

## 化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

### 拡張一世代生殖毒性試験

#### はじめに

1. 本試験ガイドライン (TG) は、Cooper et al., 2006 (1)で発表された、ライフステージ F<sub>1</sub> 拡張一世代生殖試験に関する国際生命科学協会 (ILSI) - 環境保健科学研究所 (HESI)、農薬安全性評価 (ACSA) 研究委員会の提案に基づいている。試験をガイドし調整するために生存中の観察を行いながら、柔軟性を持たせるため、さらに既存知識から始めることの重要性を強調するため、試験計画にはいくつかの改良および明確化がなされてきた。本ガイドラインでは、拡張一世代生殖毒性試験の運用上の処置について詳細に説明する。本 TG では次の 3 つのコホートの F<sub>1</sub> 動物について説明する。

- コホート 1：生殖/発生の評価指標の評価。本コホートは拡張され F<sub>2</sub> 世代を含む場合がある。
- コホート 2：神経系発達への化学物質曝露の潜在的影響の評価。
- コホート 3：免疫系発達への化学物質曝露の潜在的影響の評価。

2. 第二世代を評価するかどうか、ならびに発達神経毒性コホートや発達免疫毒性コホートを省略するかどうかに関する決定には、さまざまな規制当局の要求だけではなく、評価される化学物質についての既存知識を反映させる必要がある。本試験ガイドラインの目的は、どのようにして試験を実施するか、その詳細を提供し、さらに各コホートをどのように評価するかを示すことである。

3. 第二世代を作出するかどうかの判断において、(F<sub>1</sub> までの) 試験で得られた評価項目 (internal triggers) をどのように利用するかについては、ガイダンス文書 117 (39)に記載されており、これはこのような評価項目を用いることとしている規制当局のためのものである。

#### © OECD (2018年)

本資料は、<http://www.oecd.org/termsandconditions/>に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

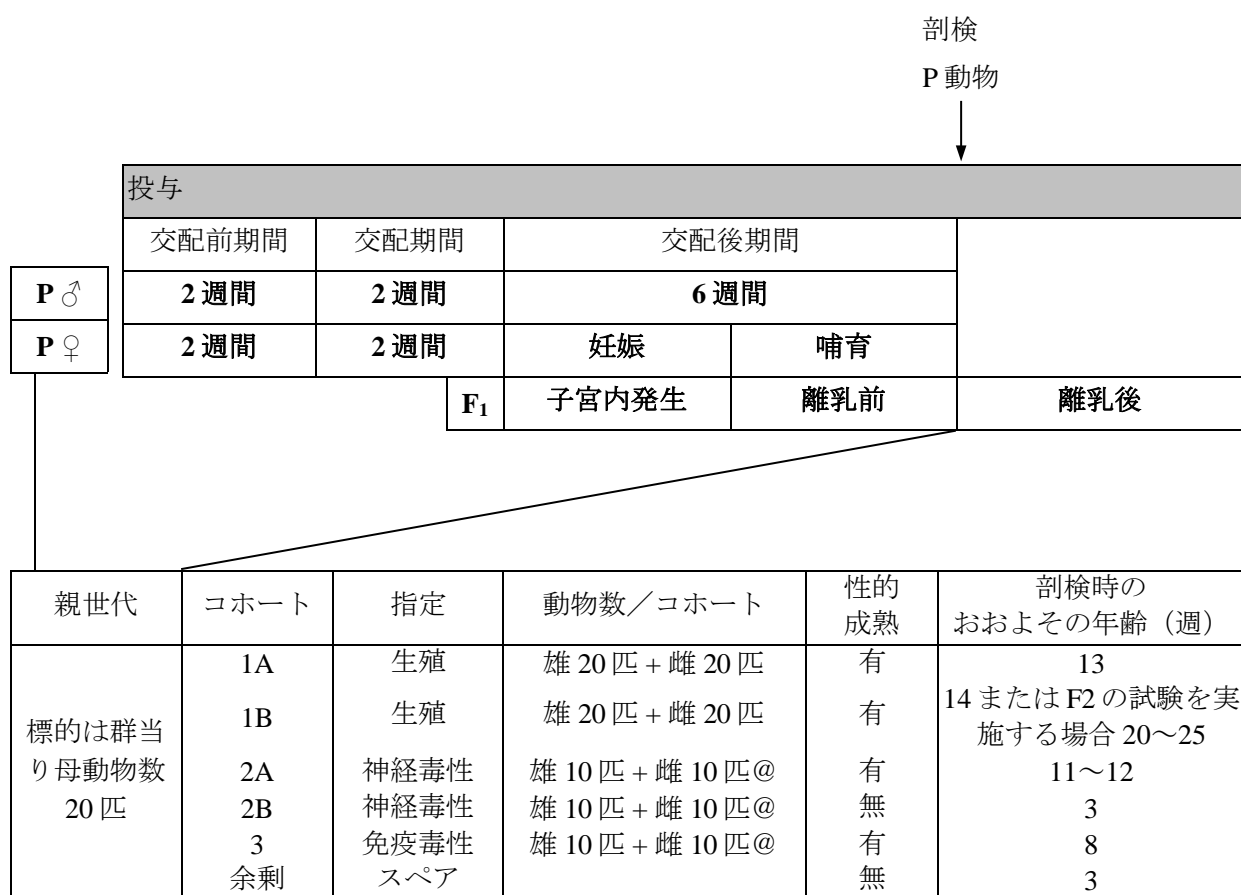
本ガイドラインは、2018年6月25日付けにて書面手続きにより「化学品評価におけるデータ相互受け入れに関する理事会決定 (Decision of the Council on the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals)」の「補遺 I」を改訂するための「権限の委任に関する理事会決定 (Decision of the Council on a Delegation of Authority)」に則って [C (2018) 49]、OECDの化学品委員会と化学品、農薬、バイオテクノロジーに関する作業部会との合同会議で改訂された。

