

## 哺乳類を用いる簡易生殖発生毒性試験（案）

## 目的

本試験は、生殖発生毒性に関する情報を得ることを目的とした簡易試験である<sup>(注1)</sup>。

1 試験動物<sup>(注2)</sup>

## 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<sup>(注3)</sup>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 $\pm 20\%$ 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<sup>(注4)</sup>を示している動物を使用する。

## 1-3 動物数

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。

## 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<sup>(注5)</sup>。

## 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<sup>(注6)</sup>

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。雄については交配期間も含めて少なくとも28日間以上<sup>(注7)</sup>とする。雌については交配期間、妊娠期間及び分娩後13日（分娩完

了確認日を分娩後0日とする。)まで、原則として連続投与する(注8、9、10)。

### 3 観察・検査

全ての動物について、その生死(注11)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する(注12、13)。

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14)

##### 3-1-3 性周期(注4)及び妊娠期間(注15)

##### 3-1-4 血液検査(注16)

###### 3-1-4-1 血液生化学的検査(注17)

##### 3-1-5 病理学的検査

###### 3-1-5-1 肉眼的検査及び器官重量(注18、19)

###### 3-1-5-2 病理組織学的検査(注20)

#### 3-2 児動物(注21、22)

##### 3-2-1 生存児検査(注23、24、25)

##### 3-2-3 剖検時検査(注26)

##### 3-2-1 血液検査(注27、28)

###### 3-2-1-1 血液生化学的検査(注、17)

#### 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6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) 本試験は、原則として反復投与毒性試験が既に行われている場合に行う。反復投与毒性試験が実施済みである化学物質について、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験における生殖発生毒性試験相当部分の試験成績を得るために本試験を実施することができる。

(注2) 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3) 性成熟期は系統により異なるので注意する。

(注4) 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。臍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 5) 雌動物については、毎朝臍垢中の精子又は臍栓の検査を行い、精子又は臍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) 剖検前に血液検査等のため一晩絶食させる場合は、投与期間は分娩後 13 日までとし、剖検は分娩後 14 日とする。
- (注 9) 被験物質を吸入又は経皮暴露する場合は、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 10) 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 11) 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 12) 少なくとも 1 日 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 13) 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 14) 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 15) 妊娠期間について、妊娠 0 日から起算する。
- (注 16) 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。
- (注 17) 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<sub>4</sub> 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 T<sub>4</sub> 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。T<sub>4</sub> 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（T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub>）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 18) 解剖に当たり、臍垢を採取し、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 19) 原則として、最終投与の翌日に剖検する。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、甲状腺\*、生殖腺（精巣\*又は卵巣\*）、副生殖器（前立腺\*、精囊\*（凝固腺を含む。）、精巣上体\*、子宮（子宮頸部を含む。））、膣。

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。

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 2 0) 最高用量群及び対照群について各群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・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。保存した他の器官・組織については、肉眼的変化が認められた場合や毒性が予想される場合などは検査をすることが望ましい。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。
- (注 2 1) 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 2 2) 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 2 3) 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 2 4) 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 2 5) 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 2 6) 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 2 7) 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 2 8) 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。