

JECFAにおける乳児を対象にした添加物評価のまとめ

考慮すべき視点	評価項目	カラギーナン	CITREM	ペクチン	OSA加工澱粉	イナゴマメガム	キサンタンガム
全体的な毒性プロファイル (重大な影響の特定を含む)	過去の評価	ADI “not specified”	ADI “not specified”	ADI “not specified”	ADI “not specified”	ADI “not specified”	ADI “not specified”
新生児におけるADME	ADME	○ 低分子の吸収に関する懸念を検討	○ リパーゼの作用が異なる可能性を指摘するが、すべて加水分解されると結論	△ 乳児に対する特別な考察はない	○ 乳児はラット、イヌに類似、同じ代謝物	○ ミネラル吸収が減弱する可能性	△ 乳児に対する特別な考察はない
ヒト乳児のモデルとなる実験動物における乳児期のばく露が各ライフステージに及ぼす潜在的影響 毒性試験に使用された新生児動物モデルでの毒性をヒト乳児に外挿する妥当性 新生児動物の試験において有害影響が確認されたか、それとも最高用量がNOAELであったのか	新生児ブタ/ミニブタ試験	○ NOAELは最高用量	× (クエン酸)	△ NOAELは中間用量 最高用量で体重減少がみられたが、物性によると考察	○ NOAELは最高用量	×	△ NOAELは中間用量
乳児を対象とした臨床研究の結果 市販後調査での有害事象報告(添加物を含む乳児用調整乳を既に使用している国がある場合)	ヒト臨床試験	○ 有害事象なし	△ 高用量(提案された用量)の知見はない	○ 有害事象なし	○ 有害事象なし	△ 腸に対する影響は未検証	○ 有害事象なし
	MOEの評価	○ 2~12	× 追加データを要求	○ 2.4~2.9	○ 2.3~2.7	× 追加データを要求	○ 3.4

乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価の考え方（案）

第1 はじめに

これまで添加物の食品健康影響評価は、「添加物に関する食品健康影響評価指針（2010年5月（2017年7月改正）食品安全委員会）」（以下添加物評価指針）に基づき、リスク評価を行ってきたところである。

乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価は、生後3～4ヶ月までの乳児にとって母乳あるいは調整乳は唯一の栄養源であり、乳児の外来化学物質に対する吸収・分布・代謝・排泄機構や感受性は成人とは異なると考えられていること等から、その特殊性を考慮したリスク評価方法の確立が求められている。現行の添加物評価指針において、「妊婦・胎児、乳幼児、小児、高齢者等における検討は、リスクを考え得る知見がある場合に必要に応じて行う。」とされ、特殊性を考慮した評価が求められている。しかしながら、考慮すべき特性や具体的な評価方法については確立されていない。本研究班では、現在の科学的知見や国際的な動向を踏まえ、乳児を対象にした調整乳に使用する添加物の食品健康影響評価を行う際の考慮すべき特性を整理し、その考え方を取りまとめたため、指針案を提言する。なお、当該指針案は、調整乳に使用する添加物を対象とし、離乳食等に使用する添加物は対象としない。

第2 乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価の考え方

乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価の考え方としては、生理学・毒性学的、ばく露評価的並びに食品健康影響評価の観点からの特殊性を考慮し、以下の点に留意する。

【生理学・毒性学的観点】

- ・ 乳児を対象にした添加物の健康影響を評価するに当たり、評価対象添加物の全般的な体内動態や毒性のプロファイルが明らかであることが必要であると考えられる。従って、現行の添加物評価指針で求められている評価に必要な項目並びに資料によって、評価対象添加物の全般的な生体影響を検討する。
- ・ 新生児や乳児は、外部の化合物の有害影響に特に敏感であることが示されている。具体的には、成人と比較して酵素による解毒機構が未成熟、排泄器官の機能が不完全、腸内細菌叢の差異、体内水分量が異なる、腸・血液脳関門やその他の生理学的バリア形成が不完全、有害物質と結合する血漿中タンパク量が少ない、などが挙げられる。従って、乳児が評価対象添加物を摂取した際の体内動態や有害作用発現の推定等を成人と乳児の生理学的な違いに留意して考察する。必要であれば新生児モデルや *in vitro* 試験等のデータを加え、乳児における評価対象添加物の体内動態を考察する。
- ・ 新生児や乳児は成人と異なる生理学的特徴を有していることから、現行の添加物評価

指針で定められた資料に加えて幼若動物を用いた乳児期ばく露の毒性試験が必要である。従来の生殖毒性試験や発生毒性試験は子宮や授乳を介した化学物質のばく露による新生児への影響をみるうえでよく用いられるが、しばしば直接的な経口投与試験は含まれていない。また、幼若動物を用いた乳児期ばく露の毒性試験は、ヒトと実験動物モデルとの器官発生、生理学的成熟度の差異などを考慮して、適切な動物種を選択する必要がある。毒性試験に用いられている動物種のうち、ブタ（ミニブタ）新生児は以下のような特徴が知られている。

- 1) ブタ（ミニブタ）新生児モデルは解剖学的、生理学的、生物学的にヒトに類似しており、化学物質や医薬品の安全性・薬効薬理試験の動物モデルとしてよく用いられる¹⁾。
- 2) ブタ（ミニブタ）新生児の胃腸管、心肺系、皮膚、泌尿器、代謝機能、免疫系などはげっ歯類に比べヒトに類似する²⁻⁶⁾。
- 3) 新生児ブタでは被験物質の直接経口投与も可能である。

従って、現在の科学的知見から、乳児期ばく露の毒性試験はブタ（ミニブタ）新生児を用いるのが望ましいと考える。また、被験物質は直接経口により投与される必要がある。

- ・ ブタ（ミニブタ）新生児を用いた毒性試験は以下のような点に留意する。
 - 1) 投与期間は新生児ブタの哺乳期間に合わせて設定する¹⁾。
 - 2) 新生児動物に被験物質を混じた調整乳を直接経口投与する場合、高濃度で投与することが困難であることが多い。また、評価対象品目の物性によっては調整乳が消化管内に停滞することもある。従って、投与量は提案される使用量に加えて栄養障害の可能性にも配慮し設定する必要がある。
 - 3) エンドポイントを判定する際には、ブタ（ミニブタ）新生児の試験データのみならず、全般的な体内動態や毒性をふまえた乳児の体内動態や生理学的な違いも十分考慮する。特に、乳児で代謝や吸収等が大きく変化することや感受性が高いことが想定される場合は、詳細な解析を追加することが望ましい。
 - 4) ブタ（ミニブタ）新生児の試験結果及び乳児における体内動態や毒性を考察した結果、免疫毒性や神経毒性等が疑われた場合には、必要に応じ、追加の試験を検討する。その際、ブタ（ミニブタ）新生児を用いた試験で特殊毒性の検討が困難な場合は、げっ歯類等を用いた試験により検討する。ただし、動物種差及び種特異性等を考慮し、ヒトへの外挿可能性について考察する必要がある。

¹⁾ JECFA では、新生児ブタを用いて生後 2 日から投与を開始し 3 週間投与を継続する試験がしばしば評価されている⁷⁾。

- ・ 評価対象添加物や関連物質に関して、ヒト乳児を対象とする適切な試験（臨床研究、市販後調査など）がある場合には活用する。

【ばく露評価的観点】

- ・ 生後 3~4 ヶ月までの乳児にとって母乳あるいは調整乳は唯一の栄養源であり、添加物は許容された最大限のレベルで使用されることが多い。
- ・ ばく露期間は限られるものの、ばく露期間中の体重変化が大きい。
- ・ 全年齢を対象とした食事摂取に比較して、母乳あるいは調整乳の摂取量に関する知見は限定される。

【食品健康影響評価】

- ・ ADI は「ヒトがある物質を毎日生涯にわたって摂取し続けても、現在の科学的知見からみて健康への悪影響がないと推定される一日当たりの摂取量」として設定される。一方、調整乳を介した乳児の暴露期間は限られていることから、生涯摂取することを想定して設定される従来の ADI の考え方はそぐわない。従って、乳児を対象にした添加物の食品健康影響評価は、現行の添加物評価指針における「ADI の設定の考え方」を適用せず、ばく露マージンの評価を行う。ばく露マージンは評価対象添加物の NOAEL と一日摂取量とを比較する。
- ・ ばく露マージンの評価は NOAEL の設定根拠となる動物試験のデザイン（選択した動物種、投与期間、投与量等）、新生児モデルにおける毒性、全般的な毒性プロファイル、毒性の作用機序、ヒト乳児を対象とする試験成績などを考慮して総合的に検討する^{2,3}。

² JECFA では毒性学的観点として、乳児における吸収・消化・代謝・排泄、全般的な毒性、新生児実験動物のヒト乳児に対する外挿性、新生児実験動物における毒性、乳児を対象とした臨床研究・市販後調査、ばく露評価的観点として、12 週未満の乳児で唯一の栄養源であること、添加物は許容される最大レベルでの使用される可能性があること、乳児用調整乳の量とエネルギーの換算は 67 kcal /100 mL (280 kJ /100 mL) が用いられること、高用量摂取群には 95 パーセントイル値を用いること、乳児間のばく露量の相違が少ないこと、ばく露期間は限られ、ばく露量は体重換算で徐々に減少すること、などを考慮して、これらの観点が考慮された場合は 1~10 の範囲のばく露マージンは、乳児用調整乳を消費する 0~12 週齢児における健康リスクは低いことを示唆すると解釈できるとしている⁷⁾。

³ JECFA では一般的な毒性試験において毒性が低く、ブタ（ミニブタ）新生児を用いた試験から NOAEL が得られ、その試験で顕著な毒性影響が認められておらず、ヒト乳児のデータでも有害影響が示唆されていない場合、ばく露マージンが 1~10 程度である場合は健康へのリスクは低いことを示唆するとしている⁷⁾。

参考文献

- 1) Bode G, Clausing P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Nogues V, Sims J; Steering Group of the RETHINK Project. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 62, 196-220. 2010.
- 2) Helm RM, Golden C, McMahon M, Thampi P, Badger TM, Nagarajan S. Diet regulates the development of gut-associated lymphoid tissue in neonatal piglets. *Neonatology*. 91, 248-55. 2007.
- 3) Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutr Res Rev*. 23, 4-22. 2010.
- 4) Barrow PC. Use of the swine paediatric model. In: Doberman AM and Lewis EM (eds.). *Pediatric Non-Clinical Drug Testing: Principles, Requirements, and Practice*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, USA. pp. 213–230. 2012.
- 5) Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr Res Rev*. 26, 191-209. 2013.
- 6) Odle J, Lin X, Jacobi SK, Kim SW, Stahl CH. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism. *Annu Rev Anim Biosci*. 2, 419-44. 2014.
- 7) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain food additives (Seventy-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series: 990. 2014.

1 体内動態試験

参照ガイドライン：(OECD TG417) トキシコキネティクス

試験方法

予備試験

1. TK 試験の試験パラメータ（たとえば代謝、物質収支、分析手順、用量設定、呼気中二酸化炭素など）を選択するために、予備試験を実施することを薦める。これらのパラメータについては、その特徴付けに放射性標識体を使用する必要がないものもある。

動物の選択

動物種

2. TK 試験の動物種（および系統）は、可能であれば、当該被験物質で実施した他の毒性試験で使用した動物種（および系統）と同一にする。毒性試験ではラットが広範に使用されているため、通常は TK 試験でもラットを使用する。重要な毒性試験でラット以外の動物種に重要な毒性がみられた場合、またはラット以外の動物種の毒性/TKの方がヒトとの関連性が強いことが示された場合は、ラット以外の他の動物種を使用または追加してもよい。ただし、その動物種および系統を選択した妥当性を示すこと。
3. 本試験ガイドラインの動物種は、特記のない限り、ラットとする。他の動物種を使用する場合、本試験ガイドラインの内容を調整しなくてはならない場合がある。

週齢および系統

4. 健康な若齢成熟動物（通常、投与時に 6～12 週齢）を使用する（段落 13 および 14 も参照）。若齢成熟動物以外を使用した場合、その妥当性を示すこと。試験開始時、全例は同様の週齢とする。各個体の体重は、試験群の平均体重の±20%以内とする。理想的には、当該化学物質の毒性データベースを得るのに使用した系統と同じ系統を TK 試験でも使用する。

動物数および性

5. 各用量あたり雌雄いずれか一方の性で 4 例以上を使用する。使用した性の妥当性を示すこと。毒性に有意な性差があることを裏付ける所見がある場合、各用量あたり雌雄各 4 例（雄 4 例、雌 4 例）の使用を検討する。

飼育および給餌条件

6. 試験期間中は通常、個別飼育とする。特別な状況では、群飼育が正当化される場合もある。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。動物飼育室の温度は 22 °C（± 3°C）、相対湿度は 30～70%とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲料水は自由に摂取させる。

被験物質

7. 本試験ガイドラインの物質収支および代謝物同定の検討では、¹⁴C 標識体を使用する。

ただし、以下が立証された場合、放射性標識体を使用する必要はない。

- 非標識体を用いて物質収支および代謝物同定が適切に評価可能であること
- 非放射性標識体を用いた方法の分析特異性および感度が、放射性標識体を用いた方法で得られる分析特異性および感度と同等かそれ以上であること

また、標識した元素が毒性発現に必須である、または一部関与している場合特に、他の放射性同位体および安定同位体を使用してもかまわない。可能であれば、分子構造の中核部分を放射性標識する。これは、構造の中核部分は代謝的に安定なためである（構造の中核部分は置換不能であり、代謝されて CO_2 として脱離することもなく、生体の一炭素プールに組み込まれることもない）。化合物の代謝運命を追跡するために、分子構造の複数の部位または特定の部位を標識することが必要な場合もある。

8. 被験物質の放射性標識体および非放射性標識体は、適切な方法で分析し、その純度および特定データを確認する。放射性標識体の放射性純度は、当該被験物質で到達し得る最高純度とし（理想的には、95%超）、2%以上存在する不純物を同定するよう合理的な努力を尽くすこと。放射性標識体の純度に加え、同定された不純物の特定データおよび割合を報告すること。複数の成分からなる被験物質の特定および規格、ならびに純度測定法については、それらに役立つ追加ガイダンスを個々の規制プログラムごとに用意してもよい。

用量選択

予備試験

9. 予備試験の用量段階は通常 1 段階で十分である。予備試験の用量は、排泄物（および適切であれば血漿）中の代謝物を同定可能で、予備試験の目的を満たす非毒性用量とする。

主試験

10. 主試験の用量段階は 2 段階以上が望ましい。これは、少なくとも 2 段階の用量群から収集した情報であれば、他の毒性試験の用量設定や、これまでに実施された毒性試験の用量反応関係の評価に有用であると考えられるためである。
11. 用量を 2 段階とする場合、いずれの用量も、排泄物（および適切であれば血漿）中の代謝物を同定可能な用量とする。用量選択にあたっては、入手可能な毒性データ情報を熟慮する。毒性に関する情報が（たとえば、毒性徴候が記録された急性経口毒性試験または反復投与毒性試験から）得られない場合、2 段階のうちの高用量を、推定 LD_{50} 未満または推定急性毒性域の下限値未満として検討することが可能である。2 段階のうち低用量は、高用量の数分の一とする。
12. 用量を 1 段階とする場合、理想的には、排泄物（および必要に応じて血漿）中の代謝物を同定可能だが、明確な毒性はみられない用量とする。用量を 2 段階としない理論

的根拠を示すこと。

13. 用量が体内動態過程に及ぼす影響を確認する必要がある場合、用量が 2 段階では不十分な可能性がある。またそのような場合、少なくとも 1 段階は体内動態過程を飽和させるのに十分な用量とする。濃度時間曲線下面積 (AUC) について、主試験で使用した 2 段階の用量間で線形性がみられない場合、この 2 用量段階の間の用量で少なくとも 1 過程の体内動態過程が飽和していることが強く示唆される。
14. 毒性が低い被験物質では、最高用量を 1000 mg/kg 体重とする。高用量では、規制ニーズに応じて、その化学物質特有の事項を考慮する必要が生じる場合もある。用量選択の妥当性を必ず示すこと。
15. 被験物質の蓄積/残留の可能性を決定する場合、単回投与の TK データおよび組織分布データがあれば十分である。ただし、i) 被験物質の蓄積/残留の可能性または TK の変化(すなわち、酵素誘導および酵素阻害)をより詳細に決定する場合、または ii) 監督官庁に要求された場合など、状況によっては反復投与のデータが必要となる場合がある。反復投与試験を実施する場合、通常、低用量で反復投与すれば十分であるが、ある特定の状況によっては、高用量で反復投与する必要が生じる場合もある。

被験物質の投与

16. 当該被験物質で他の強制経口投与毒性試験が実施されており、そこで使用された溶媒の情報がある場合、その溶媒と同じ溶媒に被験物質を均一に溶解または懸濁する。溶媒選択の理論的根拠を示すこと。溶媒の選択および投与容量は試験デザイン設計時に検討する。通常、投与方法は強制経口投与であるが、状況によってはゼラチンカプセルによる経口投与や混餌投与の方が適している場合もある(これらの投与方法を使用した場合、その妥当性を示すこと)。各個体に投与した実際の用量を確認する。
17. 1 回の強制経口投与で投与可能な最大液量は、供試動物の大きさ、投与溶媒の種類および被験物質投与前の絶食の有無によって決まる。投与前に絶食させた場合も、絶食させなかった場合も、その理論的根拠を示すこと。溶媒量は、溶媒の水性または非水性にかかわらず、通常、実行可能な範囲で少量とする。げっ歯類では、投与容量を通常 10 mL/kg 体重未満とする。親油性が高い被験物質の場合、溶媒量を 4 mL/kg 体重から検討することが可能な場合もある。被験物質投与前に毎日絶食させることが禁忌の場合、投与容量を少なくする(たとえば 2~4 mL/kg 体重とする)ことを検討する。可能な場合、当該被験物質で実施した他の強制経口投与試験と同じ投与容量とすることを検討してもよい。
18. 被験物質を静脈内 (IV) 投与して、血中や排泄物中の被験物質を測定し、バイオアベイラビリティまたは相対的な経口吸収性を決定してもよい。IV 投与する場合、適切な溶媒を用いて被験物質を単回投与する (IV 投与の用量は通常、経口投与用量の最低用量以下とする。用量選択を参照)。適切な投与容量(たとえば 1 mL/kg 体重)で、雌雄いずれか一方の性の供試動物 4 例以上に、選択した投与部位から投与する(正当な

理由がある場合、雌雄双方を使用してもよい。IV 投与する場合、被験物質を適切な溶媒に完全に溶解させる、または懸濁させる必要がある。IV 投与の溶媒は、血液の完全性または血流に影響を与えるものであってはならない。点滴静注する場合、点滴速度を報告する。点滴ポンプを使用する場合、点滴速度を各個体間で標準化する。頸静脈にカニューレを挿入する場合（被験物質投与のためあるいは採血のため）、または大腿動脈を使用する場合（被験物質投与のため）、麻酔を実施する。麻酔はその種類によってはトキシコキネティクスに影響が及ぶ可能性があるため、麻酔の種類を十分に考慮する。供試動物は、被験物質の投与前に適切に回復させること。

測定

物質収支

19. 投与量（投与放射能）のうち尿、糞および呼気中に排泄された割合と、組織、残屍およびケージ洗浄液（段落 46 を参照）中に存在する割合とを合計して物質収支を決定する。通常、投与量（投与放射能）に対する総回収率が約 90%を超える場合、物質収支は適切であると判断する。

吸収

20. 決定した物質収支から胃腸管 (GI) 中や糞中に存在する割合を減算することによって、吸収率の初期推定値を得ることができる。物質収支の検討から、経口投与後の正確な吸収が決定できない場合（たとえば、投与量の 20%超が糞中に存在している場合など）、さらなる検討が必要となる場合がある。そのような場合、さらなる検討として、1) 被験物質を経口投与して、胆汁中に存在する被験物質を測定する試験、または 2) 被験物質を経口および IV 投与して、尿、呼気および屠体中に存在する被験物質の合計を投与経路ごとに求める試験のいずれかを実施することが可能である。いずれの試験でも、被験物質およびその代謝物に特異的な化学分析を行う代わりに放射能を測定してもよい。
21. 胆汁中排泄試験を実施する場合、その投与経路は通常、経口とする。胆汁中排泄試験では、雌雄いずれか一方の性（正当な理由がある場合、雌雄双方を使用してもよい）を 4 例以上用い、胆管にカニューレを挿入した後、被験物質を単回投与する。被験物質投与後に胆汁に排泄される放射能または被験物質の量をモニタリングするが、投与放射能／投与量に対する胆汁中排泄率を推定するのに必要な時間の間、モニタリングする。得られた胆汁中排泄量は、経口吸収率を求める下式にそのまま使用してよい。

吸収率 = (胆汁中排泄量 + 尿中排泄量 + 呼気中排泄量 + 胃腸管を除く屠体中に存在する量) / 投与量 × 100

22. ある種の被験物質は、吸収された後、腸膜を通過して腸に直接分泌される可能性がある

る。そのような場合、胆管カニューレ挿入ラットに経口投与したときの糞中排泄量を、非吸収量とみなすことはできないと考えられる。吸収された被験物質が腸に分泌されていると考えられる場合、経口投与後と IV 投与後の排泄を（胆管カニューレ挿入ラットまたは非挿入ラットで）比較することによって吸収率を算出することが推奨される。また、被験物質の腸分泌量を定量する必要があると判断された場合、胆管カニューレ挿入ラットに IV 投与したときの排泄を測定することが推奨される。

バイオアベイラビリティ

23. バイオアベイラビリティは、経口投与後と IV 投与後の血漿中（血中）動態から求めることが可能である。バイオアベイラビリティは被験物質やその代謝物に特異的な化学分析によって求めるため、被験物質の放射性標識体は不要である。被験物質またはその代謝物のバイオアベイラビリティ（F）の算出は下式によって行う。

$$F = (\text{AUC}_{\text{exp}}/\text{AUC}_{\text{IV}}) \times (\text{用量 IV}/\text{用量 exp})$$

AUC とは血漿濃度時間曲線下面積、exp とは試験で使用した投与経路である。

24. 全身性作用のリスク評価を行う際に、動物試験の全身濃度を労働者暴露評価における類似のバイオモニタリングデータと比較する場合は、毒性成分の吸収率ではなくバイオアベイラビリティを用いるのが通常望ましい。線形性がみられない用量では状況がより複雑になる可能性があるため、トキシコキネティクスのスクリーニングを実施して線形性がみられる用量の範囲を決定することが重要である。

組織分布

25. 被験物質やその代謝物の組織分布の情報は、標的組織を同定するため、根底にある毒性機序を理解するため、ならびに被験物質やその代謝物が蓄積および残留する可能性について情報を得るために重要である。総投与量（総放射能）のうち組織および残屍中に存在する割合は、少なくとも排泄試験終了時（被験物質の挙動によるが、たとえば投与後最大 7 日まで）に測定する。試験終了時に組織中から被験物質が検出されない場合（たとえば、半減期が短いために試験終了前に消失した場合）、データの解釈を間違えないよう注意する。このような場合、被験物質やその代謝物の最高血漿中（血中）濃度到達時間（Tmax）または最高尿中排泄速度到達時間において、適宜、組織分布を検討する。また、被験物質やその代謝物の組織分布を求めるため、時間依存性を評価するため（適切な場合）、物質収支の決定に役立つ情報を得るため、または監督官庁の要求を満たすために、組織採取時点の追加が必要となる場合がある。採取する組織は肝臓、脂肪、胃腸管、腎臓、脾臓、全血、残屍、標的器官組織および被験物質の毒性評価において意義があると考えられるその他の組織（たとえば甲状腺、赤血球、生殖器、皮膚、眼（特に、非アルビノ動物））である。亜慢性または慢性毒性試験で標

的器官に毒性が認められた場合には、供試動物を最大限利用するため、同一時点で追加組織分析するよう検討する。残留濃度（残留放射能濃度）および組織血漿（血液）比も報告する。

26. 追加評価時点（たとえば血漿中（血中）動態試験から求めた最高血漿中（血中）濃度到達時間（Tmax）や排泄試験から求めた最高尿中排泄速度到達時間）における組織分布の評価が、必要となったり、あるいは監督官庁によって要求される場合もある。この追加評価の情報は、被験物質やその代謝物の毒性、蓄積性および残留性を理解するのに役立つと考えられる。
27. 組織分布試験における放射能の定量は、器官を摘出・細断し、その細断片をホモジネートし、得られたホモジネートに燃焼や可溶化処理を施した後、捕集した残渣を液体シンチレーション（LSC）法で計測することによって実施する。開発段階は様々であるが、現在開発段階にあるある種の技術（たとえば、定量的全身オートラジオグラフィおよび受容体の顕微鏡オートラジオグラフィ）も、器官や組織中の被験物質の分布を決定するのに有用である可能性がある。

代謝

28. 被験物質の未変化体および代謝物を同定および定量するために、排泄物（および適切であれば血漿）を採取する。代謝物の同定を容易にするために、所定の用量群内で排泄物をプールしてもよい。試料採取時点ごとに代謝物プロファイルを求めることが推奨されるが、試料がないあるいは放射能がないなどの理由で、試料採取時点ごとに代謝物プロファイルを求めることができない場合、複数の時点の尿および糞をプールしてもよい。ただし、異なる性別間および異なる用量群間の試料をプールすることはできない。適切な定性法および定量法を用いて、供試動物の尿中、糞中および呼気中（ならびに適切であれば胆汁中）の放射能を評価する。
29. 投与量の 5%以上の代謝物をすべて同定し、被験物質の代謝スキームを示すよう合理的な努力を払う。排泄物中の化合物のうち、投与量の 5%以上の化合物を同定する。同定は、化合物の構造解析によって行う。同定は通常、代謝物と既知の標品の同時クロマトグラフィーを 2 種類の異なるシステムで実施する方法か、明確に構造を同定することが可能な分析法（たとえば質量分析法や核磁気共鳴法（NMR）など）のいずれかによって成し遂げられる。同時クロマトグラフィーを 2 種類の異なるシステムで実施することによって代謝物の同定を行う場合、溶媒システムは異なるが固定相が同じ 2 種類の方法は、互いに独立した方法ではないため、不適切であると考えられる。同時クロマトグラフィーによる同定は、分析的に独立したシステム（たとえば、逆相および順相の薄層クロマトグラフィー（TLC）、ならびに高速液体クロマトグラフィー（HPLC）など）を 2 種類用いることで実施すること。クロマトグラフィーによる分離の質が適切である場合、確認のために分光分析を追加する必要はない。代謝物は構造情報が得られる方法、たとえば液体クロマトグラフ／質量分析法（LC-MS）、液体クロマトグラ

フ/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS)、ガスクロマトグラフ/質量分析法 (GC-MS) および NMR などを用いることによって、明確に同定することも可能である。

30. 投与量の 5%以上の代謝物の同定が不可能な場合、その妥当性/説明を最終報告書に示す。被験物質の有害性やリスクの評価では、代謝経路をよりよく理解するために、投与量の 5%未満の代謝物を同定することが適切な場合がある。可能な場合は必ず構造確認を示す。これは、血漿、血液またはその他の組織におけるプロファイリングにも適用される。

排泄

31. 尿、糞および呼気からの回収量 (放射能) の割合を求めることによって、排泄速度および排泄率を決定する。これらのデータも、物質収支を求めるのに役立つデータである。尿、糞および呼気中に排泄された被験物質 (放射能) は、適切な時間間隔ごとに求める。反復投与試験は、目的に合う排泄データが収集できるよう、適切に設計する。適切に設計された反復投与試験は、単独投与試験と比較することが可能となる。
32. 予備試験によって、呼気への被験物質 (放射能) の排泄は重要ではないことが明らかになった場合、主試験で呼気を収集する必要はない。供試動物を個別に代謝ケージに収容し、排泄物 (尿、糞および呼気) を収集する。収集期間終了時、被験物質 (放射能) を最大限回収するために、代謝ケージを適切な溶媒ですすぐ (このすすいだ液を「ケージ洗浄液」と呼ぶ)。排泄物の収集は、7 日目または投与量の 90%以上が回収された時点のいずれか早い時点までとする。
33. 尿中の被験物質 (放射能) 総量を、収集の Day 1 は少なくとも 2 点の時点で (そのうち 1 点は投与後 24 時間とする) 測定し、それ以降は試験終了まで 1 日 1 回測定する。Day 1 は、2 点を上回る試料収集時点 (たとえば投与後 6、12、24 時間) を選択することが奨励される。予備試験の結果を分析して、他のまたは追加の試料収集時点について情報を得る。収集スケジュールについては、その理論的根拠を示すこと。
34. 糞中の被験物質 (放射能) 総量を、予備試験から他のまたは追加の試料収集時点が示唆されない限り、投与後 24 時間から試験終了まで 1 日 1 回測定する。これ以外の収集スケジュールについては、その理論的根拠を示すこと。
35. 24 時間収集した呼気中の被験物質が投与量の 1%未満であった場合、当該試験では呼気中の CO₂ およびその他の揮発性物質の収集を中止してもよい。

経時変化試験

血漿中 (血中) 動態

36. これらの試験の目的は、被験物質の基本的な TK パラメータ (たとえば C_{max}、T_{max}、半減期 (t_{1/2})、AUC) の推定値を得ることである。これらの試験の用量段階は 1 段階でもよいが、2 段階以上の方が適切である。これらの試験の用量設定は、試験の性質や焦点となっている論点によって決定する。被験物質のバイオアベイラビリティなど

の論点を解明したり、用量がクリアランスに与える影響（たとえば、クリアランスが用量依存的に増加し飽和に達するかどうかなど）を明らかにしたりするためには、体内動態データが必要であると考えられる。

37. これらの試験では、動物数を各用量群あたり雌雄いずれか一方の性で 4 例以上とする。使用した性の妥当性を示すこと。毒性に有意な性差があることを裏付ける所見がある場合、各用量群あたり雌雄各 4 例（雄 4 例、雌 4 例）で検討する。
38. 被験物質（放射性標識体）を投与後、適切な採血方法を用いて適切な時点で各個体から採血を行う。反復採血は供試動物の健康状態／生理機能や分析法の感度に影響を与える可能性があることから、各個体の採血量および採血回数が制限される場合もある。採血試料は、個体ごとに分析する。状況によっては（たとえば、代謝物の同定などの場合）、他の個体の試料とプールする必要がある場合もある。試料をプールした場合、プール試料であることを明記し、その説明を示す。放射性標識体を使用した場合、存在する総放射能を分析する。その場合、血液／血漿比を算出できるよう、全血中および血漿中の総放射能、または赤血球中および血漿中の総放射能を分析する。そのほかにも、親化合物や代謝物の同定のためやタンパク結合の評価のために、より特異的な検討が必要となる場合もある。

その他の組織内動態

39. これらの試験の目的は、毒性様式、生物蓄積性、生物残留性などに関連する疑問を解明するために、様々な組織で組織内の被験物質量を測定して、その経時変化情報を得ることである。組織および組織採取時点数は、焦点となっている論点および当該被験物質の毒性データベースに応じて選択する。その他の組織内動態を検討するこれらの追加試験のデザインは、収集された情報を考慮に入れる。これらの試験は、単回または反復投与としてよい。使用したアプローチについては、詳細な理論的根拠を示すこと。
40. その他の組織内動態試験を実施する理由としては、以下などが挙げられる。
 - 血中半減期の延長が認められ、被験物質が様々な組織に蓄積している可能性が示唆されるため
 - 特定の組織内で被験物質が定常状態濃度に達したかどうかに興味があるため（たとえば、反復投与試験で被験物質の血中濃度がみかけの定常状態濃度に達しているが、標的組織でも定常状態濃度に達しているかどうか確認することに興味があるためなど）
41. この種の経時変化試験では、各用量群の各時点あたり 4 例以上の供試動物を用い、被験物質を適切な用量で経口投与した後に、選択した組織において分布の経時変化をモニタリングする。性特異的な毒性がみられない限り、雌雄いずれか一方の性を使用してよい。放射能を分析するか、または親化合物や代謝物を分析するかについては、焦点となっている論点に応じて決定する。組織分布の評価は、適切な手法を用いて実施

する。

酵素誘導／酵素阻害

42. 以下の項目に 1 つ以上当てはまる場合、酵素誘導／酵素阻害の影響または被験物質の試験下における生体内変換に焦点を当てた試験が必要となる可能性がある。
- 利用可能な知見から、被験物質の生体内変換と毒性増強との間に関係性があることが示された場合
 - 利用可能な毒性データから、用量と代謝の間の関係性が非線形であることが示された場合
 - 代謝物同定試験の結果から、毒性の可能性がある代謝物が同定され、それが被験物質によって誘導された酵素経路によって生成した可能性がある場合
 - 酵素誘導に関係があると仮定される影響を説明する場合
 - 異なる種または異なる条件を用いた *in vitro* 試験または *in vivo* 試験のいずれかにおいて、被験物質の代謝物プロファイルに毒性学的に重要な変化が観察された場合、関与する酵素（たとえば、チトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼ系のアイソザイムなどの第 I 段階酵素、スルホトランスフェラーゼもしくはウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素のアイソザイムなどの第 II 段階酵素、またはその他の関連する酵素）の特徴付けが必要となることがある。この情報は、種間外挿の適切性を評価するのに使用できる可能性がある。
43. TK の被験物質に関連した変化を評価する際には、適切にバリデーションされ、妥当性が示された適切な試験実施計画書を使用する。試験デザインの例として、非標識被験物質を反復投与して Day 14 に放射性標識体を単回投与するデザインや、放射性標識体を反復投与して Day 1、7 および 14 に試料を採取し、代謝物プロファイルを決定するデザインが挙げられる。放射性標識体の反復投与では、生物蓄積に関する情報も得られる可能性がある。

補足アプローチ

44. 本試験ガイドラインに示した *in vivo* 試験以外の補足アプローチからも、ある特定の種において、化学物質の吸収、分布、代謝または排泄に関して有用な情報が得られる可能性がある。

In vitro 情報の使用

45. 被験物質の代謝に関するいくつかの論点については、適切な試験系を用いた *in vitro* 試験で対応可能な場合がある。新鮮分離肝細胞または培養肝細胞および肝臓の細胞成分分画（たとえばミクロソーム分画および細胞質分画、または S9 分画）を用いて、代謝物を研究することが可能である。また、標的器官（たとえば肺）における局所的な代謝が、リスク評価で焦点となる場合がある。そのような場合、標的器官のミクロソーム分画が有用となる場合がある。ミクロソームを用いた試験は、性差および世代差の有無を検討したり、代謝の用量依存性の評価で有用な酵素パラメータ（ K_m およ

び Vmax) を暴露段階と関連させて特徴付けたりするのに役立つ場合がある。ミクロソームはまた、被験物質の代謝に関与し、種間外挿に関連する可能性があるミクロソーム酵素を同定するのに役立つ可能性がある。生体内変換が誘導される可能性についても、被験物質で前処理を行った動物の肝臓の細胞成分分画（たとえばミクロソーム分画および細胞質分画）を用いて、*in vitro* 肝細胞誘導試験または関連する酵素を発現する特定の細胞系によって *in vitro* で検討することが可能である。状況によっては、生体内変換の種差の可能性を検討するために、ヒト組織由来の細胞成分分画を適切な条件下で使用することを検討してもよい。*in vitro* 試験の結果も、PBTK モデルの開発に使用することが可能である。