## 最初に考慮すべき事項および目的

4. 拡張一世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、TG 422 (32)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 TG 440 (36)、およびハッシュバーガー試験（雄の生殖器肥大試験） - TG 441 (37)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、拡張一世代生殖毒性試験は、雄と雌、雌と受胎産物、雌と出生児および性成熟までの F<sub>1</sub> 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（本試験ガイドラインを補足するガイダンス文書 151 (40)を参照）。
5. 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。
6. 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 F<sub>1</sub> 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）。F<sub>1</sub> 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（GD 117 (39)を参照）、F<sub>2</sub> の離乳まで、または試験の終了まで F<sub>1</sub> 出生児の投与を維持する。

7. 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、段落 33 および 34 ならびに図 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。
8. 試験を実施する際には、安全性評価に用いる実験動物のための人道的指標としての臨床症状の認識、評価および使用に関する OECD ガイダンス文書 No.19(34)に概説された処理原則および考慮点に従う。
9. ここに示された新しい試験デザインで十分な数の研究が行われ、それがもたらす影響を確認するため利用可能となった時点で、得られた経験を考慮して本試験ガイドラインは見直され、必要に応じて改訂される。

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

## 試験方法／試験準備の説明

### 動物

#### 動物種と系統の選択

10. 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

11. 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）体重が一樣、交配時において日齢が一樣（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

12. 試験動物飼育室の温度は 22°C（±3°）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(2)(30)。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。
13. 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一っしょに飼育する。F<sub>1</sub> 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

14. 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 F<sub>1</sub> 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。
15. 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、F<sub>1</sub> 出生児はすべて個体識別をする。すべての F<sub>1</sub> 動物について、また適用可能であれば F<sub>2</sub> 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

16. 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

17. 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。

一般的なガイドとして、次の TK データセットが拡張一世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

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分であるが、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

18. 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

19. 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

20. 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。
21. 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。
22. 試験を行う者は、用量選択において、得られたデータが OECD 諸国全体の規制（ハザード及びリスク評価、分類とラベリング、ED 評価等）の要件を適切に十分満たすよう検討し確保すべきである。
23. 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といえるような用量を、あるいはベンチマークドーズ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が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。
24. 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

24. 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

26. 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。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

27. 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 F<sub>1</sub> 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(6)(7)(8)(9)および GD151(40)。
28. 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(40)を参照）。
29. 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 F<sub>1</sub> 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ければ、コホート割付けに応じて、選抜した F<sub>1</sub> 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。

30. 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。
31. 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 F<sub>1</sub> 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

32. 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

33. 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)

34. 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。

PND 21 に、選抜した F<sub>1</sub> 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) : F<sub>1</sub> 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(39)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。

35. 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 F<sub>2</sub> 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 (段落 55 を参照) および剖検 (段落 68 を参照) に提出されることになる。

