

< 化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験 >

ここでは、化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験の標準となるべき方法について規定する。

## 総則

### 1 試験動物

試験動物は原則として、哺乳類の中から選択し、その出所、系統又は品種の明らかなものを使用する。また、特殊な試験を除いては、年齢による影響（幼若又は加齢による影響）の少ないものであることが必要である。また、ヒトにおいて被験物質の代謝様式が知られている場合には、代謝様式がヒトと類似した動物を用いることが望ましい。

試験動物は原則として、各試験間で共通の動物種、系統又は品種を用いる。更に、適正な飼育条件下における自然発生病変の種類及び頻度が知られている系統を用いることが望ましい。

### 2 飼育管理

長期間動物を飼育する場合には、特に管理条件（温度、湿度、換気、照明等の飼育環境、飼料等）を適切に保ち、感染症等を発生させないように注意する。

### 3 被験物質

被験物質を飼料等に添加して投与する場合には、添加後の被験物質の均一性、添加濃度及び安全性について十分留意するとともに一定期間ごとに確認する。また、被験物質を溶媒等に溶解、懸濁又は乳化させた場合等にも被験物質の濃度及び安定性について明らかにしておく。

### 4 対照群

被験物質を飼料等に添加して投与する場合には、被験物質を除いた飼料等を与えて飼育する対照群をおく。また、溶媒、懸濁化剤、乳化剤等を用いて投与した場合には、対照群として溶媒、懸濁化剤、乳化剤等のみを含む飼料等を与えて飼育する群を設けることが望ましい。なお、被験物質の添加が高濃度の場合には、栄養バランスについて考慮することが必要である。

### 5 予備試験

あらかじめ被験物質のおおよその毒性を把握するために、急性毒性試験を行ったのち、他の予備試験を実施する。（ただし、哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験の結果を用いることができる場合には、この限りでない<sup>(注)</sup>。)

## 6 その他

用量設定などのために行われた予備試験の結果も同時に報告書として提出する。

(注) 急性毒性試験及び1～3ヶ月の短期の予備試験は、OECD Test Guideline (OECD 理事会決定 [ C (81) 30 最終別添 1 ] ) 402、403、420、423 及び 425 並びに 407～413、及び哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験等を参考にして実施することが望ましい。

### 慢性毒性試験

#### 目的

本試験は、動物に被験物質を長期連続投与したときに現れる生体の機能及び形態等の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

#### 1 試験動物

##### 1 - 1 動物種及び性

1～3か月の短期の予備試験で用いたものと同種のマウス、ラット等2種以上の雄及び雌を用いる。このうち1種は非げっ歯類であることが望ましい。

##### 1 - 2 年齢

マウス、ラット等の寿命の短い動物種では、5～6週齢の体重のそろったものを用い、寿命の比較的長い動物種では、マウス、ラット等におおむね対応する年齢のものを用いる。

##### 1 - 3 動物数

マウス、ラット等では、各群雄及び雌それぞれ20匹以上を用いる。非げっ歯類では、各群雄及び雌それぞれ4匹以上を用いる。なお、マウス、ラット等について途中で屠殺して検査を行う場合には、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。

#### 2 被験物質

##### 2 - 1 投与方法

原則として経口投与で行う。被験物質は飼料又は飲料水に添加して投与することが望ましい。なお飼料に添加する被験物質の濃度は5W/W%以下とする。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、非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

##### 2 - 2 用量

用量と作用との関係を知るために、投与量は3段階以上とする。

あらかじめ1～3か月の短期の予備試験を行い、多数の死亡例を引き起こすことなく、被験物質による何らかの毒性影響が認められる量を最高用量とする。

最低用量は試験期間を通じて動物に影響が発現しない量とする。別に対照群をおく。なお、実際の被験物質摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出す

る。

## 2 - 3 投与期間

12 か月以上とする<sup>(注1)</sup>。

## 3 観察・測定事項

原則として、次の事項について観察を行う。

### 3 - 1 一般状態、死亡率

### 3 - 2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率<sup>(注2)</sup>

### 3 - 3 血液検査

#### 3 - 3 - 1 血液学的検査<sup>(注3)</sup>

#### 3 - 3 - 2 血液生化学的検査<sup>(注4)</sup>

### 3 - 4 尿検査<sup>(注5)</sup>

### 3 - 5 病理学的検査

#### 3 - 5 - 1 肉眼的観察及び器官重量<sup>(注6)</sup>

#### 3 - 5 - 2 顕微鏡的観察（必要に応じて電子顕微鏡による検査又は組織化学的検査を行う。）<sup>(注7)</sup>

### 3 - 6 その他の必要な事項

試験中死亡した動物についてはその死因を調べる。また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺解剖を行う。

(注1) マウス、ラットでは、少なくとも投与期間の中間時点で1回、雄雌それぞれ5匹以上を用いて、実験終了時に行う検査と同様の諸項目について検討することが望ましい。

(注2) 摂水量については、被験物質を飲料水に混ぜて投与するときのみ測定し、食餌効率については、動物の成長期間中は算出することが望ましい。

(注3) 一般的に行われている血液学的検査の項目は次のとおりである。各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法と測定単位を採用する。このほか、毒性との関連性が示唆される項目についても検査することが望ましい。