46. *in vitro* 皮膚吸収試験からも、吸収を特徴付ける補足情報が得られる可能性がある。
47. 肝ミクロソームを用いて検討する論点については、新鮮組織切片および肝細胞由来の初代培養細胞を用いて同様に検討することが可能である。関連酵素の発現が確定している細胞系または特別に設計された細胞系を用いて、ある特定の論点を解明することが可能な場合もある。また場合によっては、特定のチトクロム P 450 アイソザイム（たとえば、CYP1A1、2E1、1A2 など）や第 II 段階酵素が、親化合物によって阻害および誘導されるかどうかを、*in vitro* 試験で検討することが有用な場合もある。得られたこれらの情報は、構造類似化合物にも有益である可能性がある。

毒性試験から得られた TK データの補足情報としての使用

48. 他の毒性試験の実施中に得られた血液、組織あるいは排泄物試料の分析によって、バイオアベイラビリティ、血漿中濃度の推移の変化 (AUC、Cmax)、生物蓄積の可能性、クリアランス速度、ならびに代謝および体内動態における性差および世代差に関するデータが得られる可能性がある。
49. 試験デザインを考慮することによって、以下などに関連する疑問点を解明することが可能である。
 - 高用量段階における吸収の飽和、生体内変換、排泄経路および新規代謝経路、ならびに毒性代謝物による高用量段階の制限。
50. その他に、有害性評価の考察として以下などの論点を含めることができる。
 - 血液脳関門、腎臓あるいは解毒能の状態が異なることによる年齢に関連した感受性の違い
 - 生体内変換能に差がある、または他の TK に差があることによる亜集団間の感受性の違い
 - 化学物質の胎盤通過による胎児の暴露の程度または授乳による新生児の暴露の程度

トキシコキネティックモデルの使用

51. トキシコキネティックモデルは、有害性およびリスク評価の多様な面（たとえば、全身暴露および内部組織量の予測）において有用である可能性がある。これらのモデル

は、作用モードに関する特定の疑問点の解明にも使用することができ、種間外挿、暴露経路、投与パターンおよびヒトのリスク評価においてたたき台となり得るものである。所定のいずれの種においても、化学物質の PBTK モデルを開発するうえで有用なデータは 1) 分配係数、2) 生化学的定数および生理学的パラメータ、3) 経路に特異的な吸収パラメータ、4) モデル評価用の *in vivo* 動態データ（たとえば、関連する排泄経路（>10%）におけるクリアランスパラメータ、代謝の K_m および V_{max} ）などである。モデルの開発に使用する実験データは、科学的根拠に基づく方法によって生成したデータであり、得られたモデルはバリデーションを実施する。非コンパートメントモデルまたは生理学的トキシコキネティックモデルの開発を容易にするために、吸収速度、血液組織分配および代謝速度定数などの化学物質特異的なパラメータおよび種特異的なパラメータを決定することが多い。

(1) 亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

亜急性毒性試験 (げっ歯類)

参照ガイドライン：(OECD TG408) げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験

試験の概要

1. 被験物質を、実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で 90 日間毎日経口投与する。投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動物は剖検し、試験終了時には生存動物も屠殺して剖検する。

試験方法

動物種を選択

2. 試験の動物種としてはラットが望ましいが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いてもよい。一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。雌は未経産で非妊娠のものを用いる。離乳後可能な限り速やかに（遅くとも 9 週齢前に）投与を開始する。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の±20%を超えないこととする。長期慢性毒性試験の予備試験として当該試験を実施する場合には、両試験において同じ系統および供給元の動物を使用する。

飼育および給餌条件

3. 動物飼育室の温度は 22 °C ± 3 °C とする。相対湿度は目標値を 50～60 % とし、30 % 以上、70 % を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要がある場合がある。動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育する。

動物の準備

4. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 5 日間以上馴化した後用いる。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重または週齢を明らかにする。動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。

投与の準備

5. 被験物質を強制的に、または飼料や飲水を介して投与する。経口投与の方法は、試験の目的および被験物質の物理化学的性状に基づいて選択する。
6. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後

に他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっているなければならない。また、投与条件下での被験物質の安定性を分析する。

手順

動物数および性

7. 各用量とも少なくとも 20 匹（雌 10 匹、雄 10 匹）の動物を用いる。中間屠殺を予定する場合には、試験終了前に計画殺する動物数をこれに追加する。また、被験物質や類縁物質に関する予備知識に基づき、投与期間後に毒性影響の可逆性や持続性を観察するため、対照群および最高用量群各 10 匹（5 匹／性）からなる追加のサテライト群を設けることを考慮する。この投与後の期間は、認められる影響に応じて適切に定める。

投与量

8. 限度試験を実施する場合を除き、少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。用量は反復投与試験や用量設定試験に基づいて設定するが、設定の際には、被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性およびトキシコキネティクスデータを考慮する。被験物質の物理化学的性質や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は毒性を生じさせるが死亡や重度の苦痛を引き起こさない用量とする。その下の各用量段階は、投与量と反応との関連性を明らかにし、最低用量で無毒性量（NOAEL）が得られるように設定する。用量段階の設定には公比 2～4 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ 6～10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。
9. 対照群は未投与群または溶媒対照群とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で摂餌量の減少がみられるときには、嗜好性による減少か毒性学的変化かをその試験モデルで区別するために、給餌量を揃えた対照群が有用な場合がある。
10. 溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や飲水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。

限度試験

11. 本ガイドラインに記載された方法で試験を行った結果、1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられなかった場合、および構造的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には 3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、

限度試験が適用される。

投与

12. 被験物質を動物に週 7 日、90 日間にわたって毎日投与する。週 5 日の投与など、その他の投与方法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。強制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて 1 日 1 回投与する。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、体重 100 g あたり 1 mL を超えないようにする。ただし、水溶液については体重 100 g あたり 2 mL まで投与してもよい。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。
13. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要である。被験物質の混餌投与では、飼料中濃度 (ppm) を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておかなければならない。被験物質の強制経口投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行う。また、必要に応じて投与量を調整し、体重あたりの用量を一定に保つ。長期慢性毒性試験の予備試験として 90 日間試験を実施する場合には、両試験において同様の飼料を用いる。

観察

14. 観察期間は 90 日間以上とする。追跡観察を予定しているサテライト群の動物については、毒性影響の持続性や毒性影響からの回復を検出するため、適切な期間、投与を行わずに飼育する。
15. 一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行い、動物の状態を記録する。観察は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら、毎日同じ時刻に行うことが望ましい。また、少なくとも 1 日 2 回、全ての動物について病気の徴候および生死を確認する。
16. 少なくとも初回暴露前に 1 回、およびその後は週 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。観察すべき徴候は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の取扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同行動（身づくろいの変化、旋回など）および異常行動（自咬、後ずさりなど）も記録する。
17. 被験物質投与前および試験終了時に、検眼鏡またはそれに相当する適切な器械を用いて眼科学的検査を行う。検査は全ての動物について行うことが望ましいが、少なくとも高用量群および対照群については実施し、眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。
18. 暴露期間終了に近い時点で（遅くとも 11 週以降に）、種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺

激、固有受容器刺激など) に対する感覚運動反応の検査、握力測定、および自発運動量の測定を行う。

19. 他の試験で得られた機能検査のデータがあり、かつ毎日の状態の観察で機能障害が認められない場合には、試験終了に近い時点で行われる機能検査を省略してもよい。
20. 例外として、機能検査成績に顕著な影響を与えると考えられるほどの毒性徴候が他の検査で認められた群については、機能検査を省略することができる場合もある。

体重および摂餌量／摂水量

21. 全ての動物について、少なくとも週 1 回体重を測定する。また、摂餌量を少なくとも週 1 回測定する。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量も少なくとも週 1 回測定する。混餌または強制経口投与試験でも飲水行動の変化がみられた場合には、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

22. 指定部位から血液試料を採取し、必要であれば、適切な条件下で保存する。試験期間終了時には、屠殺直前に、または屠殺手順の一部として試料を採取する。
23. 試験期間終了時、および中間採血が行われた場合は採血時ごとに、以下に示す血液学的検査を行う。

ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総および型別白血球数、血小板数、血液凝固時間／凝固能に関連する項目。

24. 各動物（瀕死状態で発見された動物や試験途中で屠殺された動物を除く）から屠殺直前に、または屠殺手順の一部として採取した血液試料について、組織における主な毒性影響を調べるため、臨床生化学的検査を行う。採血前には動物を一晩絶食させることが推奨される。血漿または血清について以下の項目を検査する。

■ ナトリウム、カリウム、血糖、総コレステロール、尿素、尿素窒素、クレアチニン、総蛋白およびアルブミン、肝細胞に対する影響の指標となる三つ以上の酵素（アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼなど）。場合によっては有用な情報が得られることがある、追加の酵素および胆汁酸の測定を含めてもよい。

25. 任意検査として、試験最終週に、一定時間の採取尿について以下に示す尿検査を行う。外観、尿量、浸透圧または比重、pH、蛋白、糖、血液／血球。
26. 更に、一般的な組織障害に関する血清マーカーの検査も考慮する。被験物質について分かっている性質から、関連代謝プロファイルに影響を与える可能性があったり、それが疑われたりする場合に行うべきその他の検査としては、カルシウム、リン、絶食時トリグリセリド、特定のホルモン、メトヘモグロビン、コリンエステラーゼなどがある。検査すべき項目は化学物質の種類ごとに、また個々の場合に応じて決める必要がある。

27. 基準となる背景データが不適切な場合には、投与開始前に血液学的および臨床生化学的検査項目を測定すべきかを考慮するが、投与前にこれらのデータを得ることは一般には推奨されない。

病理学的検査

剖検

28. 試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。全ての動物（瀕死状態で発見された動物や試験途中で屠殺された動物を除く）の肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、子宮、卵巣、胸腺、脾臓、脳および心臓について、必要であれば周囲の組織を取り除き、その湿重量を測定する。重量測定は乾燥を防ぐため、摘出後可能な限り速やかに行う。
29. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する。
30. 全ての肉眼病変、脳（大脳、小脳および延髄／橋を含む代表的な部位）、脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、食道、唾液腺、胃、小腸および大腸（パイエル板を含む）、肝臓、膵臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、気管および肺（固定液を注入後、浸漬して保存）、大動脈、生殖腺、子宮、副生殖器、雌の乳腺、前立腺、膀胱、胆嚢（マウス）、リンパ節（投与経路をカバーする1リンパ節と、投与経路から離れた部位にあって全身性の影響をカバーする別の1リンパ節が望ましい）、末梢神経（坐骨または脛骨、筋肉に近い部分が望ましい）、骨髄の一部（または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方）、皮膚、眼（眼科学的検査で変化が認められた場合）。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

31. 対照群および高用量群の全ての動物について、保存した器官および組織の完全な病理組織学的検査を行う。高用量群で投与に関連する変化が認められた場合には、他の全ての用量群の動物についても検査する。
32. 全ての肉眼病変を検査する。
33. サテライト群を設けた場合には、投与群での影響の発現が明らかになった器官および組織について、病理組織学的検査を行う。

亜急性毒性試験（非げっ歯類）

参照ガイドライン：(OECD TG409) 非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験

考慮すべき事項

この改訂ガイドラインは化学物質暴露の有害影響を非げっ歯類において明らかにすることができるが、その使用は以下の場合に限るものとする。

- 他の試験で影響が認められ、第二の動物種の非げっ歯類でこれを明確化／特徴付けする必要性が示された場合。または、トキシコキネティクス試験により、特定の非げっ歯類が実験動物として最も関連性の高い選択肢であることが示された場合。または、非げっ歯類の使用を正当化する他の特別な理由がある場合。

試験の概要

1. 被験物質を、実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で 90 日間毎日経口投与する。投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動物は剖検し、試験終了時には生存動物も屠殺して剖検する。

試験方法

動物種の選択

2. 一般的に用いられる非げっ歯類はイヌである。品種のはっきりしたものとするが、ビーグル犬が用いられることが多い。ブタ、ミニブタなど、他の動物種を用いてもよい。霊長類は推奨されず、これを用いる場合にはその妥当性を示すこと。健康な若齢動物を用いる。
3. イヌの場合、4～6 カ月齢で投与を開始することが望ましく、遅くとも 9 カ月齢を超えないものとする。長期慢性毒性試験の予備試験として当該試験を実施する場合には、両試験において同じ動物種／品種を使用する。

飼育および給餌条件

4. 飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要がある場合がある。ケージは動物種に合ったものとする。照明は人工照明が望ましく、12 時間明期、12 時間暗期とする。

動物の準備

5. 以前に実験に供されたことのない健康な若齢動物を、飼育室環境に馴化した後に用いる。馴化期間は、選択した試験動物種とその供給元によるが、イヌや実験用ブタが施設内のコロニーから供給される場合は 5 日間以上、これらの動物が外部から供給される場合は 2 週間以上が推奨される。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重または月（週）齢を明らかにする。動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。

ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。

投与の準備

6. 被験物質は飼料や飲水に混ぜて挿管法で、またはカプセルに封入して投与する。経口投与の方法は、試験の目的および被験物質の物理化学的性状に基づいて選択する。
7. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後に他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっているなければならない。また、投与条件下での被験物質の安定性を分析する。

手順

動物数および性

8. 各用量とも少なくとも 8 匹（雌 4 匹、雄 4 匹）の動物を用いる。中間屠殺を予定する場合には、試験終了前に計画殺する動物数をこれに追加する。試験終了時の動物数は、毒性影響の意味のある評価を行うのに十分な数でなければならない。また、被験物質や類縁物質に関する予備知識に基づき、投与期間後に毒性影響の可逆性や持続性を観察するため、対照群および最高用量群各 8 匹（4 匹／性）からなる追加のサテライト群を設けることを考慮する。この投与後の期間は、認められる影響に応じて適切に定める。

投与量

9. 限度試験を実施する場合を除き、少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。用量は反復投与試験や用量設定試験に基づいて設定するが、設定の際には被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性およびトキシコキネティクスデータを考慮する。被験物質の物理化学的性状や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は毒性を生じさせるが死亡や重度の苦痛を引き起こさない用量とする。その下の各用量段階は投与量と反応との関連性を明らかにし、最低用量で無毒性量（NOAEL）が得られるように設定する。用量段階の設定には公比 2~4 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ 6~10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。
10. 対照群は未投与群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に扱う。溶媒を用いる場合には、用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で摂餌量の減少がみられるときには、嗜好性による減少か毒性学的変化かをその試験モデルで区別するために、給餌量を揃えた対照群が有用な場合がある。
11. 溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留

に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や飲水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。

限度試験

12. 本ガイドラインに記載された方法で試験を行った結果、1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられなかった場合、および構造的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度試験が適用される。

投与

13. 被験物質を動物に週 7 日、90 日間にわたって毎日投与する。週 5 日の投与など、その他の投与方法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。挿管法による場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて 1 日 1 回投与する。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、一般に投与容量は可能な限り小さくする。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。
14. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要である。被験物質の混餌投与では飼料中濃度（ppm）を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておかなければならない。挿管法またはカプセルでの被験物質投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行う。また、必要に応じて投与量を調整し、体重あたりの用量を一定に保つ。長期慢性毒性試験の予備試験として 90 日間試験を実施する場合には、両試験において同様の飼料を用いる。

観察

15. 観察期間は 90 日間以上とする。追跡観察を予定しているサテライト群の動物については、毒性影響の持続性や毒性影響からの回復を検出するため、適切な期間、投与を行わずに飼育する。
16. 一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行い、動物の状態を記録する。観察は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら、毎日同じ時刻に行うことが望ましい。また、少なくとも 1 日 2 回（通常、1 日の始めと終わりに）、全ての動物について病気の徴候および生死を確認する。
17. 少なくとも初回暴露前に 1 回（個体内比較のため）、およびその後は週 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。これらの観察は、可能であれば飼育ケージの外の観察台上で行うが、毎回ほぼ同じ時刻にすることが望ましい。また、観察条件の

変動は最小になるようにする。毒性徴候を、発現時期、程度および持続期間を含めて、注意深く記録する。観察内容は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の取扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同行動（身づくろいの変化、旋回など）および異常行動も記録する。

18. 被験物質投与前および試験終了時に、検眼鏡またはそれに相当する適切な器械を用いて眼科学的検査を行う。検査は全ての動物について行うことが望ましいが、少なくとも高用量群および対照群については実施し、投与に関連した眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。

体重および摂餌量／摂水量

19. 全ての動物について、少なくとも週 1 回体重を測定する。また、摂餌量を少なくとも週 1 回測定する。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量も少なくとも週 1 回測定する。混餌または強制経口投与試験でも飲水行動の変化がみられた場合には、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

20. 指定部位から血液試料を採取し、必要であれば、適切な条件下で保存する。試験期間終了時には屠殺直前に、または屠殺手順の一部として試料を採取する。
21. 試験開始時、その後は 1 カ月ごとまたは試験期間の中間時点、最後に試験期間終了時に、以下に示す血液学的検査を行う。
 - ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総および型別白血球数、血小板数、血液凝固能に関連する項目（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間など）。
22. 試験開始時、その後は 1 カ月ごとまたは試験期間の中間時点、最後に試験期間終了時に、全ての動物から採取した血液試料について、組織における主な毒性影響、特に腎臓および肝臓に対する影響を調べるため、臨床生化学的検査を行う。考慮すべき検査分野は、電解質バランス、炭水化物代謝および肝機能と腎機能であるが、どの検査を選択するかは被験物質の作用様式に関する観察の結果によって異なる。採血前には、その動物種に適した期間、動物を絶食させる。検査項目として提案されるものは以下の通りである。
 - カルシウム、リン、塩素、ナトリウム、カリウム、絶食時血糖、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ、尿素窒素、アルブミン、血中クレアチニン、総ビリルビン、血清総蛋白。
23. 少なくとも試験開始時、中間時および最後に終了時に、一定時間の採取尿について尿検査を行う。尿検査では以下の項目を検査する。

- 外観、尿量、浸透圧または比重、pH、蛋白、糖、血液／血球。また、認められた影響について更に検討するため、必要に応じて、追加項目の検査を行ってもよい。
24. 更に、一般的な組織障害に関するマーカーの検査も考慮する。適切な毒性学的評価のため必要とされる場合のあるその他の項目には、脂質、ホルモン、酸／塩基平衡、メトヘモグロビン、コリンエステラーゼ阻害などがある。また、認められた影響について更に検討するため、必要に応じて、追加の臨床生化学的検査を行ってもよい。検査すべき項目は化学物質の種類ごとに、また個々の場合に応じて決める必要がある。

病理学的検査

剖検

25. 試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内臓の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。全ての動物（瀕死状態で発見された動物や試験途中で屠殺された動物を除く）の胆嚢を含む肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、甲状腺（上皮小体を含む）、胸腺、脾臓、脳および心臓について、必要であれば周囲の組織を取り除き、その湿重量を測定する。重量測定は乾燥を防ぐため、摘出後可能な限り速やかに行う。
26. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する。
- 全ての肉眼病変、脳（大脳、小脳および延髄／橋を含む代表的な部位）、脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）、下垂体、眼、甲状腺、上皮小体、胸腺、食道、唾液腺、胃、小腸および大腸（パイエル板を含む）、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、気管および肺、大動脈、生殖腺、子宮、副生殖器、雌の乳腺、前立腺、膀胱、リンパ節（投与経路をカバーする 1 リンパ節と、投与経路から離れた部位にあって全身性の影響をカバーする別の 1 リンパ節が望ましい）、末梢神経（坐骨または脛骨、筋肉に近い部分が望ましい）、骨髄の一部（または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方）、皮膚。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

27. 少なくとも対照群および高用量群の全ての動物について、保存した器官および組織の完全な病理組織学的検査を行う。高用量群で投与に関連する変化が認められた場合には、他の全ての用量群の動物についても検査する。
28. 全ての肉眼病変を検査する。
29. サテライト群を設けた場合には、投与群での影響の発現が明らかになった器官および組織について、病理組織学的検査を行う。

慢性毒性試験

参照ガイドライン：(OECD TG452) 慢性毒性試験

試験の概要

1. 被験物質を、実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で通常 12 カ月間毎日投与する。規制要件によっては期間をより長く、または短くしてもよい。この期間は、蓄積毒性の影響が現われるほど十分に長いが加齢性変化による影響は受けないように設定する。暴露期間を 12 カ月としない場合（特により短期間の場合）は、その妥当性を示すこと。試験計画に 1 回または複数回の中間屠殺（3 および 6 カ月時など）を含めてもよく、そのための追加動物群を設けることがある。投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動物は剖検し、試験終了時には生存動物を屠殺して剖検する。

試験方法

動物種を選択

2. 本ガイドラインは主にげっ歯類を用いた慢性毒性の評価法について述べている。種を選択については妥当性を示すこと。
3. 本ガイドラインではげっ歯類の種はラットが望ましいとしているが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いてもよい。試験では、一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。慢性毒性試験は、より短期間の予備的な毒性試験と同じ系統および供給元の動物を用いて行う。また、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

飼育および給餌条件

4. 動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育するが、個別飼育は科学的に妥当性のある場合のみ検討する。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。動物飼育室の温度は $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ とする。相対湿度は目標値を 50~60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、飼料は、供試動物種の栄養学的要件を全て満たすとともに、試験結果に影響を与える可能性のある汚染物質（残留農薬、難分解性の汚染有機物、植物エストロゲン、重金属およびカビ毒を含むが、それのみとは限らない）の濃度が可能な限り低いものであること。栄養および飼料中の汚染物質濃度については定期的（少なくとも試験開始時および使用バッチの変更時）に分析し、その情報を最終報告書に含める。試験に用いた飲料水の分析情報も同様に示す。被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できて動物の栄養学的要件にも合った飼料を選択する必要がある場合がある。

動物の準備

5. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 7 日間以上馴化した後
に用いる。げっ歯類の場合、離乳および馴化後可能な限り速やかに投与を開始する（8
週齢前の開始が望ましい）。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重お
よび週齢を明らかにする。また、試験開始時、使用動物の雌雄別の体重のばらつきは
最小限とし、各性の全供試動物の平均体重の $\pm 20\%$ を超えないこととする。動物は対
照群と投与群に無作為に割り付ける。無作為化後は雌雄とも各群の平均体重間に有意
差があってはならず、統計学的有意差がみられた場合は、可能であれば再度無作為化
を行う。各動物には固有の識別番号を付し、その番号を入墨、マイクロチップの埋め
込み、その他適切な方法で永続的に表示する。

手順

動物数および性

6. 雌雄の動物を用いる。また、試験終了時に各群とも詳細な生物学的および統計学的評
価が可能なだけの動物が得られるように、十分な数の動物を用いる。このため、げっ
歯類の場合は通常 1 群あたり少なくとも雌雄各 20 匹とする。また、非げっ歯類の場
合は 1 群あたり雌雄最低各 4 匹とすることが推奨される。なお、マウスの試験では、
要求されている全ての血液学的検査を行うため、各用量群に追加動物が必要かもしれ
ない。

中間屠殺、サテライト群およびモニター動物の設定

7. 科学的妥当性があれば、毒性学的変化の進行に関する情報とメカニズム的な情報を得
るため、中間屠殺（6 カ月時など）を設定してもよい（1 群あたり少なくとも雌雄各 10
匹）。ただし、先に行ったその物質の反復投与毒性試験においてそのような情報がすで
に得られている場合には、中間屠殺は科学的に妥当であるとはいえない可能性がある。
また、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるため、サテライト群を設けるこ
ともできる。サテライト群は通常、試験の最高用量および対照群のみとする。更に、
必要であれば、試験中の疾病状態の監視のため、追加のモニター動物群（通常雌雄各 5
匹）を設けてもよい。なお、中間屠殺やサテライト群／モニター群を計画している場
合には、試験完了前に計画殺する動物数を試験計画に含める動物数に追加する。これ
らの動物については、通常、体重、摂餌量／摂水量、血液学的および臨床生化学的検
査ならびに病理学的検査など、主試験の慢性毒性部分の動物と同じ検査を行う。ただ
し、（中間屠殺群では）神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行っ
てもよい。

用量群および投与量

8. 限度試験を実施する場合を除き、少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。
用量は一般により短期の反復投与試験や用量設定試験に基づいて設定するが、設定の
際には、被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性およびトキシコキネティ

クスデータを考慮する。

9. 被験物質の物理化学的性質や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は通常、主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は、体重増加抑制(約 10%)などで示される明らかな毒性が得られるように設定する。
10. 試験目的によっては、明らかな毒性を示す用量より低い用量を最高用量とすることも ある(ある用量で問題となる有害作用が発現するが、その作用自体は寿命や体重にほとんど影響を与えない場合など)。また、最高用量は 1000 mg/kg 体重/day を超えないこととする。
11. 用量とその間隔は、用量反応関係を確立するために、また最低用量において NOAEL その他試験で意図する成果(BMD など)を得るために設定される場合もある。低用量の設定で考慮すべき点としては、予測される用量反応曲線の傾き、代謝や毒性作用機序に重要な変化が生じる用量、予測される閾値、また予測される低用量の外挿の開始点などがある。
12. 用量間隔の設定は被験物質の特性によるため、このガイドラインで規定することはできないが、公比 2~4 で用量を下げていくとしばしば良好な試験成績が得られる。用量間隔が非常に大きい場合(公比がおおよそ 6~10 を超える場合など)には、4 群目を追加した方がよいことが多い。一般に 10 を超える公比は避けるべきで、用いる場合には妥当性を示す必要がある。
13. 用量設定にあたって考慮すべき点には以下のようなものがある。
 - 用量反応関係における既知の非線形性または変化点、もしくはそれらの可能性
 - トキシコキネティクスと、代謝の誘導、飽和または投与用量と体内用量の非線形関係がみられる／みられない用量範囲
 - 前駆病変、影響のマーカー、背景にある主要な生物学的過程の進行を示す指標
 - 作用機序における主要な局面(またはそれが疑われるもの)。例えば、細胞毒性の発現、ホルモン濃度の乱れ、恒常性維持機構の崩壊などがみられる用量。
 - 用量反応曲線のうち、特に頑健な推定が必要となる領域(予測される BMD または閾値と考えられる値を含む範囲など)
 - ヒトで予測される暴露量に関する考察
14. 対照群は未投与群または溶媒対照群(被験物質投与に溶媒を用いる場合)とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、全用量群のうちで用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で嗜好性の悪化のため摂餌量の顕著な減少がみられるときには、より適切な対照として、給餌量を揃えた追加の対照群が有用な場合がある。
15. 予備試験の情報から、本ガイドラインに記載された方法で試験を行ったときに 1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられそうにないと予測

される場合、および構造的に関連する物質のデータから毒性がないと予想される場合には、3段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度用量の 1000 mg/kg 体重/day が適用できる可能性がある。

被験物質投与の準備および投与

16. 被験物質は通常飼料や飲水を介して、または強制的に経口投与する。投与経路および投与方法は、試験の目的、被験物質の物理化学的性状、生物学的利用性およびヒトの主な暴露経路と暴露方法による。投与経路と投与方法についてはその選択根拠を示すこと。なお、動物愛護の観点から、強制経口投与法は、通常、この投与経路と投与方法がヒトで起こりうる暴露に相当すると考えるのが妥当な物質（医薬品など）の場合のみ選択する。農薬など、食物または環境中の化学物質については、飼料や飲水を介しての投与が一般的である。ただし、状況によっては（職業暴露など）、その他の経路による投与がより適切な場合もある。
17. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や摂水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっている必要がある。また、投与条件下（飼料中など）での被験物質の安定性および投与溶液または調製飼料の均一性（該当する場合）に関する情報を示す。
18. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要であり、混餌投与による長期毒性試験では、栄養の不均衡を防ぐため、飼料中の化学物質濃度は通常、全飼料の 5%（上限）を超えないこととする。また、被験物質の混餌投与では、飼料中濃度（mg/kg 飼料または ppm）を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量（mg/kg 体重、週 1 回算出）を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておく。
19. 経口投与の場合は、被験物質を動物に毎日（週 7 日）、通常 12 カ月間にわたって投与する。ただし、規制要件によってはより長い期間が必要な場合もある。また、週 5 日の投与など、その他の投与方法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。
20. 被験物質を動物に強制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて毎日ほぼ同じ時刻に投与する。通常は 1 日 1 回一度に全量を投与するが、化合物が局所刺激性物質である場合などは、分割投与（1 日 2 回投与）することで 1

日あたりの用量を維持することも可能である。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、可能な限り少量とし、げっ歯類に対しては通常体重 100 g あたり 1 mL を超えないようにする(23)。また、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。ただし、腐食性または刺激性物質の可能性のあるものは例外で、局所への高度な影響を避けるため希釈する必要がある。消化管に対して腐食性または刺激性を示す恐れのある濃度での試験は避けること。

試験期間

21. 本試験ガイドラインは主に 12 カ月間慢性毒性試験として計画されているが、特定の規制制度の要件によっては、また特定のメカニズム的な目的によっては、この試験計画でより短い (6 または 9 カ月など)、もしくは長い (18 または 24 カ月など) 試験を行ってもよいし、実際にそれらに適用が可能である。ただし、暴露期間を 12 カ月としない場合 (特により短期間の場合) には、その妥当性を示すこと。なお、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるために設けるサテライト群は、暴露終了後、4 週間以上かつ全試験期間の 1/3 以下の期間、投与を行わずに飼育する。

観察

22. 全ての動物について、通常、1 日の始めと終わり (週末および祝日を含む) に、病気の徴候および生死を確認する。加えて、一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行う。この観察は毎日同じ時刻に行うことが望ましく、強制経口投与の場合は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら行う。
23. 少なくとも初回暴露前に 1 回 (個体内比較のため)、試験第 1 週の終わり、およびその後は月 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。観察のためのプロトコールは、各観察者間のばらつきが最小限で、試験群とも無関係になるように作成する。これらの観察は飼育ケージの外で行うが、観察台上で、かつ毎回ほぼ同じ時刻にすることが望ましい。その結果は、可能であれば、試験を行う研究所ごとに明確に定めた尺度基準による採点法を用い、注意深く記録する。観察条件の変動は最小になるようにする。観察すべき徴候は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能 (流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など) であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の取り扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同行動 (身づくろいの変化、旋回など) および異常行動 (自咬、後ずさりなど) も記録する。
24. 被験物質の初回投与前に、全ての動物について検眼鏡その他の適切な器械を用いて眼科学的検査を行う。試験終了時にも全ての動物について同検査を行うことが望ましいが、少なくとも高用量群および対照群については実施し、投与に関連した眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。なお、構造解析やその他の情報から眼毒性が示唆される場合には、眼科学的検査の頻度を増やす。

25. 先に行われた 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において神経毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験開始前、試験開始後 3 カ月に 1 回 (12 カ月時まで)、および試験終了時 (12 カ月より長い場合) に、種々の刺激 (聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激など) に対する感覚運動反応の検査、握力測定、および自発運動量の測定を行ってもよい。
26. 先に行われた 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において免疫毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験終了時にこの評価項目に関する更なる検討を行ってもよい。

体重、摂餌量／摂水量および食餌効率

27. 全ての動物について、投与開始時、最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回体重を測定する。また、摂餌量および食餌効率を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回求める。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回測定する。更に、試験において飲水行動の変化がみられた場合にも、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

28. げっ歯類を用いた試験では、血液学的検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹の常に同じ動物について 3、6、12 カ月時および試験終了時 (12 カ月より長い場合) に行う。マウスでは、要求されている全ての血液学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、より少数の動物 (イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど) から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で血液学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の測定を行う必要はない。検査では麻酔下で指定部位から血液試料を採取する (心臓穿刺または眼窩静脈叢からの採血など)。
29. 以下の項目を検査する
 - 総および型別白血球数、赤血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値 (PCV)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、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。物質の毒性によっては、ハインツ小体その他の赤血球の形態異常やメトヘモグロビンなど、上記以外の血液学的検査項目を測定することが適当な場合もある。
30. 組織における主な毒性影響、特に腎臓および肝臓に対する影響を調べるため、臨床生化学的検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹の常に同じ動物から採取した血液について、血液学的検査の項に示したのと同じ間隔で行う。マウスでは、要求されている全ての臨床生化学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、よ

り少数の動物（イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど）から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で臨床生化学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の測定を行う必要はない。採血前には動物（マウスを除く）を一晩絶食させることが推奨される。

31. 以下の項目を検査する。

■ 血糖、尿素（尿素窒素）、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、総コレステロール、肝細胞の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸）および肝胆道の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アルカリフォスファターゼ、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、総ビリルビン、総胆汁酸）。物質の毒性によっては、空腹時トリグリセリド、特定のホルモンおよびコリンエステラーゼなど、上記以外の臨床化学的検査項目を測定することが適当な場合もある。

32. 尿検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹について、血液学的および臨床化学的検査と同じ間隔でサンプルを採取して実施する。ただし、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で尿検査に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の検査を行う必要はない。臨床病理検査に関する専門家の推奨に含まれていた項目は、外観、尿量、浸透圧または比重、pH、総蛋白および糖であるが、その他の項目として、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血などもある。認められた影響について検討を進めるために必要な場合には、更なる項目の検査を行ってもよい。

33. 一般に、イヌの試験では投与前に基準となる血液学的および臨床生化学的検査値が必要であるが、げっ歯類の試験では測定しておく必要はないと考えられている。しかし、基準となる背景データが不適切な場合には、これらのデータを得ておくことを考慮する。

病理学的検査

剖検

34. 通常、試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。ただし、（中間屠殺またはサテライト群では）神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行ってもよく、これらの動物については剖検および以下の段落に述べるその後の手順を行う必要はない。また、モニター動物については、試験責任者の判断により、個々の場合に応じて剖検が必要になることがある。

35. 前段落の後半部分で除外された動物を除く全ての動物について、器官重量を測定する。具体的には、全ての動物（瀕死状態で発見された動物および試験途中の屠殺動物を除

く)の副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、脾臓、精巣、甲状腺(固定後秤量、上皮小体を含む)および子宮について、必要であれば周囲の組織を取り除き、その湿重量を測定する。重量測定は乾燥を防ぐため、摘出後可能な限り速やかに行う。なお、マウスの試験での副腎重量の測定は任意とする。

36. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する(□内の組織は任意)。

全ての肉眼病変	心臓	脾臓	胃(前胃、腺胃)
副腎	回腸	上皮小体	[歯]
大動脈	空腸	末梢神経	精巣
脳(大脳、小脳および延髄/橋の一部を含む)	腎臓	下垂体	胸腺
盲腸	涙腺(外涙腺)	前立腺	甲状腺
子宮頸	肝臓	直腸	[舌]
凝固腺	肺	唾液腺	気管
結腸	リンパ節(表在および深部の両方)	精囊	膀胱
十二指腸	乳腺(雌は必須、雄は肉眼的に採取可能な場合)	骨格筋	子宮(頸部を含む)
精巣上体	[上気道(鼻、鼻甲介および副鼻腔を含む)]	皮膚	[尿管]
眼(網膜を含む)	食道	脊髄(3カ所:頸部、中胸部および腰部)	[尿道]
[大腿骨および関節]	[嗅球]	脾臓	膣
胆嚢(ラット以外の種)	卵巣	[胸骨]	骨髄の一部または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方
ハーダー腺			