### P 動物の2回目の交配

36. 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、F<sub>1</sub> 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

37. P および選抜した F<sub>1</sub> 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。
38. さらに、すべての P および F<sub>1</sub> 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

39. 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（段落 44 を参照）。すべての F<sub>1</sub> 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膣開口の完了）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。
40. 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）。F<sub>1</sub> 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

41. 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（膣細胞診による）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、投与開始時に膣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 週間の膣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。膣／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(10)(11)。
42. コホート 1A のすべての F<sub>1</sub> の雌について、膣開口発生以後、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膣垢塗抹を毎日検査する。コホート 1A のすべての F<sub>1</sub> 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、F<sub>1</sub> 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 の膣細胞診を追跡する。

## 交配および妊娠

43. 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。
44. 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 (PND 0) 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

45. 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。

46. 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(12)。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。
47. 選抜されたすべての F<sub>1</sub> 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も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、F<sub>1</sub> 動物の性的成熟を身体的発達と比較する(13)。

#### **発達神経毒性の可能性の評価 (コホート 2A および 2B)**

48. 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 (段落 48~50 を参照)、および神経病理学的評価 (段落 74~75 を参照) 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 (段落 74~75 を参照)。
49. 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(35)に合致するものとする。

50. 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。この手順は OECD TG424(33)および 426(35)に合致するものとする。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。
51. 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リングする。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、補足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）**

52. 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 (14)(15) 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）

53. 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、F<sub>2</sub> 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

54. 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（GD151(40)を参照）。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、 $\gamma$ -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。

55. F<sub>1</sub> 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。
56. 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 F<sub>1</sub> 児動物) からも採血する。

### 精子パラメータ

57. 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。
58. P および F<sub>1</sub> (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(16)(17)。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(18)。
59. 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(19)(20)(21)(22)(23)(24)。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(25)、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(26)。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。
60. 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(27)、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

61. すべての P および F<sub>1</sub> 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。
62. 成熟した P および F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 成熟動物

63. 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 F<sub>1</sub> 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
  - 精巢、精巢上体（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
64. 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。
65. 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。
66. 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。

67. 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

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。

68. 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 PND 22 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。OECD TG426(35)で規定されるように、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 - F<sub>1</sub> 離乳児

69. 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<sup>1</sup>のために保管してもよい (GD151(40)を参照)。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

70. 高用量群および対照群のすべての P 動物について、段落 62 および 63 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。<sup>1</sup>

## 病理組織学的検査 - F<sub>1</sub> 動物

### コホート1の動物

71. 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 62 および 63 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。

72. 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、段落 66 に記載しているように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。

<sup>1</sup> 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。妥当性が確認できれば、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。

73. 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、F<sub>1</sub>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（GD151(40)を参照）。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、および膈については、適切な器官型発達の有無を検査する。
74. F<sub>1</sub>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(38)。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

75. 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。すべての神経組織学的手順は OECD TG426(35)に合致するものとする。
76. 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(28)。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

77. 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。
78. 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

79. 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。

### 試験報告書

80. 試験報告書には、P、F<sub>1</sub> 動物および F<sub>2</sub> 動物（関連する場合）から本試験で得られた次の情報を含める。

#### 被験物質

- 被験物質の物質特性、トキシコキネティクス特性、トキシコダイナミクス特性に関して入手可能な関連情報
- 特定データ
- 純度

#### 溶媒（必要に応じて）

- 水以外の場合は、溶媒選択の妥当性

#### 供試動物

- 使用した動物種／系統
- 動物数、週齢、性
- 供給元、飼育条件、飼料、巢材など
- 試験開始時の個体ごとの体重
- 投与開始前の P の雌に関する膣垢塗抹データ（そのときにデータを採取する場合）
- 交配の雌雄のパートナーおよび交配の成功を示す P 世代のペアリング記録
- 成熟した F<sub>1</sub> 世代の動物についての母動物の記録

#### 試験条件

- 用量設定根拠
- 被験物質溶液／被験物質混合飼料の調製方法の詳細、濃度分析値  
使用条件および使用と使用との間の保管条件下での、溶媒または担体中（飼料、飲水  
など）、血液や乳汁中における調製物の安定性および均一性
- 被験物質投与の詳細  
必要に応じて、飼料／飲水中の被験物質濃度（ppm）から実際の投与量（mg/kg 体重/日）への換算方法
- 飼料および水質の詳細（測定した場合、飼料の組成も含む）
- 間引き動物の選抜、および児動物の各試験群への割付けのための無作為化手順の詳細
- 環境条件
- 試験従事者、専門的訓練の内容を含む