赤血球数、網状赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、白血球百分率、血小板数など。

(注4) 一般的に行われている血液生化学的検査の項目は次のとおりである。各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法と測定単位を採用する。このほか、毒性との関連性が示唆される項目についても検査することが望ましい。

総蛋白、A/G比、血糖、トリグリセライド、リン脂質、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、Na、K、Cl、Ca、P、GOT、GPT、LPH、アルカリホスファターゼ、クレアチンホスホキナーゼ、 $\gamma$ -GTP、オルニチンデカルボキシラーゼなど。

(注5) 尿量、pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン及びビリルビンの半定量試験を行い、必要に応じて沈渣の顕微鏡的検査を行う。

(注6) 試験に使用したすべての動物（途中死亡及び途中屠殺した動物も含む。）を解

剖し、全器官・組織について十分な肉眼的観察を行う。(注7)において示すすべての器官・組織を全群について適当な保存液中に保存する。

(注7)において\*印を付した器官・組織について、その重量を測定する。

(注7) 病理組織学的検査を必要とする器官・組織は次のとおりである。本検査は最高用量群と対照群について実施し、最高用量群で変化が認められた器官・組織については他の用量群についても検査を実施する。

脳\*、脊髄、末梢神経、下垂体\*、眼球、鼻腔(#)、肺\*(気管支を含む。)、舌、食道、胃、小腸、大腸、皮膚、唾液腺、リンパ節、甲状腺(上皮小体を含む。)、胸腺、心臓\*、肝臓\*、膵臓、脾臓\*、腎臓\*、副腎\*、膀胱、精巣\*、精のう、前立腺、乳腺(雌)、卵巣\*、子宮、胸骨(骨髄を含む。)、椎骨又は大腿骨(関節を含む。))及び肉眼的に変化の認められた器官・組織。

(#)吸入試験の場合は、鼻腔、咽頭、喉頭及び気管。

## 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験

### 目的

本試験は、動物の雄及び雌に被験物質を多世代にわたり投与し、被験物質の生殖能及び後世代の発生に及ぼす障害を明らかにすることを目的とする。

### 1 試験動物

#### 1 - 1 動物種

##### 1 - 1 - 1

ラット又はマウスなど1種以上とし、の催奇形性試験に用いられるもののうちから選ぶ。

動物種、系統又は品種の選択に当たっては、受胎能など生殖に関連する知見、自然発生奇形の発生頻度、既知生殖・発生毒性物質に対する感受性などを考慮する。また、自然発生奇形の発生頻度の低いものを選択することが望ましい。

##### 1 - 1 - 2

慢性毒性試験と同じ動物種を用いる場合は、その系統が同一であるものを選択することが望ましい。

##### 1 - 1 - 3

ラット又はマウス以外の動物種を用いるときは、この指針は試験の目的にかなうよう適切な修正を必要とする。

#### 1 - 2 動物数

ラット又はマウスでは、被験物質を投与しない対照群において、20匹程度の妊娠動物を得られることが期待される数の雌と同数の雄を用意する。

### 2 被験物質

#### 2 - 1 投与方法

原則として、経口投与で行う。被験物質は飼料又は飲料水に添加して投与することが

望ましい。なお、飼料に添加する被験物質の濃度は 5W/W% 以下とする。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で行う。

## 2 - 2 用量

用量・反応関係を知り、最大無作用量を推定するために、少なくとも 3 段階の用量の試験群を設定する。最高用量は、親世代動物 ( $F_0$ ) に摂餌量の低下や体重増加の抑制などの若干の毒性徴候が示されるが 10% 以上の死亡率をきたさない量とする。

最低用量は、生殖能及び後世代の発生に毒性影響を及ぼさない量とする。別に対照群をおく。

## 3 交配と被験物質の投与

### 3 - 1

$F_0$  は、5~8 週齢頃までに被験物質の投与を開始し、原則として、10 週間 (マウスでは 8 週間) 以上の間、連日投与したのち交配にあてる。

同一の雄と雌の同居期間は 2 ないし 3 週間とし、その間毎日交尾の有無を確認する。

### 3 - 2

交尾を確認した雌は分離飼育し、自然分娩させ第 1 世代 ( $F_1$ ) を得る。

同腹生子数を調整する場合には、出生後比較的早い時期に 1 母体当たり雄と雌がほぼ同数からなる一定匹数を無作為に残す。仔はそのまま母動物に哺育させる。

なお、父動物にあつては、 $F_1$  を得るための交配終了まで、母動物においては  $F_1$  の離乳まで継続して被験物質を投与する。

### 3 - 3

$F_1$  の離乳時に次世代を得るための動物を無作為に選択し、残りの動物は剖検する。次世代を得るための動物には、離乳後  $F_0$  と同様に被験物質を 10 週間 (マウスでは 8 週間) 以上投与した後に、原則として、同腹仔でない雄と雌の対を 20 以上とり、 $F_0$  と同様に交配させ第 2 世代 ( $F_2$ ) を得る。 $F_2$  は原則として、離乳後性成熟期に至るまで被験物質を投与し、飼育する。