37. 両側性の器官(腎臓、副腎など)は両側とも保存する。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

38. 最低限、次の病理組織学的検査を行う。

- 高用量群および対照群の全組織
- 試験中の死亡または屠殺動物の全組織
- 肉眼的異常がみられた全組織
- 標的組織または高用量群で投与に関連する変化が認められた組織があるとき、他の全ての用量群の全ての動物から採取したそれらの組織
- 両側性の器官（腎臓、副腎など）は、両側とも検査する。

データおよび報告

データ

39. 背景データは試験結果の解釈に有用な場合がある。背景データを評価に用いる場合には、同じ施設において当該試験以前の 5 年間に得られた同一齢／系統の動物のデータを提出する。
40. 必要に応じて、適切かつ一般的に認められている統計方法を用いて数的結果を評価する。統計方法と解析するデータは試験計画の段階で選択するものとする。選択にあたっては、必要な場合に生存率による補正もできるようにする。

(2) 発がん性試験

参照ガイドライン：(OECD TG451) 癌原性試験

試験の概要

1. 被験物質を、供試動物からなるいくつかの群に段階的な用量でその生涯の大部分の期間にわたって毎日、通常は経口で投与する。動物の毒性徴候および腫瘍性病変の発生を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動物は剖検し、試験終了時には生存動物を屠殺して剖検する。

試験方法

動物種を選択

2. 本ガイドラインは主にげっ歯類を用いた癌原性の評価法について述べている。げっ歯類以外の種の方がヒトの健康に対する影響の予測により適していることを示唆するデータがある場合には、それらの使用を考慮してもよい。種を選択については妥当性を示すこと。げっ歯類の種はラットが望ましいが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いてもよい。癌原性試験におけるマウスの使用については、有用性が限られている可能性があるが、現在の規制プログラムの中にはマウスを用いた癌原性試験を要求するものが依然として存在する。ラットおよびマウスは、寿命が比較的短いこと、薬理試験や毒性試験において広く用いられていること、腫瘍の誘発に対して感受性があること、および十分に特性のはっきりした系統が入手可能であることから、好ましい実験モデルとされてきた。このような特徴の結果、その生理と病理については豊富な情報が存在する。
3. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。癌原性試験は、より短期間の予備的な毒性試験と同じ系統および供給元の動物を用いて行うことが望ましい。ただし、その系統および供給元の動物では長期試験における通常の生存率の許容基準を満たすのが難しいと分かっている場合は、長期試験の生存率が許容基準内である系統の使用を考慮する。また、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

飼育および給餌

4. 動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育するが、個別飼育は科学的に妥当性のある場合のみ検討する。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。動物飼育室の温度は $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ とする。相対湿度は目標値を 50~60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、飼料は、供試動物種の栄養学的要件を全て満たすとともに、試験結果に影響を与える可能性のある汚染物質の濃度が可能な限り低いものであること。栄養および飼料中の汚染物質濃度につ

いては定期的に分析し、その情報を最終報告書に含める。試験に用いた飲料水の分析情報も同様に示す。被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できて動物の栄養学的要件にも合った飼料を選択する必要がある場合がある。

動物の準備

5. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 7 日間以上馴化した後
に用いる。げっ歯類の場合、離乳および馴化後可能な限り速やかに投与を開始する（8
週齢前の開始が望ましい）。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重お
よび週齢を明らかにする。また、試験開始時、使用動物の雌雄別の体重のばらつきは
最小限とし、各性の全供試動物の平均体重の $\pm 20\%$ を超えないこととする。動物は対
照群と投与群に無作為に割り付ける。無作為化後は雌雄とも各群の平均体重間に有意
差があってはならず、統計学的有意差がみられた場合は、可能であれば再度無作為化
を行う。各動物には固有の識別番号を付し、その番号を適切な方法で永続的に表示す
る。

手順

動物数および性

6. 雌雄の動物を用いる。また、詳細な生物学的および統計学的評価が可能なように、十
分な数の動物を用いる。このため、各用量群および同時対照群には少なくとも雌雄各
50 匹を含める。試験目的によっては、個々の用量群に動物を不均等に割り付けること
により、主要な評価項目の統計検出力を高めることが可能な場合がある。

中間屠殺およびサテライト（モニター）群の設定

7. 科学的妥当性があれば、腫瘍性変化の進行に関する情報とメカニズ的な情報を得る
ため、中間屠殺（12 カ月時など）を設定してもよい。ただし、先に行ったその物質の
反復投与毒性試験においてそのような情報がすでに得られている場合には、中間屠殺
は科学的に妥当であるとはいえない可能性がある。試験計画に中間屠殺を含む場合、
各用量群の中間屠殺用の動物数は通常雌雄各 10 匹とし、これら試験完了前に計画殺
する動物数を試験計画に含める総動物数に追加する。必要であれば、試験中の疾病状
態の監視のため、追加のモニター動物群（通常雌雄各 5 匹）を設けてもよい。

用量群および投与量

8. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。用量は一般により短期の反復投与
試験や用量設定試験に基づいて設定するが、設定の際には、被験物質や関連物質に関
して入手可能な既存の毒性およびトキシコキネティクスデータを考慮する。
9. 被験物質の物理化学的性質や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は主要な
標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引
き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は通常、以下に示す点を考慮し
ながら、体重増加抑制（約 10%）などで示される明らかな毒性が得られるように設定

する。

10. 用量とその間隔は、用量反応関係を確立するために、また被験物質の作用機序によっては、最低用量において NOAEL その他試験で意図する成果を得るために設定される場合もある。低用量の設定で考慮すべき点としては、予測される用量反応曲線の傾き、代謝や毒性作用機序に重要な変化が生じる用量、予測される閾値、また予測される低用量の外挿の開始点などがある。
11. 用量間隔の設定は被験物質の特性によるため、このガイドラインで規定することはできないが、公比 2~4 で用量を下げていくとしばしば良好な試験成績が得られる。用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ 6~10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。一般に 10 を超える公比は避けるべきで、用いる場合には妥当性を示す必要がある。
12. 用量設定にあたって考慮すべき点には以下のようなものがある。
 - 用量反応関係における既知の非線形性または変化点、もしくはそれらの可能性
 - トキシコキネティクスと、代謝の誘導、飽和または投与用量と体内用量の非線形関係がみられる／みられない用量範囲
 - 前駆病変、影響のマーカー、背景にある主要な生物学的過程の進行を示す指標
 - 作用機序における主要な局面（またはそれが疑われるもの）。例えば、細胞毒性の発現、ホルモン濃度の乱れ、恒常性維持機構の崩壊などがみられる用量。
 - 用量反応曲線のうち、特に頑健な推定が必要となる領域（予測される BMD または閾値と考えられる値を含む範囲など）
 - ヒトで予測される暴露量に関する考察
13. 対照群は未投与群または溶媒対照群とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、全用量群のうちで用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で嗜好性の悪化のため摂餌量の顕著な減少がみられるときには、より適切な対照として、給餌量を揃えた追加の対照群が有用な場合がある。

被験物質投与の準備および投与

14. 被験物質は通常飼料や飲水を介して、または強制的に経口投与する。投与経路および投与方法は、試験の目的、被験物質の物理化学的性状、生物学的利用性およびヒトの主な暴露経路と暴露方法による。投与経路と投与方法についてはその選択根拠を示すこと。
15. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響、および動物の摂餌量や摂水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後他の溶媒の溶液を考慮

することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっている必要がある。また、投与条件下での被験物質の安定性および投与溶液または調製飼料の均一性に関する情報を示す。

16. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要であり、混餌投与による長期毒性試験では、栄養の不均衡を防ぐため、飼料中の化学物質濃度は通常、全飼料の 5%を超えないこととする。また、被験物質の混餌投与では、飼料中濃度 (mg/kg 飼料または ppm) を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量 (mg/kg 体重、週 1 回算出) を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておく。
17. 経口投与の場合は、被験物質を動物に毎日 (週 7 日)、げっ歯類では通常 24 カ月間にわたって投与する。週 5 日の投与など、その他の投与方法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。
18. 被験物質を動物に強制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて毎日ほぼ同じ時刻に投与する。通常は 1 日 1 回一度に全量を投与するが、化合物が局所刺激性物質である場合などは、分割投与することで 1 日あたりの用量を維持することも可能である。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、可能な限り少量とし、げっ歯類に対しては通常体重 100 g あたり 1 mL を超えないようにする。また、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。ただし、腐食性または刺激性物質の可能性のあるものは例外で、局所への高度な影響を避けるため希釈する必要がある。消化管に対して腐食性または刺激性を示す恐れのある濃度での試験は避けること。

試験期間

19. 試験期間はげっ歯類では通常 24 カ月間で、これは使用する動物の正常な寿命の大部分に相当する。試験で用いる動物種の系統の寿命によっては試験期間をより短く、または長くしてもよいが、その妥当性を示すこと。マウスの特定の系統 (AKR/J、C3H/J、C57BL/6J など) では 18 カ月間がより適当である可能性がある。試験期間、試験の終了および生存率に関するいくつかのガイダンスを次に示す。
 - 低用量群または対照群の生存動物数が 25%を下回った場合は、試験の終了を考える。
 - 高用量群のみが毒性のために試験途中で死亡しても、それによる試験の終了は考えない。
 - 雌雄の生存率は分けて考える。
 - 試験で得られるデータが統計学的に有効な評価を行うのに十分でなくなる時点まで試験を延長することはしない。

観察

20. 全ての動物について、通常、1 日の始めと終わりに、病気の徴候および生死を確認す

る。加えて、毒性学的に意味のある特異的な徴候の有無を 1 日 1 回確認する。強制経口投与の場合、この確認は投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら行う。腫瘍発生には特に注意を払い、肉眼的に認められる腫瘍および触知可能な腫瘍について、それぞれの発生時期、位置、大きさ、外観および進行具合を記録する。

体重、摂餌量／摂水量および食餌効率

21. 全ての動物について、投与開始時、最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回体重を測定する。また、摂餌量および食餌効率を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回求める。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回測定する。更に、試験において飲水行動の変化がみられた場合にも、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査、臨床生化学的検査およびその他の測定

22. 試験から最大限の情報を得るため、血液学的および臨床生化学的検査用に採血を行ってもよいが、これは試験責任者の判断による。尿検査を行ったほうがよい場合もある。適切と判断された場合には、血液学的および臨床化学的検査用の採血ならびに尿検査を、中間屠殺の一部として、および試験終了時に、各群雌雄最低 10 匹ずつについて行う。指定部位から血液試料を採取し、必要であれば、適切な条件下で保存する。検査用の血液塗抹標本作製してもよい。ただし、癌原性の評価における血液塗抹検査の価値には疑問が呈されている。

病理学的検査

剖検

23. モニター動物およびその他のサテライト動物を除き、試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。モニター動物およびその他のサテライト動物については、試験責任者の判断により、個々の場合に応じて剖検が必要になることがある。器官重量は、加齢性の変化に加え、より後期には腫瘍発生によってもデータの有用性が損なわれるため、通常癌原性試験では測定しない。ただし、科学的根拠の重要度 (weight of evidence) の評価を行ったり、特に作用機序に関して考察したりするには、これらが非常に重要な場合もある。なお、サテライト試験の一部として測定する場合には、試験開始後 1 年以内に行う。
24. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する ([] 内の組織は任意)。

全ての肉眼病変	心臓	脾臓	胃 (前胃、腺胃)
副腎	回腸	上皮小体	[歯]

大動脈	空腸	末梢神経	精巣
脳（大脳、小脳および延髄／橋の一部を含む）	腎臓	下垂体	胸腺
盲腸	涙腺（外涙腺）	前立腺	甲状腺
子宮頸	肝臓	直腸	[舌]
凝固腺	肺	唾液腺	気管
結腸	リンパ節（表在および深部の両方）	精嚢	膀胱
十二指腸	乳腺（雌は必須、雄は肉眼的に採取可能な場合）	骨格筋	子宮（頸部を含む）
精巣上体	[上気道（鼻、鼻甲介および副鼻腔を含む）]	皮膚	[尿管]
眼（網膜を含む）	食道	脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）	[尿道]
[大腿骨および関節]	[嗅球]	脾臓	膣
胆嚢（ラット以外の種）	卵巣	[胸骨]	骨髄の一部または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方
ハーダー腺			

25. 両側性の器官は両側とも保存する。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

26. 最低限、次の組織を検査する。

- 高用量群および対照群の全組織
- 試験中の死亡または屠殺動物の全組織
- 腫瘍を含め、肉眼的異常がみられた全組織
- 高用量群で投与に関連する病理組織学的変化が認められた場合には、他の全ての用量群の全ての動物についても同じ組織を検査する。
- 両側性の器官は、両側とも検査する。

データおよび報告

データ

27. 背景データは試験結果の解釈に有用な場合がある。背景データを評価に用いる場合には、同じ施設において当該試験以前の 5 年間に得られた同一齢／系統の動物のデータを提出する。
28. 必要に応じて、適切かつ一般的に認められている統計方法を用いて数的結果を評価する。
29. 統計方法と解析するデータは試験計画の段階で選択するものとする。選択にあたっては、必要な場合に生存率による補正もできるようにする。

(3) 1年間反復投与毒性／発がん性併合試験

参照ガイドライン：(OECD TG453) 慢性毒性／癌原性併合試験

試験の概要

1. 試験計画は慢性毒性部分と癌原性部分の並行する 2 つの部分からなる。被験物質は通常経口投与とする。慢性毒性部分では、被験物質を供試動物からなるいくつかの群に段階的な用量で (1 群 1 用量) 通常 12 カ月間毎日投与する。規制要件によっては期間をより長く、または短くしてもよい。この期間は、蓄積毒性の影響が現われるほど十分に長い加齢性変化による影響は受けないように設定する。また、試験計画に 1 回または複数回の間断屠殺 (3 および 6 カ月時など) を含めてもよく、そのための追加動物群を設けることがある。癌原性部分では、被験物質を供試動物からなるいくつかの群にその生涯の大部分の期間にわたって毎日投与する。これら両部分の動物の毒性徴候および腫瘍性病変の発生を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動物は剖検し、試験終了時には生存動物を屠殺して剖検する。

試験方法

動物種を選択

2. 本ガイドラインは主にげっ歯類を用いた慢性毒性および癌原性の評価法について述べている。げっ歯類以外の種の方がヒトの健康に対する影響の予測により適していることを示唆するデータがある場合には、それらの使用を考慮してもよい。種を選択については妥当性を示すこと。げっ歯類の種はラットが望ましいが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いてもよい。癌原性試験におけるマウスの使用については、有用性が限られている可能性があるが、現在の規制プログラムの中にはマウスを用いた癌原性試験を要求するものが依然として存在する。
3. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。慢性毒性／癌原性併合試験は、より短期間の予備的な毒性試験と同じ系統および供給元の動物を用いて行う。また、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

飼育および給餌条件

4. 動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育するが、個別飼育は科学的に妥当性のある場合のみ検討する。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。動物飼育室の温度は $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと (飼育室清掃時を除く) が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、飼料は、供試動物種の栄養学的要件を全て満たすとともに、試験結果に影響を与える可能性のある汚染物質 (残留農薬、難分解性の汚染有機物、植物エストロゲン、重金属およびカビ毒を含むが、そ

れのみとは限らない) の濃度が可能な限り低いものであること。栄養および飼料中の汚染物質濃度については定期的 (少なくとも試験開始時および使用バッチの変更時) に分析し、その情報を最終報告書に含める。試験に用いた飲料水の分析情報も同様に示す。被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できて動物の栄養学的要件にも合った飼料を選択する必要がある場合がある。

動物の準備

5. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 7 日間以上馴化した後用いる。げっ歯類の場合、離乳および馴化後可能な限り速やかに投与を開始する (8 週齢前の開始が望ましい)。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重および週齢を明らかにする。また、試験開始時、使用動物の雌雄別の体重のばらつきは最小限とし、各性の全供試動物の平均体重の $\pm 20\%$ を超えないこととする。動物は対照群と投与群に無作為に割り付ける。無作為化後は雌雄とも各群の平均体重間に有意差があってはならず、統計学的有意差がみられた場合は、可能であれば再度無作為化を行う。各動物には固有の識別番号を付し、その番号を入墨、マイクロチップの埋め込み、その他適切な方法で永続的に表示する。

手順

動物数および性

6. 雌雄の動物を用いる。また、詳細な生物学的および統計学的評価が可能なように、十分な数の動物を用いる。このため、げっ歯類の場合、試験の癌原性部分に使用する各用量群および同時対照群には少なくとも雌雄各 50 匹を含める。試験目的によっては、個々の用量群に動物を不均等に割り付けることにより、主要な評価項目の統計検出力を高めることが可能な場合がある (低用量での癌原性を推測するため、同群に 50 匹より多く割り付けるなど)。ただし、群の大きさをある程度大きくしても、試験の統計検出力はあまり大きくは増加しないことを認識しておく必要がある。一方、げっ歯類の場合、試験の慢性毒性部分に使用する各用量群および同時対照群には少なくとも雌雄各 10 匹を含める。この併合試験の慢性毒性部分で 1 群あたりの動物数を削減しても、そこから得られるデータの解釈は、より多くの動物を用いる癌原性部分から得られるデータによって裏付けることができる。なお、マウスの試験では、要求されている全ての血液学的検査を行うため、慢性毒性部分の各用量群に追加動物が必要かもしれない。

中間屠殺、サテライト群およびモニター動物の設定

7. 科学的妥当性があれば、非腫瘍性変化の進行に関する情報とメカニズ的な情報を得るため、中間屠殺 (慢性毒性部分の 6 カ月時など) を設定してもよい。ただし、先に行ったその物質の反復投与毒性試験においてそのような情報がすでに得られている場合には、中間屠殺は科学的に妥当であるとはいえない可能性がある。試験の慢性毒性部分 (期間は通常 12 カ月間) に用いる動物から癌原性部分の中間屠殺のデータが得られ

るため、全体として使用動物数を削減できる。また、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるため、試験の慢性毒性部分にサテライト群を設けることもできる。サテライト群は試験の最高用量および対照群のみでよい。更に、必要であれば、試験中の疾病状態の監視のため、追加のモニター動物群（通常雌雄各 5 匹）を設けてもよい。試験計画にサテライト動物または中間屠殺もしくはその両方を含む場合、そのための各用量群の動物数は通常雌雄各 10 匹とし、これら試験完了前に計画殺する動物数を試験計画に含める総動物数に追加する。中間屠殺およびサテライト動物については、通常、体重、摂餌量／摂水量、血液学的および臨床生化学的検査ならびに病理学的検査など、主試験の慢性毒性部分の動物と同じ検査を行う。ただし、（中間屠殺群では）神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行ってもよい。

用量群および投与量

8. 慢性毒性部分、癌原性部分の両方について少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。用量は一般により短期の反復投与試験や用量設定試験に基づいて設定するが、設定の際には、被験物質や関連物質に関して入手可能な既存の毒性およびトキシコキネティクスデータを考慮する。
9. 試験の慢性毒性部分については、1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられそうにないと予測される場合、3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられる。その判断は、予備試験の情報と、構造的に関連する物質のデータから毒性がないと予想されるという考察に基づくものであること。このような場合には、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度用量の 1000 mg/kg 体重/day が適用できる可能性がある。
10. 被験物質の物理化学的性質や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は通常、体重増加抑制（約 10%）などで示される明らかな毒性が得られるように設定する。ただし、試験目的によっては、明らかな毒性を示す用量より低い用量を最高用量とすることもある（ある用量で問題となる有害作用が発現するが、その作用自体は寿命や体重にほとんど影響を与えない場合など）。
11. 用量とその間隔は、用量反応関係を確立するために、また被験物質の作用機序によっては、NOAEL その他試験で意図する成果（BMD など）を得るために設定される場合もある。低用量の設定で考慮すべき点としては、予測される用量反応曲線の傾き、代謝や毒性作用機序に重要な変化が生じる用量、予測される閾値、また予測される低用量の外挿の開始点などがある。なお、慢性毒性／癌原性併合試験を実施する場合、主要目的は癌原性のリスク評価のための情報を得ることであり、慢性毒性に関する情報は通常副次的目的である。用量とその間隔を設定する際にはこれを念頭におくこと。
12. 用量間隔の設定は試験の目的と被験物質の特性によるため、このガイドラインで詳細

に規定することはできないが、公比 2~4 で用量を下げていくとしばしば良好な試験成績が得られる。用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ 6~10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。一般に 10 を超える公比は避けるべきで、用いる場合には妥当性を示す必要がある。

13. 用量設定にあたって考慮すべき点には以下のようなものがある。
 - 用量反応関係における既知の非線形性または変化点、もしくはそれらの可能性
 - トキシコキネティクスと、代謝の誘導、飽和または投与用量と体内用量の非線形関係がみられる／みられない用量範囲
 - 前駆病変、影響のマーカー、背景にある主要な生物学的過程の進行を示す指標
 - 作用機序における主要な局面（またはそれが疑われるもの）。例えば、細胞毒性の発現、ホルモン濃度の乱れ、恒常性維持機構の崩壊などがみられる用量。
 - 用量反応曲線のうち、特に頑健な推定が必要となる領域（予測される BMD または閾値と考えられる値を含む範囲など）
 - ヒトで予測される暴露量に関する考察（特に中間および低用量の設定時）
14. 対照群は未投与群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、全用量群のうちで用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で嗜好性の悪化のため摂餌量の顕著な減少がみられるときには、より適切な対照として、給餌量を揃えた追加の対照群が有用な場合がある。

被験物質投与の準備および投与

15. 被験物質は通常飼料や飲水を介して、または強制的に経口投与する。投与経路および投与方法は、試験の目的、被験物質の物理化学的性状、生物学的利用性およびヒトの主な暴露経路と暴露方法による。投与経路と投与方法についてはその選択根拠を示すこと。なお、動物愛護の観点から、強制経口投与方法は、通常、この投与経路と投与方法がヒトで起こりうる暴露に相当すると考えるのが妥当な物質（医薬品など）の場合のみ選択する。農薬など、食物または環境中の化学物質については、飼料や飲水を介しての投与が一般的である。ただし、状況によっては（職業暴露など）、その他の経路による投与がより適切な場合もある。
16. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や摂水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっている必要がある。また、投与条件下（飼料中など）での被験物質の安定性および投与溶液または調製飼料の均一性（該当する場合）に関する

情報を示す。

17. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要であり、混餌投与による長期毒性試験では、栄養の不均衡を防ぐため、飼料中の化学物質濃度は通常、全飼料の5%(上限)を超えないこととする。また、被験物質の混餌投与では、飼料中濃度(mg/kg 飼料または ppm)を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量(mg/kg 体重、週1回算出)を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておく。
18. 経口投与の場合は、被験物質を動物に毎日(週7日)、12カ月間(慢性毒性部分)または24カ月間(癌原性部分)にわたって投与する。週5日の投与など、その他の投与方法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。
19. 被験物質を動物に強制経口投与する場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて毎日ほぼ同じ時刻に投与する。通常は1日1回一度に全量を投与するが、化合物が局所刺激性物質である場合などは、分割投与(1日2回投与)することで1日あたりの用量を維持することも可能である。1回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、可能な限り少量とし、げっ歯類に対しては通常体重100gあたり1mLを超えないようにする。また、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。ただし、腐食性または刺激性物質の可能性のあるものは例外で、局所への高度な影響を避けるため希釈する必要がある。消化管に対して腐食性または刺激性を示す恐れのある濃度での試験は避けること。

試験期間

20. 本試験の慢性毒性部分の投与期間は通常12カ月間であるが、特定の規制制度の要件によっては、また特定のメカニズ目的によっては、この試験計画でより短い(6または9カ月など)、もしくは長い(18または24カ月など)試験を行ってもよいし、実際にそれらに適用が可能である。ただし、暴露期間を12カ月としない場合(特により短期間の場合)には、その妥当性を示すこと。慢性毒性部分に割り付けられた用量群は全て所定の時期に屠殺し、慢性毒性および非腫瘍性病理所見の評価を行う。なお、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるために設けるサテライト群は、暴露終了後、4週間以上かつ全試験期間の1/3以下の期間、投与を行わずに飼育する。
21. 本試験の癌原性部分の試験期間はげっ歯類では通常24カ月間で、これは使用する動物の正常な寿命の大部分に相当する。試験で用いる動物種の系統の寿命によっては試験期間をより短く、または長くしてもよいが、その妥当性を示すこと。マウスの特定の系統(AKR/J、C3H/J、C57BL/6Jなど)では18カ月間がより適当である可能性がある。試験期間、試験の終了および生存率に関するいくつかのガイダンスを次に示す。
 - 低用量群または対照群の生存動物数が25%を下回った場合は、試験の終了を考える。

- 高用量群のみが毒性のために試験途中で死亡しても、それによる試験の終了は考えない。
- 雌雄の生存率は分けて考える。
- 試験で得られるデータが統計学的に有効な評価を行うのに十分でなくなる時点まで試験を延長することはしない。

観察（慢性毒性部分）

22. 全ての動物について、通常、1 日の始めと終わり（週末および祝日を含む）に、病気の徴候および生死を確認する。加えて、一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行う。この観察は毎日同じ時刻に行うことが望ましく、強制経口投与の場合は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら行う。
23. 少なくとも初回暴露前に 1 回（個体内比較のため）、試験第 1 週の終わり、およびその後は月 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。観察のためのプロトコールは、各観察者間のばらつきが最小限で、試験群とも無関係になるように作成する。これらの観察は飼育ケージの外で行うが、観察台上で、かつ毎回ほぼ同じ時刻にすることが望ましい。その結果は、可能であれば、試験を行う研究所ごとに明確に定めた尺度基準による採点法を用い、注意深く記録する。観察条件の変動は最小になるようにする。観察すべき徴候は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の取り扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同行動（身づくろいの変化、旋回など）および異常行動（自咬、後ずさりなど）も記録する。
24. 被験物質の初回投与前に、全ての動物について検眼鏡その他の適切な器械を用いて眼科学的検査を行う。試験終了時にも全ての動物について同検査を行うことが望ましいが、少なくとも高用量群および対照群については実施し、投与に関連した眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。なお、構造解析やその他の情報から眼毒性が示唆される場合には、眼科学的検査の頻度を増やす。
25. 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において神経毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験開始前、試験開始後 3 カ月に 1 回（12 カ月時まで）、および試験終了時（12 カ月より長い場合）に、種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激など）に対する感覚運動反応の検査、握力測定、および自発運動量の測定を行ってもよい。
26. 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において免疫毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験終了時にこの評価項目に関する更なる検討を行ってもよい。

体重、摂餌量／摂水量および食餌効率

27. 全ての動物について、投与開始時、最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少

なくとも月 1 回体重を測定する。また、摂餌量および食餌効率を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回求める。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回測定する。更に、試験において飲水行動の変化がみられた場合にも、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

28. げっ歯類を用いた試験では、血液学的検査を全供試動物（各群雄 10 匹、雌 10 匹）について 3、6、12 カ月時および試験終了時（12 カ月より長い場合）に行う。マウスでは、要求されている全ての血液学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない（段落 19 参照）。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、より少数の動物（イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど）から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で血液学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の測定を行う必要はない。検査では麻酔下で指定部位から血液試料を採取する（心臓穿刺または眼窩静脈叢からの採血など）。以下の項目を検査する。

■ 総および型別白血球数、赤血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値 (PCV)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、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。物質の毒性によっては、ハイツ小体その他の赤血球の形態異常やメトヘモグロビンなど、上記以外の血液学的検査項目を測定することが適当な場合もある。また、その化学物質が造血器系に影響を与える場合には、網状赤血球数と骨髓細胞像の検査の必要性も示唆される場合がある。ただし、これらの検査を日常的に行う必要はない。

29. 組織における主な毒性影響、特に腎臓および肝臓に対する影響を調べるため、臨床生化学的検査を全供試動物（各群雄 10 匹、雌 10 匹）から採取した血液について、血液学的検査の項に示したのと同じ間隔で行う。マウスでは、要求されている全ての臨床生化学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、より少数の動物（イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど）から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、同程度の用量で実施した 90 日間試験で臨床生化学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の測定を行う必要はない。採血前には動物（マウスを除く）を一晩絶食させることが推奨される。以下の項目を検査する。

■ 血糖、尿素（尿素窒素）、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、総コレステロール、肝細胞の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸）および肝胆道の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アルカリフォスファターゼ、ガンマグル

タミルトランスフェラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、総ビリルビン、総胆汁酸)。物質の毒性によっては、空腹時トリグリセリド、特定のホルモンおよびコリンエステラーゼなど、上記以外の臨床化学的検査項目を測定することが適当な場合もある。

30. 尿検査を全供試動物（各群雄 10 匹、雌 10 匹）について、血液学および臨床化学的検査と同じ間隔でサンプルを採取して実施する。ただし、同程度の用量で実施した 90 日間試験で尿検査に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の検査を行う必要はない。臨床病理検査に関する専門家の推奨に含まれていた項目は、外観、尿量、浸透圧または比重、pH、総蛋白および糖であるが、その他の項目として、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血などもある。認められた影響について検討を進めるために必要な場合には、更なる項目の検査を行ってもよい。
31. 一般に、イヌの試験では投与前に基準となる血液学および臨床生化学的検査値を測定しておく必要があるが、げっ歯類の試験ではその必要はないと考えられている。しかし、基準となる背景データが不適切な場合には、これらのデータを得ておくことを考慮する。

病理学的検査

剖検

32. 通常、試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。ただし、(中間屠殺またはサテライト群では) 神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行ってもよく、これらの動物については剖検および以下の段落に述べるその後の手順を行う必要はない。また、モニター動物については、試験責任者の判断により、個々の場合に応じて剖検が必要になることがある。
33. 前段落の後半部分で除外された動物を除く全ての動物について、器官重量を測定する。具体的には、全ての動物(瀕死状態で発見された動物および試験途中の屠殺動物を除く)の副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、脾臓、精巣、甲状腺(固定後秤量、上皮小体を含む)および子宮について、必要であれば周囲の組織を取り除き、その湿重量を測定する。重量測定は乾燥を防ぐため、摘出後可能な限り速やかに行う。
34. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する(□内の組織は任意)。

全ての肉眼病変	心臓	脾臓	胃(前胃、腺胃)
副腎	回腸	上皮小体	[歯]
大動脈	空腸	末梢神経	精巣
脳(大脳、小脳および延髄/橋の一部)	腎臓	下垂体	胸腺

を含む)			
盲腸	涙腺 (外涙腺)	前立腺	甲状腺
子宮頸	肝臓	直腸	[舌]
凝固腺	肺	唾液腺	気管
結腸	リンパ節 (表在および深部の両方)	精囊	膀胱
十二指腸	乳腺 (雌は必須、雄は肉眼的に採取可能な場合)	骨格筋	子宮 (頸部を含む)
精巣上体	[上気道 (鼻、鼻甲介および副鼻腔を含む)]	皮膚	[尿管]
眼 (網膜を含む)	食道	脊髄 (3 カ所: 頸部、中胸部および腰部)	[尿道]
[大腿骨および関節]	[嗅球]	脾臓	膣
胆嚢 (ラット以外の種)	卵巣	[胸骨]	骨髄の一部または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方
ハーダー腺			

35. 両側性の器官 (腎臓、副腎など) は両側とも保存する。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

36. 最低限、次の病理組織学的検査を行う。

- 高用量群および対照群の全組織
- 試験中の死亡または屠殺動物の全組織
- 肉眼的異常がみられた全組織
- 標的組織または高用量群で投与に関連する変化が認められた組織があるとき、他の全ての用量群の全ての動物から採取したそれらの組織
- 両側性の器官 (腎臓、副腎など) は、両側とも検査する。

観察 (癌原性部分)

37. 全ての動物について、通常、1 日の始めと終わり (週末および祝日を含む) に、病気の徴候および生死を確認する。加えて、毒性学的に意味のある特異的な徴候の有無を 1

日 1 回確認する。強制経口投与の場合、この確認は投与直後に行う。腫瘍発生には特に注意を払い、肉眼的に認められる腫瘍および触知可能な腫瘍について、それぞれの発生時期、位置、大きさ、外観および進行具合を記録する。

38. 全ての動物について、投与開始時、最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回体重を測定する。また、摂餌量および食餌効率を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回求める。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回測定する。更に、試験において飲水行動の変化がみられた場合にも、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査、臨床生化学的検査およびその他の測定

39. 試験から最大限の情報を得るため（特に作用機序に関する考察のため）、血液学的および臨床生化学的検査用に採血を行ってもよいが、これは試験責任者の判断による。尿検査を行ったほうがよい場合もある。これらの検査項目に関する情報は、試験の慢性毒性部分（通常 12 カ月間）で用いた動物のデータから得ることができる。採血を行う場合には、試験期間終了時の屠殺直前または屠殺手順の一部として実施することとし、麻酔下で指定部位から血液試料を採取する（心臓穿刺または眼窩静脈叢からの採血など）。検査用の血液塗抹標本作製してもよい（特に骨髄が標的器官と考えられる場合）。ただし、癌原性部分における癌原性の評価のための血液塗抹検査の価値には疑問が呈されている。

病理学的検査

剖検

40. モニター動物およびその他のサテライト動物を除き、試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。モニター動物およびその他のサテライト動物については、試験責任者の判断により、個々の場合に応じて剖検が必要になることがある。器官重量は、加齢性の変化に加え、より後期には腫瘍発生によってもデータの有用性が損なわれるため、通常癌原性試験では測定しない。ただし、科学的根拠の重要度（weight of evidence）の評価を行ったり、特に作用機序に関して考察したりするには、これらが非常に重要な場合もある。なお、サテライト試験の一部として測定する場合には、試験開始後 1 年以内に行う。
41. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する（[] 内の組織は任意）。

全ての肉眼病変	心臓	脾臓	胃（前胃、腺胃）
副腎	回腸	上皮小体	[歯]

大動脈	空腸	末梢神経	精巣
脳（大脳、小脳および延髄／橋の一部を含む）	腎臓	下垂体	胸腺
盲腸	涙腺（外涙腺）	前立腺	甲状腺
子宮頸	肝臓	直腸	[舌]
凝固腺	肺	唾液腺	気管
結腸	リンパ節（表在および深部の両方）	精嚢	膀胱
十二指腸	乳腺（雌は必須、雄は肉眼的に採取可能な場合）	骨格筋	子宮（頸部を含む）
精巣上体	[上気道（鼻、鼻甲介および副鼻腔を含む）]	皮膚	[尿管]
眼（網膜を含む）	食道	脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）	[尿道]
[大腿骨および関節]	[嗅球]	脾臓	膈
胆嚢（ラット以外の種）	卵巣	[胸骨]	骨髄の一部または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方
ハーダー腺			

42. 両側性の器官（腎臓、副腎など）は両側とも保存する。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

