯類では投与開始前及び投与期間中少なくとも1回、各群の全例について眼科学的検査を行う。検査は肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼部・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施する。
その他の機能検査	必要に応じて、心電図、腎機能、感覚機能検査や自発運動量測定、更により高次の行動変化等の検査を実施。			
剖検	① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。 ② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。 ③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣、精囊、卵巣、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]。	試験動物は、体表部、開口部および頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察することを含め全て剖検に供す。副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、前立腺、甲状腺/副甲状腺、胸腺(存在する場合)、卵巣および子宮等の臓器を秤量。臓器は脂肪及び周囲組織を除いて剖検後乾燥による影響を最小にすべく直ちに秤量。	試験動物は全て剖検。体表部、開口部および頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察。liver, kidneys, adrenals, testes, epididymides, thymus, spleen, brain and heart of all animals (apart from those found moribund and/or intercurrently killed)は付着組織を取り除いた後、湿重量測定。	病理組織学的検査:皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、骨及び骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、脳、下垂体、脊髄、眼球及びその付属器、その他肉眼的に変化が認められた器官・組織

病理組織学的検査	非げっ歯類では全試験動物、げっ歯類では少なくとも最高用量群と対照群の動物の組織。皮膚、乳腺、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等)、大動脈、唾液腺、骨及び骨髄(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸(空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓及び胆嚢、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣・精巣上体、卵巢及び卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄、鼻腔(鼻甲介)、眼球及びその附属器、ジンバル腺、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織。また、げっ歯類の他の用量群についても、肉眼的に変化の認められた器官のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその用量群の全試験動物について。	通常、下記の組織を 10%緩衝ホルマリン(または一般的に知られる他の固定液)で固定し、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(または適切な染色)で染色して、病理組織標本を作製する。肺は、固定液を注入して膨らませてから固定液に浸漬する。[副腎、大動脈、骨(大腿骨)、骨髄(胸骨)、脳(少なくとも異なる3部位)、盲腸、結腸、子宮体部および頸部、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢(あれば)、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺、主気管支とともに)、リンパ節(投与経路に関連するリンパ節と遠隔にあるリンパ節それぞれ1つ)、乳腺、鼻甲介、卵巢および卵管、膵臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精嚢(あれば)、骨格筋、皮膚、脊髄(3部位:頸部、胸部中央、腰部)、脾臓、胃、精巣、胸腺(あれば)、甲状腺/上皮小体、気管、膀胱、膣、ジンバル腺、異常を示すすべての組織。]	次の組織を固定し保存:all gross lesions, brain (representative regions including cerebrum, cerebellum and pons), spinal cord, stomach, small and large intestines (including Peyer's patches), liver, kidneys, adrenals, spleen, heart, thymus, thyroid, trachea and lungs	
光顕的評価		病変全てを検鏡。対照及び最高用量群の全ての組織を検査。投与による影響が認められた場合は、次の低用量について当該組織の検査を行う。影響が認められなくなるまで順次検査を行う。また投与終了前に死亡した動物がある場合は、毒性影響の可能性を探るべく検鏡。		
リンパ系の病理組織		リンパ組織の病理組織評価は Chapter V. C を参照。		
免疫系に対する影響	免疫系[胸腺、脾臓とリンパ節/リンパ様組織については必要により免疫組織化学検査を行い、免疫毒性が疑われた時は、更に、骨髄構成細胞比、脾リンパ球組成、NK 細胞活性についても検査。	免疫毒性(Chapter V. C)を参照。		
神経系及び性腺に対する影響	被験物質の投与によると考えられる神経症状の発現がみられた場合、一部の動物に対して灌流固定法により固定を行い、前脳、大脳中央部、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄(頸、胸、腰部)、背根神経節、背根、腹根、近位坐骨神経、腓腹神経、腓腹筋について神経病理学的検査。性腺[精巣は、通常、ブアン固定]。	神経毒性は実験動物の適正年齢を考慮し、(1)脳、脊髄、末梢神経系の主たる部位を表す組織標本の特異的病理組織試験、(2)定量解析のための観察及び神経学的、行動的及び生理学的機能欠落を示す兆候を観察するに適した試験を行う。		
その他	また、げっ歯類の他の用量群についても、肉眼的に変化の認められた器官のある場合、あるいは高用量群での所見から考えて、必要と考えられる場合には、当該器官・組織についてその用量群の全試験動物について病理組織学的検査を行う。 なお、上述の場合のほかにあっても、げっ歯類において、全試験動物について病理組織学的検査を行うことは、評価の助けになる。			

		限界試験			被験動物の体重 1 kg あたり 5 mg (または ml) の被験物質を、絶食か(ラットについては 1 番、マウスについては 4 時間)にある複数の(たいていは 5 匹の)動物に強制経口投与する。動物は最長 14 日間、注意深く観察し、一般症状および回復性について記録する。	In the case of substances of low toxicity as demonstrated in repeated-dose studies, if a dose of at least 1000 mg/kg produces no evidence of interference with reproductive performance, studies at other dose levels may not be considered necessary.	If an oral study at one dose level of at least 1000 mg/kg body weight/day or for dietary or drinking water administration, an equivalent percentage in the diet or drinking water using the procedures described for this study, produces no observable toxic		技術的に投与可能な最大量又は 1,000 mg/kg 体重/日相当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。
親動物	投与期間	F0	雌:2 週間以上投与した後、交配。交配期間、妊娠期間及び哺育期間を通じ、出生児(FI)が離乳するまで連日。 雄:8 週間以上投与した後、交配する。交配期間中も連日投与。	雄:離乳、訓化後直ちに開始。精子形成期間が少なくとも 1 サイクル終了するまで。成長期の期間継続的に。交尾期間中も継続的に。 雌:交尾の 2 週間前より。交尾後妊娠、授乳中も。	最初(第一世代)の雌親動物(F0)については、被験物質による精子形成に対する有害な作用を調べるため、交配前では雄と同じ期間(少なくとも10 週間)ならびにその後の交配および妊娠期間から F1a 同腹児の離乳まで曝露。	Male: In rats dosing is continued for ten weeks prior to the mating period (for mice, eight weeks).[for at least one complete spermatogenic cycle] Female: For parental (P) females, dosing should begin after at least five days of acclimatisation and contin	For both sexes (P and F1), dosing shall be continued for at least 10 weeks before the mating period. Dosing is continued in both sexes during the 2 week mating period. Males should be humanely killed and examined when they are no longer needed for assessm	特に精子形成に及ぼす影響に関する試験では、毒性試験で得られたデータ(例えば、病理組織学的所見、生殖器官の重量、ある場合にはホルモン測定データ及び遺伝毒性データ)が有効に利用できるであろう。少なくとも2週間の反復投与毒性試験で影響が認められなかった場合には、雌で2週間、雄で2週間の交配前投与期間を設定することができる。(。雄の生殖器官の病理組織学的検査及び精子検査によっては検出できない雄の生殖に及ぼす影響を見出すためには、交配前4週間投与したのち雌と交配させる方法が、さらに長期間投与したのち雌と交配させる方法と比べて、少なくとも同程度に有効であることが示されている。バリデーションにより2週間試験が4週間試験と同じように有効であると確認されたので、交配前2週間の投与も許容される。)	5～9週齢目から投与を開始し、交配するまで 10 週間以上投与する。その後も、雄は少なくとも交配が終了するまで、雌はF1児を離乳するまで投与を継続する。
		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	雄:離乳から交尾期間を通じ継続的に。 雌:屠殺するまで。	同腹児(通常 F1a および F2a)については、出生前から生後の全期間を通して曝露。第三世代が計画されている場合においても、同腹児には出生前から生後の全期間を通して曝露。		Daily dosing of the F1 males and females shall begin at weaning; it should be kept in mind that in cases of test substance administration via diet or drinking water, direct exposure of the F1 pups to the test substance may already occur during the lactate	本ガイドラインは、医薬品の既存のガイドラインに由来しているので、離乳時から性成熟期にわたる薬物曝露については全面的に網羅しておらず、また、生殖寿命の短縮の可能性も取り扱っていない。	離乳の時点から投与を開始し、交配するまで 10 週間以上連続投与する。その後も、雄は少なくとも交配が終了するまで、雌はF2 児を離乳するまで投与を継続する。
	一般状態		全試験動物:一般状態及び妊娠・分娩状態を毎日観察。生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を観察。流産・早産、分娩遅延等を観察。 新生児: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。	雄:離乳、訓化後直ちに開始。精子形成期間が少なくとも 1 サイクル終了するまで。成長期の期間継続的に。交尾期間中も継続的に。 雌:交尾の 2 週間前より。交尾後妊娠、離乳するまで。		Throughout the test period, each animal should be observed at least once daily. Pertinent behavioural changes, signs of difficult or prolonged parturition and all signs of toxicity, including mortality, should be recorded.	Pairs without progeny should be evaluated to determine the apparent cause of the infertility. This may involve such procedures as additional opportunities to mate with other proven sires or dams, microscopic examination of the reproductive organs, and exa	症状及び生死:少なくとも1日1回、 一体重及び体重変化:少なくとも週2回、一臍垢塗沫標本:交尾または交尾成立前の期間に及ぼす影響の有無を調べるために、少なくとも交配期間中は毎日記録すること。	P及び交配用F1動物について、一般状態を毎日観察する。繁殖期の雌については、妊娠・分娩状態も観察する。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・分娩状態は、流産・早産、分娩遅延等を観察する。 交配用F1動物について、外部生殖器の発育状態を調べる。

親動物	体重	投与開始前及び投与開始後は少なくとも週1回測定。	雄：離乳から交尾期間を通じ継続的に。 雌：屠殺するまで。		P males and females should be weighed on the first day of dosing and weekly thereafter. These observations should be reported individually for each adult animal.	Parental animals (P and F1) shall be weighed on the first day of dosing and at least weekly thereafter. Parental females (P and F1) shall be weighed at a minimum on gestation days 0, 7, 14, and 20 or 21, and during lactation on the same days as the weighi	少なくとも週2回[投与期間中の妊娠雌動物の体重を毎日測定することにより有益な情報が得られることもある。化合物によっては、妊娠期間以外の時期(交配前、交配中、授乳期間中)にも週2回以上、体重を測定することが望ましい]。	定期的に体重及び摂餌量を測定する(飲水投与の場合にあつては摂水量も測定する。以下同じ。)。なお、体重及び摂餌量の測定は、通常、投与開始日及び投与開始後は少なくとも週1回の割合で行う。繁殖期間中の雌については、妊娠0、7、14、21日及び哺育0、7、14、21日に測定する。被験物質の摂取量も合わせて算出すること。
	餌摂取量	投与開始前及び投与開始後は少なくとも週1回。	少なくとも1日1回各動物を観察する。行動及び飼料摂取量の変化、毒性の徴候、動物の死亡等について記録すること。		During pre-mating and mating periods, food consumption should be measured weekly. Optionally, during pregnancy food consumption may be measured daily. After parturition, and during lactation, food consumption measurements should be made on the same day as	During the premating and gestation periods food consumption shall be measured weekly at a minimum. Water consumption shall be measured weekly at a minimum if the test substance is administered in the water.	少なくとも週1回(交配期間中は除く)	上記
	妊娠、出産	交尾率、妊娠率、出産率、離乳時の生存率を算出。	投与開始日に体重を測定し、以降毎週1回体重測定を行う。					交尾率【(交尾した動物数／交配に用いた動物数)×100】、受胎率【(妊娠動物数／交尾した雌動物数)×100】、出産率【(生存児出産雌数／妊娠雌数)×100】、離乳率【(離乳時の生存児数／生後4日に調整した児数)×100】を算出する。
	性周期	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。	個々の動物の体重の変化に応じて週ごとに調整。妊娠中は6日目の体重に基づいて計算した投与量を与える。			Oestrous cycle length and normality are evaluated in P and F1 females by vaginal smears prior to mating, and optionally during mating, until evidence of mating is found.		P及び交配用F1雌について、交配前に2週間以上発情周期を調べる。必要に応じて第三世代(F2)雌の発情周期も調べる。
	交配	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。同居期間は3週間を限度。	3週間を限度。	各交配では、雌1例を同用量群から無作為に選抜した雄1例(1対1交配)と妊娠が確認されるまであるいは2～3週間が経過するまで同居させる。雄が死亡する状況においては雄1例と雌2例の交配も許容される。	Either 1:1 (one male to one female) or 1:2 (one male to two females) matings may be used in this study.	For each mating, each female shall be placed with a single male from the same dose level (1:1mating) until copulation occurs or 2 weeks have elapsed.	雌雄1対1の交配比が望ましい。雄動物 交配結果が曖昧な場合には、受胎能あるいは不妊を確認するために雄動物を無処置の雌動物と交配させることができる。	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2週間を限度とする。
	二次交配	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。	同一投与群の母獣の異なるF1の間で行う。	少なくとも雄1例と雌1例について同用量群の異なる同腹児を無作為に交配相手に選抜して次世代児を繁殖させる。		For mating the F1 offspring, at least one male and one female should be selected at weaning from each litter for mating with other pups of the same dose level but different litter, to produce the F2 generation.		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1又は2匹を交配用として選抜する。交配に際して、同腹児の交配を避ける。