## 4 観察事項

### 4 - 1 $F_0$

#### 4 - 1 - 1

一般状態及び死亡の有無を観察し、体重及び摂餌量 (必要に応じ摂水量) を測定し、被験物質摂取量を算出する。

#### 4 - 1 - 2

親動物について交尾率及び受胎率を算出する。また、母動物については分娩の異常を検索し、出産率を算出する (注 1)。

#### 4 - 1 - 3

$F_1$  の離乳時に母動物を剖検し、内部器官を観察する。

#### 4 - 1 - 4

雄及び交尾、妊娠又は出産をしなかった雌は適切な時期に屠殺し、内部器官を観察する (注 2)。

#### 4 - 2 F<sub>1</sub>

##### 4 2 - 1

新生仔については、出生仔数、その生死、性別、体重及び外表における変化等を調べる。

##### 4 - 2 - 2

出生後は、一般状態、死亡の有無、成長及び形態と機能の発達を観察する。少なくとも週一回体重の測定を行う。適当な期間ごとに生存率を算出し、離乳時に離乳率を算出する<sup>(注3)</sup>。

##### 4 - 2 - 3

F<sub>2</sub>を得るための交配に用いた F<sub>1</sub>については、F<sub>0</sub>と同様の検索を行う。残りの F<sub>1</sub>は離乳時に剖検する。

#### 4 - 3 F<sub>2</sub>

F<sub>1</sub>と同様の観察を行い、原則として、性成熟期に剖検する。必要に応じ、組織学的あるいは生化学的方法により詳細に検査を行う。

#### 4 - 4 観察のまとめ方

観察された異常又は毒性症状と被験物質の投与量との関係について適切な統計学的手法を用いて考察し、最大無作用量について見解をのべる。この際、離乳までは1腹仔を標本単位とするのが望ましい。

### 5 試験の延長など

必要に応じて、第2産仔以後を得るために F<sub>0</sub>及び F<sub>1</sub>の交配を繰り返し行う検査、又は F<sub>2</sub>について性成熟期以後の長期間観察、更には F<sub>3</sub>を得るための交配と生殖能の検査を行う。また、被験物質投与による生殖障害が主として雄・雌いずれの側への影響によるかを明らかにする必要がある場合には、投与雄と非投与雌、あるいは非投与雄と投与雌との交配を行う。

(注1) 通常、次の計算法による。

$$\text{交尾率} = (\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$$

$$\text{受胎率} = (\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$$

$$\text{出産率} = (\text{生仔出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

(注2) 雄では通常、交配期間の終了時に屠殺する。雌では例えば交尾を認めなかったものは、交配期間の終了時に、また、妊娠又は出産しなかったものは、交尾日から計算して、出産予定日を2、3日経過した時に屠殺する。

(注3) 通常、次の算出法による。

$$\text{生存率} = (\text{検索日の生仔数} / \text{出産時の生仔数、生後4日若しくは淘汰直後の生仔数} \\ \text{又は離乳時の生仔数}) \times 100$$

検索の時期により分母が異なる。

$$\text{離乳率} = (\text{離乳時生仔数} / \text{生後4日又は淘汰直後の生仔数}) \times 100$$

## 目的

本試験は、胎子の器官形成期に妊娠動物に被験物質を投与し、被験物質の胎子の発生に及ぼす障害、特に催奇形性を明らかにすることを目的とする。

## 1 試験動物

### 1 - 1 動物種

#### 1 - 1 - 1

ラット又はマウスなどのげっ歯類及びウサギなどの非げっ歯類から各 1 種以上とする。

動物種、系統又は品種の選択に当たっては、受胎能などの生殖に関連する知見、自然発生奇形の発生頻度、既知生殖・発生毒性物質に対する感受性などを考慮する。また、自然発生奇形の発生頻度の低いものを選択することが望ましい。

#### 1 - 1 - 2

慢性毒性試験と同じ動物種を用いる場合は、その系統が同一であることが望ましい。

#### 1 - 1 - 3

ラット、マウス又はウサギ以外の動物種を用いるときは、この指針は本試験の目的にかなうよう適切な修正を必要とする。

### 1 - 2 動物数

ラット、マウスでは妊娠が成立した個体の数として、各用量群 20 匹以上、ウサギでは 12 匹以上を用いる。

## 2 被験物質

### 2 - 1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う

### 2 - 2 用量

用量・反応関係を知り、最大無作用量を推定するために、原則として 3 段階以上の用量を試験群を設定する。最高用量は原則として母動物に摂餌量の低下や体重増加の抑制などの若干の毒性徴候が示されるが、10%以上の死亡をきたさない量とする。投与可能な最大量（1,000mg/kg を限度とする。）においても母動物に毒性徴候が示されない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は胎子の発生に毒性影響が示されない量とする。別に溶媒のみを投与する対照群をおく。

### 2 - 3 投与期間

胎子の器官形成期を通じて連日投与を行う。通常、交尾確認日を妊娠 0 日とした場合、マウスでは妊娠 6 日より 15 日まで、ラットでは妊娠 7 日より 17 日まで、ウサギでは妊娠 6 日より 18 日までとする。ただし、ラットでは妊娠 6 日より 15 日まででもよい。

