

哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（案）

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる被験物質の一般毒性及び生殖発生毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物^(注1)

1-1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1-2 週齢

ラットでは、交配開始時に性成熟期^(注2)に達している週齢とする。投与開始に際しては、体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の±20%以内とする。また、雌動物については、未経産で正常な性周期^(注3)を示している動物を使用する。

1-3 動物数

交配群については、各群雄及び雌それぞれ10匹以上とし、著しい毒性影響が認められる場合を除き、妊娠末期において1群8匹以上の妊娠動物を確保する。また、雌については少なくとも対照群及び最高用量群について、それぞれ5匹以上で構成される非交配群を設けることが望ましい。なお、途中解剖を行う場合は、それに要する数の動物をあらかじめ加えておくものとする。また、投与終了後少なくとも14日間飼育し、変化の可逆性及び持続性、遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ5匹以上で構成される回復群を、少なくとも対照群及び最高用量群にそれぞれ設けることが望ましい^(注4)。

1-4 交配方法

雌動物は、交尾が確認されるまで同じ試験群の同一の雄動物と1対1で同居させる。交配期間は14日間を限度とする^(注5)。

2 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量^(注6)

被験物質投与群は原則として3段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に1段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000 mg/kg/dayとする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の摂取量が1000 mg/kg/dayに相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で3用量を用いなくてもよい。

2-3 投与期間

雌雄に少なくとも交配前14日間投与する。雄^(注7)及び雌の非交配群については合計で少なくとも28日間以上、雌の交配群については交配期間、妊娠期間及び剖検前日(分娩完了確認日を分娩後0日とした場合、分娩後13日)まで、原則として連続投与する^(注8、9)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注10)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注11、12)。さらに、詳細な観察を、投与期間前に1回以上、その後は少なくとも週に1回、全ての親/成熟動物について行い、記録する^(注13、14)。

さらに、次の事項について検査する。

3-1 親/成熟動物

3-1-1 死亡率

3-1-2 体重、摂餌量及び摂水量(被験物質を飲料水に添加した場合)^(注15)

3-1-3 機能検査^(注16)

3-1-4 性周期^(注3)及び妊娠期間^(注17)

3-1-5 血液検査^(注18)

3-1-5-1 血液学的検査^(注19)

3-1-5-2 血液生化学的検査^(注20、21)

3-1-6 尿検査^(注22)

3-1-7 病理学的検査

3-1-7-1 肉眼的検査及び器官重量^(注23、24)

3-1-7-2 病理組織学的検査^(注25)

3-2 児動物^(注26、27)

3-2-1 生存児検査^(注28、29、30)

3-2-2 剖検時検査^(注31)

3-2-3 血液検査^(注32、33)

3-2-3-1 血液生化学的検査^(注21)

3-3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となった瀕死の動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4 結果報告

試験の結果は様式5によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

- (注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。
- (注2) 性成熟期は系統により異なるので注意する。
- (注3) 交配群の全ての雌動物について、性周期を投与前期間の2週間を含め交尾まで毎日観察し、記録する。膣垢を採取する際は子宮頸部の刺激による偽妊娠を引き起こさないように注意する。
- (注4) 雄については、投与終了時に各群それぞれ少なくとも5匹以上を選択し、回復群としてもよい。雌については、別途回復群として、交配させない群を設定する。
- (注5) 雌動物については、毎朝膣垢中の精子又は膣栓の検査を行い、精子又は膣栓が認められた日を妊娠0日とする。
- (注6) 用量設定に際しては、全身的な毒性（例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など）や毒性と断定できない変化が観察された場合には、内分泌関連の影響についても考慮する。
- (注7) 交尾が確認できなかった、又は雌を妊娠させ得なかった雄について、無処置の成熟雌と再交配する場合などは、それを考慮して適切な時期まで雄を飼育しその間投与を継続する。
- (注8) 被験物質を吸入又は経皮暴露する場合、雌については少なくとも妊娠19日まで暴露し、分娩後4日までに暴露を再開する。
- (注9) 交尾が確認できなかった雌についても投与を継続し、交配期間の最終日の24日から26日後に安楽死させた後、剖検する。
- (注10) 少なくとも1日に2回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。
- (注11) 少なくとも1日に1回（毒性の徴候が観察された場合はより頻繁に）、投与により予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。
- (注12) 母動物については、妊娠期における分娩の障害又は遅延の徴候、授乳期における哺育行動等、児動物については、形態、哺乳状態及び行動の異常がないかを確認する。
- (注13) 観察は飼育室内又はそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場において行う。試験施設で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験条件のばらつきを最小にするよう配慮する。観察は投与内容について知らされていない観察者が実施することが望ましい。
- (注14) 少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜の状態、分泌物及び排せつ物、自律神経系への影響を示す反応（流涎、流涙、立毛、縮瞳・散瞳、異常呼吸等）を観察する。また、間代性・強直性痙攣、常同行動（過度の身づくろい、反復旋回運動等）、異常行動（自傷行動、後ずさり等）の有無と共に、歩行、姿勢及びハンドリングへの

反応に異常がないかを確認する。

(注15) 投与開始日、その後週に1回以上及び解剖時に体重を測定する。交尾が成立した雌については、妊娠0日、7日、14日及び20日、分娩後0日、4日及び13日に体重を測定する。また、摂餌量及び摂水量については、原則として週1回以上測定する。