		出産予定前日の子宮検査		選抜して、交尾させた P 及び F の全数につき、陰、子宮、卵巣、辜丸、副辜丸、精囊、前立腺及び標的臓器を顕微鏡下で検査することができるように保存。					
		不妊動物の子宮検査				Those pairs that fail to mate should be evaluated to determine the cause of the apparent infertility. This may involve such procedures as additional opportunities to mate with other proven sires or dams, microscopic examination of the reproductive organs,			交尾が成立しなかった雌雄動物については、その原因を調査すること。
		観察	産児数、死児数、生存児数を数え外表異常の有無及び性別。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。	生後、1.4、及び 21 日に体重、及び匹数を測定。母獣、新生仔において観察された身体異常及び行動異常を記録。出産困難、遅延及び分娩時間の延長などが観察された場合は記録。		Live pups should be counted and litters weighed on the morning after birth and on days 4 and 7 and weekly thereafter until termination of the study, when animals should be weighed individually. Physical or behavioural abnormalities observed in the dams or		形態異常、出生時生存児、出生時死亡児、出生時体重、離乳前及び離乳後の生存率、成長／体重、成熟及び受胎能、身体的発達(推奨される離乳後の発達指標は、雌では陰膣開口で、雄では陰茎龟头と包皮との分離である)	出産後速やかに母動物ごとの産児数、死産児数、生存児数、児動物の外表異常の有無及び性を調べ、体重を測定する。必要に応じて肛門・生殖結節間距離 (AGD: Anogenital Distance) を測定する。生後 4 日、7 日、14 日及び 21 日における生存児の数を調べ、生存率を算出する。
		体重	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。	生後直後、4 及び 21 日目に測定し、以降毎週 1 回。	各生存胎児の体重を測定し、性別を記録する。各生存胎児の外表奇形を観察した後、骨格および軟組織異常の検査を行なう。	on day 4 after birth, the size of each litter may be adjusted by eliminating extra pups by selection to yield, as nearly as possible, four males and four females per litter.		出生時の身体発達に関する最も的確な指標は体重である。	生後 4 日、7 日、14 日及び 21 日における個体ごとに体重を測定する。
		児数調節	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)に調整可。同腹児の匹数が 8 匹以下の場合には調整せず。	同産仔数が 10 匹を超える場合は、その内から 10 匹を選ぶ。	各生存胎児の体重を測定し、性別を記録。各生存胎児の外表奇形を観察した後、骨格および軟組織異常の検査を行なう。			生殖発生毒性試験において同腹新生児の調整を行うことの可否については、現在なお議論中。同腹児新生児数の調整については、調整するか否かにかかわらず実験者が説明を加えなければならない。	生後 4 日に、雌雄各 4 匹になるよう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)となるように調整すればよい。また、同腹児が 8 匹以下の場合には調整を行わない。
		胎児顕微解剖		[発生毒性] 妊娠期間のの末期(出産予定日の 1 日前)に体重測定、屠殺剖検。子宮内胎児数、着床部位、再吸収胚、奇形胎児及びその他の異常を検索。	形態的構造異常あるいは形態構造変化について肉眼的に観察した F1 および F2 離乳児の脳、胸腺、および脾臓の重量を測定。				脳、脾臓、胸腺及び子宮

	胎児病理組織	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。反復投与毒性試験の結果を参考にする。				[児動物] Grossly abnormal tissue and target organs from all pups with external abnormalities or clinical signs, as well as from at least one randomly selected pup/sex/litter from both the F1 and F2 generation which have not been selected for mating, shall be		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病理組織学的検査を実施する。反復投与毒性試験の結果を参考にする。
	神経毒性スクリーニング			出生児の生後日数に見合った身体発達(開眼、生殖器の発達および歯牙萌出)および機能(正向反射、驚愕反応および運動性)に注意して記録。			面正向反射, 聴覚性驚愕反射, 空中落下正向反射, 対光反射等の諸反射も同様に身体発達に関連する。 :現在まで機能試験はほとんど行動についてのみ行われてきた。これについて多大の努力がなされてきたが, 推奨できる特定の試験方法は認められない。	
	免疫毒性スクリーニング			多世代生殖毒性試験は、発達する免疫系に対する被験物質の作用をスクリーニングし、非侵襲性試験(タイプⅠ)および侵襲性試験(タイプⅡ)による免疫毒性能を評価。				
その他	GLP		試験は GLP にしたがって行う。	試験は、医薬品の非臨床試験の実施に関する基準(GLP)に準拠して実施。			GLP に準拠することが求められている部分については、当該規則を参考にする。	
	動物飼育法指定		DHEW Pub. No. (NIH)74-3 準拠。	動物は、実験動物の飼育と使用に関するガイドに記述された勧告に従って飼育、維持および収容。	The temperature in the experimental animal room should be 22° C (± 3°) and the relative humidity 30 to 70 per cent. When the lighting is artificial the sequence should be 12 hours light, 12 hours dark.	The temperature in the experimental animal room should be (22 ± 3)° C. Although the relative humidity should be at least 30 % and preferably not exceed 70% other than during room cleaning, the aim should be 50-60 %. Lighting should be artificial, the seque		

(注 1) いずれの動物種でも次のような欠点がある。

ラット：性ホルモンに対する感受性の違い、プロラクチンが妊娠の成立と初期の妊娠維持のための主要なホルモンであることから、プロラクチン分泌に影響を示すドーパミン作用薬に対しては不適切である。妊娠後期における非ステロイド性抗炎症薬に対する感受性が高い。マウス：代謝速度が速い。ストレスに対する感受性が高い。奇形の群発（どの種でもみられるが）が特に著しい。胎児が小型である。
マウス：代謝速度が速い。ストレスに対する感受性が高い。奇形の群発（どの種でもみられるが）が特に著しい。胎児が小型である。
ウサギ：キネティクスや毒性試験のデータが十分でない。ある種の抗生物質や消化管の障害に対する感受性が高い。臨床症状の解釈が容易でない。
モルモット：キネティクスや毒性試験のデータが十分でないことが多い。ある種の抗生物質や消化管の障害に対する感受性が高い。胎児期が長い。背景データが十分でない。
ブタ／ミニブタ：背景データの変動が大きい。奇形の群発が多い。大量の被験物質が必要である。飼育設備に費用がかかる。背景データが十分でない。
フェレット：特殊な管理システムがないと季節性の繁殖をする。背景データが十分でない。
ハムスター：静脈内投与が不可能ではないとしても極めて困難である。投与薬物が頬袋に隠される可能性がある。性質が攻撃的である。消化管障害に対して感受性が高い。多くの化合物の催奇形性に対して過度な感受性を示す。胎児が小型である。
イヌ：季節性の繁殖をする。近親交配による弊害が現れやすい。背景データが十分でない。
ヒト以外の霊長類：他の動物と同様にキネティクスがヒトと異なる場合がある。背景データが十分でない。リスクの検出のために十分な動物数を使用することがしばしば困難である。障害を検出することを目的とする試験よりも生殖発生毒性が知られている物質の特性を検索する目的の試験に適している。

Developmental Toxicity			1	2	3	4	5	参考
項目			食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針	Redbook I	Redbook 2000	OECD (414)	医薬品ガイドライン(胚・胎児発生)	農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針
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	ラットまたはマウス。	被験物質のキネティクスおよび代謝データから発生毒性試験にもっとも適した動物種が示される場合には、その種を使用。このようなデータがない場合には、ラットおよびウサギが望ましい。	The preferred rodent species is the rat and the preferred non-rodent species is the rabbit.	通常 2 種。げっ歯類:ラット 非げっ歯類:ウサギ [胚・胎児毒性試験に限り、2 種類の哺乳動物を用いることが従来より要求されている]	げっ歯類1種以上(通常、ラット)及び非げっ歯類(通常、ウサギ)の合計2種以上に用いる。
親動物	親動物数	F0	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。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)。	雄 20、雌(妊娠末期の時点で有効な動物数として)20 匹/群を構成。この条件を満たすためには親世代群は各群雌雄各 30 匹で試験を開始。	十分な数の動物を用意するため、各被験物質群および対照群でそれぞれ約 20 例の妊娠ラット、マウスあるいはウサギを使用。	Each test and control group should contain a sufficient number of females to result in approximately 20 female animals with implantation sites at necropsy. Groups with fewer than 16 animals with implantation sites may be inappropriate. Maternal mortality	1 群あたりの動物数は、意味のあるデータ解釈が十分にできる数とする。げっ歯類及びウサギについては、母動物数が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。母動物数が16匹を下まわると試験間の結果は一貫性を欠き、また、20～24匹よりもくても整合性及び精度が大きく向上することはない。	試験に用いる妊娠動物数は、データの解釈が十分できる数とする。
		F1		各群雌雄各 25 匹を確保。				
	馴化期間			馴化後投与を開始(期間の記述なし)。		Healthy animals, which have been acclimated to laboratory conditions for at least 5 days.		
	投与	経路	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。	胃チューブによる投与が妥当とされる場合を除き、飼料混入または飲水中混入により投与。	被験物質あるいは溶媒は、ヒトへの曝露に最も近い経路で投与する(混餌あるいは飲み水を介して)。ヒトへの曝露がボーラス投与の場合あるいは動物が所定の被験物質量を受けることが重要である場合には、強制経口投与(胃管)が適切。		一般的には、投与経路はヒトで予定されている適用経路と同じものとする。異なった投与経路においても、同様な分布(キネティクスプロフィール)を示すことができる場合は、単一の投与経路でもよいであろう。	原則として、経口による強制連続投与とする。投与量は、投与に最も近い日の体重に基づいて計算する。ただし、被験物質の血中濃度の値、摂餌状況等により、一定の投与量が確保出来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よい。
		用量	対照群の他に少なくとも 3 段階の投与群。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(NOAE)を推定することができるように設定。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。		高用量は、死亡率がおよそ10%以下で、発生毒性および/母体毒性を誘発する用量。高用量は毒性学的指標よりも栄養学的な影響に基づくべきである。最低用量は親動物に毒性作用を誘発せず、最低限の安全性を提供する用量。中間用量は高用量と低用量間の算術的あるいは等比数列となる間隔。用量間の間隔が大きい場合には、1～2 群を追加することが望ましい。	At least three dose levels and a concurrent control should be used. The highest dose should be chosen with the aim to induce some developmental and/or maternal toxicity (clinical signs or a decrease in body weight) but not death or severe suffering. At 1	投与量の設定は、生殖発生毒性試験の計画において、最も重要な事項の一つである。高用量は、入手可能なあらゆる試験のデータ(薬理、急性及び慢性毒性、及びキネティクス試験)を参考にして設定しなければならない。高用量を決定したのち、段階的に低用量を決定する。用量間隔はキネティクス及び他の毒性要因に基づいて設定する。「無毒性量」を設定することが望ましいが、用量反応関係を明らかにできるように、十分に狭い用量間隔を設定することを優先させなければならない。	少なくとも3段階の用量設定による投与群を設ける。イ用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は、母動物又は胎児に体重増加の抑制等何らかの毒性影響が認められる用量とし、一方、最低用量は親動物、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。
		NOAE	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(NOAE)を推定することができるように設定。			A descending sequence of dose levels should be selected with a view to demonstrating any dosage-related response and no-observed-adverse-effect level (NOAE) or doses near the limit of detection that would allow the determination of a benchmark dose.	用量反応関係が疑わしい場合には、用量間隔が広くなりすぎるのを避けるために第四の用量を追加しなければならない。このような方策によって生殖発生に対する「無毒性量」が得られるはずである。もし無毒性量が求められない場合は、より詳細な研究や追加試験が必要である。	