## 3 観察事項

### 3 - 1 母動物

#### 3 - 1 - 1

試験期間を通じ一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。

### 3 - 1 - 2

出産予定日のほぼ前日に全数を剖検し、妊娠の成立を調べ、黄体数、着床数を数え、内部器官を肉眼的に観察する。

### 3 - 2 胎仔

胎仔の生死を判定し、死亡仔については死亡時期を推定する。生仔については、体重を測定し、性を判定する。更に外表及び内部器官の肉眼的検査と骨格染色透明標本による骨の形態や骨化に関する検査を行う。

### 3 - 3 観察のまとめ方

観察された異常又は毒性症状と被験物質の投与量との関係について適切な統計学的手法を用いて考察し、最大無作用量について見解をのべる。この際、1 腹仔を標本単位とするのが望ましい。

## 変異原性試験

### 目的

比較的簡便な短期間の試験により被験物質の遺伝毒性を検出し、それに基づくがん原性及び次世代への遺伝的影響について予測することを目的とする。

### 試験法の選択

変異原性試験には種々の方法<sup>(注1)</sup>があるが、このうち遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験として、「1 細菌を用いる復帰突然変異試験」、及び染色体異常誘発性を指標とする試験として、「2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」を行い、両者いずれかで陽性の結果が得られた場合には、「3 げっ歯類を用いる小核試験」を行う。

## 1 細菌を用いる復帰突然変異試験

### 1 - 1 目的

細菌を用いて、被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する。

### 1 - 2 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う。

(1) ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98

(2) ネズミチフス菌 TA100

(3) ネズミチフス菌 TA1535

(4) ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a

(5) 大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*、大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102

DNA にクロスリンクする化合物を検出する時には、ネズミチフス菌では TA102 を含めるか、大腸菌では除去修復能が野生型の WP2 株又は WP2/pKM101 株を追加する。必要に応じて他の菌株を追加する。

### 1 - 3 試験法

ブレインキュベーション法又はプレート法のいずれかで実施する。科学的に正当な理由があれば、他の方法を用いてもよい。いずれの方法においても、代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を行う。代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネート 9,000 × g 上清分画（S9）に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 5 ~ 30% の範囲内（通常 10%）とする。

### 1 - 4 用量段階

適切な間隔で 5 段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は 5 mg/plate を最高用量とする。難溶性物質で全く生育阻害がみられない場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

### 1 - 5 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける。

### 1 - 6 プレート数

被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ 2 枚以上のプレートを用いる。

### 1 - 7 復帰変異コロニーの観察

全てのプレートを原則として 37 °C で 48 ~ 72 時間培養した後に、プレートごとに復帰変異コロニー数を計測し、記録する。同時に生育阻害を観察し、それが認められた場合には、その用量を記録する。また、被験物質の析出が認められた場合にも記録する。

### 1 - 8 再現性

原則として試験結果には再現性がなければならない。ただし、全菌株を用いて、陰性対照及び陽性対照も含めた用量設定試験が各用量 2 枚以上のプレートを用いて行われている場合には、再現性の確認に用いることができる。

### 1 - 9 結果の判定

復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その作用に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する。用量設定試験及び本試験の結果に再現性が認められない場合には、再現性を確認する試験を実施する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

### 1 - 10 結果の表示

各プレートごとの復帰変異コロニー数を示すとともに、各用量ごとにその平均値を表示する。

## 2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

### 2 - 1 目的

哺乳類培養細胞を用いて、被験物質の染色体構造異常の誘発性の有無を検索する。倍数体等が出現した場合には、それを記録する。

## 2 - 2 使用細胞

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（例えば CHL/IU、CHO）、ヒト末梢血リンパ球、若しくは、その他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数（modal number）、マイコプラズマの汚染の有無、細胞周期などを調べる。

## 2 - 3 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について、3～6 時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 細胞周期後に染色体標本作製する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、次に代謝活性化によらない場合について 1.5 細胞周期の連続処理法による試験を実施する。被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。代謝活性化によらない場合には 1.5 細胞周期よりも長い連続処理が必要な場合があり、そのため必要に応じて確認試験を行う。

代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用等）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9,000×g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 1～10% の範囲内（通常 1～2%）とする。

## 2 - 4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩水などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

## 2 - 5 用量段階

適切な間隔（原則として公比 2）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 2mg/mL、2μL/mL 又は 10mM のうちいずれか低い濃度を最高用量とし、細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。

細胞毒性の指標として、細胞株については相対的細胞集団倍加（RPD）、又は相対的細胞数増加（RICC）を、初代培養リンパ球については分裂指数（MI）の相対値を用い、原則として、最高用量はこれらの指標において 50% 以上 60% 以下の細胞毒性を示す（RICC、RPD、MI が陰性対照の 50% 以下 40% 以上となる）用量に設定する。

ただし、60% を超えた細胞毒性が認められる場合であっても、染色体の観察が十分に可能であれば、その用量を最高用量とすることができる。50% 以上の細胞毒性が認められない場合は 2mg/mL、2μL/mL 又は 10mM のうちいずれか低い方を最高用量とする。50% 以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