43. 最低限、次の組織を検査する。

- 高用量群および対照群の全組織
- 試験中の死亡または屠殺動物の全組織
- 腫瘍を含め、肉眼的異常がみられた全組織
- 高用量群で投与に関連する病理組織学的変化が認められた場合には、他の全ての用量群の全ての動物についても同じ組織を検査する。
- 両側性の器官（腎臓、副腎など）は、両側とも検査する。

データおよび報告（癌原性および慢性毒性）

データ

44. 評価した全項目について動物の個体ごとのデータを示す。また、全データを総括表にし、各試験群について、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見されたり、人道的理由により安楽死させた動物数、死亡または安楽死の時期、毒性徴候を示した動物数、認められた毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）、病変を示した動物数、病変の種類、ならびに各病変を示した動物の割合を示す。総括表には、病変の程度に加え、毒性影響または病変がみられた動物の平均と標準偏差（連続データの場合）を示す。
45. 背景データは試験結果の解釈に有用な場合がある（同時対照群から得られたデータが、同じ試験施設／コロニーの対照動物の最近のデータと比較して明らかにはずれている場合など）。背景データを評価に用いる場合には、同じ施設において当該試験以前の 5 年間に得られた同一齢／系統の動物のデータを提出する。
46. 必要に応じて、適切かつ一般的に認められている統計方法を用いて数的結果を評価する。統計方法と解析するデータは試験計画の段階で選択するものとする。選択にあたっては、必要な場合に生存率による補正もできるようにする。

(4) 生殖毒性試験

参照ガイドライン：(OECD TG416) 二世世代生殖毒性試験

試験の概要

1. 被験物質を、段階的な用量で雌雄動物からなるいくつかの群に投与する。P 世代の雄については、精子形成に対するあらゆる有害な影響を引き出すため、成長期間中、少なくとも 1 精子形成サイクル全体（マウスで約 56 日間、ラットで約 70 日間）を含む期間にわたって投与を行う。多くの精子パラメータ（精子の形態、運動性など）および組織切片の詳細な病理組織学的検査により、精子に対する影響を評価する。十分な期間にわたる反復投与試験（90 日間試験など）で精子形成に関するデータが得られている場合には、P 世代の雄について評価を行う必要はない。ただし、後日行う評価が可能となるように、P 世代の精子を標本またはデジタル記録として保存しておくことが推奨される。P 世代の雌については、性周期の正常な発現に対する被験物質のあらゆる有害な影響を検出するため、成長期間中、性周期全体を数回分含む期間にわたって投与を行う。親（P）動物に対しては、交配期間中およびその後の妊娠期間から F1 児の離乳まで被験物質の投与を行う。離乳後は、F1 児に対して成熟までの成長期間中、交配期間中および F2 世代の出生を経て F2 世代の離乳まで被験物質投与を続ける。
2. 全動物について状態観察および病理学的検査を行ない、特に雌雄の生殖器系の健全性および生殖能、ならびに出生児の成長および発達に対する影響に重点を置いて、毒性徴候の有無を調べる。

試験方法—試験の準備

動物種を選択

3. 試験の動物種としては、ラットが望ましい。他の動物種を用いる場合には、その妥当性を明らかにするとともに、試験方法を適宜修正する必要がある。受胎率が低い系統や発生異常の頻度が高いことがわかっている系統は用いない。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の 20 %を超えないこととする。

飼育および給餌条件

4. 動物飼育室の温度は 22 °C ± 3 °C とする。相対湿度は目標値 50 ~ 60 % とし、30 % 以上、70 % を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要がある場合がある。
5. 動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育する。交配にはその目的に合ったケージを用いる。交尾確認後、交配した雌を分娩用ケージに個別に収容する。または少数匹ずつ収容し、分娩 1 ~ 2 日前に個別飼育にしてもよい。分娩が近づいたら、

確かな品質の適切な巢材を与える。

動物の準備

6. 以前に実験に供されたことのない健康な若齢動物を、飼育室環境に 5 日間以上馴化した後に用いる。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重または週齢を明らかにする。兄妹交配を避けるため、同腹関係を知っておく。対照群と投与群への動物の割付けは無作為とする（体重層別法が推奨される）。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。P 世代については、投与開始前に識別番号を割付ける。F1 世代については、交配用に選抜された動物について離乳時に識別番号を付す。また、選抜された全 F1 動物について母動物の記録を保存する。なお、児動物の個体ごとの体重測定や機能検査を予定している場合には、生後可能な限り速やかに個体識別を行うことが推奨される。
7. 親 (P) 動物には、約 5~9 週齢で投与を開始する。現実的に可能な限り、全試験群の動物の体重および週齢を均一にする。

手順

動物数および性

8. 各投与群および対照群には、分娩前後の時点であるべく 20 匹以上の妊娠した雌が得られるように十分な数の動物を含めることとする。ただし、投与によって望ましくない影響（不妊、高用量における過度な毒性など）を生じる物質では、この条件を満たせない場合もあろう。上記の目的は、受胎、妊娠、母動物の行動と授乳、F1 出生児の受胎から性成熟までの成長および発達、ならびにその児動物 (F2) の離乳までの発達に対して被験物質が与える影響について、意味のある評価ができるように十分な妊娠数を得ることである。したがって、要求されている妊娠動物数 (20 匹) が得られない場合でも、その試験が無効になるとは限らず、状況に応じて評価すべきである。

投与の準備

9. 被験物質の経口（混餌、飲水、強制）投与が推奨される。
10. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／乳剤を、その後他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性がわかっていなければならない。また、溶媒中での被験物質の安定性を分析する。

投与量

11. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。被験物質の物理化学的性質や生物学的影響による制限がない限り、最高用量は毒性を生じさせるが死亡や重度の苦痛を引き起こさない用量とする。ただし、予期しない死亡がみられた場合でも、親 (P) 動物の死亡率が約 10%に満たなければ、通常その試験は許容されるであろう。その下の

各用量段階は、投与量と影響との関連性を明らかにし、無毒性量（NOAEL）か、またはベンチマーク用量を決定できるような検出限界に近い用量を得られるように設定する。用量段階の設定には公比 2~4 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きい場合（公比 10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。なお、混餌試験の用量間隔は公比 3 を超えないようにする。用量段階の設定では、その時点で得られているあらゆる毒性データ、特に反復投与試験の結果を考慮する。被験物質やその関連物質の代謝および動態に関する情報も、すべて考慮に入れる。これらの情報は投与法の適切さを示す根拠ともなる。

12. 対照群は無処置群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に扱う。溶媒を用いる場合には、用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で摂餌量の減少や食餌効率の低下がみられる場合には、それに対応した対照群を設けることが必要と考えられる場合がある。同時対照群で給餌量を揃える代わりに、摂餌量の減少が生殖項目に与える影響を評価するように計画した対照試験のデータを用いることもできる。
13. 溶媒その他の添加物については、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や飲水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。

限度試験

14. 本ガイドラインに記載された方法で経口投与試験を行なった結果、1000 mg/kg 体重/day 以上の 1 用量において、あるいは混餌または飲水による投与ではそれに相当する飼料中または飲水中濃度において毒性がみられなかった場合、および構造的または代謝的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、数段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い経口用量の必要性が示唆されない限り、限度試験が適用される。

投与

15. 被験物質を動物に週 7 日投与する。経口（混餌、飲水、強制）投与が望ましい。適切な実験期間を通じ、全動物に同じ方法で投与する。被験物質を強制経口投与する場合には、胃ゾンデを用いる。1 回に投与する液体の量は、体重 100g 当たり 1 mL（コーン油の場合は、体重 100 g 当たり 0.4 mL）を超えないようにする。ただし、水溶液については体重 100 g 当たり 2 mL まで投与してもよい。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。なお、強制経口投与試験では、離乳時に直接投与を開始するまで、児動物は通常乳汁を通じて間接的にしか被験物質を摂取しない。混餌または飲水投与試験では、児動物は哺育期最終週

に自分で食べ始めるとその分被験物質を直接摂取することになる。

16. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要である。被験物質の混餌投与では、飼料中濃度 (ppm) を一定にする方法か、動物の体重当たりの用量を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておかなければならない。被験物質の強制経口投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行ない、少なくとも週 1 回、投与量を調整して体重当たりの用量を一定に保つ。体重に基づいて強制経口投与量を調整する際には、胎盤への分布に関する情報を考慮に入れる。

試験スケジュール

17. 雌雄の親 (P) 動物に対して、5~9 週齢で毎日の投与を開始する。F1 の雌雄に対しては、離乳時に毎日の投与を開始する。ただし、飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合、被験物質に対する F1 児の直接暴露は哺育期間中にすでに始まっているであろう点に留意する。雌雄 (P および F1) とも、交配期間前に少なくとも 10 週間投与を行ない、さらに 2 週間の交配期間中投与を継続する。雄については、生殖に対する影響の評価に不要となった時点で安楽死させ、検査に供する。雌親 (P) 動物については、妊娠期間を通じ、さらに F1 児の離乳まで投与を継続する。得られている毒性データ、代謝誘導、生体内蓄積など、被験物質に関する入手可能な情報に基づいて、投与スケジュールを修正することも考慮する。動物に対する投与量は、通常その個体の最新の体重値に基づいて決定するが、妊娠後期の投与量調整には注意を払う。
18. P および F1 の雌雄については、屠殺時まで投与を継続する。P および F1 の雌雄の親動物は、生殖に対する影響の評価に不要となった時点で安楽死させる。交配用に選抜されなかった F1 児および全 F2 児については、離乳時に安楽死させる。

交配手順

親動物 (P) の交配

19. 各交配では、それぞれの雌を同じ用量群の雄 1 匹と交尾するまで、または 2 週間が経過するまで同居させる (1 対 1 交配)。精子または膣栓の有無について毎日雌を検査し、膣栓または膣垢に精子が認められた日を妊娠 0 日とする。交配が成功しなかった場合には、同じ群の生殖能力が確認されている雄との再交配を考慮してもよい。交配対については、データ中に明確に記載する。兄妹交配は避ける。

F1 動物の交配

20. F1 児の交配では、離乳時に各母動物から少なくとも雌雄各 1 匹の児動物を選び、同じ用量群の異なる母動物から選んだ児動物と交配させて F2 世代を得る。同腹児の体重や外観に顕著な差がない場合には、各母動物から無作為に児動物を選抜する。差がみられた場合には、同腹児中で最も代表的な児動物を選抜する。実際には体重に基づいて選ぶのが最もよいが、外観に基づいた方がよい場合もある。F1 児は完全に性成熟

に達してから交配する。

21. 次世代が得られなかった交配対については、検査を行なって不妊の原因と考えられるものを明らかにする。その手順としては、生殖能力が確認されている雄または雌との追加交配、生殖器の顕微鏡検査、性周期や精子形成の検査などがある。

2 回目の交配

22. 場合によっては（初回の交配で被験物質により出生児数が変化したり、あいまいな影響がみられたりした場合など）、P または F1 の親動物を再交配し、第二産児を得ることが推奨される。また、児動物が得られなかった雌または雄は、生殖能力が確認されている雄または雌と再交配することが推奨される。第二産児を得る必要があると考えられる場合には、いずれの世代も最後の産児の離乳後約 1 週間で動物を再交配する。

同腹児数

23. 動物には通常通り出産させ、出生児を離乳まで育てさせてよい。同腹児数の調整は任意である。調整を行う場合には、使用した方法を詳細に記載する。

観察

状態観察

24. 一般状態の観察を毎日行う。強制経口投与の場合には、投与後、影響が最大になると予想される時間を考慮に入れて観察する。行動の変化、分娩困難や分娩長期化の徴候、およびすべての毒性徴候を記録する。さらに、各動物についてより詳細な検査を少なくとも週 1 回実施するが、これは体重測定時に行うとよい。1 日 2 回（問題がなければ、週末は 1 日 1 回）、すべての動物について病気の有無および生死を確認する。

親動物の体重および摂餌量／摂水量

25. 親動物（P および F1）について、投与開始日およびその後は少なくとも週 1 回体重を測定する。加えて、雌の親動物（P および F1）については、少なくとも妊娠 0、7、14、20 または 21 日と、哺育期間中は児動物の体重測定と同じ日に、さらに屠殺日に体重を測定する。各親動物について、個体ごとに測定結果を報告する。また、交配前期間および妊娠期間中、摂餌量を少なくとも週 1 回測定する。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を少なくとも週 1 回測定する。

性周期

26. P および F1 の雌について交配前に、また交配期間中も交配が確認されるまで（任意）、性周期の長さおよび正常な発現の有無を膣垢塗抹標本で評価する。膣や子宮頸部の細胞を採取する際には、粘膜を刺激して偽妊娠を引き起こすことのないように注意する。

精子パラメータ

27. P および F1 のすべての雄について、屠殺時に精巣および精巣上体の重量を記録し、各器官の片側を病理組織学的検査用に保存する。P および F1 の雄のうち、各群少なくとも 10 匹について、残りの精巣および精巣上体を用い、それぞれ均質化抵抗性精

子細胞数および精巣上部尾部の貯蔵精子数を計測する。また、これと同じ動物から精巣上部尾部または精管の精子を採取し、精子の運動性および形態を評価する。投与による影響が認められた場合や、他の試験で精子形成に対する影響を示唆する結果が得られている場合には、各用量群のすべての雄について精子評価を実施する。それ以外の場合には、P および F1 の雄の対照群および高用量群についてのみ計数を行なえばよい。

28. 均質化抵抗性精子細胞および精巣上部尾部精子の総数を求める。尾部の貯蔵精子数は、定性評価に用いた懸濁液中の精子の濃度および量と、残りの尾部組織を細切または均質化して得た精子数から求める。ビデオまたはデジタル記録するか、標本を凍結して後日分析する場合を除き、全用量群の選抜された雄について屠殺後ただちに計数を行う。後日分析する場合には、対照群および高用量群をまず解析してもよい。投与による影響（精子数、運動性または形態に対する影響など）が認められない場合には、他の用量群を解析する必要はない。高用量群で投与による影響が認められた場合には、より低い用量群についても評価を行う。
29. 精巣上部（または精管）の精子の運動性については、屠殺後ただちに評価するか、またはビデオに録画する。損傷を最小限にするよう精子を取り出し、一般に認められている方法で希釈して運動性を解析する。前進運動精子率を、主観的または客観的に求める。コンピュータで運動解析を行う場合、前進運動はユーザーが設定した進行方向性速度の平均値と直進性または線形指数の閾値によって決まる。剖検時に試料をビデオに録画するか、他の方法で画像を記録する場合、投与による影響が認められない限り、その後の解析は P および F1 の雄の対照群および高用量群についてのみ行なえばよい。投与による影響が認められた場合には、より低い用量群についても評価を行う。ビデオやデジタル画像を記録しない場合には、剖検時に全用量群の全試料について解析する。
30. 精巣上部（または精管）の精子試料について形態評価を行う。精子（1 試料当たり 200 個以上）を固定した湿標本の状態で検査し、正常か異常かに分類する。精子の形態異常の例としては、融合、頭部分離、頭部／尾部の奇形などが挙げられる。評価は全用量群の選抜された雄について屠殺後ただちに行うか、またはビデオやデジタル記録に基づいて後日行う。固定した塗抹標本も、後日の評価が可能である。後日行う場合には、対照群および高用量群をまず解析する。投与による影響（精子の形態に対する影響など）が認められない場合には、他の用量群を解析する必要はない。高用量群で投与による影響が認められた場合には、より低い用量群についても評価を行う。
31. 上記の精子パラメータのうち、全身毒性を評価する 90 日以上の試験ですでに検査されたものがある場合には、二世世代試験でこれを繰り返す必要はない。ただし、必要に応じて後日評価ができるように、P 世代の精子の試料またはデジタル記録を保存しておくことが推奨される。

児動物

32. 出産後（哺育 0 日）可能な限り速やかに母動物ごとの産児数および性、死産児数、生存児数、ならびに肉眼的異常の有無を確認する。0 日に死亡して発見された児動物については、浸軟していない限り、異常の有無および死因を調べ、保存することが望ましい。生存児については匹数を数え、出生時（哺育 0 日）、哺育 1 日およびその後は定期的な体測日（哺育 4、7、14、21 日など）に個体ごとに体重を測定する。母動物および出生児に認められた身体的異常や行動の異常を記録する。
33. 出生児の身体的発達を主に体重増加量により記録する。他の身体的項目（耳介展開、眼瞼開裂、切歯萌出、毛生など）から追加情報が得られることもあるが、これらのデータは性成熟のデータ（膣開口時または陰茎亀頭と包皮の分離時の日齢および体重など）との関連で評価することが望ましい。別の試験で離乳前または離乳後に F1 児の機能検査（運動機能、感覚機能、反射の発達など）を行わない場合には、これらの検査、特に性成熟に関する検査を行うことが推奨される。交配用に選抜された F1 離乳児について、膣開口および包皮分離の日齢を確認する。F1 の性比や性成熟の時期の変化から必要と考えられる場合には、F2 児について生後 0 日に肛門・生殖結節間距離を測定する。
34. 他に明らかな毒性徴候（有意な体重増加抑制など）が認められている群については、機能検査を省略してもよい。機能検査を実施する場合、交配用に選抜された児動物は検査に用いない。

剖検

35. すべての親動物（P および F1）、外表異常や一般状態の異常がみられたすべての児動物、ならびに F1 および F2 の両世代から無作為に選んだ同腹につき少なくとも雌雄各 1 匹の児動物について、屠殺時または試験中の死亡時に形態異常や病理学的変化の有無を肉眼的に検査する。検査では特に生殖器系の器官に注意を払う。瀕死状態で安楽死させた児動物および死亡した児動物（浸軟していないもの）については、異常の有無や死因を調べ、保存する。
36. すべての初産の雌の子宮について、病理組織学的評価を妨げないような方法により着床痕の有無および数を調べる。

器官重量

37. P および F1 の全親動物について、屠殺時に体重および以下の器官重量を測定する（両側性の器官は左右別々に測定する）。
 - 子宮、卵巣
 - 精巣、精巣上体（全体および尾部）
 - 前立腺
 - 精嚢（凝固腺および内容液を含み、全体を一つの器官として）
 - 脳、肝臓、腎臓、脾臓、下垂体、甲状腺、副腎、既知の標的器官

38. 剖検用に選抜された F1 児および F2 児について最終体重を測定し、さらに無作為に選んだ同腹につき雌雄各 1 匹の児動物について脳、脾臓および胸腺重量を測定する。
39. 剖検および器官重量の結果は、可能な限り、他の反復投与試験の観察結果と関連付けて評価する。

病理組織学的検査

親動物

40. 病理組織学的検査のため、親 (P および F1) 動物について以下の器官および組織、またはその代表的な試料を固定し、適切な保存液に保存する。
- 膣、子宮 (頸部を含む)、卵巣 (適切な固定液に保存)
 - 片側の精巣 (ブアン液またはそれと同等の固定液に保存)、片側の精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺
 - P および交配用に選抜された F1 の全動物における、先に確認された標的器官
41. P および交配用に選抜された F1 の対照群および高用量群の全動物について、保存器官・組織の詳細な病理組織学的検査を行う。ただし、P 動物の卵巣の検査は任意である。投与による変化が認められた器官については、NOAEL の判定に資するため、低および中間用量群についても検査を行う。さらに、低および中間用量群で受胎能の低下が疑われる動物 (交尾、受・授胎または健康な出生児の出産がみられなかったもの、また性周期や精子の数、運動性、形態に影響がみられたものなど) の生殖器官についても病理組織学的評価を行う。さらに、すべての肉眼病変 (萎縮や腫瘍など) を検査する。
42. 詳細な精巣の病理組織学的検査 (ブアン固定、パラフィン包埋、厚さ 4~5 μm の横断切片を使用) を行ない、精子細胞の停滞、胚細胞層の消失およびその種類、多核巨細胞、腔内への精子形成細胞の剥脱など、投与による影響を明らかにする(15)。精巣上体全体の検査には頭部、体部および尾部の検査が含まれるが、これは縦断切片を評価することで可能となる。精巣上体については、白血球浸潤、優勢な細胞種の変化、異常細胞種の出現、および精子食作用の有無を評価する。雄の生殖器の検査には PAS・ヘマトキシリン染色を用いてもよい。
43. 授乳期後の卵巣は大きな授乳期の黄体に加え、原始卵胞と発育卵胞を含むはずである。病理組織学的検査では、この原始卵胞の減少を定性的に検出する。また F1 の雌については原始卵胞の定量的な評価を行うが、その際の動物数、卵巣切片の選択および切片数は、用いる評価方法に対して統計学的に適切なものとする。検査では原始卵胞数 (小型の発育卵胞と合わせてもよい) を計測し、投与群と対照群の卵巣を比較する。

離乳児

44. 外部異常や一般状態の異常がみられたすべての児動物、ならびに F1 および F2 両世代の交配用に選抜されなかった動物から無作為に選んだ同腹につき少なくとも雌雄各

1 匹について、肉眼的に異常な組織および標的器官を固定し、適切な保存液に保存して病理組織学的検査を行う。保存した組織について、特に生殖器系の器官に重点を置いて詳細な病理組織学的検査を行う。

データおよび報告

データ

45. 各試験群および各世代について、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽死させた動物数、死亡または安楽死の時期、受胎動物数、妊娠動物数、毒性徴候を示した動物数、認められた毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）、病理組織学的変化の種類、ならびに同腹ごとのすべての関連データを、個体ごとおよび総括表として示す。
46. 一般に認められた適切な統計方法により、数値データを評価する。統計方法は試験計画で定めておく。データの解析には、用量・反応の統計モデルが有用な場合がある。第三者の審査官や統計学者が解析を再評価・再構成できるように、報告書には解析方法および用いたコンピュータプログラムに関する十分な情報を含める。

結果の評価

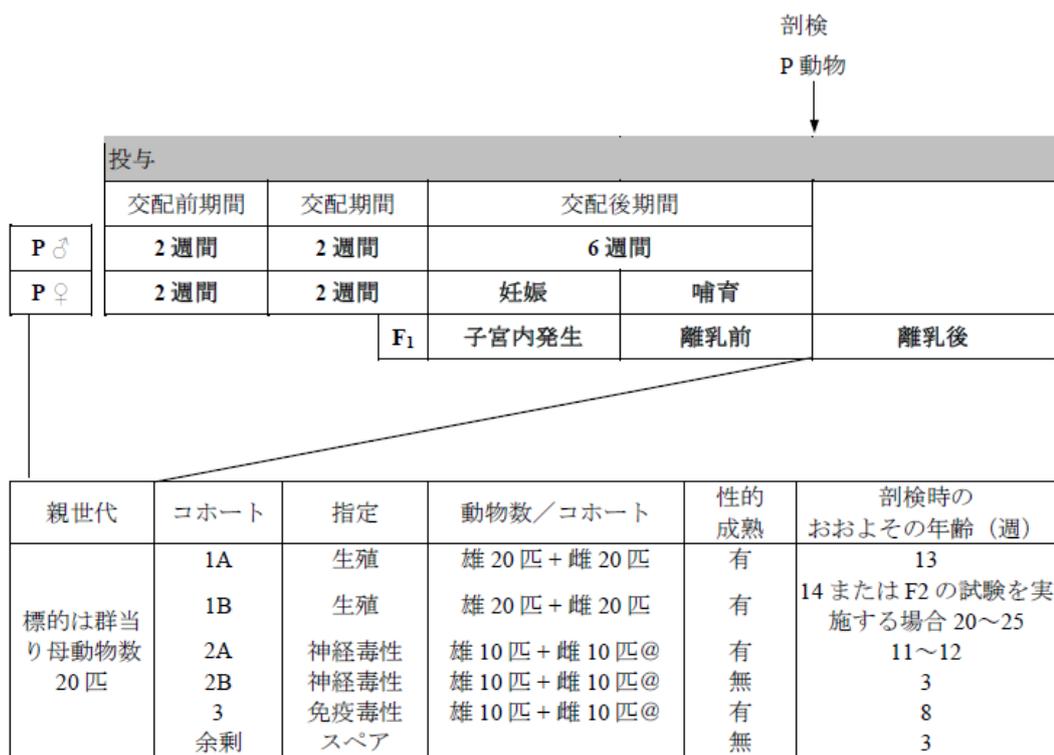
47. 二世世代生殖毒性試験の結果は、剖検および病理組織学的所見を含むあらゆる認められた影響に基づいて評価する。評価では、被験物質の用量と異常（肉眼病変、判明した標的器官、受胎率の変化、一般状態の異常、生殖能および同腹ごとの成績の変化、体重変化、死亡率に対する影響その他の毒性など）の有無、頻度、程度との関連性もしくはその欠如などを明らかにする。試験結果を評価する際には、被験物質の物理化学的性質および可能ならばトキシコキネティクスデータを考慮に入れる。
48. 適切に実施された生殖毒性試験により、無作用量の十分な推定と、生殖、分娩、哺育、出生後の成長および発達、ならびに性的な発達に対する有害な影響の理解が可能となるはずである。

最初に考慮すべき事項および目的

1. 拡張一代生殖毒性試験の主な目的は、他の種類の毒性試験で取り上げられていない特定のライフステージを評価すること、および出生前および出生後の化学物質曝露の結果として生ずる可能性のある影響を検査することである。生殖の評価指標については、最初の段階でおよび入手可能となったときに、反復投与試験（スクリーニング生殖毒性試験などを含む）、または短期内分泌かく乱物質スクリーニング試験（子宮肥大試験およびハッシュバーガー試験（雄の生殖器肥大試験）など）からの情報を使用して、雌雄の生殖器に対する影響を検出することを想定している。これには、雄については精子形成（精巣の病理組織）、雌については性周期、卵胞数／卵母細胞成熟および卵巣健全性（病理組織）が含まれる場合がある。したがって、拡張一代生殖毒性試験は、雄と雌、雌と受胎産物、雌と出生児および性成熟までの F1 世代という、それぞれの相互作用が必然的に関わるような生殖影響評価指標についての試験として役立つ。
2. 本 TG は、化学物質による出生前後の発生への影響を評価し、また妊娠中および哺育中の雌ならびに若齢および成熟した出生児の全身毒性を徹底して評価するようにデザインされている。出生児生存率、新生児の健康、出生時の発生状態、ならびに成熟期までの身体および機能の発達といった主要な発生の評価指標の詳細な調査によって、出生児の具体的な標的器官を特定することを期待している。さらに、本試験は、成熟した雌雄の生殖器系の健全性および生殖能に対する被験物質の影響に関する情報の提供や確認を行う。具体的には、限定されるものではないが、次のパラメータを考慮する。すなわち、生殖腺の機能、性周期、精巣上体内の精子成熟、交尾行動、受胎、妊娠、分娩、および哺育である。さらには、発達神経毒性評価および発達免疫毒性評価から得られる情報が、これらの系における潜在的な影響を明らかにする。これらの試験から得られるデータは、さまざまな影響評価指標についての最大無毒性量 (NOAEL)、最少毒性量 (LOAEL)、ベンチマークドースの決定を可能にし、また先に行われた反復投与試験において検出された影響を総合的に判断するために使用され、さらに後の試験へのガイドとしての役割を果たす。
3. プロトコールの計画図を図 1 に示す。被験物質を段階的な用量で、性的に成熟した雌雄動物からなるいくつかの群に継続的に投与する。この親 (P) 世代に、規定の交配前期間（被験物質に関する入手可能な情報に基づいて選定するが、最低 2 週間）、および 2 週間の交配期間の間投与する。P の雄には、少なくとも F1 の離乳までさらに投与する。P の雄には最低 10 週間投与する。生殖に対する影響を明確にする必要がある場合は、より長期間投与する。P の雌への投与は、妊娠および哺育の間継続し、同腹の胎児の離乳の後の実験終了まで続ける（すなわち、8～10 週間の投与）。F1 出生

児には、離乳から成熟まで被験物質をさらに投与する。第二世代を評価する場合、F2 の離乳まで、または試験の終了まで F1 出生児の投与を維持する。

図 1：拡張一代生殖毒性試験の計画



@母動物当たり 1 匹で、可能な場合は母動物 20 匹の同腹胎児の代表

- 全動物について一般状態観察および病理検査を行い、特に雌雄の生殖系の健全性および生殖能、ならびに出生児の健康、成長、発達および機能に重点をおいて、毒性徴候の有無を調べる。離乳時に、選抜した出生児を特定のサブグループ（コホート 1~3、図 1 を参照）に割付け、性的成熟、生殖器の健全性および生殖能、神経学的および行動的影響、ならびに免疫機能についてさらなる検討を行う。

試験方法/試験準備の説明

動物

動物種と系統の選択

- 生殖毒性試験のための動物種の選択は、入手可能なすべての情報を考慮して慎重に検討する。ただし、背景データの程度および一般毒性試験に対する互換性から、通常はラットが望ましい動物種であり、本 TG の基準および推奨事項は、この動物種を参照

している。別の動物種を用いる場合には、妥当性を説明するとともに、プロトコールを適宜修正する必要がある。受胎率が低い系統や自然発生異常頻度が高いことがわかっている系統は用いない。

年齢、体重および組入れ基準

6. 他の試験で用いられていない健康な親動物を用いる。雌雄ともに試験を行い、雌は未経産で、非妊娠とする。P 動物は性的に成熟し、投与開始時において（性別内で）体重が同様、交配時において日齢が同様（約 90 日）で、試験で用いる代表的動物種および系統とする。動物は入荷後 5 日以上馴化する。動物は、群間で同等の平均体重値（すなわち平均の±20%）になる様な方法で、無作為に対照群と投与群に割付ける。

飼育および給餌条件

7. 試験動物飼育室の温度は 22°C（±3°C）とする。相対湿度は 30～70%とし、理想的な範囲は 50～60%とする。人工照明は 12 時間明期、12 時間暗期に設定する。飼料は通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。飼料の中の高レベルの植物エストロゲンがいくつかの生殖評価指標に影響する可能性があるため、飼料から摂取する植物エストロゲン量に細心の注意を払う。エストロゲン性物質が低減された標準的な調製成分が公表されている飼料を推奨する。被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要がある。飼料の中の被験物質の含量、均一性および安定性を確認する。給餌および飲水は、定期的に汚染物質の分析を行う。結果によって飼料成分のさらなる分析が必要となる場合に備えて、試験中に使用した飼料の各バッチのサンプルは、報告書の完了まで適切な条件（-20° C で凍結するなど）で保管する。
8. 動物は同じ性別および投与群の動物を少数匹ずつ飼育する。けがの可能性を避けるため個別飼育する（交配期間後の雄など）。交配手順は適切なケージで行う。交配がみられた後、妊娠したと推定される雌は、分娩ケージまたは妊娠ケージの中で別に飼育し、規定の適切な巣材を与える。同腹児は離乳までそれぞれの母動物といっしょに飼育する。F1 動物は離乳から終了まで、同じ性別および投与群の少数匹で飼育する。科学的に妥当性を説明できる場合には、動物を個別に飼育することができる。選択した床敷材に含まれる植物エストロゲンのレベルは最小限にする。

動物数および識別

9. 通常、各投与群および対照群には、各用量群最低 20 匹の妊娠した雌を得られるように十分な数の交配対を含める。上記の目的は、P 世代の受胎、妊娠および母性行動ならびに F1 出生児の受胎から成熟までの成長および発達に対して被験物質が影響する可能性について、意味のある評価ができるように十分な妊娠数を得ることである。要求されている妊娠動物数を得ることができない場合でも、その試験が無効になるとは限

らず、被験物質に対して可能性のある因果関係を考慮しながら、状況に応じて評価を行う。

10. 投与開始前に、各 P 動物には固有の識別番号を割付ける。飼育室の履歴データが、かなりの割合の雌が規則的な性周期（4 日または 5 日）を示していないとされる場合には、投与開始前の性周期の評価が推奨される。投与開始時に各試験群で 20 匹以上の雌が規則的な性周期（4 日または 5 日）をもつことを確実にするため、試験群の規模を増加させる方法もある。生後（PND）0 日目または 1 日目に新生児を最初に検査するときに、F1 出生児はすべて個体識別をする。すべての F1 動物について、また適用可能であれば F2 動物についても、母動物を示す記録を試験の期間中をとおして保管する。

被験物質

被験物質に関して入手可能な情報

11. 既存情報の見直しは、投与経路、溶媒の選択、動物種の選択、投与量の選択および投与スケジュールの修正の可能性についての意思決定のために重要である。そのため、拡張一代生殖毒性試験の計画の際には、被験物質に関して入手可能なすべての関連情報、すなわち物理化学的特性、トキシコキネティクス（種特異的代謝を含む）、トキシコダイナミクス特性、構造-活性相関（SAR）、*in vitro* 代謝プロセス、先に行われた毒性試験の結果、および構造的な類似物質についての関連情報を考慮しなければならない。毒性試験の結果は、例えば NOAEL、代謝または代謝誘導に関する付加的な情報をもたらすが、吸収・分布・代謝・排泄（ADME）および生物蓄積性に関する予備情報は、化学構造、物理化学データ、血漿蛋白質結合の程度またはトキシコキネティクス（TK）から得られる場合がある。

トキシコキネティクスデータへの考慮

12. 要求はされるものではないが、以前に実施された用量設定試験またはその他の試験からの TK データは、試験計画の策定、用量レベルの選択および結果の解釈において極めて有用である。特に有用なのは、1) 発生中の胎児および児動物の被験物質（または関連する代謝物）への曝露を検証するデータ、2) 体内用量の推定を提示するデータ、および 3) 体内動態過程における用量依存的な飽和の可能性を評価するデータである。入手可能な場合は、付加的な TK データ、例えば代謝物プロファイル、濃度経時変化なども考慮する。主試験の評価指標の採取および解釈を妨げないならば、主試験中に補足的な TK データを採取してもよい。
13. 一般的なガイドとして、次の TK データセットが拡張一代生殖毒性試験の計画の際に有用であろう。
 - 妊娠後期（妊娠 20 日など） - 母体血および胎児血
 - 哺育中期（PND 10） - 母体血、児動物血や乳汁

■ 離乳後初期（PND 28 など） - 離乳直後の児動物の血液サンプル

14. 具体的な分析対象物（未変化体や代謝物など）およびサンプリング計画の決定には柔軟性を持たせる必要がある。例えば、規定のサンプリング日におけるサンプル採取の数量およびタイミングは、投与経路および非妊娠動物における TK の特性についての予備知識に依存する。混餌試験については、それぞれの日の一貫した 1 つの時間にサンプリングすることで十であるが、強制経口投与では、体内用量の範囲のより良好な推定値を得るため、サンプリング時点の追加が必要となる場合がある。ただし、全てのサンプリング日において、完全な濃度の経時変化データをとる必要はない。必要な場合には、胎児および新生児の分析のために同腹児内で性別ごとに血液をプールする。

投与経路

15. 経路の選択は、ヒトでの投与に最も関わりのある経路を考慮する必要がある。プロトコールは飼料をとおしての被験物質の投与用にデザインされているが、被験物質の特性および必要とする情報に応じて、他の経路（飲水、強制経口、吸入、経皮）による投与用に修正する。