		限界試験						技術的に投与可能な最大量又は 1,000 mg/kg 体重/日相当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。
親動物	投与期間	F0	胎児の器官形成期を含む期間	雄：離乳、訓化後直ちに開始。精子形成期間が少なくとも 1 サイクル終了するまで。成長期の期間継続的に。交尾期間中も継続的に。雌：交尾の 2 週間前より。交尾後妊娠、離乳するまで。	この期間はラットでは試験 6 日から 20 日、マウスでは 6 日から 18 日、ハムスターでは 4 日から 15 日、およびウサギでは 6 日から 29 日に相当。	Normally, the test substance should be administered daily from implantation (e.g., day 5 post mating) to the day prior to scheduled caesarean section.	着床から硬口蓋の閉鎖まで	被験物質の投与期間は、少なくとも着床から分娩予定日の前々日までの期間とし、連日投与とする。
		F1		雄：離乳から交尾期間を通じ継続的に。雌：屠殺するまで。				
	一般状態		全試験動物：一般状態及び妊娠状態を毎日観察。生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を観察。流産・早産等を観察。	少なくとも 1 日 1 回各動物を観察する。行動及び飼料摂取量の変化、毒性の徴候、動物の死亡等について記録すること。	試験期間を通して各動物を毎日少なくとも 2 回観察。1 回目の観察は完全な臨床検査を、2 回目はケージ観察を行なう。	Clinical observations should be made and recorded at least once a day, preferably at the same time(s) each day taking into consideration the peak period of anticipated effects after dosing. The condition of the animals should be recorded including mortality.	症状及び生死：少なくとも 1 日 1 回	すべての母動物について、一般状態及び妊娠状態を毎日観察する。一般状態は、生死、外観のほか、興奮、けいれん、鎮静、歩行異常等を、妊娠状態は、流産、早産等を観察する。
	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。	投与開始日に体重を測定し、以降毎週 1 回体重測定を行う。	被験物質の初回投与の直前（通常、マウス、ラットおよびウサギでは妊娠 6 日；ハムスターでは妊娠 4 日）、剖検までは週 1 回、および剖検時にそれぞれ母動物の体重を測定。	Animals should be weighed on day 0 or no later than day 3 if time-mated animals are supplied by an outside breeder, on the first day of dosing, at least every 3 days during the dosing period and on the day of scheduled kill.	少なくとも週 2 回	体重の測定は、通常、妊娠 0 日、剖検日及び被験物質の投与期間中にあるのは少なくとも 3 日ごとに行う。
	餌摂取量		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。	個々の動物の体重の変化に応じて週ごとに調整。妊娠中は 6 日目の体重に基づいて計算した投与量を与える。		Food consumption should be recorded at three-day intervals and should coincide with days of body weight determination.	少なくとも週 1 回	摂餌量（飲水投与の場合にあっては、摂水量も測定する。以下同じ）の測定は、通常、妊娠 0 日、剖検日及び被験物質の投与期間中にあるのは少なくとも 3 日ごとに行う。
	交配				試験施設内での交配が望ましい。大規模な遺伝子集団を保証するために十分な数の雄動物を交配。兄妹交配を避ける。雄 1 例と雌 1 例あるいは 2 例と交配。	The females should be mated with males of the same species and strain, and the mating of siblings should be avoided.		
	二次交配			同一投与群の母獣の異なる F1 の間で行う。				
親動物	剖検	剖検	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。	屠殺した場合、生殖系臓器に注目して十分な肉眼的剖検を行う。	母動物の肉眼的病理検査を実施する場合、試験は予測される出産日（ラットでは妊娠 20～21 日、ウサギでは妊娠 29 日、マウスでは妊娠 18 日、およびハムスターでは妊娠 15 日）のおよそ 1 日前に終了。	Females should be killed one day prior to the expected day of delivery. Females showing signs of abortion or premature delivery prior to scheduled kill should be killed and subjected to a thorough macroscopic examination. At the time of termination or de	雌動物は分娩予定の約 1 日前にと殺、剖検する。すべての胎児について生死と異常の有無を検査する。一肉眼的変化が認められた組織・器官は保存し、必要に応じて病理組織学的評価を行うこと。比較検討のため十分な数の対照群の同じ組織・器官を保存すること。	分娩予定日の前日にすべての動物を屠殺し、子宮を摘出した後、すべての器官・組織の肉眼的観察を行う。

児動物／胎児		臓器重量	必要に応じ、器官の重量の測定を行う。					
		病理組織	必要に応じ、病理組織学的検査を行う。	選抜して、交尾させた P 及び F の全数につき、膣、子宮、卵巣、睪丸、副睪丸、精嚢、前立腺及び標的臓器を顕微鏡下で検査することができるように保存。		The ovaries, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, seminal vesicles, prostate, coagulating gland, pituitary gland and target organ(s) of all P animals should be preserved for microscopic examination, if necessary. In the event that these organs ha		
		流産徴候動物の子宮検査	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。					流産や早産の徴候を示した動物は、速やかに屠殺し、器官・組織の肉眼的観察を行う。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。
		出産予定前日の子宮検査			子宮から取り出した後、各胎児の重量を測定し、性別を記録。胎児の外表を観察し、正常からの逸脱についてはすべて記録。	Immediately after termination or as soon as possible after death, the uteri should be removed and the pregnancy status of the animals ascertained. Uteri that ppear non-gravid should be further examined to confirm the non-pregnant status. The number of cor	一黄体数、死亡胚・胎児数、生存胎児数 一胎児の個体別重量 一胎児の異常	摘出した子宮については、重量を測定した後、下記に記載する検査を行う。黄体数を調べる。子宮内に受胎産物がみられない場合には、さらに詳細に検査し、着床痕の有無を調べる。
		不妊動物の子宮検査			各非妊娠動物の子宮を、吸収部位が肉眼でみることができるよう硫酸ナトリウムまたは硫酸アンモニウム液(4)あるいはその他の適切な化学物質で染色。			
		観察	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。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。ラット及びウサギでは黄体数も検査。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。	生後、1.4、及び21日に体重、及び匹数を測定。母獣、新生仔において観察された身体異常及び行動異常を記録。出産困難、遅延及び分娩時間の延長などが観察された場合は記録。	子宮から取り出した後、各胎児の重量を測定し、性別を記録する。胎児の外表を観察し、正常からの逸脱についてはすべて記録。各胎児の頭腎長のような追加の指標を測定。ウサギ胎児の性別は内臓検査で決定する。各胎児体重は個体別に測定し、各群の性別の平均体重値を計算。	Foetuses should be examined for skeletal and soft tissue alterations.		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。死亡胚・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。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。
		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。	生後直後、4及び21日目に測定し、以降毎週1回。	各胎児体重は個体別に測定し、各群の性別の平均体重値を計算。	The sex and body weight of each foetus should be determined.		上記
		児数調節		同産仔数が10匹を超える場合は、その内から10匹を選ぶ。				

	胎児顕微解剖	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。	[発生毒性] 妊娠期間のの末期(出産予定日の 1 日前)に体重測定、屠殺剖検。 子宮内胎児数、着床部位、再吸収胚、奇形胎児及びその他の異常を検索。 奇形の有無を検索する。	げっ歯類の骨の識別には Yasuda と Yuki (10)の図版を参照すべきである。すべてのげっ歯類の胎児を新たに剖検(輪切り)(1),(5)して軟組織の異常を検査し、その後固定して骨格異常の検査を行なう方法もある。 各ウサギ胎児では、軟組織および骨格異常および変異の両方について検査する。体部については、剖検で軟組織の異常を調べ、その後固定して骨格異常を検査する。ウサギ胎児の少なくとも約半数の胎児頭部について、頭部の内部構造を検査する。この検査には少なくとも眼球、脳、鼻腔、および舌が含まれる。	For rodents, approximately one-half of each litter should be prepared and examined for skeletal alterations. The remainder should be prepared and examined for soft tissue alterations, using accepted or appropriate serial sectioning methods or careful gross		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、ラットについては同腹胎児の1／2について骨格異常の検査を行い、残りについて内臓異常の検査を行う。 ウサギについては、すべての胎児について内臓異常(1／2については頭部を切断して詳細に観察する。)の検査を行った後に骨格異常の検査を行う。
	胎児病理組織			発生毒性試験を単独で実施する場合、帝王切開時に器官で異常が観察されない限り、病理組織学的検査を実施する必要はない。			
その他	GLP		試験は GLP にしたがって行う。	試験は、医薬品の非臨床試験の実施に関する基準(GLP)に準拠して実施。		GLP に準拠することが求められている部分については、当該規則を参考にすること。	
	動物飼育法指定		DHEW Pub. No. (NIH)74-3 準拠。	動物は、実験動物の飼育と使用に関するガイドに記述された勧告に従って飼育、維持および収容。	The temperature in the experimental animal room should be (22 ± 3)° C for rodents and (18 ± 3)° C rabbits. Lighting should be artificial, the sequence being 12 hours light, 12 hours dark.		

In-utero Carcinogenicity /Chronic Toxicity Studies		1	3	4	5
試験項目		食品添加物の指定及び使用基準 改正に関する指針について	FDA Redbook 2000	OECD	医薬品 ガイドライン (ICH 日本語訳)
1	GLP		U.S. FDA good laboratory practice 準拠		
2	飼育法他		Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 準拠		
3	動物種及び性		げっ歯類: マウスおよびラット。少なくとも 5 日間の馴化を終了した親動物に被験物質を投与。		
4	動物数		少なくとも各群で雌雄各 25 例が試験終了時まで生存することを保証。これらの試験では最低、各群雌雄各 70 例で試験を開始することを推奨。10 例(あるいは 8 例)に統一。		
5	感染		感染無きもの		
6	ケージ		1 ケージに 1 匹		
7	食餌		飼料および飲水を自由に摂取できる		
8	死後融解		動物の飼育管理を適切に行なえば、自己融解による動物および器官あるいは組織の損失は 10% をかなり下回る筈。		
9	剖検		自己融解による組織の損失を最小限にとどめるため、剖検は屠殺あるいは死亡が発見された直後に実施すべき。直後に剖検できないときには、自己融解を防ぐため細胞傷害を起こさない程度の十分な低温度(すなわち 4℃～8℃)で冷蔵保存。病理組織学的検査を実施する場合、組織試料を動物から採取し、剖検終了時に適切な固定液に浸漬。		
10	Identity		CAS Registry Number を記載		
11	組成/純度		すべての主要成分名およびそれらの量、既知の汚染物質および不純物、ならびに確定できない物質の割合を含む被験物質の組成が既知でなければならない。		
12	保存状態		被験物質サンプルは、試験が完了するまでその安定性、品質および純度を維持する条件下で保存しなければならない。		
13	有効期限		被験物質の有効期限が既知でなければならない、また、容易にわかるようにしておく。有効期限の過ぎた被験物質を使用してはならない。		
14	投与経路		通常の人における暴露を考慮。 混餌、給水投与。 カプセル、ゾンデ使用可。		
15	投与期間		親動物は少なくとも交配前の 4 週間(あるいは雄では全精子形成周期をカバーする 10 週間曝露が望ましい)から被験物質の投与。交配前、交配、妊娠、および F1 動物が離乳するまでの授乳期間を通して曝露を続ける。		
16	用量段階及び対照群		高用量: 高用量は、被験物質の毒性学的なプロファイルが明らかになるような毒性を引き起こす用量。低用量: 低用量は、試験動物の正常な成長、発達、および寿命を阻害してはならないし、その他の生物学的に重大ないかなる毒性徴候を引き起こしてもならない(例えば、NOEL あるいは NOAEL)。中間用量: 中間用量は最小の毒性徴候を引き起こす用量。オプションの第 4 用量: 高用量および低用量で投与した被験物質のキネティクスおよび代謝プロファイルに著しい差がある場合、試験にオプション(第 4 の)の用量を設けることができる。この用量は、低用量で得られたプロファイルと同様のキネティクスおよび代謝プロファイルをつくりだす最高用量。オプション群の試験動物数は、被験物質の高用量群での発がん作用を検出するのとほぼ同じ感度を提供するように選択。		
17	電算機処理		GLP 準拠		
18	観察及び検査		すべての親動物の正常な活動から逸脱した全体的な徴候、病的状態、および生死について、F1 児の離乳時までルーチンのケージ観察を実施。通常の複数回の観察の間隔は、少なくとも 6 時間ごと。正常な活動から逸脱した全体的な徴候、病的状態、および生死だけでなく、神経学的な障害、行動変化、自律性の機能障害、およびその他の神経系毒性の徴候についてもケージ内およびケージ外観察を行なう。		
19	血液検査		少なくとも雌雄各 10 例の F1 動物について、試験の最初の 2 週間、ならびに 3、6 および 12 カ月目に実施。12 カ月目の測定データにおいて、ある傾向または顕著なパラメータの変化(生物学的あるいは統計的)が懸念され、試験期間が 1 年以上の場合には、18 カ月目の検査を含める。各採取時間ポイントで同じ動物から採取するのが望ましい。血液サンプルはプールせずに個別に測定。 以下の項目の測定が推奨: ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および白血球分類、平均血球ヘモグロビン量、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン		