## 2 - 6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群を設ける。

## 2 - 7 プレート数

被験物質の各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ2枚のプレートを用いる。

## 2 - 8 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり少なくとも300個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数が $2n \pm 2$ ）を計数する。なお、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できる。

また、染色体構造異常を有する細胞を計数する。染色分体型及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。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常には含めない。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。染色体数的異常については、倍数体等の出現数を記録する。

## 2 - 9 結果の判定

原則として、次に掲げる全ての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定する。

- a) 少なくとも1つの試験濃度において、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。
- b) 適切な傾向検定において、用量依存性があること。
- c) 試験結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布から外れていること。

明確に陽性又は陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

## 2 - 10 結果の表示

短時間処理法又は連続処理法による試験における全てのプレートについて、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度（%）並びに構造異常の種類別に細胞数を表示する。また、群ごとにプレートの平均値を表示する。ギャップは他の異常とは区別して記録するが、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（%）を表示する。

細胞増殖抑制試験並びに短時間処理法による試験及び連続処理法による試験における

全てのプレートについて、処理群、陰性対照群及び陽性対照群の全てについて細胞毒性

を同時に測定、記録する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

## 2 - 11 結果のまとめ

試験の結果は様式8によりまとめる。

（注）

## 細胞毒性評価のための計算式

分裂指数 (MI: Mitotic Index) :

$$MI (\%) = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) 又は相対的細胞集団倍加 (RPD: Relative Population Doubling) は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして用いられる。

$$RICC (\%) = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}}{\text{(対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時))}} \times 100$$

$$RPD (\%) = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞集団倍加)}}{\text{(対照培養細胞における細胞集団倍加)}} \times 100$$

細胞集団倍加 (PD: Population Doubling) = [ log ( 処理後の細胞数 ÷ 処理開始時の細胞数 ) ] ÷ log 2

### 3 げっ歯類を用いる小核試験

#### 3 - 1 動物及び観察細胞

若い成熟げっ歯類を用い、骨髄又は末梢血の幼若赤血球を観察対象とする。一般的にはマウス又はラットが用いられるが、ラットについては、骨髄を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核の出現、末梢血を用いた場合に脾臓で小核を持つ赤血球が除去されることに注意し、より適切な観察方法を用いる。

#### 3 - 2 動物の性及び数

1群、性あたり5匹以上とする。ただし、毒性に明らかな性差が見られない場合には、片性のみ(5匹以上)の使用で十分である。

#### 3 - 3 被験物質の調製

被験物質が固体の場合には適切な溶媒に溶解又は媒体に懸濁させ、液体の場合には直接投与するか又は適切な溶媒で希釈して調製する<sup>(注2)</sup>。被験物質が気体の場合には清浄な空気等を用いて希釈する。調製後の安定性が判明している場合には、安定な期間内に使用し、不明な場合には用時に調製する。

#### 3 - 4 対照群

陰性対照<sup>(注3)</sup>としては溶媒又は媒体を、陽性対照としては適切な既知小核誘発物質<sup>(注4)</sup>を、それぞれ設定する<sup>(注5)</sup>。

#### 3 - 5 投与経路

強制経口投与を原則とする。ただし、特定の暴露経路(吸入暴露等)が想定される等、科学的な理由がある場合にはこの限りでない。

#### 3 - 6 投与回数

単回又は反復投与とする。

### 3 - 7 用量段階

最高用量は、幼若赤血球の減少等、骨髄で細胞毒性が認められる用量、何らかの毒性兆候が認められる、若しくはそれ以上で致死が予想される用量又は技術的に投与可能な上限の用量とする<sup>(注6)</sup>。また、毒性兆候が現れない場合の最高用量は、単回又は14日未満の反復投与については2,000mg/kg/日、14日以上長期反復投与については1,000mg/kg/日とする。なお、被験物質が気体の場合は、安全に暴露できる濃度を最高用量とする<sup>(注7)</sup>。適切な間隔(公比2を原則とするが、公比4以下であればよい。)で3段階以上の用量を設定する。

### 3 - 8 標本作製時期

#### 3 - 8 - 1 骨髄を用いる場合

単回投与では、投与後24~48時間の間に適切な間隔をおいて最低2回の標本作製時期を設定し、動物を屠殺、骨髄塗沫標本作製する<sup>(注8)</sup>。連日の2回投与を行った場合には、最終投与後18~24時間の間に1回、標本作製を行う。連日の3回以上の投与を行った場合には、最終投与後24時間以内に1回、標本作製を行う<sup>(注9)</sup>。

#### 3 - 8 - 2 末梢血を用いる場合

単回投与では、投与後36~72時間の間に適切な間隔をおいて最低2回の採血時期を設定し、標本作製する<sup>(注8)</sup>。連日の2回投与を行った場合には、最終投与後36~48時間の間に1回、標本作製を行う。連日の3回以上の投与を行った場合には、最終投与後40時間以内に1回、標本作製を行う<sup>(注9)</sup>。