溶媒の選択

16. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。可能であれば、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を考慮する。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性がわかっているなければならない。固有の毒性の可能性のある溶媒の使用は避ける（アセトン、DMSO など）。溶媒中での被験物質の安定性を分析する。投与を促すために溶媒またはその他の添加物を用いる場合には、次の特性を考慮しなければならない。すなわち、被験物質の吸収・分布・代謝・滞留に対する影響、毒性を変化させる可能性のある被験物質の化学的特性に対する影響、および動物の摂餌量／摂水量または栄養状態に対する影響である。

用量の選択

17. 通常、試験には少なくとも 3 段階の用量群と 1 つの同時対照群が含まなければならない。適切な用量を選択する際、試験担当者は先行試験における投与量に関する情報、妊娠または非妊娠動物からの TK データ、乳汁移行の程度、およびヒトでの曝露の推定評価を含めて、入手可能なすべての情報を考慮しなければならない。TK 過程の用量依存的な飽和を示す TK データが入手可能な場合には、明らかに飽和を呈する高用量を避けるようにするが、これは、当然ヒトでの曝露が飽和となるよりも十分低いと推定される場合に限る。そのような場合には、最高用量は、TK の挙動が非線形に移行する変曲点か、またはそのやや上とする。
18. 関連する TK データがない場合、被験物質の物理的／化学的性質によって制限されない限り、用量は毒性に基づいて設定しなければならない。用量を毒性に基づいて設定する場合、最高用量はなんらかの全身毒性を生じさせるが、動物の死亡や重度の苦痛を引き起こさない用量とする。

19. その下の各用量段階は最も感度の高い影響評価指標に関して、投与による影響を示し NOAEL を得ることができるような用量を、あるいはベンチマークドースを求めることができるような検出限界に近い用量を設定する。NOAEL と LOAEL との間の用量設定間隔が広くなることを避けるため、公比を 2~4 とした用量段階の設定が通常最適である。非常に大きな用量間隔（公比 10 を超えるような）を使用するよりは、4 群目を追加した方がよいことが多い。
20. 対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。被験物質の投与に溶媒を用いる場合には、この群は無処置もしくは模擬処理または溶媒対照群でなければならない。溶媒を用いる場合には、用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。

限度試験

21. 反復投与試験において 1000 mg/kg 体重/日以上 of 1 用量で毒性がみられない場合、または *in vivo/in vitro* 代謝特性において類似性を示しており構造や代謝から関連する類似化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、数段階の用量を用いた試験は不要と考えられる。そのような場合には、1 つの対照群および 1000 mg/kg 体重/日以上 of 1 用量を用いて拡張一世代生殖毒性試験を実施する。ただし、この限界量において生殖または発生毒性がみられる場合には、NOAEL を確認するため、より少ない用量でのさらなる試験が必要である。この限度試験の検討は、ヒトの曝露量からより高用量の必要性が示唆されない場合にのみ適用される。

手順

出生児の曝露

22. 飼料による曝露は望ましい投与方法である。強制経口投与試験を実施する場合には、離乳時に直接投与を開始するまで、児動物は通常乳汁をとおして間接的にしか被験物質を摂取しないということに留意する。混餌または飲水投与試験では、児動物は哺育期最終週に自分で食べ始めると、その分被験物質を直接摂取することになる。乳汁中への被験物質の排出が乏しく出生児の継続的な曝露を示す証拠がみられない場合には試験計画に対する修正を検討する。
23. そのような場合には、入手可能な TK 情報、出生児における毒性またはバイオマーカーの変化に基づき哺育期間中の児動物への直接投与を検討する(3)(4)。哺乳中の児動物に対する直接投与を実施する場合には、その利点と難点を事前に注意深く検討する(5)。

投与計画および投与

24. 性周期、雌雄生殖管の病理組織学的検査、および精巣/精巣上体精子の分析に関するいくつかの情報が、適切な期間の反復投与による先行毒性試験から得られる場合がある。したがって、拡張一世代生殖毒性試験における交配前投与の期間は、交配行動および受精を妨げる機能変化に対する影響の検出を目的としている。交配前投与の期間

は、P の雌雄において定常状態の曝露条件を達成するために十分長いものとする。ほとんどの場合、両性に対して 2 週間の交配前投与で十分と考えられる。雌に対しては、3~4 回の完全な性周期を含んでおり、周期に対する有害な影響を検出するのに十分である。雄に対しては、成熟精子の精巣上体通過に必要な時間に相当し、交配時における精子に対する精巣以降での影響（排精の最終段階および精巣上体精子成熟の間）の検出を可能にする。終了時に精巣および精巣上体の病理組織および精子パラメータの分析が予定されている時点では、P および F1 の雄は少なくとも 1 回の完全な精子形成過程の間曝露していることになるおよび GD151。

25. 雄に対する交配前投与のシナリオは、精巣毒性（精子形成障害）または精子の健全性および機能に対する影響が先行試験で明確に確認されている場合、適用可能性である。同様に、雌については、性周期に対する被験物質の既知の影響とそれによる性的受容性により、異なる交配前投与シナリオが妥当性とされる場合がある。特殊な場合には、P の雌への投与を膣塗抹標本で精子が検出されてから開始してもよい（GD151 を参照）。
26. 交配前投与期間を決定したら、剖検まで被験物質を動物に週 7 日間継続して投与する。すべての動物に同じ方法で投与する。投与は 2 週間の交配期間継続し、P の雌に対しては妊娠期間および哺育期間をとおして離乳後の試験終了まで継続する。雄には F1 動物が離乳する時点で試験が終了するまで同じように投与する。剖検については、哺育と同日／類似日に剖検する雌を優先する。雄の剖検は実験施設の能力に応じて広範囲な日にちに及んでもよい。哺育期間にすでに開始されていない場合は、コホート割付けに応じて、選抜した F1 の雌雄に対する直接投与は離乳時に開始し、剖検予定まで継続する。
27. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要である。被験物質の混餌投与では、飼料中濃度（ppm）を一定にする方法か、動物の体重当たりの用量を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておく。
28. 被験物質の強制経口投与では、1 回に投与する液体の量は、通常は体重 100g 当たり 1 mL（コーン油など、油の場合は体重 100 g 当たり 0.4 mL が最大）を超えないようにする。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、すべての用量で投与容量が一定になるようにする。毎日ほぼ同じ時間に投与を行う。動物に対する投与量は、通常その個体の最新の体重値に基づいて決定し、成熟した雌および成熟した非妊娠の雄については少なくとも週 1 回投与量を調節し、離乳前および離乳後 2 週間の間に投与する場合、妊娠している雌および F1 動物については 2 日に 1 回投与量を調節する。TK データが被験物質の胎盤移行が少ないことを示している場合には、母動物への過剰な毒性量の投与を避けるため妊娠最終週の強制経口投与を調節しなければならない場

合がある。雌については強制経口投与またはその他動物を取扱い操作する必要があるような投与経路での投与を、分娩の日には行わず、出産過程を乱すよりはむしろその日の被験物質の投与は省略する方がよい。

交配

29. それぞれの P の雌を同じ用量群から無作為に抽出された血縁関係のない雄 1 匹と、交配がみられるまで、または 2 週間が経過するまで同居させる (1 対 1 ペアリング)。例えばペアリング前の雄の死亡などによって雄が十分にいない場合には、すべての雌がペアリングされるように、既に交配した雄を 2 匹目の雌とペアリング (1 対 1) してもよい。交配の証拠 (膣栓または膣垢に精子) が認められた日を妊娠 0 日とする。交配の証拠がみられた動物はできるだけ早く別々に飼育する。2 週間後に交配がなかった場合は、その動物はさらなる交配の機会を与えることなく別々に飼育する。交配对についてはデータ中に明確に記載する。

同腹児数

30. 同腹当たり雄 5 匹と雌 5 匹に可能な限り近い数にするため、生後 4 日目に無作為抽出により余分な児動物を取除いてそれぞれの同腹児の数を調節してもよい。児動物を体重などにより選択的に取除くことは不適切である。雄または雌の児動物の数によって、同腹当たり各性 5 匹ずつ得られない場合はいつでも、部分的な調節 (例えば、雄 6 匹と雌 4 匹) が許容される。

離乳後試験用の児動物の選抜 (図 1 を参照)

31. 離乳時 (PND 21 前後) に、利用可能なすべての児動物から用量群および対照群当たり最大 20 匹の児動物をさらなる検査のために選抜し、性的成熟まで維持する (早期の試験が要求されない限り)。明らかな矮小 (体重が、それぞれの同腹の平均児動物体重よりも 2 標準偏差以上少ない動物) は投与群の代表とは考えにくいため含めないということ以外、児動物は無作為に抽出する。

32. PND 21 に、選抜した F1 児動物を 3 つの動物コホートの 1 つに無作為に割付ける。

■ コホート 1 (1A および 1B) : 生殖/発生毒性試験

■ コホート 2 (2A および 2B) : 発達神経毒性試験

■ コホート 3 : 発達免疫毒性試験

コホート 1A : 雄 1 匹と雌 1 匹/同腹/群 (20/性/群) : 生殖系に対する影響および一般毒性作用の一次評価のための優先度決定。

コホート 1B : 雄 1 匹と雌 1 匹/同腹/群 (20/性/群) : F1 動物の交配による生殖能の経過観察評価 (評価する場合) のため (GD117 を参照)、および生殖毒性物質もしくは内分泌毒性物質の疑いがある場合またはコホート 1A の結果があいまいな場合に追加の病理組織学的データを得るための優先度決定。

コホート 2A:成獣としての神経行動学的試験に続いて神経組織学的評価用に割付けた群当たり合計 20 児動物 (群当たり雄 10 匹と雌 10 匹で、同腹当たり雄 1 匹または雌 1 匹)。

コホート 2B:離乳時 (PND 21 または PND 22) の神経組織学的評価用に割付けた群当たり合計 20 児動物 (群当たり雄 10 匹と雌 10 匹で、同腹当たり雄 1 匹または雌 1 匹)。動物数が不十分な場合には、コホート 2A を優先して動物を割付ける。

コホート 3:群当たり合計 20 児動物 (群当たり雄 10 匹と雌 10 匹で、可能ならば同腹当たり 1 匹)。PND 56±3 時点での T 細胞依存性抗体産生検査において陽性対照動物の役割を果たすため、対照群から追加の児動物が必要な場合がある。

33. すべてのコホートに供給するのに 1 つの同腹中の児動物数が不十分な場合には、コホート 1 が優先する。それは拡張して F2 世代を獲得することができるからである。化学物質が神経毒物、免疫毒物または生殖毒物であると疑われる場合など、特別な懸念がある場合は、追加の児動物をどのコホートに割付けてもよい。これらの児動物は別の時点での検査に用いるか、または補足の評価指標の評価のために用いてもよい。コホートに割付けられなかった児動物は血液生化学検査および剖検に提出されることになる。

P 動物の 2 回目の交配

34. P 動物について 2 回目の交配は、最初の同腹児についての着床痕の数に関する重要な情報 (その結果、催奇形性の可能性を示す指標である着床後胚損失および出生前損失のデータ) を犠牲にして成り立つため、通常は推奨されない。曝露した雌における影響を検証または解明する要求は、F1 世代の交配を含めるまで試験を拡張することによってより良好に果たされるだろう。ただし、P 動物の曝露されていない雌との 2 回目の交配は、あいまいな結果を明確にするため、または最初の交配でみられた受胎率に対する影響についてのさらなる検査のために常に任意である。

生存中の観察

一般状態観察

35. P および選抜した F1 動物について、一般状態の観察を 1 日 1 回行う。強制経口投与の場合には、(最高血漿中濃度に関係した毒性徴候があるかもしれないため) 投与の前後に観察を行う。関連のある行動の変化、分娩困難または分娩長期化の徴候、およびすべての毒性徴候を記録する。1 日 2 回、週末は 1 日 1 回、すべての動物について強い毒性、病気の有無および生死を確認する。
36. さらに、すべての P および F1 動物についてより詳細な検査を週 1 回実施するが、これは体重測定時に行うとよい。こうすることによって、取扱い操作によるストレスを最小限にする。観察は実験室によって定義されたスコアリングシステムを用いて注意深く実施し記録する。試験を実施する状況の変動が最小限になるよう努力する。み

られる徴候には、これらに限らないが、皮膚、被毛、眼・眼球、および粘膜の変化、分泌・排泄、自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）が含まれる。歩行、姿勢、取扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同運動（過度の身づくろい、旋回など）、または異常行動（自咬、後ずさりなど）についても記録する。

体重および摂餌量／摂水量

37. P 動物について投与開始日およびその後は少なくとも週 1 回体重を測定する。さらに、P の雌については、哺育期間中はそれぞれの同腹児動物の体重測定と同じ日に体重を測定する。すべての F1 動物について、離乳時（PND 21）およびその後は少なくとも週 1 回体重を測定する。性成熟に達した（包皮との分離または陰開口の完了）日にも体重を測定する。すべての動物について屠殺時に体重を測定する。
38. 試験中は、少なくとも週 1 回、動物の体重測定と同じ日に摂餌量／摂水量（被験物質を飲水投与する場合）を記録する（同居期間中を除く）。F1 動物の各ケージの摂餌量は各コホートへの選抜からはじめて毎週記録する。

性周期

39. 被験物質に関連する性周期への影響に関する予備情報が、反復投与毒性の先行試験から既に得られている場合があり、それらの情報を、当該被験物質に特化させた拡張一世代生殖毒性試験のプロトコルをデザインするために用いてもよい。通常、性周期の評価（陰細胞診による）は投与期間の開始時に開始し、交配の確認または 2 週間の交配期間の終わりまで継続する。投与前に雌に対して正常性周期のスクリーニング検査が実施されている場合、投与開始時に陰塗抹検査が継続することは有用であるが、投与開始時に非特異な影響に関する懸念がある場合（例えば初期の摂餌量の顕著な減少）には、交配に先立つ 2 週間の陰塗抹検査の開始前に、投与に順応させるため動物に最大 2 週間の余裕を与えてもよい。このように雌の投与期間を拡張した（すなわち 4 週間の交配前期間にまで）場合には、交配前の雄の投与期間を拡張するため、より若い動物の購入を考慮する必要がある。陰／子宮頸部の細胞を採取する際には、粘膜を刺激して偽妊娠を引き起こすことのないように注意する。
40. コホート 1A のすべての F1 の雌について、陰開口発生以後、最初の角化塗抹が記録されるまでの間、この 2 つの事象の間の時間間隔を確認するため陰垢塗抹を毎日検査する。コホート 1A のすべての F1 の雌についての性周期も、PND 75 前後から開始して 2 週間モニターする。さらに、F1 世代の交配が必要な場合には、ペアリングのときから交配の証拠が検出されるまで、コホート 1B の陰細胞診を追跡する。

交配および妊娠

41. 標準的な評価指標（体重、摂餌量、生死／病気の有無のチェックを含む一般状態観察）に加えて、ペアリングの日、受精日、および分娩日を記録し、交配前の間隔（ペアリングから受精まで）および妊娠期間（受精から分娩まで）を計数する。P の雌につい

ては、分娩が見込まれる時点で、異常分娩の徴候がないか慎重に検査する。巣作り行動または哺乳行動におけるすべての異常を記録する。

42. 分娩があった日を母動物にとっての哺育 0 日 (LD 0)、および出生児にとっての生後 0 日 (PND0) とする。別の方法として、妊娠期間の違いによる出生後の発達に関するデータの交絡を排除するため、すべての比較を交配後の時間に基づいて行ってもよいもよい。ただし、分娩に関連する時期も記録する。これは、被験物質が妊娠期間に対して影響を与える場合に特に重要である。

出生児のパラメータ

43. 分娩後 (PND 0 または 1) 可能な限り速やかに母動物ごとの産児数および性、死産児数、生存児数、ならびに肉眼的異常 (口蓋裂、皮下出血、異常な皮膚の色またはきめ、臍帯の存在、胃内乳汁の不足、乾燥した分泌物の存在を含む外見からわかる異常) の有無を確認する。さらに、新生児の最初の臨床検査には体温、活動状態、および取扱い操作への反応の質的評価が含まれる。PND 0 または後日死亡して発見された児動物については、異常の有無および死因を調べる。生存児については匹数を数え、PND 0 または PND 1、およびその後は少なくとも PND 4、7、14、および 21 など定期的に個体ごとに体重を測定する。出生児の体重を測定するとき、または出生時に当該児固有の所見があった場合にはより頻繁に、動物の週齢に対して規定どおり臨床検査を繰り返す。みられる徴候には、これらには限らない可能性があるが、外表異常、皮膚、被毛、眼・眼球および粘膜の変化、分泌・排泄ならびに自律神経系機能があげられる。歩行、姿勢、取扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同運動、異常行動についても記録する。
44. PND 0 から PND 4 の間に少なくとも 1 回はそれぞれの児動物の肛門・生殖結節間距離 (AGD) を測定する。AGD を測定した日に児動物の体重を収集し、AGD を児動物の大きさの測定値、望ましくは体重の立方根で正規化する。PND 12 または 13 に、雄の児動物に乳頭/乳輪があるか確認する。
45. 選抜されたすべての F1 動物について、性的成熟が早期に起こっていないか検出するために、これらの評価指標の達成が見込まれる日より前から陰茎亀頭と包皮の分離または膣開口を雄雌それぞれについて毎日確認する。膣の糸状構造の持続、尿道下裂、または陰茎裂といった生殖器の異常に留意する。雌雄それぞれについて陰茎亀頭と包皮の分離または膣開口時の年齢および体重を確認して、F1 動物の性的成熟を身体的発達と比較する。

発達神経毒性の可能性の評価 (コホート 2A および 2B)

46. 各投与群から、雄 10 匹と雌 10 匹のコホート 2A の動物および雄 10 匹と雌 10 匹のコホート 2B の動物 (各コホートにつき : 1 腹当たり雄 1 匹または雌 1 匹、すべての腹から代表の児動物を最低 1 匹、無作為抽出) を神経毒性評価に用いる。コホート 2A の動物について聴覚性驚愕反応、機能観察試験バッテリー、運動量、および神

経病理学的評価を行う。すべての試験条件の変動が最小限になり、体系的に投与処理に関連しないよう努力する。変数の中で行動に影響を与える可能性のあるものは、雑音レベル（断続音など）、温度、湿度、照明、匂い、時刻、および注意をそらすような環境要因である。神経毒性評価の結果は、適切な参照すべきヒストリカルコントロール（背景対照）の範囲との関連で解釈する。コホート 2B の動物は PND 21 または PND 22 に神経病理学的評価に用いる。

47. コホート 2A の動物を用いて PND 24（±1 日）に聴覚性驚愕反応試験を行う。試験日は投与群および対照群にわたって均一に割付ける。一回の測定セッションは 50 回の試行からなる。聴覚性驚愕反応試験を行う際には、測定セッション内で馴化を生じさせるように試験条件を最適化して、各ブロック 10 試行（10 試行のブロックを 5 回）における平均反応強度を測定する。この手順は OECD TG426 に合致するものとする。
48. PND 63 と PND 75 の間の適切な時点で、コホート 2A の動物について機能観察試験バッテリーおよび運動量の自動化測定試験を行う。機能観察試験バッテリーは動物の外観、行動、および機能的健全性の詳細な記述を含むものとする。これは、ホームケージ内での観察、自由に動ける標準的観察台（オープンフィールド）へ取り出した後の観察、および操作試験（被験動物に操作を加え反応をみる試験）における観察をとおして評価する。試験はインタラクティブ性の最も低いものから最も高いものへと進める。補遺 A に項目のリストを示す。すべての動物について観察者によるばらつきを最小限にするような標準化された手順を用いて、訓練された観察者が盲検で観察を行う。可能であれば、任意の 1 つの試験において同じ観察者が動物の評価を行うことを推奨する。それが不可能な場合には、異なる観察者間でも同じ結果が得られることが示されていることが必要である。行動試験バッテリーの各パラメータについては、操作的に定義された明確な尺度およびスコアリング基準を用いる。可能であれば、主観的なランキングを含む観察項目のためにも客観的な定量的基準を作成する。運動量については、各動物を個別に測定する。1 回の測定時間は対象動物が馴れを示すのに十分な長さとする。運動量の測定は、活動性の増加および減少の双方を検出できるような運動量自動記録装置を用いて行なう（すなわち、その装置によって測定されたベースラインの運動量は、減少を検出できないほど低くはならず、増加を検出できないほど高くてもいけない）。各装置については、装置間および測定日間で可能な限り一定の動作が得られるように、標準的な方法を用いて確認する。それぞれの群は各装置に対して可能な限り均一に割付ける。活動性の概日リズムが交略することを避けるため、各群の測定時刻には偏りがないようにする。
49. 既存の情報がその他の機能試験（感覚、性成熟、認知など）の必要性を示唆している場合には、試験で実施される他の評価の完全性を損なわずに組入れる。この試験を標準の聴覚性驚愕反応試験、機能観察試験バッテリーおよび運動量試験に用いたものと同じ動物で実施する場合には、異なる試験はこれらの試験の完全性を損なうリスクを

最小限にするようにスケジュールする。経験的な観察結果や予想される影響、またはメカニズム／作用様式から特殊な型の神経毒性が示唆される場合には、補手的手法は特に有用な場合がある。

発達免疫毒性の可能性の評価（コホート 3）

50. 各投与群から、雄 10 匹と雌 10 匹のコホート 3 の動物（1 腹当たり雄 1 匹または雌 1 匹、すべての腹から代表の児動物を最低 1 匹、無作為抽出）を、現行の免疫毒性試験手順と整合性を取りながら、T 細胞依存性抗体産生検査、すなわちヒツジの赤血球（SRBC）またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）といった T 細胞依存性抗原に対する 1 次 IgM 抗体産生の検査に用いる。反応は、反応のピークにおいて、脾臓にある特定のプラーク形成細胞（PFC）を計数することによって、または ELISA 法によって血清中にある SRBC 特異的もしくは KLH 特異的 IgM 抗体の力価を判定することによって評価してもよい。反応は、通常静脈内免疫投与後 4 日（PFC 反応）または 5 日（ELISA）目にピークに達する。プラーク形成細胞を計数することによって 1 次抗体産生を評価する場合、PFC が反応のピークで計数されるようにサブグループの免疫投与および試験の終了が時間調整されること、サブグループが対照群を含むすべての用量群からの同数の雌雄出生児を含んでいること、およびサブグループをほぼ同じ出生後週齢で評価することを条件として、サブグループの動物を別々の日に評価することが許容される。被験物質への曝露は PFC 反応のための脾臓の採取または ELISA 評価のための血清の採取の前日まで継続する。

生殖毒性の可能性の追跡評価（コホート 1B）

51. コホート 1B の動物は必要に応じて PND 90 を超えて投与を維持し、F2 世代を得るまで飼育することができる。同じ用量群の雌雄を、PND 90 またはそれ以後の時点から開始して PND 120 を超えない時点まで、最長 2 週間同居させる（兄弟姉妹のペアリングは避ける）。手順は P 動物用のものと同様とする。ただし、証拠の重み付けに基づき、同腹児を離乳またはそれを超えて追跡するのではなく PND 4 で処分しても十分な場合がある。

最終観測

血液生化学検査／血液学的検査

52. P 動物の全身毒性をモニターする。試験終了時に規定部位からの空腹時血液サンプルを用量群ごとに無作為に抽出された P の雌雄 10 匹から採取し、適切な状態で保管し、部分的または詳細な血液学的検査、血液生化学検査、T4 および TSH の評価、または被験物質の既知の影響プロファイルによって示唆されるその他の検査を実施する。次の血液学的パラメータを検査する。すなわち、ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球、白血球分画、血小板数および凝固時間／凝固能である。血漿または血清の検査には、血糖、総コレステロール、尿素、クレアチニン、総蛋白、アル

ブミン、および肝細胞への影響を示す 2 種以上の酵素（例えばアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、ソルビトール脱水素酵素）を含む。追加の酵素および胆汁酸の測定は、特定の環境下で有用な情報となる。さらに、あいまいな影響を明確にするのを助けるため、または内部曝露データを作成するための後々の分析を可能にするためにすべての動物の血液を採取し保管してもよい。P 動物の 2 回目の交配を想定しない場合、採血は屠殺予定時の剖検の直前または剖検の一部とする。動物を維持する場合、採血は 2 回目の交配の数日前とする。パラメータが被験物質の影響を受けないことを既存の反復投与試験からのデータが示していない場合には、試験終了前に尿検査を実施し次のパラメータを評価する。すなわち外観、容量、浸透圧または比重、pH、蛋白、糖、血液および血球、細胞残骸である。被験物質の排泄や代謝物をモニターするために採尿も実施してよい。

53. F1 動物における全身毒性もモニターする。試験終了時に規定部位からの空腹時血液サンプルを用量群ごとに無作為に抽出されたコホート 1A の雌雄 10 匹から採取し、適切な状態で保管し、血清甲状腺ホルモン濃度評価 (T4 および TSH)、血液学的評価 (総白血球、白血球分画と赤血球数) および尿検査を含む標準的な血液生化学検査を実施する。
54. PND 4 の余剰の児動物については剖検を実施および血清甲状腺ホルモン (T4) 濃度測定を考慮する。必要に応じて、新生児 (PND 4) 血液を同腹ごとに生化学的/甲状腺ホルモン分析のためにプールすることができる。T4 および TSH 分析用に、PND 22 時点で剖検する離乳したばかりの児動物 (コホート用に選抜されなかった F1 児動物) からも採血する。

精子パラメータ

55. 精子パラメータが 90 日の試験において影響を受けないことを示す既存データがない場合には、すべての P 世代の雄について精子パラメータを測定する。精子パラメータの検査はコホート 1A のすべての雄について実施する。
56. P および F1 (コホート 1A) のすべての雄について、屠殺時に精巣および精巣上体の重量を記録する。少なくとも 1 つの精巣および 1 つの精巣上体を病理組織学的検査用に保管する。残りの精巣上体を用いて精巣上体尾部の貯蔵精子数を測定する。さらに、精子の運動性および形態を評価するために損傷を最小限にするような方法を用いて精巣上体尾部 (または精管) の精子を採取する。
57. 精子の運動性については、屠殺後ただちに評価するか、または後の評価のために記録する。前進運動精子率は、主観的に、またはコンピュータで運動解析を行うことにより客観的に求めることができる。精子の形態の評価については、精巣上体 (または精管) の精子サンプルを固定または湿標本の状態で検査し、サンプル当たり少なくとも 200 個の精子を正常 (頭部および中部/尾部の両方が正常に見える) か異常かに分類

する。精子の形態異常の例としては、融合、頭部分離、頭部や尾部の奇形などが挙げられる。奇形または巨大な精子頭部は排精異常を示唆している場合がある。

58. 剖検の時点で精子サンプルを凍結し、塗抹を固定し、精子の運動性解析用に画像を記録する場合には、その後の解析は対照群または高用量群の雄に限ってもよい。ただし、投与による影響が認められた場合には、より低い用量群についても評価を行う。

剖検

59. すべての P および F1 の動物につき、屠殺時または早期死亡時に剖検し、形態異常または病理学的変化の有無を肉眼的に検査する。生殖器系の器官に特に注意を払う。瀕死状態で安楽死させた児動物および死亡した児動物については記録し、浸軟していないものについては、異常の有無や死因を調べ、保存する。
60. 成熟した P および F1 の雌については、性周期の段階を判断するため、および生殖器の病理組織学的検査と相関が取れるようにするため、剖検の日に膣垢塗抹標本を検査する。すべての P の雌（および可能であれば F1 の雌）の子宮について、病理組織学的評価を妨げないような方法によって着床痕の有無および数を調べる。

器官重量および組織保存 - P および F1 成熟動物

61. 屠殺時に、関連するコホートからのすべての P 動物およびすべての F1 成熟動物について体重および以下に挙げる器官の湿重量を（以下に概要を説明）、乾燥を避けるため摘出後可能な限り速やかに測定する。その後これらの器官を適切な状態で保存する。別途規定しない限り、実施する実験室の標準的な慣例に従って、両側性の器官は左右別々に、または合わせて測定してもよい。
- 子宮（卵管および子宮頸部を含む）、卵巣
 - 精巣、精巣上部（精子の計数のためのサンプル用に全体および尾部）
 - 前立腺（背側部および腹側部を結合して）。前立腺複合体を切り出す際には、液で満たされた精嚢を穿刺しないよう注意を要する。前立腺総重量に対して投与の影響がある場合には、背側部および腹側部は固定後切除し、別々に測定する。
 - 精嚢（凝固腺および内容液を含む全体を一つの器官として）
 - 脳、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、胸腺、下垂体、甲状腺（固定後）、副腎ならびに既知の標的器官および組織
62. 上記の器官に加えて、末梢神経、筋肉、脊髄、眼球と視神経、消化管、膀胱、肺、気管（甲状腺および副甲状腺もいっしょに）、骨髄、精管（雄）、乳腺（雌雄）および膣を適切な状態で保管する。
63. コホート 1A の動物について、すべての器官の重量を測定し、病理組織学的検査用に保管する。
64. 出生前および出生後に誘発された免疫毒性の検査のため、それぞれの投与群から雄 10 匹および雌 10 匹のコホート 1A（1 腹当たり雄 1 匹または雌 1 匹、すべての腹から代表の児動物を最低 1 匹、無作為抽出）に対して屠殺時に次のことを実施する。

- 投与経路に関連する遠隔リンパ節の重量測定（コホート 1A のすべての動物ですでに実施されている、副腎、胸腺、および脾臓の重量に加えて）
 - 脾臓半分を用いた脾臓リンパ球亜集団の解析（CD4+および CD8+の T リンパ球、B リンパ球、およびナチュラルキラー細胞）。脾臓のもう半分は病理組織学的評価用に保管する。免疫投与していない（コホート 1A）動物における脾臓リンパ球亜集団の解析によって、曝露が「ヘルパー」（CD4+）もしくは細胞毒性（CD8+）胸腺由来リンパ球またはナチュラルキラー（NK）細胞（腫瘍性細胞および病原体への迅速な反応）の免疫学的定常状態分布のシフトに関係するかどうか判断する。
65. コホート 1B の動物については、次の器官の重量を測定し、対応する組織をブロック段階に向けて処理する。
- 膣（重量未測定）
 - 子宮（子宮頸部も含む）
 - 卵巣
 - 精巣（少なくとも 1 個）
 - 精巣上体
 - 精囊および凝固腺
 - 前立腺
 - 下垂体
 - 特定された標的器官
66. コホート 1B の病理組織学的検査は、コホート 1A の結果があいまいな場合、または生殖毒性物質もしくは内分泌毒性物質である疑いがある場合に実施する。
67. コホート 2A および 2B：発達神経毒性試験（PND 21 または PND 22 および成熟した児動物）。コホート 2A の動物については行動試験の後、脳の重量を記録し神経毒性評価のために詳細な神経組織学的検査を行って処分する。コホート 2B の動物については、PND 21 または PND22 に、脳の重量を記録し神経毒性評価のために脳の顕微鏡検査を行って処分する。コホート 2A の動物については灌流固定が必要で、コホート 2B の動物については任意である。

器官重量および組織保管 - F1 離乳児

68. 結果によって生存中のさらなる試験の必要性が示されない限り、コホート用に選抜されなかった児動物については、矮小を含めて離乳後 PND 22 に屠殺する。屠殺された児動物については、段落 62 および段落 63 に記載するように、生殖器の評価を含んで剖検を行う。可能な限り多くの腹から、群当たり性当たり最大 10 匹の児動物について、脳、脾臓、および胸腺の重量を測定し、適切な状態で保存する。さらに、これら雌雄の児動物の乳房組織をさらなる顕微鏡解析 1 のために保管してもよい。肉眼的異常および標的組織は病理組織学的検査を行う場合に備えて保管する。

病理組織学的検査 - P 動物

69. 高用量群および対照群のすべての P 動物について、段落 61 および 62 に示す器官の詳細な病理組織学的検査を実施する。投与による変化が認められた器官については、NOAEL の判定に資するため、すべての動物においてより低い用量群についても検査を行う。さらに、受胎能の低下が疑われるすべての動物（交尾、受・授胎または健康な出生児の出産がみられなかったもの、また性周期や精子の数、運動性、形態に影響がみられたもの、およびすべての肉眼病変など）の生殖器官についても病理組織学的評価を行う。

病理組織学的検査 - F1 動物

コホート 1 の動物

70. 高用量群および対照群の成熟したコホート 1A のすべての動物について、段落 61 および 62 に示す器官の詳細な病理組織学的検査を行う。すべての同腹について、性別ごとに最低 1 匹の児動物を代表とする。投与による変化が認められた器官および組織ならびにすべての肉眼病変については、NOAEL の判定に資するため、より低い用量群のすべての動物についても検査を行う。出生前および出生後に誘発されたリンパ器官に対する影響については、雄 10 匹と雌 10 匹のコホート 1A のすべての動物に既に実施された胸腺、脾臓、および副腎の病理組織学的評価の次に、採取されたリンパ節および骨髄に対する組織病理学的評価も 1A のすべての動物に実施する。
71. コホート 1B のすべての動物の生殖組織および内分泌組織は、ブロック段階に向けて処理するが、生殖毒性物質または内分泌毒性物質の疑いがある場合には、病理組織学的検査を実施する。コホート 1A の結果があいまいな場合には、コホート 1B について病理組織学的検査も実施する。1 研究によると、乳腺発達、特に幼少児期における乳腺発達はエストロゲン作用に対して感度の高い評価指標である。妥当性が確認されれば、両性の児動物の乳腺を含む評価指標が本試験ガイドラインに含まれることを推奨する。
72. 成熟した雌の卵巣は黄体に加え、原始卵胞と発育卵胞を含むはずであり、したがって、病理組織学的検査では、F1 の雌について黄体に加えて原始卵胞と小さな発育卵胞の定量的評価を検出することを目的とするが、その際の動物数、卵巣切片の選択、および切片数は用いる評価方法に対して統計学的に適切なものとする。対照群および高用量群の動物についての卵胞の計数を最初に実施してもよく、後に有害な影響が出た場合には、より低い用量群を検査する。検査では原始卵胞数（小型の発育卵胞と合わせてもよい）を測定し、投与群と対照群の卵巣を比較する。黄体評価は、評価において周期を考慮することができるように性周期試験と並行に実施する。卵管、子宮、および膣については、適切な器官型発達の有無を検査する。
73. F1 の雄について、詳細な精巣の病理組織学的検査を行い、精巣の分化および発達ならびに精子形成に対する投与による影響を明らかにする。可能であれば、精巣網の切片