20	血液生化学的検査		少なくとも雌雄各 10 例の F1 動物について、試験の最初の 2 週間、ならびに 3、6 および 12 カ月目に実施。12 カ月目の測定データにおいて、ある傾向または顕著なパラメータの変化(生物学的あるいは統計的)が懸念され、試験期間が 1 年以上の場合には、18 カ月目の検査を含める。 各採取時間ポイントで同じ動物から採取するのが望ましい。血液サンプルは、絶食時間終了時および給餌前に採取。絶食は動物種および実施する検査にとって適切な時間におこなう。採血は各採取日のほぼ同時刻に行ない、血液サンプルはプールせずに個別に測定。		
21	尿検査		尿沈渣および血液および/あるいは血球の存在に関する顕微鏡検査と共に、採取した尿量、尿比重、pH、糖、およびたん白の測定については、試験の最初の 2 週間、ならびに 3、6 および 12 カ月目に実施することが推奨される。		
22	眼科学的検査		試験の最初の 2 週間にはすべての F1 動物について、試験終了時には対照および高用量動物について専門家により実施。		
23	剖検		1) 母動物および離乳後試験に選抜されなかった F1 動物の試験終了時。これらの動物は、その後に継続する試験の F1 動物選抜後に屠殺する。毒性あるいは生殖毒性の徴候が観察された場合には、これらの動物の完全な剖検を実施。 2) 離乳後試験に選抜された F1 動物の試験終了時 これらすべての F1 動物の外表面、開口部、頭蓋、胸腔および腹腔、死体、ならびにすべての器官について完全な剖検を実施。		
24	病理組織学的検査		通常、下記の組織を 10%緩衝ホルマリン(または一般的に知られる他の固定液)で固定し、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(または適切な染色)で染色して、病理組織標本を作製する。肺は、固定液を注入して膨らませてから固定液に浸漬する。 副腎、大動脈、骨(大腿骨)、骨髓(胸骨)、脳(少なくとも異なる 3 部位)、盲腸、結腸、子宮体部および頸部、十二指腸、精巣上体、食道、眼球、胆嚢(あれば)、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺(主気管支とともに)、リンパ節(投与経路に関連)		
25	光顕的評価		肉眼的に認められた病変については病理組織学的検査を実施。対照群および高用量群動物のすべての組織について鏡検する。ある組織で投与に関連した影響が認められた場合、その次に低い用量群の当該組織の検査を行なう。変化が認められない用量まで、さらに低用量群の動物の検査を続ける。		
26	リンパ系の病理組織		リンパ組織の病理組織評価は Chapter V. C を参照。		

Carcinogenicity			1	3	4	5
			食品添加物の安全性評価の原則	FDA Redbook 2000	OECD (451)	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)
1	GLP			U.S. FDA good laboratory practice 準拠	GLP 準拠	
2	飼育法他			Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 準拠	detailed animal husbandry procedures can be found in the scientific literature, animal welfare publications and official documents of Good Laboratory Practices including those of the OECD.	
3	動物種及び性	げっ歯類	ラット、マウス、ハムスター：同一週齢の動物、通常 5～6 週齢。	ラット、マウス使用。離乳後に少なくとも 5 日間の馴化期間を終了した 6～8 週齢以下の動物で投与を開始する。遺伝子組換えげっ歯類のがん原性試験あるいは変異原性試験のデータは、作用機序あるいは組織分布に関連する化合物特異的な疑問の評価に有用かもしれない。ある種の食品材料(すなわち成分および/あるいは夾雑物)の発がんリスクの決定については、定量的な用量反応データが提供されないため、遺伝子組換えマウスモデルは適切でない。	It is recommended that a compound of unknown activity should be tested on two animal species. Rats and mice have been preferred because of their relatively short life span, the limited cost of their maintenance, their widespread use in pharmacological and toxicological studies, their susceptibility to tumour induction, and the availability of inbred or sufficiently characterised strains. In selecting the species and strain, it is important to be aware that there are particular susceptibilities.	種および系統の選択にあたっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、自然発生腫瘍の発生頻度、既知がん原性物質に対する感受性等を考慮する。特に動物種については、次に示すような情報を考慮した上で、適切なものとすべきである。 (1) 薬理作用、(2) 反復投与毒性、(3) 代謝 3, 7、(4) トキシコキネティクス 3, 7, 8、(5) 投与経路 (例えば通常あまり用いられない経路、すなわち経皮、吸入など)もしも 1 種を選ぶのに明らかな根拠がなければ、長期がん原性試験においてはラットを選択することが推奨される(注 5)。なお、同一週齢で、順調に発育した 6 週齢までの動物を用いることが望ましい。
4	動物数	げっ歯類	1 群/雌雄各 50 匹以上。	被験物質群および対照群には、少なくとも各群で雌雄各 25 例が試験終了時まで生存することを保証するため、試験開始時に十分な動物数を備えるべきである。各試験途中剖検には、各群で少なくとも雌雄各 10 例を予定すべきである。	各投与群ごとに 50 匹)以上を使用。If interim sacrifice(s) are included in the study plan, the initial number should be increased by the number of animals scheduled for the interim sacrifice(s).	雌雄各々について、1 群 50 匹以上とする。
5	感染			感染無きもの		
6	ケージ			1 ケージに 1 匹	動物舎の室温は 22°C(± 3° C)、湿度 30～70%。	
7	食餌			通常自由摂取。カロリー、栄養価に配慮。試験物の媒体に注意。		現在、混餌投与による投与可能最大量は飼料中 5%と考えられている。混餌投与以外の投与経路の方が適切な場合、高用量は実験手技上の問題あるいは局所毒性などにより制約されるものと思われる。
8	死後融解			死亡にて、動物、組織、臓器の loss は 10%を超えぬこと。死後融解にて、組織もしくは臓器の欠損に留意。		
9	剖検		試験期間中の死亡例は速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行う。なお、腫瘍性病変の記載に関しては、腫瘍発生に至る各種変化(前癌病変)の所見も付け加える必要がある。病理組織学的検査は、通常、以下の器官の組織について行われるが、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。試験期間中に死に瀕した例は、速やかに隔離又は屠殺、剖検し、上記と同様の観察、検査を行う。試験終了時のすべての生存例は、速やかに屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。	死後融解による組織欠損を最小にするため、剖検は屠殺もしくは死亡確認後、直ちに執り行うこと。直ちに剖検が行われないときは低音に保存。		試験終了時の生存例については、各群の全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。
10	Identity			CAS Registry Number を記載		
11	組成/純度			主たる成分、夾雑物および不純物の名称および品質を記載。		
12	保存状態			試験終了まで、試験物は品質、純度を考慮し保存。		
13	有効期限			試験物質の使用期限を守ること。		

14	投与経路		経口投与。混餌投与又は飲水投与により行う。 等混餌(飲水)投与が困難な場合強制投与、マイクロカプセル使用可。	通常の人における暴露を考慮。 混餌、給水投与。 カプセル、ゾンデ使用可。	The three main routes of administration are oral, dermal and inhalation. The choice of the route of administration depends upon the physical and chemical characteristics of the test substance and the form typifying exposure in humans. In general, the frequency of exposure may vary according to the route and type of administration chosen, and should be adjusted according to the toxicokinetic profile of the test substance, if available.	動物への曝露経路は、可能であれば臨床適用経路と同じであることが望ましい。
15	投与期間		週7日、ラット24ヶ月以上、マウス18ヶ月以上。 最低用量群又は対照群の動物の性別の一方において累積死亡率が75%になった場合には、その時点でその性の生存例を屠殺し、その性について試験を終了する。	7日/週、104週間(2年間)の投与。	毎日1週当たり7日間、マウス及びハムスター18ヶ月間、ラット24ヶ月間。腫瘍形成が遅い場合はそれぞれ24ヶ月、30ヶ月に延長可。However, termination of the study is acceptable when the number of survivors of the lower doses or control group reaches 25 per cent. For the purpose of terminating the study in which there is an apparent sex difference in response, each sex should be considered a separate study. In the case where only the high dose group dies prematurely for obvious reasons of toxicity, this should not trigger termination.	ラットでは24ヶ月以上30ヶ月以内、マウスおよびハムスターでは18ヶ月以上24ヶ月以内とし、投与は原則として週7日とする。
16	用量段階 及び 対照群	用量 段階	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。用量設定にあたっては、そのための90日間反復投与毒性試験の結果等を参考とすること。また、用量設定の根拠を示すこと。 最高用量：腫瘍以外の原因で対照群に比して有意に死亡率が増加せず、毒性影響が認められる用量とする。飼料添加濃度5%(w/w)を超える投与量で実施する必要なし。強制投与の場合、技術的に投与できる最大量又は1000mg/kg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し。 最低用量：原則として、最高用量の10%以上で設定されている。しかしながら、食品への添加量等を勘案して設定することが望ましく、設定した最低用量が被験物質の想定されるヒトの摂取量からみて著しくかけ離れている場合には、最高用量の10%未満の用量を設けてもよい。 中間用量：中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましく、通常、群間の公比は2又は3とする。	高用量投与群：高用量は最大耐量(MTD)とする。 被験物質の毒性に関連しない情報を基にがん原性試験の投与量を設定することは受け入れられない。例えば、ヒトの予測される最大被験物質曝露量から前もって決定した安全性限度量を規定し、その用量における試験結果を推量することによって、がん原性試験の投与量を選定してはならない。 低用量投与群：低用量は、試験動物の正常な成長、発達、および寿命を妨げてはならず、また、いかなる毒性の徴候を引き起こしてはならない。 中間用量投与群：中間用量は、最小限の毒性徴候を生じさせる用量とする。中間用量として選択する正確な用量は、被験物質のキネティクスの特性に基づく。 高用量および低用量で投与した被験物質のキネティクスおよび代謝プロファイルに著しい差がある場合、試験にオプション(第4の)の用量を設けることができる。この用量は、低用量で得られたプロファイルと同様のキネティクスおよび代謝プロファイルをつくりだす最高用量とする。	The highest dose level should be sufficiently high to elicit signs of minimal toxicity without substantially altering the normal life span due to effects other than tumours. Signs of toxicity are those that may be indicated by alterations in certain serum enzyme levels or slight depression of body weight gain (less than 10 per cent). The lowest dose should not interfere with normal growth, development, and longevity of the animal; and it must not otherwise cause any indication of toxicity. In general, this should not be lower than 10 per cent of the high dose. The intermediate dose(s) should be established in a mid-range between the high and low doses, depending upon the toxicokinetic properties of the chemical, if known.	雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く (慣習的に、化学物質のがん原性試験においては、高用量選択の標準的な方法として最大耐量(Maximum Tolerated Dose; MTD)が用いられてきた。MTDは通常3ヵ月毒性試験から得られるデータを基にして設定される。高用量すなわちMTDとは、がん原性試験において軽度な毒性作用が現れることの予想される用量である。そのような作用は、3ヵ月用量設定試験においてみられた軽度な毒性作用から予知できる)。
		対照群	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。	食餌試験のコントロール群には基礎餌を与える。	The negative control group is treated in the same manner as all other test animals except that this control group should not be exposed to the test substance or any vehicle.	陰性対照を置く。陰性対照は、被験物質投与にあたり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。
17	上限					その医薬品に遺伝毒性がなく、かつ、最大臨床用量が500 mg/man/日を超えない場合、がん原性試験の高用量は、1500 mg/kg/日を必ずしも超える必要はない。
18	電算機処理			GLP 準拠		

19	観察 及び 検査	一般 状態	全試験動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量(飲水投与の場合は摂水量)を測定する。 体 重: 投与開始前及び投与開始後3カ月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回。 摂餌(飲水)量: 投与開始前及び投与開始後3カ月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回。	薬理学的/毒性学的効果の一般兆候、運動性、致死性を見るために、全ての実験動物を 1~2 回/日ゲージ外から観察。 13 週目に体重測定。13 週後に食餌摂取量の減少、体重変化、死亡数の増加の際は、体重、食餌摂取量(水摂取量)を check。	臨床症状観察は少なくとも1回/日。体重は13 週までは毎週測定、その後4 週ごと。食餌摂取量は13 週までは毎週観察、その後 3 ヶ月ごと(特に大きな体重変化がない限り)。If clinical observations suggest a deterioration in health of the animals during the study, a differential blood count of the affected animals should be performed. At 12 months, 18 months and prior to sacrifice, a blood smear is obtained for all animals. A differential blood count is performed on samples of those animals in the highest dosage group and the controls.	各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後3カ月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。 試験期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察および病理組織学的検査を行う。 試験期間中に死期の迫った例については、速やかに隔離又は屠殺し、器官・組織の肉眼的観察および病理組織学的検査を行う。
		血液 検査	投与終了後の剖検前に全生存動物につき採血して血液検査(赤血球数、白血球数等)を行う。 屠殺時に血液塗抹標本を作製しておき、貧血、並びにリンパ節、肝臓、脾臓の腫大等、造血器腫瘍を予想させる例については塗抹標本を検索する。	血液化学的検査は少なくとも各群の雌雄各10例について試験の最初の2 週間、ならびに試験期間中の 3、6 および 12 カ月目に実施する。最初のサンプリング時間は短期試験の試験結果に基づく。懸念するデータの傾向あるいは顕著なパラメータの変化(生物学的あるいは統計的)が12カ月目の測定で観察された場合、次に18 カ月目の測定を含める。データの傾向あるいは顕著なパラメータの変化が18 カ月目に観察された場合には、追加の血液化学的検査を試験終了時に実施する。[ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および白血球分類、平均血球ヘモグロビン量、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン濃度および血液凝固能の測定(凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、あるいは血小板数)]		屠殺時、必要に応じて血液を採取し、赤血球数および白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作製し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。
		血液 生化学的 検査		常に同じ動物から採血。1 群雌雄 10 匹の生化学試験を行う。採血は試験の初めの2 週、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月。肝細胞の影響は次の5 項目の試験の中から最低3 項目行う。 [アラニンアミノトランスフェラーゼ(SGPT, ALT)、アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ(SGOT, AST)、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸、肝胆道系評価(下記5 項目の少なくとも3 項目)、アルカリフォスファターゼ、(総)ビリルビン、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GG transferase)、5'ヌクレオチダーゼ、総胆汁酸、その他の細胞変化あるいは細胞機能に関するマーカー、アルブミン、カルシウム、塩素、(総)コレステロール、コリンエステラーゼ、クレアチニン、グロブリン(計算値)、グルコース、無機リン、カリウム、(総)たん白質、ナトリウム、トリグリセリド、尿素窒素]		
		尿 検査	げっ歯類では雌雄各群ごとに一定数の動物(少なくとも5 匹)を選び、非げっ歯類では各群の全試験動物について、血液検査と同時期に。[尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウム等)]。	投与開始前、ならびに投与 3、6 および 12 カ月目に、尿沈渣および血液/血球の顕微鏡検査とともに採取した尿量、尿比重、pH、糖、たん白の測定が推奨されている。12 カ月目の測定データで、ある傾向または顕著なパラメータの変化(生物学的あるいは統計的)が懸念される場合には、18 カ月目にも測定を行うべきである。データの傾向あるいは顕著なパラメータの変化が18 カ月目に観察された場合には、追加の尿検査を試験終了時に実施する。これらの検査は、少なくとも各群の雌雄各10 例で実施する。		
		眼科 学的 検査		コントロール群、高用量群の全ての実験動物に対し、試験開始前、終了後に行う。投与にかかわる眼変化が認められた場合は、全ての実験動物の検査を行う。		