### 3 - 9 観察

観察前に、陰性対照及び陽性対照を含め、全てのスライド標本をコード化して、処理条件がわからない状況で観察を行う。個体当たり4,000個以上の幼若赤血球を観察して、小核を有する細胞の出現頻度を求める。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、個体当たり、骨髄を用いた場合には500個以上、末梢血を用いた場合には2,000個以上の赤血球を観察することにより求める。<sup>(注10)(注11)</sup>

### 3 - 10 結果の表示

個体ごとに、観察した幼若赤血球に対する小核を有する細胞の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、表形式にて表示するとともに、群ごとの平均値についても表示する。

### 3 - 11 結果の判定

被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待どおりの結果が得られていることを前提とし、陰性対照群の背景データの利用を含め、適切な統計処理を用いることにより結果の判定を行う<sup>(注12)</sup>。なお、両性を用いた場合の結果に明確な性差が認められなければ、両性のデータをまとめて統計処理を行ってもよい。明確に陰性又は陽性と判断できない場合には、統計的な有意性のみが判断基準ではない

ので、実験条件を考慮して再試験を実施し、最終的な判断をすることが望ましい。

### 3 - 1 2 結果の評価

いずれかの *in vitro* 試験で陽性結果が認められ、かつ本試験で陰性結果となった被験物質については、生体内運命に関する入手可能な知見等を利用して、判定結果を考察する。

(注2) 溶媒又は媒体については、被験物質と反応しないものを選択し、毒性を示さない用量で使用する。一般に、生理食塩液などの水系溶媒の使用が推奨される。

(注3) 末梢血を用いる短期試験(1~3回投与)の場合、投与前サンプルを陰性対照とすることができる。

(注4) 陽性対照物質の例

メタンサルホン酸メチル  
メタンサルホン酸エチル  
マイトマイシンC  
シクロフォスファミド  
トリエチレンメラミン

なお、投与用量としては、極端に高くはないが、明確な小核誘発性を示す用量が推奨される。

(注5) 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、同時陽性対照群の代わりに適切な陽性対照標本を使用することができる。その場合、定期的に別途実施する陽性対照実験で作成され、保存された適切な標本を含める。

(注6) 媒体が水を主成分とする場合は 20mL/kg、それ以外では 10mL/kg を最大の投与液量とする。

(注7) 暴露可能な最大濃度あるいはミストとダストでは 5mg/L、ガスと蒸気では適切な酸素濃度(19~21%)を維持でき、安全に暴露できる技術的に可能な最高濃度を用いる。

(注8) 単回投与の場合でも、予備試験によって標本作製時期を検討した結果、最も感受性の高い時期が確認され、陽性の結果が得られることが認められる場合、この時期1回だけの標本作製とすることができる。この場合の標本作製時期は、小核誘発頻度の最も顕著な上昇が認められる時期とする。

ただし、いずれの時期においても明白な小核誘発頻度の上昇が認められない場合には、骨髄を用いる場合は投与後 24~30 時間、末梢血を用いる場合は 36~48 時間を標本作製時期とする。

(注9) 陽性対照については適切な時期に 1 回、標本作製を行う。

(注10) 標本の染色は、骨髄標本に対しては、通常、アクリジン・オレンジ蛍光染色法又はギムザ染色法を用い、末梢血標本の場合には通常アクリジン・オレンジ超生体染色法を用いる。

(注11) 小核を有する赤血球の測定が可能な自動化システム(フローサイトメーター等)

を用いて観察することもできる。

(注12) 被験物質が十分な高用量まで適切に投与され、かつ陰性及び陽性対照群で期待どおりの結果が得られた場合で、全ての処理群において陰性対照群との間に統計学的な有意差が認められない場合には、陰性と判定する。一方、小核を有する細胞数に統計学的な有意差があり、用量依存性があるか、又は結果に再現性がある場合に陽性と判定する。

## がん原性試験

### 目的

本試験は、動物に被験物質をほぼ一生にわたる期間連続投与し、被験物質のがん原性の有無を明らかにすることを目的とする。

### 1 試験動物

#### 1 - 1 動物種及び性

マウス、ラット等2種以上の雄及び雌を用いる。

一般には、通常の飼育条件下における腫瘍の自然発生率及び既知がん原性物質に対する感受性などが良く知られている動物種、系統の近交系又はその一代雑種を用いる。この場合、腫瘍の自然発生率の低いものを選択することが望ましい。

#### 1 - 2 年齢

5~6週齢の体重のそろったものを用いる。

#### 1 - 3 動物数

各群雄及び雌それぞれ50匹以上を用いる。

### 2 被験物質

#### 2 - 1 投与方法

原則として、経口投与で行う。被験物質は、飼料又は飲料水に添加して投与することが望ましい。なお、飼料に添加する被験物質の濃度は5W/W%以下とする。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で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

#### 2 - 2 用量

用量と反応との関係を知るために、投与量は3段階とする。

あらかじめ1~3か月の短期試験を行い、対照群に比し10%程度の体重減少にとどまり、中毒による死亡例がなく、かつ、一般状態に著しい変化を示さない最大量を最高用量とする。最高用量から原則として、公比2ないし3で中用量及び最低用量を設定する。別に対照群をおく。