(注16) 試験期間中の適切な時期（母動物については授乳期に児動物への影響に十分配慮した上で適切に、その他の動物については剖検を実施する週に行うのが望ましい。）に1回、全ての群の雄及び雌のそれぞれ少なくとも5匹以上について、異なる種類の刺激に対する感覚応答（聴覚、視覚、深部知覚等）、握力の測定及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って行う。影響が認められた場合には、回復2週目にも同様に検査する。

(注17) 妊娠期間について、妊娠0日から起算する。

(注18) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に全ての雄及び雌動物について採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。

(注19) 全ての群の雄及び雌についてそれぞれ少なくとも5匹以上（母動物については投与期間を十分に考慮して選択することが望ましい。）について、次の項目を検査する。

赤血球数、網状赤血球率、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数、その他の血液凝固能の指標など。

なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間等がある。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えばメトヘモグロビン濃度、ハイツ小体等についても検査する。

(注20) 全ての群の雄及び雌についてそれぞれ少なくとも5匹以上（母動物については投与期間を十分に考慮して選択することが望ましい。）について、次の項目を検査する。

総たん白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す2種以上の酵素（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、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ等）、胆汁酸など。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、総ビリルビン等についても検査する。

(注21) 生後13日（出生日を生後0日とする。）児動物及び成熟雄動物について血清T

4濃度を測定する。関連性がある場合、母動物及び生後4日児動物についてもT4測定する。必要に応じて、他のホルモン濃度の測定を検討する。T4及びTSHなど甲状腺ホルモン測定のために、児動物の血液は同腹ごとにまとめて、総量として測定することが望ましい。甲状腺ホルモン（T3及びT4）及びTSHを測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス20℃以下で保存する。

(注22) 原則として、雄及び雌（非交配群）について、各群それぞれ少なくとも5匹以上、剖検を実施する週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、pH、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

(注23) 解剖に当たり、臃垢を採取し、全ての雌の性周期を特定し、エストロゲン感受性組織の病理組織学検査の結果との関連性を検討する。

(注24) 原則として、最終投与の翌日（回復群については回復期間終了後）に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を、特に生殖器官に十分に注意を払いながら行う。雌の交配群については着床痕数を記録する。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する（例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。）。全ての肉眼的病変部、脳*（大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位）、下垂体、脊髄、眼球、顎下腺、甲状腺*（上皮小体を含む。）、心臓*、気管及び肺（固定液を注入後浸漬）、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、膵臓、副腎*、胃、小腸及び大腸（パイエル板を含む。）、生殖腺（精巣*又は卵巣*）、副生殖器（前立腺*、精嚢*（凝固腺を含む。）、精巣上体*、子宮*（子宮頸部を含む。）、膣、膀胱、リンパ節（投与経路に関連するリンパ節及び試験施設の経験に従ってその他のリンパ節を採取する。）、筋肉に近い末梢神経（坐骨神経又は脛骨神経）、骨格筋、骨、骨髄（大腿骨）及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官・組織。

なお*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。ただし、妊娠した雌の子宮の測定は任意とする。また、必要に応じて、肛門挙筋-球海綿体筋複合体、カウパー腺及び陰茎亀頭の重量を測定する。

(注25) 交配群及び非交配群の最高用量群及び対照群について各群（回復群を除く。）雄及び雌それぞれ少なくとも5匹以上の保存した全ての器官及び組織について病理組織学的検査を行う。特に、卵巣、精巣及び精巣上体（精子形成過程と精巣の間質細胞に注意を払う。）について詳細に検査する。また、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官・組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

回復群では、少なくとも投与群で投与期間終了時に影響の認められた器官・組織及び、特に回復期間に変化が認められた場合には関連する器官・組織についても検査する。

- (注26) 各母動物について出産後の可能な限り早い時期に出産生児及び死産児の数及び性別並びに肉眼による外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の有無を調べる。
- (注27) 生後4日に同腹児動物の匹数が雌雄各4～5匹になるように余分な児動物を無作為に取り除いてもよい。各腹あたり雌雄各4～5匹に調整できない場合には、総数を8～10匹に調整する。体重や肛門生殖突起間距離などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切でない。
- (注28) 出産直後又は出産後の早い時期、生後4日及び生後13日に児動物の数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。
- (注29) 肛門生殖突起間距離を、生後0日から4日の間の同一日に測定する。測定日の体重の立方根で補正する。
- (注30) 生後12日又は13日に雄の児動物の乳頭数/乳輪数を算出する。
- (注31) 死亡児及び生後13日などに安楽死させた児動物について肉眼による外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の検査をする。生後13日児動物について同腹の雌雄それぞれ1匹以上の甲状腺を保存し、必要に応じて病理組織学的検査を行う。
- (注32) 生後4日児動物について、同腹児動物の匹数が8～10匹より多い場合には、同腹ごとに可能な限り2匹以上を安楽死させ、採血する。同腹児動物の匹数が8～10匹に欠ける場合には安楽死及び採血は行わない。
- (注33) 生後13日に安楽死させた児動物について同腹の少なくとも2匹以上から採血する。