剖検	① 投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。必要に応じ、器官の重量測定、病理組織学的検査を行い、死因とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。② 投与期間中に死は、死を待つより殺処分。速やかに屠殺、剖検し、①と同様の観察、検査を行い、瀕死状態となった理由とその時点での毒性変化の程度とを明らかにするよう努める。③ 投与期間終了時、すべて採血、採尿を行った後、屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、器官について重量測定を行う。重量測定[心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、前立腺、精巢、精囊、卵巢、子宮、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、肺、甲状腺・上皮小体]	試験動物は、体表部、開口部および 頭蓋腔、胸腔、腹腔とそれらの内容を観察することを含め全て剖検に供す。	Complete gross examination should be done in all animals including those which died during the experiment or were killed in moribund conditions. Prior to sacrifice of all animals, samples of blood should be collected from all animals for differential blood counts. All grossly visible tumours or lesions suspected of being tumours should be preserved.	試験終了時の生存例については、各群の全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。
病理組織学的検査	病理組織学的検査は、通常、以下の器官の組織について行われるが、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。皮膚、乳腺、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等)、大動脈、唾液腺、骨及び骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸(空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓及び胆嚢、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巢・精巢上体、卵巢及び卵管、子宮、膈、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髓、鼻腔(鼻甲介)、眼球及びその附属器、ジンバル腺、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織。	通常、下記の組織を 10%緩衝ホルマリン(または一般的に知られる他の固定液)で固定し、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(または適切な染色)で染色して、病理組織標本を作製する。肺は、固定液を注入して膨らませてから固定液に浸漬する。 [副腎、大動脈、骨(大腿骨)、骨髓(胸骨)、脳(少なくとも異なる 3 部位)、盲腸、結腸、子宮体部および頸部、十二指腸、精巢上体、食道、眼球、胆嚢(あれば)、ハーダー腺、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓、肺、主気管支とともに)、リンパ節(投与経路に関連するリンパ節と遠隔にあるリンパ節それぞれ1つ)、乳腺、鼻甲介、卵巢および卵管、脾臓、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺、坐骨神経、精嚢(あれば)、骨格筋、皮膚、脊髓(3 部位:頸部、胸部中央、腰部)、脾臓、胃、精巢、胸腺(あれば)、甲状腺/上皮小体、気管、膀胱、膈、ジンバル腺、異常を示すすべての組織。]	次の組織を固定し保存:brain, pituitary, thyroid (including parathyroid), thymus, lungs (including trachea), heart, salivary glands, liver, spleen, kidneys, adrenals, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, uterus, urinary bladder, lymph nodes, pancreas, gonads, accessory genital organs, female mammary gland, skin, musculature, peripheral nerve, spinal cord, sternum with bone marrow and femur (including joint) and eyes.	病理組織学的検査は、最高用量群および対照群の全例について行う。ただし、最高用量群と対照群との間で腫瘍発生率に差のある器官・組織が認められた場合には、他の試験群の全例についても当該器官・組織の病理組織学的検査を行う。
光顕的評価		病変全てを検鏡。対照及び最高用量群の全ての組織を検査。投与による影響が認められた場合は、次の低用量について当該組織の検査を行う。影響が認められなくなるまで順次検査を行う。また投与終了前に死亡した動物がある場合は、毒性影響の可能性を探るべく検鏡。	All grossly visible tumours or lesions suspected of being tumours in all groups; All preserved organs and tissues of: (a) all animals that die or are killed during the study, and (b) animals of the highest dose group and controls. While notation should be made of all histopathological lesions, those which were hyperplastic, pre-neoplastic and/or neoplastic should be fully described; If a significant difference is observed in hyperplastic, pre-neoplastic or neoplastic lesions between the highest dose and control groups, microscopic examination should be made on that particular organ or tissue of all animals in the study; In case the results of the experiment give evidence for substantial alteration of the animals' normal longevity or the induction of effects that might affect a neoplastic response, the next lower dose level should be examined as described above; The incidence of tumours and other suspect lesions normally occurring in the strain of animals used (under the same laboratory conditions – i.e. historical control) is desirable for assessing the significance of changes observed in exposed animals.	

		リンパ系の病理組織		リンパ組織の病理組織評価は Chapter V. C を参照。		
		その他				短期・中期 in vivo げっ歯類試験系 腫瘍発生を指標にした in vivo 試験系に注目すべきである。例として、げっ歯類の 2 段階発がんモデル(イニシエーション・プロモーションモデル)やトランスジェニックげっ歯類ないし新生児げっ歯類を用いた発がんモデルが挙げられる。

Chronic Toxicity/Carcinogenicity			1	3	4
			食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	FDA Redbook 2000(Short Term Toxicity Studies)	OECD (453)
1	GLP				GLP 準拠
2	飼育法他				More detailed animal husbandry procedures can be found in the scientific literature, animal welfare publications and official documents of Good Laboratory Practices, including those of the OECD.
3	動物 種及 び性	げっ歯類	げっ歯類1種(通常、ラット):同一週齢の動物、通常5〜6週齢。 種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、既知がん原性物質に対する感受性等の特性が知られていて、一般的に実験動物として広く使用されているものとする。特に、自然発生腫瘍の発生頻度に関するデータが蓄積されている系統を選択する。		
4	動物 数	げっ歯類	1群/雌雄各50匹以上。 ラットでは投与開始後24ヵ月、マウスでは投与開始後18ヵ月の時点で、腫瘍以外の原因による死亡率が50%以内であることが望ましい。 1年間反復投与毒性検索のためにサテライト群を設けるが、サテライト群の動物数は、1群当たり雌雄各10匹以上とする。ただし、最高用量群については、20匹以上とする。		For such reasons, each dose group and concurrent control group not intended for earlier sacrifice should contain at least 50 animals of each sex. A high dose satellite group for evaluation of pathology other than neoplasia should contain 20 animals of each sex, while the satellite control group would contain 10 animals of each sex.
5	食餌				For a diet-mixture, the highest concentration should not exceed 5 per cent with the exception of nutrients.
6	剖検		試験期間中の死亡例は速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行う。なお、腫瘍性病変の記載に関しては、腫瘍発生に至る各種変化(前癌病変)の所見も付け加える必要がある。病理組織学的検査は、通常、以下の器官の組織について行われるが、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。試験期間中に死に瀕した例は、速やかに隔離又は屠殺、剖検し、上記と同様の観察、検査を行う。試験終了時のすべての生存例は、速やかに屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。		
7	投与経路		経口投与。混餌投与又は飲水投与により行う。等混餌(飲水)投与が困難な場合強制投与、マイクロカプセル使用可。		oral, dermal, and inhalation.
8	投与期間		週7日、ラット24ヶ月以上30ヶ月以内、マウス18ヶ月以上24ヶ月以内。 最低用量群又は対照群の動物の性別の一方において累積死亡率が75%になった場合には、その時点でその性の生存例を屠殺し、その性について試験を終了する。		毎日1週当たり7日間、マウス及びハムスターで18ヶ月間、ラットで24ヶ月間。腫瘍形成が遅い場合はそれぞれ24ヶ月、30ヶ月に延長可。However, termination of the study is acceptable when the number of survivors of the lower doses or control group reaches 25 per cent. For the purpose of terminating the study in which there is an apparent sex difference in response, each sex should be considered a separate study. In the case where only the high dose group dies prematurely for obvious reasons of toxicity, this should not trigger termination.
9	用量 段階 及び 対照 群	用量段階	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。1年間反復投与毒性検索のためのサテライト群及びその対照群を設ける。用量設定にあたっては、そのための90日間反復投与毒性試験の結果等を参考とすること。また、用量設定の根拠を示すこと。 最高用量: 腫瘍以外の原因で対照群に比して有意に死亡率が増加せず、毒性影響が認められる用量とする。飼料添加濃度5%(w/w)を超える投与量で実施する必要なし。強制投与の場合、技術的に投与できる最大量又は1000mg/kg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し。 最低用量: 原則として、最高用量の10%以上で設定されている。しかしながら、食品への添加量等を勘案して設定することが望ましく、設定した最低用量が被験物質の想定される日の摂取量からみて著しくかけ離れている場合には、最高用量の10%未満の用量を設けてもよい。 中間用量: 最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましく、通常、群間の公比は2又は3とする。		For carcinogenicity risk assessment purposes, at least three dose levels should be used, in addition to the concurrent control group. The highest dose level should be sufficiently high to elicit signs of minimal toxicity without substantially altering the normal life span due to effects other than tumours. Signs of toxicity are those that may be indicated by alterations in serum enzyme levels or slight depression of body weight gain (less than 10 per cent). The lowest dose should not interfere with the normal growth, development, and longevity of the animal; and it must not otherwise cause any indication of toxicity. In general, this should not be lower than 10 per cent of the high dose. The intermediate dose(s) should be established in a mid-range between the high and low doses, depending upon the toxicokinetic properties of the chemical, if known.
		対照群	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。		A concurrent control group which is identical in every respect to the exposed groups, except for exposure to the test substance, should be used.