の検査を実施する。精巣上体の頭部、体部、および尾部、ならびに精管について、P の雄に要求されるパラメータおよび適切な器官発達の有無を検査する。

コホート 2 の動物

74. 高用量群および対照群のコホート 2A のすべての動物について性別ごとに、神経行動学的試験の終了後、神経病理組織学的検査を実施する（PND 75 以後で、PND 90 を超えない時点）。PND 21 または PND 22 の時点で、高用量群および対照群のコホート 2B のすべての動物について性別ごとに、脳の病理組織学的検査を実施する。投与による変化が認められた器官または組織については、NOAEL の判定に資するため、より低い用量群の動物についても検査を行う。コホート 2A および 2B の動物について、嗅球、大脳皮質、海馬、基底核、視床、視床下部、中脳（中脳蓋、被蓋、大脳脚）、脳幹、および小脳の検査ができるよう、脳の複数の切片を検査する。コホート 2A についてのみ、眼球（網膜および視神経）ならびに末梢神経、筋肉および脊髄のサンプルを検査する。
75. 脳の代表部位（信頼できる組織学的指標に基づいて注意深く選択した相同性のある切片）に対して形態計測（定量的）評価を実施する。形態計測では、脳の特定部位の長さや面積の測定などを行う。最も相同性があり評価する脳の特定部位を代表する切片を選択するため、各組織学的指標において少なくとも 3 つの連続する切片を採取する。神経病理学者は、測定用に準備された切片がサンプル一式の中で他と相同性があり、よって含めるのに適切かどうか適切な判断を行う。それは、特に長さの測定値は比較的短い距離で変化するためである。非相同性の切片は用いない。この目的のためにとっておいたすべての動物を採取することが目的であるが（10 匹／性／用量）、より少ない数でも十分である。ただし、6 匹／性／用量より少ないサンプルは一般に本試験ガイドラインの目的として十分とは考えられないだろう。特定の神経解剖学的部位の大きさや細胞数などのパラメータに対する投与の影響を明らかにするために、立体学が使われる場合もある。組織サンプル作製の全過程（組織の固定から、組織サンプルの切り出し、組織の処理、スライドの染色まで）には、それぞれのバッチの中に各用量群の代表サンプルが含まれるようなカウンターバランスさせた計画を用いる。形態計測または立体的評価を用いる場合には、固定液中での長期保存に関連した収縮のアーティファクトが出ることを防ぐため、すべての用量群を同時に適切な包埋剤に包埋する。

報告

データ

76. データは個体ごとおよび総括表として示す。必要に応じて、各試験群および各世代について、次の事項を報告する。すなわち、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見された、または人道的理由によって安楽死させた動物数、死亡または安楽死の時期、

受胎動物数、妊娠動物数、同腹児を出産した動物数、および毒性徴候を示した動物数である。毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）も報告する。

77. 認められた適切な統計方法によって、数値結果を評価する。統計方法は試験計画で定めておき、非正規データ（計数データなど）、打ち切りデータ（観察時間が限られているなど）、非独立性（同腹の影響および反復測定値など）、および不当分散に適切に対応しなければならない。一般化線形混合モデルおよび用量反応モデルは、本 TG で作成されたデータに適している可能性のある幅広い範囲の分析ツールを網羅している。第三者の審査官や統計学者が解析を評価・再評価できるように、報告書には解析方法および用いたコンピュータプログラムに関する十分な情報を含める。

結果の評価

78. 結果は、剖検および病理組織学的所見を含めて、認められた影響に基づいて評価する。評価では、用量と異常（肉眼病変など）の有無、頻度、程度との関連性もしくはその欠如などを明らかにする。標的器官、受胎率、一般状態の異常、生殖能および同腹ごとの成績、体重変化、死亡率ならびにその他の毒性および発生に対する影響も評価する。性別固有の変化に特に注意する。試験結果を評価する際には、被験物質の物理化学的性質および可能ならば TK データ（胎盤移行および乳汁排泄を含む）を考慮に入れる。

(5) 出生前発生毒性試験

参照ガイドライン：(OECD TG414) 出生前発生毒性試験

試験の概要

1. 通常、妊娠動物への被験物質の投与は、少なくとも着床から屠殺予定日の前日までとする。屠殺予定日は、早産によるデータ欠損のリスクがなく正常な出産日に可能な限り近い日とすること。本ガイドラインは、器官形成期（たとえば、げっ歯類 5～15 日目、ウサギ 6～18 日目）だけでなく、適宜、着床前から妊娠の全期間を経て帝王切開前日までの作用も検討の対象とする。帝王切開後は速やかに雌を屠殺して子宮内容物を検査し、胎児について内臓や骨格の異常を評価する。

試験の準備

動物種を選択

2. 試験では最も妥当な動物種を用い、出生前発生毒性試験で一般的に用いられている実験動物種および系統を使用することが推奨される。試験の動物種としては、げっ歯類種はラット、非げっ歯類種はウサギが望ましい。別の動物種を使用する場合には、その妥当性を示すこと。

飼育および給餌条件

3. 動物飼育室の温度は、げっ歯類 22 ± 3 °C、ウサギ 18 ± 3 °Cとする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。交配にはその目的に合ったケージを用いる。交配した動物は個別飼育が好ましいが、少数匹ずつ飼育してもよい。

動物の準備

4. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 5 日間以上馴化した後用いる。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重または週齢を明らかにする。現実的に可能な限り、全試験群の動物の体重および週齢を均一にする。各用量レベルにて、若齢未経産雌を使用すること。同種同系統の動物を交配させ、兄妹交配は避ける。げっ歯類では膣栓または膣垢中の精子が観察された日、ウサギでは交尾日または、人工授精を行なった場合はその実施日を妊娠 0 日とする。交配した雌は、対照群と投与群に無作為に割付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。交配した雌は対照群と試験群に無作為に割付け、雌をバッチで交配した場合は、各バッチの雌を全群に均一に分配する。同様に、同一の雄で人工授精を行なった雌は全群に均一に分配する。

手順

動物数および性

5. 各投与群および対照群には、剖検の時点で着床部位のある雌がおよそ 20 匹得られるように十分な数の雌を含める。着床部位のある雌が 16 匹未満の場合、その群は妥当とみなされない場合がある。母体死亡率が 10%を超えない限り、試験は無効とはならない。

投与の準備

6. 投与を円滑にするために溶媒または他の添加物を使用する場合は、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留、排泄に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や飲水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。溶媒は、発生毒性のないもの、および生殖への影響のないものを使用すること。

投与量

7. 通常、被験物質は着床（たとえば、交配後 5 日目）から予定帝王切開の前日まで毎日投与する。予備試験が実施されている場合、着床前損失の可能性が高いことが示唆されていない限り、交配から屠殺予定日の前日まで期間を延長して、全妊娠期間を投与期間としてもよい。妊娠中の不適切な取り扱いやストレスは、出生前死亡に至る可能性があることが知られている。投与と無関係な要因による胎児死亡を防ぐため、妊娠動物の不必要な取り扱いや騒音などの外的因子によるストレスを回避すること。
8. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。健康な動物を対照群と試験群に無作為に割付ける。用量レベルの間隔は、毒性作用に差が生じるよう設定する。被験物質の物理化学的性質や生物学的影響による制限がない限り、最高用量は一定の発生毒性や母体毒性（臨床徴候または体重減少）を生じさせるが、死亡や重度の苦痛を引き起こさない用量とする。中間用量は少なくとも 1 用量において、最小の毒性作用が観察できるレベルとする。最小用量は、母体毒性または発生毒性のどちらの徴候も生じることのないレベルとする。その下の各用量段階は、投与量と影響との関連性を明らかにし、無毒性量（NOAEL）か、またはベンチマーク用量を決定できるような検出限界に近い用量を得られるように設定する。
9. 用量段階の設定には公比 2~4 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きい場合（公比 10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。母体 NOAEL の設定が目的であるものの、これを設定しない試験も実施可能である。用量段階の設定では、被験物質や関連物質についてその時点で得られているあらゆる毒性データ、ならびに代謝やトキシコキネティクスに関する追加情報を考慮する。
10. 同時対照群を設けるが、この群は偽処置対照群または被験物質投与に溶媒を用いる場合には溶媒対照群とする。すべての群に同一量の被験物質または溶媒を投与する。対照群の動物は、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒対照群には、用いられる最大量の溶媒を投与すること（最小投与群と同様）。

限度試験

11. 本ガイドラインに記載された方法で経口投与試験を行なった結果、1000 mg/kg 体重/day 以上の 1 用量において毒性がみられなかった場合、および構造的または代謝的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられる。ヒトの予想暴露量から、限度試験においてより高い経口用量を使用する必要性が示唆されることもある。

投与

12. 被験物質または溶媒は通常、挿管にて経口投与する。他の投与経路を用いる場合は、試験実施者はその選択について妥当性と理由を明らかにする。またこの場合、試験方法を適宜修正すること。被験物質は毎日ほぼ同じ時刻に投与する。
13. 各動物に対する投与量は、通常その個体の最新の体重値に基づいて決定するが、妊娠後期の投与量調整には注意を払う。過度な母体毒性を防ぐために、用量選択には既存のデータを用いる。しかし、処置母動物に過度の毒性がみられた場合は、該当する動物を人道的に安楽死させる。複数の妊娠動物が過度の毒性の徴候を示す場合は、その用量群を終了することを考慮すること。被験物質の強制経口投与では、胃チューブまたは適当な挿管カニューレを用いて単回投与することが望ましい。1 回に投与する液体の量は被験動物の大きさに合わせて調節し、体重 100g 当たり 1 mL を超えないようにする。ただし、水溶液については体重 100g 当たり 2 mL まで投与してもよい。コーンオイルを溶媒として用いる場合は、体重 100g 当たり 0.4 mL を超えないようにすること。被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。

母動物の観察

14. 臨床観察は少なくとも 1 日 1 回、投与後に作用がピークに達する時間を考慮してなるべく毎日同一時刻に実施し、その結果を記録する。死亡、瀕死、関連する行動変化、および明らかな毒性徴候など、動物の状態を記録すること。

体重および摂餌量

15. 妊娠 0 日（外部の繁殖業者から交配済み動物を入手する場合は妊娠 3 日目まで）、投与初日、投与期間中（少なくとも 3 日おき）、および屠殺予定日に体重を測定する。
16. 体重測定と同じ日に 3 日間隔で摂餌量を記録する。

剖検

17. 雌を出産予定日の前日に屠殺する。屠殺予定日より前に流産または早産の徴候を示す雌は屠殺し、肉眼による精密検査に供する。
18. 試験終了時または死亡の場合は、母動物について、構造異常や病理学的変化の有無を肉眼検査する。帝王切開中の母動物の評価、およびその後の胎児分析は、偏りを最小限にするために投与群をふせたまま実施することが望ましい。

子宮内容物の検査

19. 試験終了後ただちに、または死亡後可能な限り速やかに子宮を摘出し、動物の妊娠状態を確認する。一見して非妊娠と思われる子宮は、非妊娠状態を確認するためにさらに検査する（たとえば、げっ歯類では硫化アンモニウム染色、ウサギでは Salewski 染色または他の適当な代替法を用いる）。
20. 頸部を含む妊娠子宮の重量を測定する。試験中に死亡した動物では、妊娠子宮の重量は測定しない。
21. 各妊娠動物の黄体数を測定する。
22. 子宮内容物について、胚死亡または胎児死亡および生存胎児の数を調べる。受胎産物の相対死亡時期を推定するために、再吸収の程度を記載する（定義は補遺を参照）。

胎児の検査

23. 各胎児の性別および体重を調べる。
24. 各胎児について外表異常を調べる(7)。
25. 胎児について、骨格および内臓の異常（変異および奇形・異常など）を検査する。胎児変化を分類することが望ましいが、必須ではない。分類を行なう場合は、各分類を定義する判定基準を明確に示すこと。特に生殖器系に注意を払い、発生変化の徴候の有無を調べる。
26. げっ歯類では、1 腹仔のおよそ半数について骨格変化の有無を検査する。残りの半数については、一般に認められているか所定の連続切片作製法を用いるか、詳細な全体解剖を用いて内臓異常を検査する。
27. ウサギなどの非げっ歯類では、全胎児について内臓および骨格異常を検査する。これらの胎児の体について、内臓異常を詳細な解剖で評価し、適宜、心臓の内部構造をさらに評価する。この方法で検査した半数の胎児の頭部を分離して、標準的な連続切片作製法または同等に高感度の方法にて処理し、内臓異常（眼、脳、鼻道、および舌）を評価する。頭部を分離した胎児を含めた全胎児の体について、げっ歯類と同一の方法にて骨格異常を検査する。

データおよび報告

データ

28. 各試験群および各世代について、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽死させた動物数、死亡または安楽死の時期、妊娠動物数、毒性徴候を示した動物数、認められた毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）、胎児観察の種類、ならびに母動物ごとのすべての関連データを、個体ごとおよび総括表として示す。
29. データ分析の単位として母動物を用い、適切な統計方法により数値データを評価する。一般に認められた統計方法を用い、統計方法は試験計画で定めておく。予定屠殺日までに死亡した動物のデータも報告する。これらのデータは、関連性が認められれば群平均

に含めてもよい。こうした動物のデータの関連性および群平均に含めるか除外するか
の判断は、個別に行なう。

結果の評価

30. 出生前発生毒性試験の結果は、認められた影響に基づいて評価する。評価には下記の情報を含める。
 - 被験物質への動物の暴露と、すべての所見の発生率および重症度との関係の有無の評価を含む、母体および胎児試験結果
 - 胎児の外表異常、内臓異常、および骨格異常を分類した場合、その分類に使用した基準
 - 必要に応じて、試験結果の解釈に役立つ対照背景データ
 - すべての百分率および指数の計算に使用した数値
 - 必要に応じて、独立した審査者または統計担当者が解析結果を再評価および再構成できるように、解析方法の十分な説明を含む、試験結果に関する適当な統計解析結果。
31. 毒性作用がないことを実証する試験では、被験物質の吸収および生物学的利用能を確立するためにさらなる調査の実施を考慮する。

(6) 遺伝毒性試験

試験手順は、本項で示す「変異原性試験」に準じるが、狭義の「変異原性」に限定されることなく、遺伝毒性全般に係る試験結果を基に評価を行うこととする。なお、標準的組合せ（「微生物を用いる復帰突然変異試験」、「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及び「げっ歯類を用いる小核試験」）を構成する試験のうち「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」については、マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA) 又は *in vitro* 小核試験をもって代えることができる。また、標準的組合せの結果を補足するための追加試験としては、以下に例示されているもののほか、単細胞ゲル電気泳動試験 (コメット試験)、*in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験が例として挙げられる。これらの試験手順は OECD テストガイドラインなど国際的に認められたガイドラインに準拠するものとする。

ただし、標準的組合せを構成する試験のいずれかにおいて、技術的な制約から実施できないような場合においては、その理由について科学的な根拠に基づき説明を受けた上で、国際的にもバリデーションが行われ妥当性が確認されている試験を代替試験として評価を行う。

(1) 遺伝子突然変異を指標とする試験

- 1) 哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験
- 2) ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験
- 3) げっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験

(2) 染色体異常を指標とする試験

- (1) げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験
- (2) げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験
- (3) げっ歯類を用いる優性致死試験

(3) DNA 損傷を指標とする試験

- (1) 微生物を用いる DNA 修復試験
- (2) 哺乳類の細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験
- (3) 哺乳類の細胞を用いる姉妹染色分体交換 (SCE) 試験

試験結果の判断手順は以下のとおり。

- ① 「微生物を用いる復帰突然変異試験」で陽性である場合においては、遺伝子突然変異又は DNA 損傷を指標とする *in vivo* 試験 (コメット試験、*in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験等) の結果を十分考慮し、総合的に判断を行う。
- ② 「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」で陽性であり、その作用が「げっ歯類を用いる小核試験」でも確認された場合においては、遺伝毒性は陽性であると判断することができる。

③ 「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」で陽性であっても、高用量まで適切に行われた「げっ歯類を用いる小核試験」（標的臓器がばく露されている証明があることが望ましい。）で陰性であれば、遺伝毒性は陰性であると判断することができる。

微生物を用いる復帰突然変異試験

参照ガイドライン：(OECD TG471) 細菌復帰突然変異試験

試験の概要

1. 細菌細胞の懸濁液を、外因性の代謝活性化系存在下および非存在下で被験物質に暴露させる。プレート法では、懸濁液を軟寒天に混合して直ちに平板の最少培地上に重層した。プレインキュベーション法では処理混合液を培養してから軟寒天と混合し、平板の最少培地上に重層した。いずれの方法でも、培養 2、3 日後に復帰細胞コロニーを計数し、溶剤対照平板上の自然発生復帰細胞コロニー数と比較する。
2. いくつかの細菌復帰突然変異試験の実施手順が記述されている。その中で一般的に用いられるのは、プレート法、プレインキュベーション法、変動法および懸濁法である。気体または蒸気を試験するための変更についても述べられている。
3. このガイドラインで述べる手順は、主にプレート法とプレインキュベーション法である。代謝活性化系存在下および非存在下の実験に対して、どちらも許容できる。ある化合物は、プレインキュベーション法を用いる方がより効率的に検出される可能性がある。短鎖脂肪族ニトロソアミン、二価金属、アルデヒド、アゾ色素、ジアゾ化合物、ピロリジジナルカロイド、アリル化合物およびニトロ化合物などの種類に属する化合物がこれに当たる。
4. 特定の種類の変異原は、プレート法やプレインキュベーション法などの標準操作法では必ずしも検出できないことも認められている。これらは「特例」と考えるべきで、その検出のために別の方法を使うよう、強く推奨したい。以下の「特例」も、(その検出に使用できる手順の例と共に) 特定されている：アゾ色素とジアゾ化合物、気体と揮発性化学物質およびグリコシド。標準操作法から逸脱する場合には、科学的に正当化される必要がある。

試験方法

準備

細菌

5. 細菌を新たに培養し、指数増殖期後期から静止期早期まで増殖させる (約 10⁹ 細胞/mL)。静止期後期の細胞は使用すべきではない。実験に使用される培養は、増殖可能な細菌力価の高いものとする。力価は成長曲線に関する背景の対照データ、または測定ごとにプレート培養実験を実施して生存細胞数を決定することにより示すことが出来る。
6. 培養温度は、37°Cが推奨される。
7. 少なくとも 5 つの細菌株を使用する。その中には、試験機関間で信頼性が高く再現性が示されているネズミチフス菌 (TA1535、TA1537 または TA97a または TA97、

TA98 および TA100) の 4 つの株を含むものとする。これらの 4 つのネズミチフス菌株は一次復帰部位に GC 塩基対を持っていること、そして特定の酸化変異誘発物質、架橋物質およびヒドラジンを検出し得ないことが知られている。そのような物質は、一次復帰部位に AT 塩基対を持つ大腸菌 WP2 株またはネズミチフス菌 TA102(19)によって検出される可能性がある。したがって、以下の株の組合せが推奨される。

- ネズミチフス菌 TA1535、および
- ネズミチフス菌 TA1537 または TA97 または TA97a、および
- ネズミチフス菌 TA98、および
- ネズミチフス菌 TA100、および
- 大腸菌 WP2 uvrA、大腸菌 WP2 uvrA (pKM101) またはネズミチフス菌 TA102。

架橋変異誘発物質を検出するために TA102 を含むか、DNA 修復に優れた大腸菌[例えば、大腸菌 WP2 または大腸菌 WP2 (pKM101) を加えることが望ましい。]

8. 保存培養の調製、標識確認および貯蔵には確立された方法を用いる。冷凍保存培養試料ごとに増殖のためのアミノ酸要求性、(ネズミチフス菌株についてはヒスチジン、大腸菌株についてはトリプトファン) を示す。他の表現型の特徴も同様に確認する。つまり、該当する場合には、R 因子プラスミドの有無、[すなわち TA98、TA100、および TA97a または TA97、WP2 uvrA および WP2 uvrA (pKM101) におけるアンピシリン抵抗性、および TA102 におけるアンピシリン+テトラサイクリン抵抗性]、特徴的な突然変異の発現 (すなわち、ネズミチフス菌のクリスタルバイオレット感受性 *rfa* 突然変異、大腸菌における紫外線感受性 *uvrA* 突然変異またはネズミチフス菌における紫外線感受性 *uvrB* 突然変異) の存在などである。これらの株では、試験機関の背景の対照データから予想される頻度、望ましくは文献で報告されている範囲の頻度で自然発生的な復帰細胞コロニーが得られなければならない。

培地

9. 数回の細胞分裂を起こさせるために、適量の最小寒天培地 (例えば、Vogel-Bonner の最少培地 E とグルコースを含む) とヒスチジンおよびビオチンまたはトリプトファンを含む軟寒天を用いる。

代謝活性

10. 細菌を、適切な代謝活性化系存在下および非存在下の状態で被験物質に暴露させる。最も一般的に用いられる系は、Aroclor 1254 などの酵素誘導剤で処理したものか、またはフェノバルビトンと β -ナフトフラボンを併用した、げっ歯類の肝臓から得た補酵素を添加したマイクロソーム画分 (S9) である。マイクロソーム画分は、通常、S9-mix 中 5~30% (v/v) の濃度範囲で使用される。代謝活性化系の選択と条件は、試験された被験化学物質のクラスに依存する可能性がある。場合によっては、複数の濃度のマイクロソーム画分を用いる方が良いかもしれない。アゾ色素とジアゾ化合物については、還

元的代謝活性化系を使用するのがより適切であろう。

被験物質／準備

11. 固体の被験物質は細胞に添加する前に適切な溶媒／溶剤に、溶解／懸濁するか、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は試験系に直接添加するか、添加前に希釈する。保存有効期間を示す安定性データがない限り、被験物質の新鮮な溶液を用いる。

試験条件

溶剤／溶媒

12. 溶剤／溶媒は、被験物質と化学反応を起こす疑いがないものを用い、細胞の生存と S9 活性がともに適合できるようにする。性質が既知ではない溶剤／溶媒を用いるときは、適合性を示すデータが助けとなる。可能であれば、まず水溶性の溶剤／溶媒を用いることが推奨される。被験物質が水に不安定であれば、有機溶媒に水が混ざらないこと。

暴露濃度

13. 被験物質の最高用量を決定するとき、考慮に入れるべき基準として最終処理混合液中の細胞毒性と溶解性がある。予備実験で毒性と不溶性を測定するのは有用であろう。細胞毒性は復帰細胞コロニー数の減少、菌叢の消失または縮小、または処理された培養の生存率によって検出できる。物質の細胞毒性は、代謝活性化系の存在により変化する可能性がある。不溶性は実際の試験条件下における最終混合液中で、肉眼で明らかな沈殿として評価する。可溶性で細胞毒性を持たない物質の最大試験濃度として推奨されるのは、5 mg/プレートまたは 5 μ L/プレートである。5 mg/プレートまたは 5 μ L/プレートの濃度では溶解しない非細胞毒性物質については、最終処理混合液の濃度の一つ以上が不溶性でなければならない。5mg/プレートまたは 5 μ L/プレートより低濃度ですでに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検査する。沈殿物は計数を妨害しないこと。
14. 被験物質の試験濃度については、最初の実験では約 3.2 倍 (half log) 間隔 ($\sqrt{10}$) の少なくとも 5 つの異なる分析可能な濃度を使用する。濃度反応を調べる場合は、より狭い間隔が適切であろう。
15. 変異原性が疑われる不純物を相当量含んでいる物質を評価する場合は、5 mg/プレートまたは 5 μ L/プレートより高濃度で評価することを考えてもよい。

対照

16. 株特異性の陽性対照および陰性対照 (溶剤または溶媒) を、それぞれ代謝活性化系存在下および非存在下で、同時に測定する。各測定が有効に実施されたこと確認できるような陽性対照濃度を選択する。
17. 代謝活性化系存在下で測定する場合、使用する細菌株のタイプに基づいて陽性対照参照物質を選択する。以下の化学物質は、代謝活性化による測定のための適切な陽性対照の例である。

化学物質および CAS 番号

9,10-ジメチルアントラセン[CAS 番号 781-43-1]
7,12-ジメチルベンズアントラセン[CAS 番号 57-97-6]
コンゴレッド[CAS 番号 573-58-0] (還元的代謝活性化法のため)
ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8]
シクロホスファミド (一水和物) [CAS 番号 50-18-0 (CAS 番号 6055-19-2)]
2-アミノアントラセン[CAS 番号 613-13-8]

2-アミノアントラセンが、S9-mix の有効性の唯一の指標として使用してはならない。2-アミノアントラセンを用いる場合、S9 のバッチごとに、マイクロソーム酵素による代謝活性化を要求する変異原、例えば、ベンゾピレンやジメチルベンズアントラセンを用いて評価する。

18. 代謝活性化系非存在下で測定する場合、株特異性の陽性対照の例を以下に示す。

化学物質および CAS 番号	菌株
(a) アジ化ナトリウム [CAS 番号 26628-22-8]	TA1535 および TA100
(b) 2-ニトロフルオレン [CAS 番号 607-57-8]	TA98
(c) 9-アミノアクリジン [CAS 番号 90-45-9]または ICR191 [CAS 番号 17070-45-0]	TA1537、TA97 および TA97a
(d) クメンヒドロペルオキシド [CAS 番号 80-15-9]	TA102
(e) マイトマイシン C [CAS 番号 50-07-7]	WP2 uvrA および TA102
(f) N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン[CAS 番号 70-25-7]または 4-ニトロキノリン 1-オキシド[CAS 番号 56-57-5]	WP2、WP2 uvrA および WP2 uvrA (pKM101)
(g) フリルフラミド(AF-2)[CAS no. 3688-53-7]	プラスミド含有菌株

19. 他の適切な陽性対照物質を用いることもできる。入手可能な場合、化学物質の種類に関する陽性対照化学物質の使用を考慮してもよい。
20. 溶剤または溶媒のみからなる陰性対照を設定し、被験物質で処理しないこと以外は試験培地と同様に扱う。選択した溶剤が有害作用や変異原性作用を誘発しないことを示す背景データがない限りは、無添加の対照を用いる。

手順

被験物質の添加

21. 代謝活性化系非存在下のプレート法では(1)(2)(3)(4)、通常、0.05 mL または 0.1 mL 試験液、0.1mL の新鮮細菌培養 (約 10⁸ の生菌を含む) と 0.5 mL の無菌緩衝液を 2.0 mL の軟寒天と混合する。代謝活性化条件下の測定では、通常、細菌および被験物質 / 被験溶液とともに、十分量のマイクロソーム画分 (5~30% v/v 代謝活性化混合物) を

含む 0.5 mL の代謝活性化混合物を軟寒天 (2.0 mL) と混合する。各試験管の内容物を混合し、最小寒天プレートの上表面に注ぐ。軟寒天は培養前に凝固させる。

22. プレインキュベーション法では、被験物質／被験溶液は試験菌株 (約 10⁸ の生菌を含む) とともに無菌緩衝液または代謝活性化系 (0.5 mL) 中で通常 20 分以上 30~37° C でプレインキュベートし、その後軟寒天と混合し、最小寒天培地表面に注ぐ。通常、0.05 または 0.1 mL の被験物質／被験溶液、0.1mL の細菌および 0.5mL の S9-mix または無菌緩衝液を、2.0mL の軟寒天に混合する。プレインキュベーション中は、振とう機を用いて試験管を通気する。
23. 変動を十分に推定するために、各用量につき 3 連のプレートを用いる。科学的に正当な理由があるときは、2 連のプレートでもよい。プレートが偶然失われても、測定が必ずしも無効になるというわけではない。
24. 気体または揮発性物質は密封した培養容器などの適切な方法で試験する。

培養

25. 一つの試験におけるプレートは全て 48~72 時間、37° C で培養する。培養後、プレートあたりの復帰コロニー数を計測する。

データおよび報告

結果の処理

26. データはプレートあたりの復帰細胞コロニー数として示す。陰性対照 (溶剤対照および使用した場合は無添加の対照) および陽性対照プレートの復帰コロニー数も示す。
27. 被験物質と陽性および陰性 (無添加および／または溶剤) 対照について、個々のプレート上の復帰コロニー数、平板あたりの復帰コロニーの平均個数および標準偏差を示す。
28. 明らかな陽性反応の検証は必要ではない。不確かな結果については更に試験を行ったうえで明確にすべきであるが、その際は実験条件を修正することが望ましい。陰性結果については、状況に応じて確認する必要がある。陰性結果の確認が必要でないと考えられる場合には、正当な理由を提出する。条件範囲を拡大する試験パラメータの修正は、追跡試験にて考慮する。修正する可能性のある試験パラメータには、濃度間隔、処理法 (プレート法または液体プレインキュベーション法) および代謝活性化条件を含む。

結果の評価および解釈

29. 陽性結果であると決定する基準がいくつかある。例えば、プレートあたりの復帰コロニー数が検査された範囲で濃度依存性に増加した場合、および／または、代謝活性化系の有無とは無関係に、少なくとも 1 つの株において 1 つ以上の濃度で再現性を持って増加した場合である。結果の生物学的関連をまず考慮する。統計解析は結果を評価する目的で用いる。ただし、統計学的な有意差は陽性反応を決定付ける唯一の因子

ではない。

30. 結果が上記の基準と合致しない被験物質は、本試験系では変異原性を有さないと考えられる。
31. 多くの実験で明らかな陽性または陰性結果を示していても、データセットから被験物質の活性を明確に判定できないことがまれにある。繰り返される実験回数に限らず、不確かな結果や疑問のある結果が解決されないことがある。
32. 細菌復帰突然変異試験の陽性結果は、物質がネズミチフス菌および／または大腸菌のゲノムにおいて塩基置換またはフレームシフトによって点変異を誘発したことを意味する。陰性結果は、試験条件下では試験に用いた菌株では被験物質が突然変異誘発性でなかったことを意味する。

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

参照ガイドライン：(OECD TG473) 哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験

試験の概要

1. 適切な代謝能を有する細胞を使用する場合を除いて、ヒトまたは他の哺乳類に由来する培養細胞を外因性代謝活性化系の存在下および非存在下において被験物質で処理する。培養細胞への被験物質処理開始後、あらかじめ定められた適切な時間で培養細胞を分裂中期停止剤（例：コルセミド®またはコルヒチン）で処理し、細胞を回収、染色して、分裂中期細胞に染色分体型および染色体型の異常があるかどうかを顕微鏡下で分析する。

試験の方法

準備

細胞

2. 種々の細胞株（例：チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO)、チャイニーズハムスター肺由来細胞(V79)、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)、ヒト由来細胞(TK6)）やヒトまたは他の哺乳類末梢血リンパ球を含む初代培養細胞が使用できる。細胞株の選択は科学的妥当性に基づいて行わなければならない。初代培養細胞を使用する場合には、動物福祉の観点から、可能であればヒト由来の初代培養細胞の使用を検討し、ヒトにおける倫理原則および規則に従って試料採取を行う。ヒト末梢血リンパ球採取の対象者は、疾病への罹患が確認されておらず、染色体異常の背景出現率を高めるレベルの遺伝毒性物質（例：化学物質、電離放射線）に最近曝露されていない若年齢（約 18～35 歳）の非喫煙者とする。これにより、染色体異常の背景出現率を低いレベルに安定して抑えることができる。染色体異常の背景出現率は加齢とともに上昇し、この傾向は男性よりも女性に顕著である。複数のドナーから採取した細胞をプールして使用する場合は、ドナー人数を明記する。また、被験物質による処理を開始してから細胞の採取までの間に細胞が分裂したことを証明する必要がある。被験物質に対する各細胞周期の感受性は不明な場合があるため、さまざまな細胞周期にある細胞が曝露されるように、培養細胞は、指数増殖期を維持するか（細胞株の場合）、または刺激して分裂させる（リンパ球の初代培養細胞の場合）。分裂を起こすため分裂促進剤で刺激する必要がある初代細胞は、通常、被験物質に曝露される期間にはもはや同調していない（例：分裂促進剤で刺激した 48 時間後のヒトリンパ球）。細胞周期が同調している細胞を処理に使用することは推奨されないが、妥当性が示されれば使用可能である。

培地および培養条件

3. 培養の維持には、適切な培地と培養条件（培養容器、必要に応じて 5%CO₂ の加湿状態、

37℃の培養温度)を使用する。細胞株は定期的に染色体モード数の安定性を検査し、マイコプラズマの汚染がないことを確認する。マイコプラズマ汚染がある場合または染色体モード数が変化した場合にはその細胞を使用しない。試験施設で使用する細胞株または初代培養細胞は、正常な細胞周期時間が把握され、それが公表されている細胞特性に一致している必要がある。

培養細胞の準備

4. 細胞株：保存細胞から細胞を増殖させ、細胞が懸濁状態または単層状態のまま回収時点まで対数増殖を維持できる密度で培地に播種する（例：単層培養では、密集状態にならないようにする）。
5. リンパ球：被験物質で処理する前に細胞分裂を誘発させるため、抗凝固剤（例：ヘパリン）で処理した全血または分離したリンパ球を、分裂促進剤（例：ヒトリンパ球に対してはフィトヘマグルチニン(PHA)）の存在下で培養する（例：ヒトリンパ球の場合 48 時間）。

代謝活性化

6. 内因性の代謝能が不十分な細胞を使用する場合は、外因性の代謝系を用いる必要がある。他に妥当な理由がある場合を除き、通常よく用いられ、既知のものとして推奨される代謝系は、アロクロール 1254 またはフェノバルビタールと β -ナフトフラボンの併用などの酵素誘導剤で処理したげっ歯類（通常はラット）の肝臓から調製したミクロソーム画分（S9）に、補酵素を添加した溶液である。フェノバルビタールと β -ナフトフラボンの併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」に抵触せず、複合機能オキシダーゼの誘導能はアロクロール 1254 と同程度に高いことが確認されている。S9 画分の最終的な試験培地中での濃度は通常 1~2% (v/v) を使用するが、10% (v/v) に高める場合もある。処理中に分裂指数を低下させる物質、特にカルシウム錯体形成物質を使用してはならない。使用する外因性代謝活性化系または代謝誘導剤の種類および濃度の選択は、被験物質の種類によっては考慮すべき場合がある。

被験物質の調製

7. 被験物質が固体の場合は、適切な溶媒で溶解し、適宜希釈して細胞を処理する。被験物質が液体の場合は、試験系に直接添加するか、希釈して添加する。被験物質が気体または揮発性の場合は、密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する。保存可能であることが安定性データによって証明されている場合を除き、被験物質は用時調製する。

試験条件

溶媒

8. 試験の実施に有害な影響を及ぼす（すなわち、細胞増殖を変化させる、被験物質の完全性に影響する、培養容器と反応する、代謝活性化系を障害する）ことがなく、被験

物質の溶解性を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、水性の溶媒（または培地）の使用を第一に考慮する。十分に確立された溶媒は、水またはジメチルスルホキシド（DMSO）である。一般に処理培地中の最終濃度は、有機溶媒では1%（v/v）、水性溶媒（生理食塩液または水）では10%（v/v）を超えないようにする。十分に確立されていない溶媒（例：エタノール、アセトン）を使用する場合は、それらが被験物質および試験系に影響しないこと、また使用する濃度で遺伝毒性がないことを示すデータによって、その溶媒の使用の正当性を裏付ける必要がある。裏付けデータがない場合は、無処理対照を設けて、選択した溶媒によって有害作用または染色体構造異常の誘発が引き起こされないことを証明することが重要である。