なお、実際の摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

#### 2 - 3 投与期間

動物のほぼ一生涯とする（マウス及びハムスターでは18か月以上、ラットでは24か月以上）。

ただし、マウス、ハムスターで18か月、ラットで24か月の時点で被験物質に起因する腫瘍性病変以外の原因による死亡率が50%以内であることが必要である。

### 3 観察・測定事項

#### 3 - 1 一般的観察（注1）

#### 3 - 2 体重、摂餌量及び摂水量、食餌効率（注2）

#### 3 - 3 病理学的検査

##### 3 - 3 - 1 肉眼的観察（注3）

##### 3 - 3 - 2 顕微鏡的観察（必要に応じて電子顕微鏡による検査、組織化学的検査を行う。）（注4）

#### 3 - 4 血液検査（注5）

#### 3 - 5 その他の必要な事項

試験中死亡した動物についてはその死因を調べる。また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺解剖を行う。

（注1） 一般状態及び死亡の有無を観察し、生存率を算出する。

（注2） 摂水量については、被験物質を飲料水に混ぜて投与するときのみ測定し、食餌効率については、動物の成長期間中は算出することが望ましい。

（注3） 試験に使用したすべての動物（途中死亡及び途中屠殺した動物も含む。）を解剖し、全器官・組織について十分な肉眼的観察を行う。（注4）において示すすべての器官・組織を全群について適当な保存液中に保存する。

（注4） 肉眼的に認められた全腫瘍性病変部の他に対照群及び最高用量群の全例について次の器官・組織の顕微鏡的検査を行う（<sup>1</sup>）。

最高用量群で変化の認められた器官・組織については、他の用量群についても検査を実施する（<sup>2</sup>）。

脳、脊髄、末梢神経、下垂体、眼球、鼻腔（<sup>#</sup>）、肺（気管支を含む。）、口腔及び舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、外耳道、皮膚、唾液腺、リンパ節、甲状腺（上皮小体を含む。）、胸腺、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精のう、前立腺、乳腺（雌）、卵巣、子宮、膣、胸骨（骨髄を含む。）、椎骨又は大腿骨（関節を含む。）。

（<sup>#</sup>） 吸入試験の場合は、鼻腔、咽頭、喉頭及び気管。

（<sup>1</sup>） 最高用量群の生存動物が対照群と比べて非常に少ない場合には、次の用量群についても行う。

（<sup>2</sup>） 最高用量群が前記の（<sup>1</sup>）に該当する場合は、最高用量群又は次の用量群で変化の認められた器官・組織とする。

最高用量群又は次の用量群で認められる変化には、腫瘍性病変だけでなく、一般的な毒性変化も含むものとする。

（注5） 剖検に際し、全例について血液塗抹標本を作製するとともに、必要に応じて、血球数の計測及び血液生化学的検査を行う。

## 生体内運命に関する試験

### 目的

本試験は、動物に被験物質を投与し、吸収、分布、蓄積、代謝、排泄等を調べることにより、被験物質の生体内における動態を把握することを目的とする。

### 1 試験動物

#### 1 - 1 動物種及び性

ラット、ウサギ、イヌ、サル等のうち 1 種以上の雄又は雌を用いる。

なお、動物種は他の毒性試験と同一の種類を用いること、また、2 種以上を用いることが望ましい。

#### 1 - 2 年齢

成熟に達した若い動物を用い、年齢を記載する。

なお、必要に応じ、幼若動物又は他の条件の動物を用いる。

#### 1 - 3 動物数

ラット等では各群 4 匹以上の雄又は雌を用いる。

また、イヌ、サル等では各群 2 匹以上とする。

### 2 被験物質

#### 2 - 1 投与方法

原則として、強制経口投与で行う。

なお、経口投与では試験目的を達成することが困難な場合には非経口投与により行う。

#### 2 - 2 用量

1 回投与の場合は少なくとも 2 段階とする。この場合、最高用量は反復投与により毒性徴候が現れる量とし、最低用量は動物に影響が発現しない量とする。

なお、可能ならば自然環境及び食物経由により摂取が予測される推定量に近い用量についても検討することが望ましい。

#### 2 - 3 投与期間

1 回投与により行う。更に一定期間にわたる反復投与についても検討することが望ましい。

なお、蓄積試験においては十分な期間にわたって継続して投与を行う。

### 3 検索

本試験は標識又は非標識の被験物質を動物に投与し、被験物質の吸収速度及び吸収量、被験物質及び主要な代謝物（以下「被験物質等」という。）の器官・組織、体液等への分布パターン、蓄積性、代謝の様式と速度、排泄経路及び排泄速度並びに排泄量を検索する。更に、被験物質等の毒性に関連があると考えられる生体成分及び生体機能（酵素活性等）への影響等についても検索することが望ましい。また、*in vivo* における検査を中心とするが、必要に応じて *in situ* 及び *in vitro* の検査を併用する。

なお、被験物質について生体試料からの分析法及び回収率、検出限界等を記載する。

被験物質として同位元素標識化合物を使用する場合は、標識する部位は代謝に関して最も多くの情報が得られる部位とし、調製法、純度、同位体濃度、比放射能等を記載する。また、検出された放射能が被験物質そのものによるか否かを確認するとともに、代謝物等の場合は化学構造を同定することが望ましい。