10	観察 及び 検査	一般状態、	全試験動物について、一般状態を毎日観察し、定期的に体重及び摂餌量(飲水投与の場合は摂水量)を測定する。 体 重:投与開始前及び投与開始後3カ月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回。 摂餌(飲水)量:投与開始前及び投与開始後3カ月までは少なくとも週1回、その後は少なくとも4週に1回。		臨床症状観察は少なくとも1回/日。体重は13週までは毎週測定、その後4週ごと。食餌摂取量は13週までは毎週観察、その後3ヶ月ごと(特に大きな体重変化がない限り)。
		血液検査	投与終了後の剖検前に全生存動物につき採血して血液検査(赤血球数、白血球数等)を行う。屠殺時に血液塗抹標本を作製しておき、貧血、並びにリンパ節、肝臓、脾臓の腫大等、造血器腫瘍を予想させる例については塗抹標本を検索する。また、1年間反復投与と毒性検索のためのサテライト群では全試験動物に対して、剖検前(12カ月時)に採血。 [赤血球数、白血球数、血液像(白血球型別百分率)、血小板数、血色素、ヘマトクリット、その他必要に応じて網状赤血球、凝固能(プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間)等]		3ヶ月、6ヶ月その後6ヶ月毎に、haemoglobin content, packed cell volume, total red blood cells, total white blood cells, platelets, or other measures of clotting potential を測定。at termination on blood samples collected from 20 rats/sex of all groups. If possible, these collections should be from the same rats at each interval.
		血液生化学的検査	血清(血漿)総蛋白、アルブミン、A/G比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ[AST(GOT)、ALT(GPT)]、 γ -GTP、アルカリホスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等)等		At approximately 6-month intervals, and at termination, blood samples are drawn for clinical chemistry measurements from 10 rats/sex of all groups, if possible, from the same rats at each interval. – total protein concentration – albumin concentration – liver function tests (such as alkaline phosphatase activity, glutamic-pyruvic transaminase* activity and glutamic oxalacetic transaminase** activity), gamma glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase – carbohydrate metabolism such as fasting blood glucose – kidney function tests such as blood urea nitrogen.
		尿検査	1年間反復投与と毒性検索のためのサテライト群の全試験動物について、血液検査と同時期に尿検査を行う。 [尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重又は浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウム等)]		Urine samples from 10 rats/sex of all groups, if possible from the same rats at the same intervals as haematological examination above, should be collected for analysis. The following determinations should be made from either individual animals or on a pooled sample/sex/group: – appearance(volume and density for individual animals) – protein, glucose, ketones, occult blood (semi-quantitatively)– microscopy of sediment (semi-quantitatively)
		眼科学的検査	1年間反復投与と毒性検索のためのサテライト群の全試験動物について、必要に応じて、投与期間中少なくとも1回(12カ月時)、眼科学的検査を行う。 検査は、通常、肉眼的及び検眼鏡的に行い、前眼房・中間透光体・眼底のそれぞれについて実施される。		Clinical signs including neurological and ocular changes as well as mortality should be recorded for all animals. Time of onset and progression of toxic conditions, including suspected tumours, should be recorded.
		その他の機能検査	必要に応じて、心電図、視覚、聴覚、腎機能等の検査を行う。		
		剖検	投与期間中の死亡例は速やかに剖検、器官・組織の肉眼的観察を行う。腫瘍性病変の記載に関しては、腫瘍発生に至る各種変化(前癌病変)の所見も付け加える必要がある。発がん性検索のための試験群及び1年間反復投与と毒性検索のためのサテライト群に対しては、試験終了時にすべての生存例を、速やかに屠殺、剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、サテライト群では器官について重量測定を行う。		A well-performed gross necropsy may provide optimal information for microscopic examination and may in certain cases facilitate more restrictive microscopic examination. An inadequate gross necropsy cannot be replaced by microscopic examination no matter how wellperformed. Gross necropsy should be carried out under the guidance of a trained laboratory animal pathologist.
		病理組織学的検査	病理組織学的検査は、通常、以下の器官の組織について行われるが、肉眼的観察所見等からの判断によって適宜追加する。、最高用量群と対照群の間で腫瘍発生率に差のある器官・組織が認められた場合には、他の用量群の全試験動物についても当該器官・組織の病理組織学的検査を行う。[皮膚、乳腺、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節等)、大動脈、唾液腺、骨及び骨髓(胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸(空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓及び胆嚢、脾臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣・精巣上体、卵巣及び卵管、子宮、膈、脳、下垂体、坐骨神経、骨格筋、脊髄、鼻腔(鼻甲介)、眼球及びその付属器、ジンバル腺、そのほか肉眼的に変化が認められた器官・組織。		All organs and tissues should be preserved for microscopic examination. This usually concerns the following organs and tissues: brain* (medulla/pons, cerebellar cortex, cerebral cortex), pituitary, thyroid (including parathyroid), thymus, lungs (including trachea), heart, salivary glands, liver*, spleen, kidneys*, adrenals*, oesophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, urinary bladder, lymph nodes, pancreas, gonads*, uterus, accessory genital organs, female mammary gland, skin, musculature, peripheral nerve, spinal cord (cervical, thoracic, lumbar), sternum with bone marrow and femur (including joint) and eyes.

Allergenicity Studies		1	2	3	4	5	6	解説
	試験項目	食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook I	Redbook 2000	OECD	医薬品ガイドライン (ICH 日本語訳)	EFSA	
Rodent	ギー 即時型アレルギー試験	(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						
	遅延型アレルギー試験	(1)モルモットにおける接触皮膚反応試験 (2)マウスにおける足趾反応又はリンパ節反応試験 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。 (1)感作動物血清の抗体力価 (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 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。 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。						
	ケラトサイトのサイトカイン産生							皮膚感作性 Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1alpha and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. Toxicology. 2005 Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes.Toxicol Appl Pharmacol. 2001
	ヒト培養細胞活性化試験							皮膚感作性 Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT.Toxicol In Vitro. 2006 Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol.Toxicol In Vitro. 2006

Genetic Toxity Studies		1	3	4	5	参考
	試験項目	食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook 2000	OECD 473～486	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳) S	VICH ガイドライン
in vitro	復帰突然変異試験	(1)菌株:TA98, TA100, TA1535, {TA1537 あるいは TA97 あるいは TA97a}、WP2uvrA あるいは WP2uvrA pKM101TA102。 (2)用量段階: 5 段階以上の試験用量群を設定。 (3)最高用量: 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。抗菌作用あるいは変異原性が認められない場合は、5mg/プレート又は最低析出用量を限度。 (4)対照: 陰性対照は溶媒対照とする。陽性対照としては、既知変異原物質(S9mix)を必要としない物質と必要とする物質)。 (5)代謝活性化:S9mix(S9+補酵素等)。 (6)試験方法:ブレインキュベーション法又はプレート法。用量当り2～3枚のプレート。 (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。	a. 細菌:少なくとも5系統の菌株を使用。これらは、信頼性があり各試験施設間で十分な再現性がみられるネズミチフス菌の5菌株(TA1535; TA1537、TA97aまたはTA97; TA98; およびTA100)。 b. 代謝活性化:Liver S9。 c. 曝露濃度:可溶性で細胞毒性を示す被験物質では、最高被験物質濃度として5 mg/plate あるいは5 µl/plate が推奨される。細胞毒性を示さない被験物質で5 mg/plate あるいは5 µl/plate では不溶の場合、1濃度以上の不溶の濃度段階を設ける。5 mg/plate あるいは5 µl/plate 以下で細胞毒性を示す被験物質については、細胞毒性が現れる濃度まで試験。 d.対照群:各試験には、代謝活性化系の存在下および被験物質存在下のいずれにおいても併設の陰性対照(溶媒または媒体)および菌株特異的な陽性対照を設ける。各試験で効果的な実施が可能な陽性対照物質および濃度を選定。 e. 結果: データはプレートごとの復帰変異コロニー数を示す。復帰変異コロニー数は陰性(溶媒対照、および使用した場合は無処理対照)および陽性プレートのいずれの復帰変異コロニー数を表示。	○	使用菌株: 以下の5菌株を用いて試験を行う。(1) TA98(2) TA100(3) TA1535(4)TA1537, TA97 または TA97a(5)TA102, WP2uvrA または WP2uvrA/pKM101。 試験法: ブレインキュベーション法またはプレート法。S9 mix を添加。S9 の S9 mix 中での濃度は5～30%の範囲内(通常10%) 用量段階: 適切な用量間隔(原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下)で5段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は5 mg/plate を最高用量とする。 対照: 陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける。 プレート数:被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ2枚以上のプレート。 結果の判定: 復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する。	
	遺伝子突然変異試験		○	○		○
	前進突然変異試験		○			
	遺伝子変換試験		○	○		
	マウスリンフォーマ試験		a. 細胞:L5178Y 細胞の TK+/- -3.7.2C 亜系 b. 代謝活性: S9。 c. 対照群:代謝活性化系の存在下および非存在下で併設陰性(溶媒あるいは媒体)および陽性対照を設ける。代謝活性化系を用いる場合、陽性対照物質は変異原性反応を示す活性を要求するものでなければならない。 d. : 比較的安全性の低い化合物の最高濃度は、5 µl/ml、5 mg/ml、または0.01Mのうちのもっとも低濃度のものとする。 e. 結果:MLA の陽性結果は、被験物質が哺乳類の培養細胞におけるチミジンキナーゼ遺伝子の発現に影響を及ぼす変異を誘発することを示している。陰性結果は、被験物質はその試験条件下においてマウスのリンパ腫由来細胞におけるチミジンキナーゼ遺伝子の発現に影響を及ぼす変異を誘発しないことを表示。	○	使用細胞: マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk +/-3.7.2c 株 試験法: S9 mix 使用。S9 の最終濃度は1～10%の範囲内(通常2%)とする。 用量段階: 適切な間隔(原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下)で4段階以上の突然変異コロニーが解析できる用量。最高用量は、用量設定試験の結果から80%以上の細胞毒性(20%以下の相対生存率または相対増殖率)が得られる用量とする。80%以上の細胞毒性が認められない場合には5 mg/mlまたは10 mM(いずれか低い方)を最高用量とする。 対照: 陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として小さなコロニーを主として誘発する既知の遺伝毒性物質で処理した群を設ける。 プレート数: 結果の判定: 突然変異頻度の有意な上昇、及び用量依存性の有無を考慮して行う。	
	姉妹染色分体交換	○				○
	不定期 DNA 組み換え試験			○		○

	染色体異常試験	(1)細胞:CHL、CHO やヒト培養リンパ球等。 (2)用量段階:3 段階以上の試験用量群。 (3)最高用量: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。細胞毒性が認められない場合は、10mM、5mg/ml 又は最低折出用量のいずれか低い濃度を限度。 (4)対照:陰性対照は溶媒対照。陽性対照は、S9miX を必要としない物質と必要とする物質。 (5)代謝活性化:S9miX を加えた試験を並行して行う。 (6)試験方法:S9miX 添加及び非添加の条件で、被験物質を短時間処理し、適切な時期(およそ正常細胞周期の 1.5 倍)に染色体標本作製。結果が共に陰性の場合には S9miX 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、直ちに標本作製。用量あたり 1~2 枚のプレート。用量当たり 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。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。 (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。	a. 細胞:例えばチャイニーズハムスターの線維芽細胞、ヒトあるいはその他の哺乳類の末梢血リンパ球 b. 代謝活性: 酵素誘導剤で処理したラットの肝臓から作製した補助因子追加の後ミトコンドリア分画(S9) c. 対照群:各試験には、代謝活性化系の存在下および被験物質存在下のいずれにも併設陽性および陰性(溶媒あるいは媒体)対照を含める。 d. 用量:少なくとも 3 試験濃度から分析できる細胞を得る。細胞毒性が観察された場合、これらの濃度は「最大」から「僅か」あるいは「毒性なし」まで抱合している必要がある;これは一般的に、因子が 2 と 10 の平方根の間を超えない濃度間隔を意味する。採取時では、最高濃度は集合性の程度の減少、細胞数、最低 50%のプレート効率を示す必要がある。比較的毒性の低い化合物の最高濃度は、5 μl/ml、5 mg/ml、または 0.01M のうちの最も低い濃度のものとする。 e. 結果:濃度に関連した増加あるいは 1 つの濃度での染色体異常を伴う細胞の再現性のある増加のように、陽性結果を決定するいくつかの基準がある。試験結果の評価における手助けとして統計学的方法が用いられる。	○	使用細胞: チャイニーズハムスター細胞株(例えば CHL/IU, CHO), ヒト末梢血リンパ球、もしくはその他の初代、継代又は株細胞。 試験法: S9 mix 使用。S9 の最終濃度は 1~10%の範囲内(通常 5%)とする。 用量段階: 適切な間隔(原則として公比$\sqrt{10}$ 以下)で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 5 mg/mL 又は 10 mM(いずれか低い方)を最高用量とした細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。 対照: 陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群 プレート数: 各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ 2 枚 結果の判定: 染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められた場合に陽性と判定する。	○
in vivo	染色体異常試験			○		○
	小核試験	(1)動物:マウス又はラット。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。 (2)動物数:1 群 5 匹以上。 (3)投与経路:強制経口投与又は腹腔内投与 (4)用量段階:3 段階以上。 (5)最高用量:幼若赤血球の減少等骨髓で何らかの細胞毒性の徴候が認められる用量、あるいは、それ以上の用量では致死が予想される用量。必要があれば予備試毒性徴候が認められない場合は、2g/kg を限度。 (6)対照群:陰性対照は溶媒対照。陽性対照、既知小核誘発物質。 (7)投与回数:単回又は複数回投与。 (8)試験方法:骨髓又は末梢血の赤血球を用いる。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。 (9)結果: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。	a. 動物種:歴史的にマウスあるいはラットがルーチンとして使用。 b. 動物数および性別:雌雄ともに少なくとも 5 例の評価対象動物を使用。末梢血を使用する場合はマウスを推奨。 c. 投与計画:いくつかの異なった投与計画(例えば 24 時間間隔で 1、2、あるいはそれ以上の投与回数)を推奨。 d. 用量段階:毒性が観察される場合には、最初のサンプリング時間では 3 投与量を使用。これらの投与量には、明らかな毒性から僅かなあるいは毒性のみられない用量範囲を含める。 e.限度試験:少なくとも 2000 mg/kg 体重の 1 用量の単回投与で毒性作用がみられない場合および化学的に構造が類似した化合物のデータから遺伝毒性が予想されない場合には、3 用量を用いる完全な試験は不要。長期間の試験では、限度用量を 2000 mg/kg/体重/日で 14 日間まで、および 1000 mg/kg/体重/日で 10 日間まで。 f. 投与:被験物質を胃管または適切な挿管カニューレを用いる経口あるいは腹腔内注射により投与。 g.骨髓/末梢血の標本作成:通常、骨髓細胞は屠殺直後に大腿骨あるいは頸骨から採取。末梢血は尾静脈あるいはその他の適切な血管から採取。 h. 結果:小核試験の陽性結果は、被験物質が染色体傷害あるいは試験した動物種の赤芽球の細胞分裂装置に対する傷害の結果である小核を誘発することを表示。	○	1.動物:若い成熟げっ歯類を用いる 2.動物数:1 群、性あたり 5 匹以上 3.投与経路:臨床適用経路、強制経口投与または腹腔内投与 4.用量段階:何らかの毒性徴候が現れる用量を最高用量とし、原則として公比$\sqrt{10}$ 以下で少なくとも 3 段階以上の試験群を設定。なお、毒性徴候が現れない場合の最高用量は、単回または 14 日以内の反復投与の場合 2000 mg/kg/日、それを超える長期連続投与では 1000 mg/kg/日 5.対照群:陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質 投与回数:単回又は反復投与 6.標本作製時期:①骨髓を用いる場合 単回投与では、投与後 24~48 時間の間に適当な間隔をおいて最低 2 回の標本作製、複数回の投与を行った場合には、最終投与後 18~24 時間の間に 1 回標本作製。②末梢血を用いる場合 単回投与では、投与後 36~72 時間の間に適当な間隔をおいて最低 2 回の採血。複数回の投与を行った場合には、最終投与後 24~36 時間の間に 1 回。 7.観察細胞数:個体当たり 2000 個以上の幼若赤血球について小核の有無を検索。同時に骨髓細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、骨髓細胞を用いる場合には最低 200 個、末梢血を用いる場合には最低 1000 個の赤血球を観察。	○
	優勢致死試験	○		○		○
	姉妹染色分体交換			○		
	不定期 DNA 合成試験	○		○		
	マウススポット試験			○		