細胞増殖と細胞毒性の評価ならびに処理濃度の選択

9. 被験物質の最高濃度を決定する際には、人為的な陽性反応、例えば、過剰な細胞毒性、培養液中の沈殿物、pH や浸透圧の著しい変化などを引き起こす可能性のある濃度は避ける。被験物質を添加した際に培養液の pH が著しく変化する場合は、最終処理培養液を緩衝液で処理して pH を調節することで、人為的な陽性結果の回避や適切な培養条件の維持ができることがある。
10. 細胞増殖の測定を行い、十分な数の処理細胞が試験中に細胞分裂を起こしていること、および処理が適切な細胞毒性レベルで実施されていることを確認する。細胞毒性は細胞死および細胞増殖などの適切な指標を用いて、主試験の代謝活性化系の存在下および非存在下それぞれで決定する。予備試験（用量設定試験）で細胞毒性を評価することは、主試験で使用する濃度をより明確に決定する上で有用であるが、予備試験の実施は義務付けられてはおらず、実施した場合も主試験での細胞毒性の測定の代用にはならない。
11. 細胞遺伝学的試験で細胞毒性を評価する際には、相対的細胞集団倍加（RPD）または相対的細胞数増加（RICC）を用いるのが適切な方法である。長時間の処理および処理開始後から回収時間までが正常な細胞周期の1.5倍以上に及ぶ（すなわち、合計で細胞周期の3倍を超える）場合には、RPD では細胞毒性が過小評価されることがある。このような状況下では RICC がより優れた方法であり、もしくは正常な細胞周期の1.5倍以降の細胞毒性の評価に RPD を用いることが有用な推定となる。
12. 初代培養リンパ球の場合、分裂指数（MI）が細胞毒性／細胞増殖抑制の尺度となる一方、MI は処理後の測定する時間、使用した分裂促進剤および被験物質処理に伴う細胞周期の乱れによって影響を受ける。しかしながら、他の細胞毒性評価法は煩雑で実用的でなく、また PHA 刺激に反応して増殖中のリンパ球が対象の場合には適用できないため、MI は細胞毒性の指標として受け入れられる尺度となっている。
13. 細胞株については RICC および RPD が、初代培養リンパ球については MI が細胞毒性パラメータとして推奨される。一方、他の指標（例：細胞の健全性、アポトーシス、

壊死、細胞周期)からもさらに有用な情報が得られる場合がある。

14. 試験許容基準(適切な細胞毒性、細胞数など)を満たす少なくとも3段階(溶媒および陽性対照を除く)の試験濃度を評価すべきである。細胞の種類(細胞株または初代培養リンパ球)に関わらず、試験する各濃度で複数系列または1系列の培養を使用する。2系列で培養した細胞を使用するのが望ましいが、計数する細胞総数が2系列で培養した細胞と同じであれば、1系列で培養した細胞の使用も可能である。1系列の培養の使用は、特に3段階を超える濃度で評価する場合に妥当である。設定した濃度において、それぞれ2系列以上で培養した細胞から得られた結果は、プールしてデータ解析できる。細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない被験物質については、通常、公比約2~3で設定した濃度段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、選択した試験濃度が22項に記載したように細胞毒性を示す濃度、中等度の細胞毒性を示す濃度および細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない濃度を含む必要がある。被験物質には急勾配の濃度反応曲線を示すものが多く、低い細胞毒性および中等度の細胞毒性でのデータを得るため、または用量反応関係を詳しく調べるためには、とりわけ確認試験が要求される状況では、濃度間隔のより密な設定や3段階を超える濃度の設定(1系列または複数系列の培養)の必要がある。
15. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、推奨する細胞毒性パラメータを用いて、 $55 \pm 5\%$ の細胞毒性をもたらすように(すなわち、細胞株についてはRICCおよびRPDが、初代培養リンパ球についてはMIが、同時陰性対照の $45 \pm 5\%$ にまで低下するように)設定する必要がある。陽性の結果がこの $55 \pm 5\%$ の細胞毒性範囲の上限においてのみ見られる場合には、結果の解釈に注意を払う必要がある(13)。
16. 被験物質が難溶性で、最低不溶濃度より低い濃度で細胞毒性がない場合は、観察した最高濃度において被験物質処理の終了時に、肉眼または倒立顕微鏡で混濁や沈殿が確認される必要がある。たとえ最低不溶濃度より高い濃度で細胞毒性が生じたとしても、人為的影響が沈殿によって生じる可能性があるため、観察対象としては濁りまたは目に見える沈殿を生じる濃度を1濃度含めるだけにすることが望ましい。沈殿を生じる濃度では、沈殿が試験の実施(例:染色や計数)を妨げないように注意する。実験前に培地での溶解性を測定しておく、有用である。
17. 沈殿も処理濃度を規定する細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は10 mM、2 mg/mLまたは2 μ L/mLのうち、最も低い濃度とする。組成が不明な被験物質、例えば、組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料(すなわち、UVCB (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 物質)、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性を示さない場合は、最高濃度を高くして(5 mg/mLにするなど)、各成分の濃度を高める必要がある。ただし、上記の要件は、ヒト用医薬品では異なる場合があるので注意する。

対照

18. 細胞の回収時期ごとに、処理培地に溶媒のみを添加したもので、被験物質処理と同じ方法で処理した同時陰性対照を設ける。
19. 同時陽性対照は、試験施設が用いた試験プロトコールの条件下で染色体構造異常誘発物質を検出する能力を備えていること、および使用した場合は外因性代謝活性化系の有効性を証明するために必要である。陽性対照の例を表 1 に示す。妥当性が示されれば代替りの陽性対照物質を使用してもよい。哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験は十分に標準化されているため、陽性対照の使用は代謝活性化を必要とする染色体構造異常誘発物質に限定できる。もし非活性化での試験を同じ処理時間を用いて同時に実施する場合には、この単一の陽性対照物質の反応によって代謝活性化系の活性と試験系の反応性がともに証明されることになる。ただし、長時間処理（S9 なし）については、代謝活性化系を用いる試験とは処理時間が異なるため、それ自体の陽性対照が必要である。試験系の感度を証明するため、それぞれの陽性対照は、再現性があり検出できる背景出現率を超える増加が期待される 1 つ以上の濃度を設定し（すなわち、作用は明らかであるが、観察者によってコード化されたスライドが直ちに特定されない）、その反応が、本試験ガイドラインに規定された限度を超える細胞毒性によるものではないようにする。

表 1 試験施設での習熟度評価および選択する陽性対照として推奨される参照物質

分類	物質	CAS 番号
1. 代謝活性化なしで活性を示す染色体異常誘発物質		
	メタンスルホン酸メチル	66-27-3
	マイトマイシン C	50-07-7
	4-ニトロキノリン・N-オキシド	56-57-5
	シトシンアラビノシド	147-94-4
2. 代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質		
	ベンゾ[a]ピレン	50-32-8
	シクロホスファミド	50-18-0

手順

被験物質による処理

20. 代謝活性化系の存在下および非存在下で増殖中の細胞を被験物質で処理する。

培養細胞の回収時期

21. 結果を陰性と判定するのに必要となる厳密な評価を行うには、代謝活性化の存在下および非存在下での短時間処理、ならびに代謝活性化の非存在下での長時間処理による、次の 3 つの実験条件をすべて実施する必要がある：

- 代謝活性化の非存在下で細胞を被験物質に 3~6 時間曝露し、処理開始後正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当する時間に回収する。
- 代謝活性化の存在下細胞を被験物質に 3~6 時間曝露し、処理開始後正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当する時間に回収する。
- 代謝活性化の非存在下で、正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当する時間にわたり細胞を被験物質で連続的に処理した後に回収する。物質によっては（例：ヌクレオシド類似体）正常な細胞周期の 1.5 倍を超える処理時間（回収までの時間）とすることでより容易に検出できる。

上記のいずれかの実験条件で陽性反応が認められた場合、残りの試験条件で試験する必要はない。

染色体標本の作製

22. 培養細胞は通常回収前の 1~3 時間にわたりコルセミド®またはコルヒチンで処理する。各培養細胞を回収し、個別に操作して染色体標本の作製を行う。染色体標本の作製では細胞の低張処理、固定、および染色を行う。単層培養の場合、3~6 時間の被験物質処理の終了時に分裂細胞（球形を呈し、単層表面から剥離しかけている細胞として認識される）が認められる。これらの分裂細胞は容易に剥がれるため、被験物質を含む培地を除去する際に失われる可能性がある。そのため、分裂細胞数が対照と比較して大幅に増加しており、分裂が停止している可能性がある場合は、分裂期にあつて染色体異常を形成している可能性のある細胞の喪失を避けるために、細胞回収の際に遠心分離によって細胞を集め、これを培養液に戻す必要がある。

分析

23. 陽性および陰性対照を含めたすべてのスライドをそれぞれコード化してから、染色体異常について顕微鏡下で分析を行う。細胞固定の操作により、染色体を欠落した分裂中期細胞を生ずることがままあるため、染色体モード数±2 のセントロメアを含む細胞を分析対象にする。
24. 被験物質が明らかに陰性であると結論するためには、300 個以上のよく広がった分裂中期細胞を濃度および対照ごとに計数する必要がある。複数系列の培養を使用する場合、300 個の細胞を各培養で均等に分割する。濃度別に 1 系列の培養を用いる場合、300 個以上のよく広がった分裂中期細胞をこの 1 系列の培養で計数する。300 個の細胞を計数することには試験の統計学的検出力を高める利点があり、またゼロ値が観察されることもほとんどない（わずか 5%と予測される）。染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことが
25. 染色体構造異常を有する細胞を、ギャップを含めた場合と除外した場合について計数する。染色分体型および染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）する。試験施設で使用する手順書には、染色体異常の分析について十分に訓練

を受けた計数者により実施されることおよび必要に応じてピアレビュー（第三者検証）を行うことを規定しておく必要がある。試験の目的は染色体構造異常を検出することであるが、倍数性および核内倍加の細胞が観察された場合には、それらの頻度を記録しておくことが重要である。

試験施設の習熟度

26. 試験を日常的に実施するに先立ち、その試験について十分な経験を積むため、異なる機序で作用する複数の標準的な陽性対照物質および種々の陰性対照（種々の溶媒／媒体を使用）による一連の実験を実施しておく必要がある。これらの陽性および陰性対照の反応は文献と一致すべきである。以上の要件は経験を有する試験施設、すなわち背景データベースが利用可能となっている試験施設には適用されない。陽性対照物質の選択に際しては、代謝活性化の非存在下での短時間および長時間処理、ならびに代謝活性化の存在下での短時間処理を用いて検討することにより、染色体構造異常誘発物質を検出でき、代謝活性化系の有効性を判定する習熟度を試験施設が有していることを証明する必要がある。試験系の感度および検出範囲を明らかにするため背景出現率を超え、かつ再現性のある濃度依存的な増加が観察されるように選択した物質の濃度範囲を設定する必要がある。

対照の背景データ

27. 試験施設は、下記について確立しておく必要がある：
- 陽性対照の背景データの範囲および分布
 - 陰性（無処理、溶媒）対照の背景データの範囲および分布
28. 最初に背景陰性対照の分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データがあれば、このデータと同時陰性対照のデータが一致していなければならない。対照の分布に追加する実験データの増加に伴い、同時陰性対照は、その分布の 95%管理限界の範囲内に収めるのが理想的である。試験施設の陰性対照の背景データベースは、最初は最低 10 回の実験によって構築すべきだが、できれば同等な条件下で実施された少なくとも 20 回の実験によって構築することが望ましい。試験施設は、管理図（例：C 管理図、X バー管理図）などの品質管理の方法を用いて、試験施設における陽性、陰性の両対照データの変動の様子を明らかにし、その試験方法が当該施設で「管理下にある」ことを示す必要がある。背景データの構築および使用の方法に関するさらなる推奨事項（すなわち、背景データにおけるデータの選択および除外基準ならびに所定の実験の許容基準）が、文献に示されている。
29. 実験プロトコールに変更がある場合は、試験施設の既存の対照背景データベースのデータとの整合性を考慮する。重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築すべきである。陰性対照のデータは、21 項で述べたように、1 系列で培養した培養細胞または 2 系列以上で培養した場合は合計した培養細胞における染色

体異常を有する細胞の出現率から構成される。同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベース分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。同時陰性対照のデータが 95%管理限界から外れた場合は、そのデータが極端な外れ値ではなく、試験系が「管理下にある」ことおよび手技的あるいは人為的なミスがなかったという証拠があれば、対照の背景データの分布に含めることができる。

データおよび報告

結果の提示

30. 染色体構造異常を有する細胞の割合 (%) を評価する。染色分体型および染色体型の異常を細分類 (切断、交換) し、それぞれについて処理群および対照群における出現数およびその頻度を記録する。ギャップは他の異常とは区別して記録・報告するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合 (%) を報告する。染色体異常を調べる本試験では、処理群、陰性対照群および陽性対照群のすべてについて細胞毒性を同時に測定、記録する。個々の培養のデータを示し、さらに、すべてのデータを表形式に要約する。

許容基準

31. 試験が許容できるかどうかは以下の基準に基づく。
 - 同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加できる。
 - 同時陽性対照は、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
 - 溶媒対照における細胞増殖基準が満たされている。
 - 3つの実験条件のうち、いずれかで陽性結果が得られていない限り、3つの条件すべてで試験を実施している。
 - 適切な細胞数および濃度数で分析可能である。
 - 最高濃度の選択基準が、上記に述べたものに適合している。

結果の評価および解釈

32. すべての許容基準が満たされている条件で、検討した実験条件のいずれかで以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陽性であると判定される。
 - a) 少なくとも1つの試験濃度で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められる。
 - b) 適切な傾向検定の評価で、用量依存性の増加が認められる。
 - c) 当該結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布 (例: ポアソン分布に従った 95%管理限界) から外れている。
33. 上記基準をすべて満たす場合、被験物質は本試験系で哺乳類培養細胞に染色体異常を誘発すると判定される。なお、最適な統計学的手法に関する勧告が文献に発表されている。

34. すべての許容基準が満たされている条件で、検討したすべての実験条件で以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。
- a) 試験した濃度のいずれにおいても、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められない。
 - b) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められない。
 - c) すべての結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った 95%管理限界）内に収まる。
- この場合、被験物質は、本試験系で哺乳類培養細胞に染色体異常を誘発しないと判定される。
35. 明らかな陽性反応または陰性反応については、確認の必要はない。
36. 得られた結果が上述したような明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、あるいは、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合には、専門家判断や追加試験によりデータを詳細に評価する必要がある。追加の細胞を計数（適切な場合）あるいは実験条件の変更（濃度間隔、他の代謝活性化条件[すなわち、S9の濃度またはその由来]）を考慮した再試験の実施が、有用な場合がある。
37. まれに、追加試験を行っても得られたデータセットからは陽性または陰性の結果に関して結論を出せず、そのため被験物質の反応が「不明確」と結論される場合もある。
38. 倍数性細胞の数の増加は被験物質に細胞分裂の過程を阻害する作用があり、その結果数的染色体異常を誘発する可能性があることを示している。核内倍加の細胞数の増加は被験物質に細胞周期の進行を阻害する作用がある可能性を示している。したがって、倍数性細胞の出現率と核内倍加の細胞の出現率は区別して記録する必要がある。

げっ歯類を用いる小核試験

参照ガイドライン：(OECD TG474) 哺乳類赤血球小核試験

試験法の概要

1. 適切な投与方法により動物を被験物質に曝露させる。骨髓を用いる場合、動物に処理した後、適切な時間に人道的に安楽死させて骨髓を採取し、標本を作製した後、染色する。末梢血を用いる場合、処理した後、適切な時間に採血し、標本を作製した後、染色する。急性投与の場合は、処理に起因する小核含有幼若赤血球の誘発が検出可能な骨髓または血液の採取時間を選択することが重要である。末梢血を採取する場合、小核を有する赤血球が循環血中で認められるのに十分な時間が経過している必要がある。標本は、顕微鏡による目視観察、画像解析、フローサイトメトリーまたはレーザーキャニングサイトメトリーのいずれかを用いて、小核の有無を分析する。

試験施設の習熟度の検証

習熟度の検討

2. 試験施設は表 1 に掲載されているような陽性対照物質を少なくとも 2 種類（低用量の陽性対照で誘発される弱い反応を含む）と適合性のある媒体／溶媒対照を用いて、小核の出現頻度について公表データから期待される結果を再現できる能力を有することを示す必要がある。これらの試験には再現性があり、用量依存的な増加が見られる複数の用量を用いて、対象組織（骨髓または末梢血）における試験系の感度および検出範囲を当該試験施設の計数方法を用いて検討する必要がある。以上の要件は、経験を有する、背景データが利用可能な試験施設には適用されない。

背景対照データ

3. 試験施設は、習熟度の検討の過程で以下を確立する必要がある。
 - 陽性対照の背景データの範囲および分布
 - 陰性対照の背景データの範囲および分布
4. 陰性対照の背景データの分布に関するデータを最初に得る際、用いた陰性対照群のデータは、公表されているものと一致している必要がある。分布の検討ではより多くの実験データが追加されるため、各陰性対照群の値は、背景データの分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。試験施設の陰性対照の背景データは、当該施設の陰性対照群のデータを確実に評価できるだけの統計学的頑健性を備えている必要がある。文献的には、最低でも 10 回の実験によって最初の構築を行う必要があるが、できれば同じの実験条件下で実施した 20 回以上の実験を含む方が望ましい。試験施設では、管理図（例：C 管理図または X バー管理図）などの品質管理方法を用いて、当該施設のデータにどの程度のばらつきがあるかを特定し、その試験方法が当該施設において「管理下にある」ことを示す必要がある。背試験を日常的に実施するに先立ち、その試験

について十分な実施経験を確立するため、景データの構築方法および使用方法（すなわち、背景データとしてのデータの選択基準および除外基準、ならびに所定の実験の許容基準）に関する詳しい勧告が、報告されている。

5. 習熟度の検討期間に、統計学的に頑健な陰性対照の分布を確立できるだけの十分な数の実験を完了できない場合、初期の日常的な試験の間に本分布の確立を行ってもよい。この手法を採る場合は、文献に提示されている推奨事項に従う必要があり、これらの実験で得られた陰性対照の結果は、公表されている陰性対照データと一致していなければならない。
6. 実験プロトコールに何らかの変更を加える場合には、その結果得られるデータと試験施設の既存の背景対照データとの整合性の維持に当該変更が及ぼす影響という観点から考察する必要がある。重大な不整合があった場合、専門家の判断により、分布が変更前のものと異なると判定された際には、新たな背景対照データベースを構築しなければならない。再構築を行う間、各陰性対照群の数値が以前のデータベースあるいは公表データと一致していることが証明できれば、実際に試験を実施する上で、完全な陰性対照の背景データベースが必要とされることはない。
7. 陰性対照データは、各動物における小核を有する幼若赤血球の出現率からなる。各陰性対照群のデータは、試験施設が有する陰性対照の背景データの分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。各陰性対照群のデータがこの 95%管理限界から外れた場合でも、そのデータが極端な外れ値でなく、試験系が「管理下にある」ことおよび技術的または人的な過誤がなかったことが証明される場合は、そのデータを背景対照の分布に含めてよい。

試験方法

準備

動物種の選択

8. 通常使用されている系統の健康な若齢成獣を使用する。マウス、ラットまたはその他の適切な哺乳動物が使用できる。末梢血を使用する場合、選択した動物種において、循環血中から小核を有する細胞が脾臓で除去されることで誘発された小核の検出が妨げられることがないことを確認しておく必要がある。これらのことは、マウスおよびラットの末梢血では明確に証明されている。ラットおよびマウス以外の動物種を使用する場合は、その科学的根拠を報告書に記載する。げっ歯類以外の動物種を使用する場合、小核誘発の測定を別の適切な毒性試験に組み入れて実施することが望ましい。

飼育および給餌条件

9. げっ歯類の場合、動物飼育室の温度は 22 °C (±3 °C) とする。相対湿度は 50~60% が理想的だが、常に 40%以上を確保し、飼育室の清掃時を除いて 70%を超えないことが望ましい。照明は人工照明とし、12 時間明期、12 時間暗期に設定する。給餌につ

いては、通常の実験動物用飼料を用い、飲水は自由摂取とする。被験物質を混餌投与する場合には、適切な混合飼料が得られるように飼料を選択する。げっ歯類では、攻撃行動が予期されない場合、同性の同一投与群の個体を少数（ケージあたり 5 匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した平底ケージの使用が望ましい。1 匹ずつの個別飼育は、科学的妥当性がある場合に限られる。

動物の準備

10. 通常は健康な若齢成獣（げっ歯類の場合、投与開始時に 6～10 週齢であることが望ましいが、この週齢を若干超えていても差し支えない）を使用し、対照群と投与群に無作為に割り付ける。各個体は、人道的で低侵襲の方法（例：足環、タグ、マイクロチップの装着あるいは生体認証が挙げられるが、耳パンチや指切法は用いない）により識別し、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。またケージは、位置による影響を最小限に抑えられるよう考慮して配置する。陽性対照と被験物質による交差汚染を防止する。試験開始時には、動物の体重のばらつきを最小限に抑え、雌雄ともそれぞれ平均体重の± 20%の範囲内に収まるようにする。

投与の準備

11. 固体の被験物質は動物に投与する前に、適切な溶媒／媒体に溶解／懸濁するか、飼料／飲水に混ぜる。液体の被験物質は直接投与するか、希釈してから投与する。吸入曝露の場合、被験物質は、その物理化学的性質に応じて気体、蒸気または固体／液体のエアロゾルとして投与できる。安定性データによって被験物質が保存可能なことが証明され、適切な保存条件が規定されている場合を除き、被験物質は用時調製する。

試験条件

溶媒／媒体

12. 溶媒／媒体は用いる量で毒性を示さず、被験物質との化学反応を起こすおそれのないものを用いる。性質が既知でない溶媒／媒体を用いる場合、適合性を示すデータによる裏付けが必要である。可能な限り、まず水溶性の溶媒／媒体の使用を検討することを推奨する。一般に用いられる適合性のある溶媒／媒体の例には、水、生理食塩液、メチルセルロース溶液、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩溶液、オリーブ油およびコーン油が挙げられる。特殊な溶媒／媒体を選択する場合、それによる小核および他の悪影響が生じないことを示した背景対照データまたは公表された対照データがないときは、本溶媒／媒体対照が使用できることを証明するための初期の試験を実施する必要がある。

対照

陽性対照

13. 通常は、試験毎に陽性対照物質で処理した動物群を設ける。ただし、試験施設が十分な習熟度を備えていることが示され、陽性対照の背景データの範囲が確立されている

場合はこの限りではない。同時陽性対照群を設けない場合は、実験ごとに計数対照（計数方法に応じた、固定した未染色スライドまたは細胞懸濁試料）を含める。これらは、試験施設において、定期的（例：6～18 ヶ月ごと。例として習熟度検証試験の間やその後必要に応じた定期的間隔）に別途実施する陽性対照実験で作製され保存された適切な標本を含めることで可能となる。

14. 陽性対照物質は、小核の出現頻度において、自然発生レベルと比較して検出可能な増加を確実にもたらすものでなければならない。顕微鏡を用いた目視での計数を行う場合、陽性対照の用量は、作用は明らかであるが、コード化された試料が測定者によって直ちに特定されないように選択する必要がある。陽性対照は、被験物質とは異なる投与スケジュールや異なる投与経路でもよく、単一時点の試料採取でも良い。また、適切な場合には、関連する化学物質クラスの陽性対照物質の使用を考慮してもよい。陽性対照物質の例を表 1 に示す。

表 1 陽性対照物質の例

物質名および CAS 番号
メタンスルホン酸エチル [CAS 番号 62-50-0]
メタンスルホン酸メチル [CAS 番号 66-27-3]
エチルニトロソ尿素 [CAS 番号 759-73-9]
マイトマイシン C [CAS 番号 50-07-7]
シクロホスファミド（一水和物） [CAS 番号 50-18-0 (CAS 番号 6055-19-2)]
トリエチレンメラミン [CAS 番号 51-18-3]
コルヒチン [CAS 番号 64-86-8] またはピンブラスチン [CAS 番号 865-21-4] — 異数性誘発物質として

陰性対照

15. 被験物質による処理を受けないことを除き、投与群と同様に取り扱う陰性対照群を各試料採取時点に設定する。被験物質を投与する際に溶媒／媒体を使用する場合は、陰性対照群にはこの溶媒／媒体を投与する必要がある。ただし、試験実施施設での各試料採取時点に陰性対照の背景データによって小核を含む細胞の個体間のばらつきおよび出現頻度に一貫性がある場合は、陰性対照については 1 回の試料採取を行うだけでよい。その場合の陰性対は、最初の試料採取時点とする。
16. 末梢血を使用する場合、短期間の試験については、得られたデータが試験実施施設の対照背景データベースと一致する場合、投与前の試料を同時陰性対照群の代わりに使用することができる。ラットの場合、処理前に少量の試料採取（例：100 μ L/日未満）を行っても小核の背景頻度は、ほとんど影響を受けないことが確認されている。

手順

動物数および性

17. 一般に、小核誘発反応の程度は雌雄の動物間で類似しており、ほとんどの試験は雌雄いずれかを用いて実施すればよい。雌雄間に意義のある違いがあることを示すデータ（例：用量設定試験等で、全身毒性、代謝、バイオアベイラビリティ、骨髄毒性に違いが見られる等）がある場合には、雌雄両性の使用が望ましい。この場合、例えば、反復投与毒性試験等の一部として雌雄を用いた試験を行うのが適切である。雌雄をともに用いる場合には、要因設計を用いるのが適切である。
18. 動物数は、1 群当たり雌雄いずれかの分析可能な動物を 5 匹以上、あるいは雌雄両性を用いる場合は、雌雄それぞれが 5 匹以上となるように設定する。化学物質に対するヒトの曝露に関して、例えばある種の医薬品のように性特異性が予想される場合、試験は適切な性の動物で実施する。動物の最大必要数の目安として、3 用量群および同時陰性対照群ならびに陽性対照群（各群ともいずれかの性の 5 匹から構成）を設け、設定しているパラメータに従って実施する骨髄を用いる試験では、25～35 匹の動物が必要となる。

用量段階

19. 用量選択に役立つ既存の入手可能な適切なデータがないために予備的な用量設定試験を実施する場合、同一試験施設において主試験に用いられるのと同じ動物種、系統、性および投与計画を用いて行う。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を特定することで、MTD とは、試験の実施を制限する毒性を示すことなく忍容性が認められる（例：体重減少や造血系の細胞毒性の誘発は認められるが、死亡や人道的な安楽死を必要とする疼痛、苦痛、疲弊の所見は認められない）最高用量と定義される。
20. 最高用量は、骨髄に毒性（例：骨髄または末梢血中の総赤血球に対する幼若赤血球の比率の減少。50%以上減少しても対照群の値の 20%以下とはならないようにする）をもたらす用量とも定義できる。しかし、末梢循環血中の CD71 陽性細胞を分析する場合（すなわち、フローサイトメトリーによる）、この非常に若い幼若赤血球画分は、幼若赤血球中のより大型の RNA 陽性を指標とする方法に比べ、毒性刺激に対してより迅速に反応する。したがって、CD71 陽性の幼若赤血球画分を検査する方が、RNA 含量に基づく幼若赤血球を特定する試験と比較してより明白な毒性が得られる。このため、投与期間が 5 日間以内の試験の場合、毒性を示す被験物質の最大投与量は、全赤血球数中に占める CD71 陽性幼若赤血球の割合を統計学的に有意に低下させるが、陰性対照群の値の 5%以下までは引き下げない用量と定義することができる。
21. トキシコキネティクスが飽和を示す物質または長期投与後に曝露量が低下するような解毒過程を誘導する物質は、用量決定基準の例外と考えられ、個別の状況により評価する。
22. 用量反応性に関する情報を得るために、陰性対照群および通常公比 2（ただし 4 を超

えない) による最低 3 用量段階を設ける必要がある。用量設定試験の結果、または既存のデータに基づき被験物質が毒性を生じない場合、最高用量は投与期間が 14 日以上の場合には 1000 mg/kg 体重/日、投与期間が 14 日未満の場合には 2000 mg/kg 体重/日とする。一方、被験物質が毒性を示す場合、MTD を最高投与量とし、用量段階は、この最大量から毒性をほとんどあるいは全く生じない用量までの範囲を含めるのが望ましい。試験したすべての用量で標的組織（骨髄）に対する毒性が認められた場合、非毒性用量での試験を追加することが望ましい。定量的用量反応性をより詳細に明らかにすることを意図した試験では、さらに多くの用量群が必要となる。特別な要件が適用されるある種の被験物質（例：ヒト用医薬品）の場合、限界量が上記とは異なる場合がある。

限度試験

23. 用量設定試験または関連する動物試験で得られた既存のデータで、少なくとも限界用量の投与により、明確な毒性作用が示されない場合（骨髄増殖の抑制または標的組織に対するその他の細胞毒性所見が認められないことを含む）、ならびに *in vitro* 遺伝毒性試験や構造的に関連のある物質のデータに基づき遺伝毒性が予測されない場合には、被験物質が標的組織（骨髄）に到達することが証明されていれば、3 用量段階を用いた完全な試験は必要ないと考えて良い。このような場合、限界用量のみの単一用量で十分である。14 日間以上の投与の場合、限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とし、投与期間が 14 日間未満の場合、限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする。

投与

24. 試験を計画する際には、想定されるヒト曝露経路を考慮する。このため、妥当性が示されれば混餌、飲水、局所皮下、静脈内、経口（強制）、吸入、気管内または埋植などの曝露経路が選択可能である。いかなる場合でも、標的組織が適切に曝露される経路を選択する。腹腔内投与はヒトで意図される曝露経路ではないため、通常は推奨されず、特別な科学的妥当性がある場合のみ用いる。被験物質を飼料または飲水に混ぜる場合、特に単回投与の試験では、餌や水の摂取と試料採取までの間隔を十分にとり、その作用が検出できるよう留意する必要がある。強制経口投与または注射により 1 回に投与できる液体の最大容量は、供試動物の大きさによって異なる。最大容量は、通常 1 mL/100 g 体重を超えないものとするが、水溶液の場合は、最大で 2 mL/100 g まで使用可能である。これを超える場合には、その妥当性を示す必要がある。通常、濃度が高くなるにつれて影響の増悪がみられる刺激性または腐食性の被験物質を除き、すべての用量段階で体重に対して一定の容量を投与できるよう濃度を調節して、投与容量のばらつきを最小限に抑える。

投与スケジュール

25. 投与は 24 時間間隔で 2 回以上実施するのが望ましく、本試験を他の毒性試験に組み込む場合には特に推奨される。別の手法として、科学的妥当性がある場合は（例：細

胞周期阻害が既知の被験物質)、単回投与での処理も可能である。大容量投与を容易にするため、被験物質を同日中に 2 回以上に分け、2~3 時間以内の間隔で分割投与することも可能である。このような場合あるいは被験物質を吸入投与する場合には、試料採取時点は最終投与時点または曝露終了時点に基づき設定する。

■ 試験は、マウスまたはラットを用い、次の 3 種類の方法のうちの 1 つで実施する。動物に被験物質を 1 回だけ投与する。骨髄の採取は、被験物質の半減期が極めて長い場合を除き、投与後 24 時間以降 48 時間を超えない間に適切な間隔で少なくとも 2 回(それぞれ独立した動物群から)実施する。投与後 24 時間以内に試料採取時間を設定する場合は、その根拠を示す必要がある。末梢血の試料採取は、投与後 36 時間以降投与後 72 時間を超えない間に適切な間隔で少なくとも 2 回(同一の動物群から)実施する。初回の試料採取時にはすべての投与群において試料を採取して解析する必要があるが、その後の試料採取時には最高用量のみ実施すればよい。1 回目の採取時で陽性反応が検出された場合、定量的な用量反応性に関する情報が必要な場合を除き、それ以上試料を採取する必要はない。記載した採取時期は、これら 2 種類の組織における小核の出現と消失の反応速度に基づくものである。

■ 連日の 2 回投与(例: 24 時間間隔で 2 回投与)を実施する。骨髄の場合、最終投与後 18 時間から 24 時間までの間に 1 回、末梢血の場合、最終投与後 36 時間から 48 時間までの間に 1 回、試料採取を行う。記載した採取時期は、これら 2 種類の組織における小核の出現と消失の反応速度に基づくものである。

■ 連日の 3 回以上の投与(例: 約 24 時間間隔で 3 回以上の投与)を実施する。骨髄試料は最終投与後 24 時間以内に、末梢血試料は最終投与後 40 時間以内に採取する。この投与方法は、コメント試験(例: 最終投与後 2~6 時間に試料を採取)と小核試験を組み合わせる場合および反復投与毒性試験に小核試験を組み込む場合に適している。蓄積されたデータから、3 回以上の投与を行った場合、上記の広い時間枠を通して小核誘発が認められることが示唆される。

26. 妥当でかつ科学的根拠がある場合や他の毒性試験への組み込みを容易とするためには、上記以外の投与または試料採取処方も使用できる。

観察

27. 1 日に少なくとも 1 回、投与後に予測される作用が最大となる時点を考慮に入れた上で、できる限り同じ時刻に動物の全身的な臨床観察を行い、一般症状を記録する。投与期間中は 1 日に少なくとも 2 回以上すべての個体を観察し、疾患や死亡が見られないかどうかを確認する。試験開始時、反復投与試験の場合は投与期間を通して週 1 回以上および安楽死処置時にすべての個体の体重を測定する。1 週間以上を要する試験の場合、摂餌量の測定を少なくとも毎週 1 回行う。被験物質を飲水に混ぜて投与する場合は、水消費量を水交換時毎および少なくとも毎週 1 回測定する。非致死性の過

剰な毒性症状を示した動物は、試験期間の完了前に人道的に安楽死させる。投与によって誘発される高体温または低体温の状況下では誤った結果がもたらされるため、動物の体温をモニターしてもよい。

標的組織の曝露

28. 曝露検証が必要とされ、曝露に関するデータが他にない場合には、骨髄が被験物質に曝露されていることを確認する目的で、被験物質の血漿中濃度測定のために、血液試料を適切な時点で採取する。

骨髄／血液の調製

29. 通常、動物を安楽死させた後、直ちに骨髄細胞を大腿骨または脛骨から採取する。一般に確立された方法で細胞の採取、標本作製および染色を行う。少量の末梢血を適切な動物福祉基準に従って、被験動物を生かしたまま尾静脈または他の血管から採血するか、安楽死処置時に心臓穿刺または大血管から採血する。骨髄由来、末梢血由来のいずれの赤血球についても、解析に用いる方法に従い、直ちに超生体染色を行うか、塗抹標本を作製して顕微鏡観察用に染色するか、あるいはフローサイトメトリー解析用に固定、染色を行う。DNA 特異的染色（例：アクリジンオレンジまたはヘキスト 33258 とピロニン-Y）の使用により、DNA 非特異的な染色で生じる偽小核を一部排除することができる。このことは従来の染色法（例：顕微鏡分析用のギムザ染色）の使用を妨げるものではない。その他のシステム（例：セルロースカラムによる有核細胞の除去）についても、そのシステムが試験施設における試料調製に適合することが示されていれば、使用できる。
30. 小核誘発機序が染色体構造異常誘発活性によるものか異数性誘発活性によるものかを決定するための、小核の由来（染色体全体か染色体断片か）の確認には、適切な DNA 対比染色を併用した、抗動原体抗体、汎セントロメア DNA プローブを用いる FISH あるいは汎セントロメア特異的プライマーを用いるプライムド *in situ* 標識が適用可能である。他の染色体構造異常誘発物質と異数性誘発物質の識別方法も、有効性が示されていれば利用できる。