### 3 - 1 吸収

3 - 1 - 1、3 - 1 - 2いずれかの方法を用いて被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する<sup>(注1)</sup>。

#### 3 - 1 - 1

被験物質の消化管内残存量、被験物質等の尿、胆汁、糞、呼気等への排泄量及び体内残存量を経時的に測定し、被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する。

#### 3 - 1 - 2

被験物質等の血中濃度（血液、血漿又は血清中濃度）について  $C_{max}$ 、 $T_{max}$ 、 $1/2$ 、 $1/2$ 等を求めると共に静脈内投与群の血中濃度の推移と比較して被験物質の消化管からの吸収速度、吸収量及び吸収率を推定する。

### 3 - 2 分布

できるだけ多くの器官・組織について被験物質等の濃度及び量を経時的に測定し、分布パターンを明らかにする<sup>(注2)</sup>。更に生物学的半減期を算出し、主要器官・組織における蓄積性を予測する。

なお、必要に応じてオートラジオグラフィ等を併用して調べる。

また、血漿蛋白との可逆的結合性等についても調べることが望ましい。

### 3 - 3 蓄積

分布等の結果を参考にして蓄積の可能性がある器官・組織を中心に、被験物質の蓄積を経時的に検討する。また、被験物質の投与をやめた後の蓄積量の減少を経時的に調べることが望ましい。

### 3 - 4 代謝

尿、糞、呼気等の分析を行い、被験物質が体内で代謝される場合は代謝物を分離し、主要な代謝物を同定し、それらの生成率を求め、更に、*in vitro*の試験等を併用して主要な代謝経路を推定する。

なお、生体成分との相互作用のうち毒性との関連性が示唆されている生体高分子との結合、肝臓、腎臓等における内因性の非蛋白性チオール化合物の減少及び薬物代謝酵素系等に与える影響等についても検討することが望ましい。

### 3 - 5 排泄

被験物質等の糞、尿、呼気等への排泄を7日間又は投与量の約95%が排泄されるまでの期間のどちらか早い方の期間にわたって経時的に測定し、被験物質等の排泄速度及び排泄率を求める。

また、被験物質等の主な排泄経路を明らかにすることが望ましい<sup>(注3)</sup>。

## 4 その他の試験

他の毒性試験により被験物質等によると考えられる障害が認められ、それを説明する上

で、被験物質等の体内動態をより詳細に検討することが有用であると考えられた場合は、更に特定の条件で一定の試験を行うことが望ましい<sup>(注4)</sup>。

(注1) 被験物質等の排泄経路によっては、尿、呼気等への排泄量の比較から吸収速度、吸収量及び吸収率を推定し得る。

なお、初回通過効果、腸肝循環について留意する。

(注2) 使用する測定法の感度にもよるが、放射性同位元素標識化合物を用いて次に示す器官・組織について調べた例がある。

大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、眼球、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、小腸、盲腸、結腸・直腸、下垂体、甲状腺、胸腺、副腎、唾液腺、膵臓、腸間膜リンパ節、精巣、精巣上体、精のう、前立腺、卵巣、子宮、腸間膜、横隔膜、筋肉、大腿骨、脂肪組織、皮膚、毛、血液

(注3) 被験物質等の乳汁への排泄や皮膚からの排泄についても必要に応じて検討する。

(注4) 例えば、

- 1) 慢性毒性試験において障害が認められた場合、被験物質等の体内分布を測定すると共に、障害の認められた特定の器官、組織について活性代謝物の生成、分布等について検討を加える。
- 2) 催奇形性試験において催奇形性が認められた場合は、妊娠動物に被験物質を投与し、被験物質等の胎盤通過、胎仔への分布等を調べると共に可能ならば胎仔における代謝を検討することが望ましい。

## 薬理学的試験

### 目的

本試験は、被験物質の薬理学的特性を明らかにすることを目的とする。

### 1 試験項目

主要な生体機能への影響について試験を行う。なお、他の毒性試験結果から毒性影響との関連が考えられる器官・組織の機能への影響についても検討することが望ましい。

### 2 試験動物

それぞれの試験に適した哺乳類及び性を選択して用いる。また、試験によっては哺乳類以外の動物を用いることができる。

### 3 被験物質

#### 3 - 1 投与方法

##### 3 - 1 - 1

*in vivo* の場合は原則として、経口投与で行う。ただし、経口投与では被験物質による影響が的確に観察出来ない場合は非経口投与で行う。

##### 3 - 1 - 2

*in vivo*、*in situ*、*in vitro*のいずれの場合も被験物質を水、食用油又は他の適当な溶媒を用いて溶液として投与する。これが不可能な場合は、適当な懸濁化剤、乳化剤等を用いる。

#### 3 - 1 - 3

通常 1 回投与によるが、試験目的によっては反復又は継続投与する。

#### 3 - 2 用量

用量と反応との関係に留意し、被験物質に由来する影響を把握し得るに十分な用量とする。

#### 4 試験法の選択

試験の種類は多岐にわたるが、被験物質の有する特異的作用が明らかとなる方法を用いる。この際、作用部位、作用機序についても検討することが望ましい。