Metabolism and Pharmacokinetic Studies		1	3	参考	参考
	試験項目	食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook 2000	VICH ガイドライン	非臨床薬物動態試験ガイドライン
Animals	動物/性/数	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慮して、適切な動物を選定。 なお、毒性試験に用いたものと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。 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。	代謝および薬物動態のデータは2種類のげっ歯類(通常はラットとマウス)および1種類の非げっ歯類(通常はイヌ)から得ることが好ましい。	試験系は、実際に被験物質が投与される対象となる健康な家畜等とする。 対象動物を用いた試験の他、ラット等の実験動物による知見についても動物種の差異を考慮するために有用な情報となるが、この場合、毒性及び薬理学的知見との対応を考慮して適切な動物種による知見が必要である。また、医薬品としてヒトへの臨床試験がある被験物質については、ヒトへの投与から得られたデータが示されていることが望ましい。	毒性、薬理及び臨床試験との対応を考慮して適切な動物種を使用。
	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。	ヒトへの曝露と標的組織への送達量を評価するために必要となる最も重要なパラメータは被験化合物の胃腸における吸収率および体内(腎臓および肝臓)からの排泄率である。		原則として、臨床適用経路とする
	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もよい。	代謝および薬物動態に関するパラメータは、一般に被験化合物の単回投与後に測定される。広範な用量の単回投与で試験で得られたパラメータを比較することによって、吸収、分布、代謝または排泄が飽和に達する用量を決定することができる。		単回投与並びに必要に応じて反復投与を行う。反復投与の期間と間隔は試験の目的に応じて設定する。
	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、可能ならば食物経路により摂取することが推定される量を考慮する。	代謝および薬物動態に関するパラメータは、一般に被験化合物の単回投与後に測定される。広範な用量の単回投与で試験で得られたパラメータを比較することによって、吸収、分布、代謝または排泄が飽和に達する用量を決定することができる。		毒性、薬理及び臨床用量との対応を考慮して適切な投与量を選択する。
	検査対象	(1) 吸収 ① 血中濃度(血清中濃度、血漿中濃度又は全血中濃度) - 時間曲線より算出、② 累積排泄量曲線より算出 (2) 分布 ① 器官内及び組織内濃度、② 胎盤、胎児、乳汁への移行性、③ 血漿中の蛋白との結合、血球への分配 (3) 代謝 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 (4) 排泄 ① 尿、糞、呼気、② 胆汁、③ 乳汁、④ 腎機能、尿 pH 等 (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幅広く検討。	血液(赤血球、血漿、血清)、尿および糞はもともと一般的な収集サンプルである。さらに肝臓、腎臓、脂肪、および標的と思われる器官など、いくつかの代表的器官および組織のサンプルを採取するべきである。	(1) 吸収及び排泄 吸収率、排泄率及び尿路経路、胆汁排泄等の排泄経路が明らかにされていること。 (2) 分布 主要な組織への分布及び血しょう蛋白への結合性、乳・卵等への移行性脂肪組織への蓄積性等生理学的な分布が明らかにされていること。 (3) 代謝 主要な代謝物の化学的性質及び生物活性が明らかにされているとともに組織及び体液中の親化合物及び各代謝物毎の濃度、総残留に対する比が経時的に測定されていなければならない。	(1) 吸収 ① 血中濃度時間曲線から求められる (2) 分布 ① 臓器内及び組織内濃度、② 胎盤・胎児移行性、③ 血漿中の蛋白結合、血球への分配 (3) 代謝 通常、血液、尿、胆汁及び糞等の生体試料、並びに in vitro 試験で得られた試料中の未変化体と代謝物を定量する。適切な試験系を用いてヒトでの代謝に関与する主たる酵素を明らかにすることも本試験の目的に含まれる。 (4) 排泄 ① 尿、糞、呼気、② 胆汁、③ 乳汁 (5) その他の検討項目及び留意点 薬物代謝酵素への影響、また、必要に応じて薬物相互作用、初回通過効果等
	in vitro studies	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 in vitro 試験は、in vivo 試験とともに代謝試験として有用である。	酵素、細胞小器官、分離細胞および還流器官を用いた in vitro 試験を利用して、小規模な代謝および薬物動態試験で得られた用量反応に関する情報を裏付けることができる。		毒性、薬理及び臨床試験との対応を考慮して in vitro 試験系を使用する。

一般薬理		1	5
	試験項目	食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	医薬品ガイドライン(安全性薬理試験ガイドライン)
Animals	動物/性/数	マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ等各試験に適した動物種を用いる。なお、系統、性別、年齢等を考慮に入れる。 試験系としては、以下のものがある。 (1)丸ごとの動物 (2)摘出器官及び組織 (3)血液及び血液成分 (4)細胞及び細胞下レベル等 試験動物及び試験系の選択に当たっては、感受性、再現性、緊用性に留意。 また、ヒトに対する予測性を考慮し、適切な情報が得られるような試験動物及び試験系を用いることが望ましい。	群の大きさは、得られたデータについて意味のある科学的な解釈を可能にするために、十分なものでなくてはならない。
	投与経路	丸ごと動物を用いる試験では、原則として、経口適用又はそれに準ずる経路。 ただし、試験の種類によっては被験物質の生体機能に及ぼす影響を検知するのに適した経路。例えば、摘出器官では栄養液への直接添加等がある。 なお、吸収の良くない被験物質の場合は、重要な試験項目については、静脈内適用等の適切な経路でも試験を行うことが望ましい。	一般的に、予想される臨床経路を可能な限り用いるべきである。
	投与回数	丸ごとの動物を用いる試験では、単回適用を原則とするが、反復適用による影響が予想される場合には、適切な回数の適用を行う。	安全性薬理試験は一般に単回投与で実施される。薬力学的作用が、ある処置期間後にのみに起こるかあるいは、反復投与で非臨床試験もしくはヒトでの使用の結果、安全性薬理作用について懸念を生ずる場合には、これらの作用を説明するための安全性薬理試験の必要な期間は合理的に定められるべきである。
	用量段階	用量設定に当たっては、以下の点を考慮。 ① 用量作用関係を求め得る用量段階を設定。 ② 他の毒性試験において有害反応等を示す量から見て十分な量を用いる。なお、体内動態試験等の情報・成績を考慮に入れ、選定した用量の妥当性を作用濃度、血中濃度等と関連づけて十分考察しておくことが望ましい。	有害作用の用量反応関係を明確にすべく計画すべきである。一般に、有害作用を引き起こす用量は、試験動物種において効力を裏づける薬力学的反応を引き起こす用量、あるいは可能であるならば、目的とする治療効果を得るためのヒトでの用量と比較すべきである。
	検査対象	A.原則としてすべての被験物質について行う項目。 (1)一般症状及び行動に及ぼす影響 (2)中枢神経に及ぼす影響① 自発運動量に及ぼす影響。② 麻酔作用。③ 痙攣作用。④ 痛覚に及ぼす影響 ⑤ 体温に及ぼす影響 (3)自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響： 摘出回腸を用いて検討。 被験物質単独の作用及びアゴニストとの相互作用。 (4)呼吸・循環器系の及ぼす影響： 呼吸運動、血圧、血流量、心拍数及び心電図に及ぼす影響。通常、麻酔動物。 (5)消化器系に及ぼす影響： 胃腸管内輸送能に及ぼす影響を検討。必要に応じて胃内容排出能。 (6)水及び電解質代謝に及ぼす影響：尿量、尿中ナトリウム・カリウム・塩素イオン濃度を測定。 (7)その他の重要な作用：類似の化学構造又は作用を有する既知物質の作用から予想される作用で、A.の(1)～(6)で検討されないもの。 B.Aの試験結果より判断して、必要に応じて行う試験 (1)中枢神経系に及ぼす影響：①自発脳波に及ぼす影響②脊髄反射に及ぼす影響③条件回避反応に及ぼす影響④協調運動に及ぼす影響 (2)本性神経系に及ぼす影響：① 神経・筋接合部に及ぼす影響②筋弛緩作用③局所麻酔作用 (3)自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響：① 瞳孔径及び瞳孔収縮に及ぼす影響②血管、器官、輸精管、子宮等の摘出器官・組織を用いる。 (4)呼吸・循環器系に及ぼす影響：① 自律神経作用薬並びに迷走神経刺激及び総頸動脈閉塞等による血圧及び心拍数の変化に対する作用。② 生体位心臓。③ 心臓、心房、乳頭筋、血管床等の摘出器官・組織。 (5)消化器系に及ぼす影響：胃液、唾液、胆汁及び膵液分泌②摘出胃・腸管を用い、その運動に及ぼす影響③生体位胃・腸管を用い、その運動に及ぼす影響④胃・十二指腸粘膜に対する作用 (6)その他の作用：①血液凝固系に及ぼす影響②血小板凝集に対する作用③溶血作用④腎機能に及ぼす影響	中枢神経系： 運動量、行動変化、協調性、感覚/運動反射反応および体温(例えば、機能観察総合評価法(FOB)(3)、Irwin の変法) 呼吸系： 呼吸数及び他の呼吸機能の尺度(例えば一回換気量あるいはヘモグロビン酸素飽和度) 心血管系：血圧、心拍数、心電図(再分極と伝導異常に対する手法を含む in vivo、in vitro あるいは ex vivo の評価も考慮すべき) フォローアップ試験として 中枢神経系：行動薬理、学習及び記憶、特異的リガンド結合、神経化学、視聴覚あるいは電気生理学的検討 呼吸系： 気道抵抗、コンプライアンス、肺動脈圧、血液ガス、血液 pH 心血管系：心拍出量、心室収縮性、血管抵抗、心血管反応における内因あるいは外因物質の作用 補足的
	in vitro studies		in vitro 試験は、濃度作用関係を確立するように計画すべきである。その試験系における作用検出の公算を上げるために、試験濃度範囲が設定されるべきである。この範囲の上限は、被験物質の物理化学的特性と他の測定の特異的要因により影響を受けることがある。影響が認められない場合は、選択された濃度範囲の正当性を説明すべきである。