分析（手動および自動）

31. 骨髄か血液かの種類を問わず解析を行う前には、解析用のスライドまたは試料を陽性および陰性対照を含めてすべて個別にコード化し、目視による測定者に処理条件が分からないようにランダム化する。ただし、操作者に由来するバイアスに影響されることのない自動測定システムを使用する場合には、このようなコード化は必要ない。各個体における全（幼若 + 成熟）赤血球中に占める幼若赤血球の割合は、骨髄の場合は合計で 500 個以上、末梢血の場合は 2000 個以上の赤血球について計数し、算出する。小核を有する幼若赤血球の出現率を算出するには、各個体につき 4000 個以上の幼若赤血球を計測する必要がある。陰性対照の背景データベースにより、試験施設における小核含有幼若赤血球の背景出現頻度が 0.1%未満の場合は、計数する細胞数の増加を考

慮する。試料の解析において、処理した動物の全赤血球に対する幼若赤血球の割合は、顕微鏡を用いて計数する場合は媒体／溶媒対照での割合の 20%を、フローサイトメトリ法により CD71 陽性幼若赤血球を計数する場合は媒体／溶媒対照での割合の約 5%を下回ってはならない。例えば、顕微鏡で計数を行う骨髄小核試験の場合、陰性対照群の骨髄における幼若赤血球の割合が 50%であったとすると、毒性の上限となる幼若赤血球の割合は 10%となる。

32. ラットでは小核含有赤血球が脾臓で捕捉されて壊されるため、ラット末梢血を解析する際には、検出感度を高く維持するために小核含有幼若赤血球の解析は最も幼若な画分に制限することが望ましい。自動解析法を用いる場合、この非常に幼若な赤血球は、高い RNA 含量または細胞表面で高レベルに発現しているトランスフェリン受容体 (CD71+) により識別できる。複数の異なる染色法を直接比較することにより、従来からのアクリジンオレンジ染色を含め、様々な方法により満足な結果が得られることが示されている。

データおよび報告

結果の処理

33. 動物のデータは、個体別に表形式で提示する。分析した各個体について、計数した幼若赤血球数、小核を含む幼若赤血球の数および全赤血球中に占める幼若赤血球の割合を示す。
34. マウスに 4 週間以上継続して投与する場合、小核を有する成熟赤血球の数および割合についてもデータがあれば示す。動物で見られた毒性および一般症状に関するデータも報告する必要がある。

許容基準

35. 以下に試験が許容できるか否かを判定するための基準を示す。
- 同時陰性対照群のデータが、試験施設の陰性対照背景データベースに追加できるとみなせること。
 - 同時陽性対照群または計数陽性対照群が、陽性対照の背景データベースと一致するものであり、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加していること。
 - 適切な投与用量数および細胞数の解析が行われていること。
 - 最高用量の選択基準が、記載の基準と合致していること。

結果の評価および解釈

36. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陽性と判定される。
- 少なくとも 1 つの投与群で、小核含有幼若赤血球の出現頻度が同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており、
 - この増加を適切な傾向検定で評価した場合に、少なくとも 1 つの試料採取時点で

用量依存性が見られる。さらに、

- 当該結果は陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。

最高用量のみを特定の 1 つの試料採取時点で検討する場合は、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められ、陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れていれば、被験物質は明らかに陽性であると判定される。適切な統計学的手法に関する勧告が示されている。用量反応性の解析を実施する場合は、3 用量以上の投与群を解析する必要がある。統計学的検定では動物個体を実験単位とする。小核試験の陽性結果は、被験物質が試験に用いた動物種の赤芽球において染色体または染色体分裂装置の損傷を誘起し、その結果、小核を誘発することを意味している。小核内のセントロメアを検出する試験を実施した際に、被験物質によりセントロメアを有する小核（セントロメア DNA または動原体、認められれば染色体の喪失を示す）が形成された場合は、この被験物質は異数性誘発物質であるといえる。

37. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陰性と判定される。

- いずれの投与群においても、小核含有幼若赤血球の出現頻度が陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さず、
- 適切な傾向検定で評価した場合、いずれの試料採取時点においても、用量依存性の増加がみられず、
- すべての結果が、陰性対照の背景データの分布（例：ポアソンモデルに基づく 95%管理限界）内に収まり、さらに、
- 骨髄が被験物質に曝露されている。

最適な統計学的手法に関する勧告が示されている。骨髄が被験物質に曝露されたことを示す所見には、成熟赤血球に対する幼若赤血球の割合の低下、あるいは被験物質の血漿中または血中濃度の測定等がある。静脈内投与の場合、曝露証明は必要ない。骨髄曝露を証明する別の方法として、同一の投与経路および動物種を用いて別に実施された試験で得られた ADME データを使用することも可能である。陰性の結果は、試験条件下において、被験物質が試験に用いた動物種の幼若赤血球に小核を誘発しないことを示している。

38. 明らかな陽性反応または明らかな陰性反応の場合、その結果を確認する必要はない。
39. 反応が明確な陰性でも陽性でもない場合に、結果の生物学的意義（例：弱いあるいは境界線上の増加）を明確にするには、専門家による試験データの判定やこれまでに完了した試験のさらに詳細な分析により評価する必要がある。場合によっては、さらに多くの細胞数での分析または実験条件を変更した再試験の実施が有用と考えられる。
40. まれに、より詳細な検討を行っても、被験物質が陽性、陰性のいずれか結論を出せず、

したがって、試験の結論が不明確 (equivocal) とされる場合がある。

(7) アレルゲン性 試験

化学物質を経口的に摂取した場合のアレルギー誘発能を予測する方法は十分に確立されておらず、特に、即時型アレルギーの誘発性を予測し得る方法は未確立であるが、添加物に係る知見、使用形態等を考慮した上で、専門家が適切と判断した感作及び惹起方法で試験を実施すべきである。当面は、少なくとも遅延型アレルギーを指標とするアレルゲン性試験を実施する必要があるが、モルモットを用いた皮膚感作性試験（例：OECD テストガイドライン 406 のうちマキシミゼーション試験 (GPMT)）又はマウスを用いたリンパ節反応試験（例：OECD テストガイドライン 429（局所リンパ節試験 (LLNA)））を利用することができる。なお、タンパク質を構成成分とする添加物のアレルゲン性の評価については、「添加物（酵素）に関する食品健康影響評価指針」に準じて行うこととする。

モルモットを用いた皮膚感作性試験

参照ガイドライン：(OECD TG406) 皮膚感作性

モルモットを用いた感作性試験の概要

1. まず皮内注射または表皮への適用によって試験動物を被験物質に暴露する（感作暴露）。10～14 日間の無処置期間（感作期間、この間に免疫応答が起きる）後、惹起暴露を行ない、それに対する試験動物の皮膚反応の広がりや程度を対照動物でみられるものと比較する。対照動物については感作時に模擬処置を行なったうえで惹起暴露を実施する。

モルモットを用いた感作性試験に共通する項目

動物の性

雄または雌の健康な若齢成熟動物を用いる。雌を用いる場合には未経産で非妊娠のものとする。

飼育および給餌条件

2. 動物飼育室の温度は $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度は 30～70%とする。人工照明を用いる場合には 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、モルモットには適切な量のアスコルビン酸を与える必要がある。

動物の準備

3. 動物は試験前に 5 日間以上、飼育室環境に馴化させる。試験前に動物を無作為化し、試験群に割り付ける。用いる試験方法に応じ、刈毛、剃毛、また場合によっては脱毛剤により除毛する。その際、皮膚を損傷しないように注意する。試験開始前および試験終了時に動物の体重を測定する。

信頼性のチェック

4. 軽度～中等度の皮膚感作性を有することが知られている物質を用い、使用する実験手法の感度と信頼性を 6 カ月ごとに評価する。
5. 適切に実施された試験では、軽度／中等度感作性物質に対してアジュバント試験で 30%以上、非アジュバント試験で 15%以上の反応が予測されるはずである。推奨物質はヘキシルシンナミックアルデヒド（CAS 番号 101-86-0）、メルカプトベンゾチアゾール（CAS 番号 149-30-4）およびベンゾカイン（CAS 番号 94-09-7）であるが、適切な理由があれば上記の基準を満たす他の対照物質を使用できる場合もある。

被験物質の除去

6. 被験物質の除去が必要と考えられる場合には、水または適切な溶剤を用いて行なう。その際、みられている反応や表皮の正常な状態を変化させないようにする。

モルモットマキシマイゼーション法

動物数

7. 被験物質処置群には少なくとも 10 匹、対照群には少なくとも 5 匹を用いる。被験物質処置群に 20 匹未満、対照群に 10 匹未満の動物を使用している場合で、かつ被験物質が感作性物質と結論できない場合には、被験物質処置群では少なくとも総数が 20 匹、対照群では少なくとも総数が 10 匹となるまで追加試験を行なうことが強く推奨される。

用量

8. 各感作暴露に用いる被験物質の濃度は、全身的に十分に耐性のある濃度で、軽度から中等度の皮膚刺激性を示す最高濃度とする。惹起暴露に用いる濃度は、刺激を示さない最高濃度とする。適切な濃度は 2 匹または 3 匹の動物を用いた予備試験で決定できる。この目的には FCA 処置動物の使用を考慮する。

感作：皮内注射

第 0 日 — 被験物質処置群

9. 除毛した肩部に 3 対の皮内注射 (0.1 mL) を行なう。その際、正中線のそれぞれの側に各対の一方ずつがくるようにする。
注射 1： FCA と水または生理食塩液の 1：1 (v/v) の混合物
注射 2： 適切な溶媒で所定濃度に調製した被験物質
注射 3： FCA と水または生理食塩液の 1：1 (v/v) の混合物で所定濃度に調製した被験物質
10. 注射 3 において、水溶性物質は水相に溶解してから FCA と混合する。脂溶性または不溶性物質は FCA に懸濁してから水相と混合する。被験物質の濃度は注射 2 で用いたものと同じとする。
11. 注射 1 と注射 2 は近接させて、かつ頭部に最も近い部分に行ない、注射 3 は試験区画の尾側に行なう。

第 0 日 — 対照群

12. 3 対の皮内注射 (0.1 mL) を被験物質処置動物と同じ位置に行なう。
注射 1： FCA と水または生理食塩液の 1：1 (v/v) の混合物
注射 2： 未希釈の溶媒
注射 3： FCA と水または生理食塩液の 1：1 (v/v) の混合物で 50% (w/v) に調製した溶媒

感作：貼付適用

第 5～7 日 — 被験物質処置群および対照群

13. 被験物質が皮膚刺激性物質でない場合には、貼付適用による感作の約 24 時間前に試

験区画を短く刈毛または剃毛した後、局所刺激を生じさせるため、10%ラウリル硫酸ナトリウム含有ワセリン 0.5 mL を塗布する。

第 6～8 日 - 被験物質処置群

14. 試験区画を再度除毛する。適切な溶媒で調製した被験物質をろ紙 (2 × 4 cm) に十分含ませた後、試験区画に適用し、48 時間閉塞貼付する。溶媒の選択には理由が必要である。固体は細かく粉碎し、適切な溶媒と混合する。液体の場合には適切であれば希釈せずに適用する。

第 6～8 日 - 対照群

15. 試験区画を再度除毛する。溶媒のみを同様の方法で試験区画に適用し、48 時間閉塞貼付する。

惹起：貼付適用

第 20～22 日 - 被験物質処置群および対照群

16. 被験物質処置動物および対照動物の腹側部を除毛する。被験物質を塗布したパッチまたはチャンバーを動物の一方の腹側部に適用し、必要であれば溶媒のみを塗布したパッチまたはチャンバーも他方の腹側部に適用する。パッチは 24 時間閉塞貼付する。

観察 - 被験物質処置群および対照群

17. - パッチ除去の約 21 時間後に惹起区画をきれいにし、必要があれば短く刈毛または剃毛、あるいは脱毛剤により除毛する。
 - 約 3 時間後 (惹起適用開始から約 48 時間後)、皮膚反応を観察し、以下に示した等級に従って記録する。
 - 上記の観察の約 24 時間後に 2 回目の観察 (72 時間後) を行ない、再度記録する。被験物質処置動物と対照動物の観察では盲検が推奨される。

表：惹起パッチテスト反応評価のための Magnusson and Kligman の等級付け

0 = 肉眼的変化なし

1 = 散在性または斑状の紅斑

2 = 中等度びまん性紅斑

3 = 強い紅斑と腫脹

再惹起

18. 初回惹起で得られた結果を明白にする必要がある場合には、適切であれば新たに対照群を設けて、初回惹起の約 1 週間後に 2 回目の惹起 (再惹起) を検討する。初回惹起に用いた対照群に対して再惹起を行なってもよい。

一般状態観察

19. 感作および惹起手順の結果生じたすべての皮膚反応および異常所見 (全身性の反応を含む) を観察し、記録する。疑わしい反応を確認するために他の方法 (病理組織学的

検査、皮膚のひだの厚さ測定など) を用いてもよい。

マウスを用いたリンパ節反応試験

参照ガイドライン：(OECD TG429) 皮膚感作性：局所リンパ節試験

試験の概要

1. LLNA の基本原理は、感作性物質が被験物質適用部位の流入領域リンパ節でリンパ球の増殖を惹起するということにある。この増殖は適用されたアレルゲンの用量および効力に比例し、感作性を定量的に測定できる簡単な方法となる。増殖は、各試験群の増殖の平均値と、媒体対照 (VC) 群の増殖の平均値との比較により測定される。各試験群の増殖の平均値と、同時 VC 群の増殖の平均値との比は、刺激指数 (SI) と呼ばれ、本指数が測定される。被験物質について、皮膚感作性物質の可能性ありとの分類が正当化される SI は、3 以上とする。本ガイドラインの記述は、*in vivo* 放射性標識法を用いて、流入領域耳介リンパ節の増殖細胞数の増加を測定する方法に基づいている。ただし、PS の要件が完全に満たされる場合、増殖細胞数評価のために別の評価項目を使用してもよい。

試験方法

動物種を選択

2. マウスが本試験の選択種になる。CBA/Ca または CBA/J 系統の未経産で非妊娠の若齢成熟雌マウスを使用する。試験開始時、動物は 8~12 週齢で体重のばらつきは最小限にし、平均体重の 20%を超えないこととする。ただし、LLNA 応答について、系統や性特異的に有意差がないことを示す十分なデータが得られる場合には、上記以外の系統や雄マウスを使用してもよい。

飼育および給餌条件

3. マウスを個別飼育する適切な科学的根拠がない限り、マウスは集団飼育する(23)。動物飼育室の温度は 22°C±3°Cとする。相対湿度は少なくとも 30%、できれば飼育室清掃時を除き 70%を超えないこととし、目標値を 50~60%とすべきである。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。

動物の準備

4. 動物を無作為に選び、個体識別ができるようにマーク（耳につけることは不可）し、投与開始前に 5 日間以上それぞれのケージに飼育して飼育室環境に馴化させる。投与開始に先立って、識別可能な皮膚損傷がないことを全ての動物で確認する。

投与液の調製

5. 固体の被験物質は溶媒／媒体に溶解するか懸濁させ、マウス耳介への適用前に必要に応じて希釈する。液体の被験物質は、投与前に希釈しなくても、希釈してから適用してもよい。医療機器に一般にみられる物質など不溶性物質は、適切な溶媒で過剰に抽

出し、試験において抽出可能な成分を全て明らかにしてからマウス耳介に適用する。
被験物質は、安定性データにより保存の許容性が認められない限り毎日調製する。

信頼性のチェック

6. 感作性を有する被験物質に対し、反応の大きさを明確に特徴づけるのに十分かつ再現可能な感度で反応させることにより、試験が適切に行われていることを示すには、陽性対照を用いる。同時 PC により、施設に各試験の実施を成功する能力があると証明され、施設内および施設間の再現性および相互比較の評価が可能になることから、同時 PC を含めることが推奨される。試験ごとに PC を置くよう要求する規制当局もあるので、ユーザーは LLNA 実施前に関連規制当局に相談することが奨励される。したがって、定期的な PC 使用から生じ得る要件を満たすため、追加的な動物試験の必要性を回避するには、同時 PC を定期的に用いることが奨励される。PC は、陰性対照 (NC) 群に比べて 3 を超える SI の増加が予測される曝露量において、LLNA 応答が陽性でなければならない。PC の用量は、過剰な皮膚刺激性も全身毒性も起こさず、感作性に再現性はあるが過剰 (すなわち SI が 20 を超える) にならないよう選択する。推奨される PC 物質は、25%ヘキシルシンナミックアルデヒド (CAS 番号 101-86-0、媒体はアセトン：オリーブ油 (4：1、v/v))、および 5%メルカプトベンゾチアゾール (CAS 番号 149-30-4、媒体は N,N-ジメチルホルムアミド) である (補遺表 1 参照)。状況により、十分な正当性がある場合には、上述の基準を満たす限り、他の PC 物質を使用することができる。
7. 同時 PC 群を含めることが推奨される一方、PC 物質の定期的な (すなわち 6 ヶ月以内の間隔での) 試験を行えば十分である状況が考えられる。そうした状況が考えられるのは、施設が LLNA を定期的に実施 (すなわち 1 ヶ月に 1 回ほどの頻度で LLNA を実施) し、また施設が背景 PC データベースを確立し、PC により再現性がある正確な結果を入手できることが立証される場合である。PC を用いて、妥当な期間内 (すなわち 1 年未満) に独立した試験を 10 回以上行い、一貫して結果が陽性であれば、LLNA の習熟度が十分であることを支障なく立証できる。
8. LLNA の手順に変更が生じた場合 (例えば、訓練を受けた人員の変更、試験法に用いる材料や試薬の変更、試験法に用いる機器の変更、供試動物供給元の変更)、常に同時 PC 群を含め、その変更事項を実験報告書に記載する。こうした変更が、変更前に確立された背景データベースの妥当性に及ぼす影響について、PC による結果の記録の一貫性から、新たな背景データベース確立の必要性を判断する際に検討すべきである。
9. PC 試験を同時ではなく定期的に行う判断については、それぞれの定期的な PC 試験の合間に同時 PC を置かずに得られた試験結果が陰性であると、その妥当性および許容性に影響が生じることを試験担当者は留意すべきである。例えば、定期的な PC 試験で偽陰性の結果が得られている場合、被験物質の結果が陰性であると、許容可能な最新の結果どおり偽陰性なのか、許容不能である真の陰性が得られたのか、その隔た

りに疑義が生じ得る。同時 PC を含めるか、定期的な PC 試験のみ実施するかを判断する場合、その結果が示す意味を慎重に検討すること。また、同時 PC 群に用いる動物の削減が科学的に正当化される場合、および施設特異的な背景データに基づいて用いるマウスの削減が施設により立証される場合、そのことも検討する。

10. PC 物質は、一貫した反応を示すことが知られている媒体（例えばアセトン：オリーブ油（4：1、v/v））で検討すべきであるが、ある種の規制条件下では、非標準的な媒体（臨床的／化学的に関連する製剤）を用いる試験が必要とされることも考えられる(24)。同時 PC 物質を被験物質とは異なる媒体で検討する場合、同時 PC とは別に VC を含める。
11. 特異的な化学クラスまたは反応範囲の被験物質が評価中である場合、そうしたタイプの被験物質について、試験法に、皮膚感作性の可能性の適切な検出機能があることを示すには、ベンチマーク物質が有用であることもある。適切なベンチマーク物質は、以下の特性を有する。
 - 対象とする被験物質のクラスに類似した構造および機能を有すること
 - 物理的／化学的特性が既知であること
 - LLNA から得られた裏づけデータがあること
 - 他の動物モデルやヒトから得られた裏づけデータがあること

試験の手順

動物数および投与量

12. 投与群あたり最低 4 匹の動物（被験物質あたり最低 3 濃度で）に加えて、被験物質用媒体のみで処置した同時 NC 群、および PC を設ける。複数の用量による PC 試験を、特に PC 試験を間欠的に行う場合には検討すべきである。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱い処置する。
13. 用量および媒体の選択は、参考文献(3)および(5)の推奨事項を基準とする。連続的な用量は、通常 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%など一連の適切な濃度から選択する。使用する一連の濃度選択には、適切な科学的根拠を伴うこと。既存の全ての毒性学的情報（例えば急性毒性および皮膚刺激性）、ならびに目的とする被験物質（あるいは構造的に関連する被験物質）の構造および物理化学的情報については、最大濃度により曝露量が最大になる一方、全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を回避するような連続 3 段階の濃度を選択する際、入手可能であれば検討すべきである。そのような情報がない場合、最初に予備スクリーニング試験を要することがある。
14. 媒体は試験結果の妨げや偏りとなつてはならず、被験物質の適用に適した溶液／懸濁液になると共に、達成可能な最大濃度を得るため、溶解度の最大化を基準に選択する。推奨される媒体はアセトン：オリーブ油（4：1、v/v）、N,N-ジメチルホルムアミド、メチルエチルケトン、プロピレングリコール、およびジメチルスルホキシドであるが、

十分な科学的根拠があればそれ以外の媒体を使用できる。ある種の状況下では、臨床的に関連する溶媒、または被験物質の市販製剤を追加的な対照として用いる必要があり得る。親水性物質は、適切な可溶化剤（例えば 1% Pluronic® L92）の混合により媒体系に取り込み、媒体系が皮膚を湿らせ直ちに流出しないよう特に注意を払うべきである。そのため、完全な水性媒体は回避する。

15. 個体マウスのリンパ節を処理することにより、動物間のばらつきの評価、および被験物質群と VC 群の測定値の差について統計学的比較が可能になる。また、個体マウスのデータを収集すると、PC 群のマウス数削減の可能性について検討できる。さらに、一部の国の規制当局では、動物の個体別データの収集を必要とする。それでも、規制当局によってはプールされた動物のデータを許容可能とみなすことがあり、そうした状況のガイドライン利用者には、個体かプールされた動物のデータのいずれを収集するか選択肢があると考えられる。

予備スクリーニング試験

16. 実施試験における最大投与量を決定する情報がない場合、LLNA での検討に適した投与量を定義するため、予備スクリーニング試験を行う。予備スクリーニング試験の目的は、全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こす濃度情報が入手できない場合、LLNA の主試験で用いる最大投与量を選択する手引きとすることにある。実施試験における最大投与量は、液体の被験物質では 100%、固体または懸濁液では可能な限り最大の濃度とする。
17. 予備スクリーニング試験は、リンパ節増殖の評価をしないこと、および投与群あたり用いる動物の削減以外、LLNA の主試験と同一条件下で実施する。投与群あたり 1 匹か 2 匹であることが示唆される。全てのマウスを対象に、全身毒性または適用部位の局所刺激性の徴候について毎日観察する。体重を試験前および終了前（第 6 日）に記録する。各マウスの両耳の紅斑を観察し、表 1 を用いてスコアを求める。耳介の厚さは、厚み計（例えば、デジタル式マイクロメータまたは Peacock Dial 厚み計）を用いて、第 1 日（投与前）、第 3 日（初回投与から約 48 時間後）、第 6 日に測定する。さらに、第 6 日に耳介の厚さを耳パンチ重量測定法により測定することが考えられるが、本測定法は動物を人道的に屠殺後実施する。過剰な局所皮膚刺激性は、いずれの測定日であっても、紅斑スコアが 3 以上あるいは耳介の厚さが 25%以上の増加により示される。LLNA の主試験で選択される最大投与量は、全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こさない一連の予備スクリーニング濃度の中で、最大の用量に次ぐ用量とする。

表 1：紅斑スコア

観察結果	スコア
紅斑なし	0

ごく軽度の紅斑（かろうじて識別できる）	1
はっきりした紅斑	2
中等度から重度の紅斑	3
重度の紅斑（ビート様の赤色）から紅斑を グレード付けできない痂皮形成	4

18. LLNA では、耳介の厚さが 25%上昇した場合(26)(27)に加え、投与マウスの耳介の厚さが対照マウスに比べ統計学的に有意に増加した場合も、刺激性物質の同定に用いられてきた。しかし、耳介の厚さが、統計学的に有意に増加する場合があっても 25%未満の場合には、過剰な刺激性との特異的な関連は認められていない。
19. 以下の一般状態の観察結果は、全体的な評価の一部として用いられた場合には全身毒性を示すと考えられ、したがって LLNA の主試験に用いる最大投与量を示し得る。神経系機能の変化（例えば、立毛、運動失調、振戦、痙攣）、行動変化（例えば、攻撃性、毛づくろい行動の変化、活動レベルの顕著な変化）、呼吸パターンの変化（すなわち、呼吸困難、喘ぎ呼吸、ラ音など呼吸の頻度および程度の変化）、ならびに摂餌量および摂水量の変化。なお、嗜眠や無反応の徴候、ならびに軽微または一時的な疼痛および苦痛を上回る徴候、あるいは 5%を超える体重減少が第 1 日～第 6 日に認められた場合、ならびに死亡については、評価の際に考慮すべきである。瀕死の動物、または明らかな疼痛もしくは重度の永続的な苦痛の徴候を示す動物は、人道的に屠殺する。

主試験の実験スケジュール

20. 本試験の実験スケジュールは以下のとおりである。

第 1 日：

個体識別を行い、各動物の体重および一般状態を記録する。被験物質、媒体のみ、または PC の適切な希釈液 25 μ L を耳背部に適用する。

第 2 日および第 3 日：

第 1 日に実施した適用手順を繰り返す。

第 4 日および第 5 日：無処置。

第 6 日：動物の個体ごとの体重を記録する。20 μ Ci (7.4 \times 10⁵ Bq) のトリチウム標識 (3H) -メチルチミジン含有滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 250 μ L を全ての被験マウスおよび対照マウスに尾静脈から注射する。代替として、125I-ヨードデオキシウリジン 2 μ Ci (7.4 \times 10⁴Bq) およびフルオロデオキシウリジン 10-5M 含有滅菌 PBS 250 μ L を全てのマウスに尾静脈から注射する。5 時間後、動物を人道的に屠殺

する。個体別に、各マウスの耳から流入領域耳介リンパ節を切除し同時に PBS 中で処理する（動物個体方式）。代替として、投与群別に、切除後各耳のリンパ節を PBS 中にプールする（プール処理群方式）。LLNA の主試験において、局所皮膚反応をさらにモニターするには、耳の紅斑のスコア化、または耳の厚さの測定（厚み計または剖検時の耳パンチ重量測定法により入手）など追加的なパラメータを本試験プロトコルに含めることができる。

細胞懸濁液の調製

21. 動物個体方式またはその代替法であるプール処理群方式により、両耳から切除されたリンパ節細胞（LNC）の単一細胞懸濁液は、200 ミクロンのメッシュステンレススチールガーゼまたは別の許容可能な単一細胞懸濁液作成法を通じ、穏やかな機械的分散により調製される。LNC は多量の PBS で 2 回洗浄し、5%トリクロロ酢酸（TCA）に 4° C で 18 時間放置して DNA を沈殿させる(3)。沈殿物を 1 mL の TCA に再懸濁し、3H 計数用のシンチレーション液 10 mL 含有シンチレーションバイアルに移すか、または 125I 計数用の γ 計数管に直接移す。

細胞増殖（取り込まれた放射能）の測定

22. 取り込まれた 3H-メチルチミジンは β シンチレーションカウンターで壊変毎分（DPM）として計測される。取り込まれた 125I-ヨードデオキシウリジンは 125I の計数により測定され、こちらも DPM として表される。使用した方式法により、取り込みは DPM/マウス（動物個体方式）、または DPM/投与群（プール処理群方式方式）として表す。

rLLNA

23. ある種の状況において、本 TG の他の LLNA プロトコル仕様を全て遵守している条件の下、皮膚感作性の可能性の予測が陰性であることを確認するよう規制上必要とされる場合、選択肢として動物の使用を削減する rLLNA プロトコル(16)(17)(18)を用いることができる。rLLNA 法の適用前に、rLLNA 法を用いる明確な正当性および科学的根拠を示すべきである。陽性または不明確な結果が得られた場合、その結果の解釈または明確化のため追加試験を要することがある。
24. 投与群の数の削減が、LLNA と rLLNA 法プロトコルとの唯一の差であり、このため rLLNA は用量反応情報を提示しない。したがって、rLLNA は用量反応情報が必要とされる場合、用いるべきではない。複数の用量を用いる LLNA と同様、rLLNA で評価される被験物質の濃度は、マウスに明確な全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こさない最大濃度にすべきである。

観察

一般状態観察

25. 各マウスの適用部位における局所刺激性、あるいは全身毒性に関する徴候の有無につ

いて、少なくとも 1 日 1 回注意深く観察する。個体別に続けられている記録については、全ての観察事項を体系的に記録する。モニタリング計画には、安楽死を支持する全身毒性、過剰な局所皮膚刺激性、または皮膚腐食性を示したマウスを直ちに同定する基準について記載する。

体重

26. 動物の個体ごとの体重は試験開始時および予定された人道的屠殺時に測定する。

結果の算出

27. 各投与群の結果を SI として表す。動物個体方式を用いた場合、SI は各被験物質群および PC 群内の平均 DPM/マウスを、溶媒/VC 群の平均 DPM/マウスで除算することによって得られる。したがって、VC 群の平均 SI は 1 になる。プール処理群方式を用いた場合、SI は各投与群のプールされた放射能取り込みを、VC 群のプールされた取り込みで除算することによって得られ、これにより平均 SI が求められる。
28. 判断の過程では、SI が 3 以上の場合、結果を陽性とみなす。ただし、境界線上の結果が陽性を示すか判定する場合、用量反応の強さ、統計的有意性、ならびに溶媒/媒体および PC の反応の一貫性が用いられることもある。
29. 得られた結果を明らかにする必要がある場合、被験物質の様々な特性、すなわち既知の皮膚感作性物質と構造的な関係があるかどうか、マウスに過剰な局所皮膚刺激性があるかどうか、また認められた用量反応関係の性質などを考慮すべきである。上記その他の考慮事項については、詳細な議論が行われている。
30. 放射能に関するデータをマウス個体レベルで収集すると、データにおける用量反応関係の存在および程度について統計解析が可能になる。統計による評価には、用量反応関係の評価や、適切に調整された被験群の比較（例えば、投与群対同時 VC 群の対比較）などが挙げられる。統計解析には、例えば用量反応の傾向の評価には直線回帰やウィリアムズ (Williams) 検定、対比較にはダネット (Dunnett) 検定が挙げられる。適切な統計解析法を選択する際、分散の不均一性、またそれ以外にデータ変換やノンパラメトリック統計解析を必要とし得る統計関連の問題が起こる可能性があることを、試験担当者は留意すべきである。いずれの場合も、試験担当者は、特定のデータポイント（「外れ値」と呼ばれることもある）を含める場合と含めない場合とで、SI の算出および統計解析を行う必要があると考えられる。

データおよび報告

データ

31. データは表形式にまとめる。動物個体方式を用いた場合、動物の個体別の DPM 値、群の平均 DPM/動物、平均値と関連する誤差項（例えば SD、SEM）、および同時 VC 群と比較した各投与群の平均 SI を示す。プール処理群方式を用いた場合、DPM の平均値/中央値、および同時 VC 群と比較した各投与群の平均 SI を示す。

(8) 一般薬理試験

本試験は、被験物質の生体の機能に及ぼす影響を、主に薬理学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

本試験では、実施すべき試験項目を、A. 原則として全ての被験物質について行うものと、B. 前記Aの結果より判断し、必要に応じて行うものに分類した。

また、被験物質の化学構造や得られている毒性等の情報・知見から判断し、必要と思われる試験を追加実施することも考慮する。

なお、試験のあり方は、被験物質の特性によって異なることが十分考えられるので、試験項目及び試験方法は被験物質ごとに適切なものを選択する。

1. 試験動物及び試験系

マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ（ミニブタ）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、汎用性に留意する。

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。

2. 適用法

(1) 適用経路

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とする。

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を用いる。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。

(2) 適用回数

丸ごと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。

(3) 用量設定

用量設定に当たっては、以下の点を考慮する。

- (1) 用量作用関係を求め得る用量段階を設定する。
- (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。

(4) 対照群

対照群には、陰性対照（溶媒）群及び陽性対照（標準物質、作用既知の類似物質）群を適宜設ける。

3. 試験項目

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

(1) 一般症状及び行動に及ぼす影響

一般症状について観察する。

詳細な症状観察を行い、被験物質の作用を十分把握することに努める。

(2) 中枢神経に及ぼす影響

(1) 自発運動量に及ぼす影響を検討する。

(2) 麻酔作用について検討する。

無処置動物について被験物質の作用を検討するとともに、必要に応じて、バルビツール酸誘導体等による誘発処置との協力及び拮抗作用についても調べる。

(3) 痙攣作用について検討する。

無処置動物について被験物質の作用を検討するとともに、必要に応じて、電撃、ペンテトラゾール等による誘発処置との協力及び拮抗作用についても調べる。

(4) 痛覚に及ぼす影響を検討する。

(5) 体温に及ぼす影響を検討する。

(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する。

被験物質単独の作用及びアゴニスト（ヒスタミン、アセチルコリン、塩化バリウム、セロトニン等）との相互作用を調べる。

(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を検討する。

通常は麻酔動物が用いられる。必要に応じ、無麻酔動物についても調べる。

(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する。

腸管内輸送能について調べるが、必要に応じて胃内容排出能についても検討する。

(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する。

(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を検討する。

必要に応じ、得られたデータについてコンピューターを用いて解析を行う。

(2) 脊髄反射に及ぼす影響を検討する。

(3) 条件回避反応に及ぼす影響を検討する。

(4) 協調運動に及ぼす影響を検討する。

(2) 体性神経系に及ぼす影響

(1) 神経・筋接合部に及ぼす影響を検討する。

(2) 筋弛緩作用について検討する。

(3) 知覚神経に及ぼす影響について検討する。

(3) 自律神経系及び平滑筋に及ぼす影響

(1) 瞳孔径に及ぼす影響を検討する。

(2) 血管、気管、輸精管、子宮等の摘出器官・組織を用いて検討する。

(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作用薬による血圧及び心拍数の変化に対する作用を検討する。

(2) 生体位心臓を用いて検討する。

(3) 心臓、心房、乳頭筋、血管床等の摘出器官・組織を用いて検討する。

(5) 消化器系に及ぼす影響

- (1) 胃液、唾液、胆汁及び膵液分泌に及ぼす影響を検討する。
- (2) 摘出胃・腸管を用い、その運動に及ぼす影響を検討する。
- (3) 生体位胃・腸管を用い、その運動に及ぼす影響を検討する。
- (4) 胃・十二指腸粘膜に対する作用を検討する。

(6) その他の作用

- (1) 血液凝固系に及ぼす影響を検討する。
- (2) 血小板凝集に対する作用を検討する。
- (3) 溶血作用について検討する。
- (4) 腎機能に及ぼす影響を検討する。