Immunotoxicity Studies		1	3	5	参考
試験項目		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook 2000 (Redbook II)	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)	NTP Murine LLNA (Draft)
標準的毒性試験	病理組織学的検査		剖検およびルーチンの組織学的検査で、脾臓、リンパ節、胸腺、腸管関連リンパ組織 (GALT、特にパイエル板) および骨髄などのリンパ組織に認められる異常。	免疫系器官の重量または組織像の変化 (例えば、胸腺、脾臓、リンパ節、または骨髄の変化など)	
	血液		白血球(WBC)数の増加または減少、WBC 百分率の異常、リンパ球増加症およびリンパ球減少症、好酸球増加症。	白血球の減少または増加、顆粒球の減少または増加、リンパ球の減少または増加	
	血液生化学		アルブミン対グロブリン比(A/G)の異常を伴った血清総タンパク質の増加または減少。	血清グロブリン濃度の変化: 肝臓または腎臓への作用など、他に適切な理由がなければ、血清免疫グロブリン濃度が増加した可能性	
	その他	反復毒性試験: 胸腺、脾臓とリンパ節/リンパ様組織については必要により免疫組織化学検査を行い、免疫毒性が疑われた時は、更に、骨髄構成細胞比、脾リンパ球組成、NK 細胞活性についても検査することが望ましい。繁殖試験: 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。	脾臓および胸腺重量の増加または減少; 脾臓および胸腺の、器官重量対体重比の上昇または低下 (器官重量対体重比の統計学的解析には体重を共変量とした共分散分析を含めること)。体重の増加または減少は、主に内分泌機能の指標であるが、内分泌機能は免疫系に有意な影響を及ぼしうするため、間接的な免疫毒性作用も示す可能性もある。	腫瘍の発生率の増加: 遺伝毒性、ホルモン作用、または肝臓の酵素誘導など、他に妥当な原因がなければ、免疫抑制の可能性を示す徴候	
免疫毒性試験	T細胞依存性抗原試験		げっ歯類および非げっ歯類に最も広く用いられている抗原の 1 つは、ヒツジの赤血球 (SRBC) である。たとえば、SRBC はマウスのブランク形成細胞試験に広く用いられてきた。この試験では抗体産生脾臓細胞懸濁液を SRBC と混合し、カバーをしたスライド上に置き、インキュベートする。抗体産生細胞はスライド上に小さな透明な部分 (ブランク) を形成するので、このブランクを計数する。	T 細胞依存性抗原 (例えば SRBC または KLH) を用いて実施	
	T細胞非依存性抗原試験		分枝状多糖類であるフィコール、ハプテン化フィコール、ポリビニルピロリドン、細菌リポ多糖類が T 細胞非依存性抗原としてマウスおよびラットに用いられてきた。		
	フェノタイピング		B リンパ球、T リンパ球および T リンパ球サブセット (TH+TS または CD4 および CD8) のフローサイトメトリー解析。末梢血または脾臓の細胞懸濁液由来の B リンパ球、T リンパ球および T リンパ球サブセットの免疫染色試験 (免疫ペルオキシダーゼ法または免疫蛍光法)	フローサイトメトリー法または免疫組織化学的手法により。	
	NK 細胞活性		NK 細胞の機能的能力は、古典的な ⁵¹ Cr クロミウム放出試験 19 を用いて測定することができる。この試験法は十分に標準化されており、マウスおよびラットの両者が多くの免疫毒性試験の中で使用されている。	イムノフェノタイピングにおいて NK 細胞数の変化がみられた場合、標準的毒性試験でウイルス感染の発生率が増加した場合、または他に懸念される要因がある場合に実施	
	Mφ /Neutro の機能		マクロファージの貪食能を測定するための様々な試験が報告されている。これらの試験では、マクロファージが、プラスチックビーズあるいは鉄片など不溶性の物質を摂取する能力を測定するが、末梢血あるいは脾臓のようなリンパ器官から得られる細胞懸濁液を用いて実施することが可能である。	マクロファージ及び好中球の in vitro 機能検査 (食作用、活性酸素生成、走化性及び細胞溶解活性)	
	宿主抵抗性		Listeria monocytogenes、様々なレンサ球菌および大腸菌株など、数多くの細菌株が宿主抵抗性の測定に用いられてきた。有用なウイルスモデルには、インフルエンザ、ヘルペスおよびサイトメガロウイルスなどが含まれる。Candida albicans を用いた酵母感染モデル、Trichinella spiralis および Plasmodium yoelli を用いた寄生虫感染モデルも報告されている。 多くの培養腫瘍細胞株を用いた様々な宿主抵抗性試験法が報告されている。これらの試験法は、上述の感染体を用いた試験法とは異なり、感染が動物群全体に広がることを防ぐための特殊なバリア施設を必要としない。	被験物質を複数の用量で投与されたマウスやラットに、種々の濃度の病原体 (細菌、真菌、ウイルス、寄生虫) や腫瘍細胞を接種	

	細胞性免疫		動物における CMI の測定に、ジニトロクロロベンゼン(DNCB)などの接触性感作物質が、遅延型過敏症(DTH)反応を惹起するために利用されてきた。これらの試験はげっ歯類および非げっ歯類を用いて実施することができる。DTH 試験は経済的であり、CMI と感染体に対する宿主抵抗性の低下と良好な相関が、ヒトおよび動物において認められている。異なる系統のリンパ球を用いるリンパ球混合反応(MLR)は、マウスの CMI を評価するためによく用いられている。	細胞性免疫の測定法は抗体産生測定法ほど十分には確立されていない。In vivo アッセイ法として、抗原を用いた感作法がある	In summary, the local lymph node assay provides a novel approach to the identification of skin allergens where immunobiological events stimulated during the induction phase of skin sensitization are measured. Decisions are based upon assessment of draining lymph node cell proliferative responses – responses that are known to be essential for, and to correlate with, the induction of skin sensitization.
	その他		被験動物の IgG に対するポリクローナル抗体を用いた脾臓およびリンパ節中の B リンパ球の免疫染色。30.31 様々な細胞マーカーに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いた脾臓中の T リンパ球および T リンパ球サブセットの免疫染色。脾臓の胚中心および PALS 並びにリンパ節の濾胞および胚中心の高精度測定。ルーチンの病理組織学的染色標本を用いた、胸腺の皮質および髄質の相対面積に関する形態学的分析。		

Neurotoxicity Studies		1	3	4	5	参考
試験項目		食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について	Redbook 2000	OECD 424	医薬品ガイドライン(ICH 日本語訳)	Guidelines for Neuro-toxicity Risk Assessment(EPA)
Rodent	使用動物数			at least 20 animals (10 females and 10 males) Table 1 参照		
	投与量			The highest dose level should be chosen with the aim of inducing neurotoxic effects or clear systemic toxic effects. Thereafter, a descending sequence of dose levels should be selected with a view to demonstrating any dose-related response and a no-observed-adverse effect (NOAEL) at the lowest dose level.		
	投与期間			Table 2 参照		
	健康状態観察			Table 2 参照		
	死亡/病的状態の観察			Table 1、Table 2 参照		
	行動観察		体系的な臨床評価を重要な神経学的障害の徴候、行動異常、生理学的機能障害、およびその他の神経系毒性徴候を検出するため、選択した臨床試験および観察の明確に規定した組合せをケージ内外で使用して実施。			
	意識・態度観察		動物の外観、体位および体重に加え、臨床的なスクリーニングは以下のような指標を評価する十分な情報を提供する：発作、振戦、麻痺あるいはその他の神経障害の徴候の発現頻度および重篤度；運動活性および警戒の程度；取扱いあるいはその他の刺激に対する動物の反応；運動協調性および強さ；歩行；主要な感覚刺激に対する感覚運動；過剰な流涙および流涎；立毛；下痢；多尿；眼瞼下垂；異常な摂食行動；およびその他の異常行動あるいは神経系毒性。			
	病理組織検査		脳、脊椎および末梢神経系構成要素のすべての主要区域の代表的な組織サンプル			Gross changes in morphology, including brain weight Histologic changes in neurons or glia (neuronopathy, axonopathy, myelinopathy)
	血液生化学他					Alterations in synthesis, release, uptake, degradation of neurotransmitters Alterations in second-messenger-associated signal transduction Alterations in membrane-bound enzymes regulating neuronal activity Inhibition and aging of neuropathy enzyme Increases in glial fibrillary acidic protein in adults
	神経生理学					Change in velocity, amplitude, or refractory period of nerve conduction Change in latency or amplitude of sensory-evoked potential Change in electroencephalographic pattern

	運動機能・行動観察		試験動物の体系的な臨床評価を重要な神経学的障害の徴候、行動異常、生理学的機能障害、およびその他の神経系毒性徴候を検出するため、選択した臨床試験および観察の明確に規定した組合せをケージ内外で使用して実施。一般に、動物の外観、体位および体重に加え、臨床的なスクリーニングは以下のような指標を評価する十分な情報を提供：発作、振戦、麻痺あるいはその他の神経障害の徴候の発現頻度および重篤度；運動活性および警戒の程度；取扱いあるいはその他の刺激に対する動物の反応；運動協調性および強さ；歩行；主要な感覚刺激に対する感覚運動；過剰な流涙および流涎；立毛；下痢；多尿；眼瞼下垂；異常な摂取行動；およびその他の異常行動あるいは神経系毒性。		○ [生殖毒性で]	Increases or decreases in motor activity Changes in motor coordination, weakness, paralysis, abnormal movement or posture, tremor, ongoing performance Absence or decreased occurrence, magnitude, or latency of sensorimotor reflex Altered magnitude of neurological measurement, including grip strength, hindlimb splay Seizures Changes in rate or temporal patterning of schedule-controlled behavior
	知覚機能観察		学習および記憶ならびに知覚機能および運動行動の定量的検査などの神経毒性のより感覚的あるいは客観的指標			Changes in touch, sight, sound, taste, or smell sensations
	認知機能					Changes in learning, memory, and attention
	発生毒性		発達に対する神経毒性誘発能スクリーニングの検査には、典型的な身体の日印となる生後発達（例えば、体重および外性器の発達）および機能的な重要段階（例えば、正向反射、驚愕反応、および運動性発達）の検査が含まれる。			Chemically induced changes in the time of appearance of behaviors during development Chemically induced changes in the growth or organization of structural or neurochemical elements
	Irwin の変法				Functional Observational Battery examinations of rats. J. Am. Coll. Toxicol. 15, 239 (1996).[薬理試験で]	
	Haggerty 法				Haggerty, G.C.: Strategies for and experience with neurotoxicity testing of new pharmaceuticals. J. Am. Coll. Toxicol. 10:677-687 (1991).[薬理試験で]	
Human	症例報告					Case reports can be obtained more quickly than more complex studies. Case reports of acute high-level exposure to a toxicant can be useful for identifying signs and symptoms that may also apply to lower exposure. Case reports can also be useful when corroborating epidemiological data are available.
	疫学（横断研究）					In cross-sectional studies or surveys, both the disease and suspected risk factors are ascertained at the same time, and the findings are useful in generating hypotheses. A group of people are interviewed, examined, and tested at a single point in time to ascertain a relationship between a disease and a neurotoxic exposure.
	症例対照研究,					Last (1986) defines a case-control study as one that “starts with the identification of persons with the disease (or other outcome variable) of interest, and a suitable control population (comparison, reference group) of persons without the disease.”
	コホート研究					Studies. In a prospective study design, a healthy group of people is assembled and followed forward in time and observed for the development of dysfunction. Such studies are invaluable for determining the time course for development of dysfunction (e.g., follow-up studies performed in various cities on the effects of lead on child development).

	人体試験(ボランティア)					Information from experimental human exposure studies has been used to set occupational exposure limits, mostly for organic solvents that can be inhaled. Laboratory exposure studies have contributed to risk assessment and the setting of exposure limits for several solvents and other chemicals with acute reversible effects.
--	--------------	--	--	--	--	---

Table 1: Minimum numbers of animals needed per group when the neurotoxicity study is conducted separately or in combination with other studies

	NEUROTOXICITY STUDY CONDUCTED AS			
	Separate study	Combined study with the 28-day study	Combined study with the 90-day study	Combined study with the chronic toxicity study
Total number of animals per group	10 males and 10 females	10 males and 10 females	15 males and 15 females	25 males and 25 females
Number of animals selected for functional testing including detailed clinical observations	10 males and 10 females	10 males and 10 females	10 males and 10 females	10 males and 10 females
Number of animals selected for perfusion in situ and neuro-histopathology	5 males and 5 females	5 males and 5 females	5 males and 5 females	5 males and 5 females
Number of animals selected for repeated dose/subchronic/chronic toxicity observations, haematology, clinical biochemistry, histopathology, etc. as indicated in the respective Guidelines		5 males and 5 females	10 males and 10 females	20 males and 20 females
Supplemental observations, as appropriate	5 males and 5 females			

Table 2: Frequency of clinical observation and functional tests

Type of observations		Study duration			
		Acute	28-day	90-day	Chronic
In all animals	General health condition Mortality/morbidity	daily	daily	daily	daily
		twice daily	twice daily	twice daily	twice daily
In animals selected for functional observations	Detailed clinical observations	prior to first exposure – within 8 hours of dosing at estimated time of peak effect – at day 7 and 14 after dosing	– prior to first exposure – once weekly thereafter	– prior to first exposure – once during the first or second week of exposure – monthly thereafter	– prior to first exposure – once at the end of the first month of exposure – every three months thereafter
	Functional tests	– prior to first exposure – within 8 hours of dosing at estimated time of peak effect – at day 7 and 14 after dosing	– prior to first exposure – during the fourth week of treatment as close as possible to the end of the exposure period	– prior to first exposure – once during the first or second week of exposure – monthly thereafter	– prior to first exposure – once at the end of the first month of exposure – every three months thereafter