#### 結果（性別ごとおよび用量ごとの要約および個別データ）

- P および F<sub>1</sub> 動物の摂餌量、摂水量（測定した場合）、食餌効率（摂餌量 1 g 当たりの体重増加量（同居期間中および哺育期間を除く））および被験物質摂取量（混餌または飲水による投与）。
- 吸収データ（測定した場合）
- P 動物の体重データ
- 選抜された離乳後の F<sub>1</sub> 動物の体重データ

- 試験終了時まで生存したか、または試験中に死亡した場合にはその時期
- 一般状態の変化の種類、程度および期間（可逆性の有無を含む）
- TSH および T4 を含む血液学的検査、尿検査、および血液生化学検査データ
- 脾臓細胞（T 細胞、B 細胞、NK 細胞）の表現型解析
- 骨髄細胞充実性
- 毒性反応データ
- 正常または異常な性周期を示す P および F<sub>1</sub> の雌動物の数および性周期の長さ
- 交配までの期間（交配前の間隔、ペアリングから交配までの日数）
- 生殖毒性またはその他の影響（交配、妊娠、分娩および哺育を達成した動物、妊娠を誘発させた雄、異常分娩／分娩長期化または分娩困難の徴候を示した雌の数および率）
- 妊娠期間および分娩期間（測定した場合）
- 着床数、同腹児数、および雄の児動物の率
- 着床後胚損失、生存児、および死産児の数および率
- 一腹総体重および各児動物の体重データ（雄、雌、および混在）、わかる場合には矮小児数
- 肉眼的異常を有する児動物数
- 出生児、出生後の成長、生存率などに対する毒性その他の影響
- 児動物の身体指標データおよび出生後の発達に関するその他のデータ
- F<sub>1</sub> 動物の性的成熟に関するデータ
- 児動物および成熟動物の機能検査データ（検査した場合）
- P および成熟した F<sub>1</sub> 動物の屠殺時体重および絶対／相対器官重量
- 剖検所見
- すべての病理組織学的所見に関する詳細な記述
- P および F<sub>1</sub> の雄の精巣上部尾部の総精子数、前進運動精子率、正常形態精子率、各種異常精子率
- 適用可能であれば、P および F<sub>1</sub> の雌の卵巣内の卵胞数および成熟段階
- F<sub>1</sub> の雌の卵巣内の黄体の計測
- 必要に応じて、結果の統計処理方法

#### コホート 2 のパラメータ

- 観察および検査手順の標準化に用いた方法の詳細、また実際的な観察結果の尺度基準
- 全検査手順の一覧、またその使用の妥当性
- 用いた行動／機能試験、神経病理学的、および形態計測手順の詳細（自動機器の情報および詳細を含む）
- 機器のキャリブレーションおよび同等性確認手順、また検査において試験群の偏りをなくするための手順
- 専門家判断を含めて、すべての決定の妥当性についての簡潔な理由

- 性別および用量群ごとのすべての行動／機能試験、神経病理学的、および形態計測所見の詳細な説明（対照群と比較しての増加および減少の両方を含む）
- 脳重量
- 神経症状および神経病変から得られた診断（自然発生性疾患または状態を含む）
- 典型的な所見像
- 形態計測に用いた切片の相同性を評価するための低倍像
- 結果の統計処理（データ解析に用いた統計モデルおよび解析結果を含み、また有意か否かを問わない）
- 性別および用量群ごとの被験物質の神経毒性に関する結論とその他の毒性との関連性
- トキシコキネティクス情報の結論に対する影響
- 検査方法の信頼性と感度を裏付けるデータ（陽性対照および背景データなど）
- 神経病理学的変化と機能変化との関連性（存在する場合）
- 性別および用量群ごとの母動物および児動物における NOAEL またはベンチマーク用量
- 結果に基づいた、データの総合的な解釈に関する考察（被験物質が発達神経毒性を引き起こしたのか否かに関する結論および NOAEL を含む）

#### コホート3のパラメータ

- 血清 IgM 抗体の力価（SRBC または KLH に対する感作）、または脾臓中 IgM-PFC ユニット（SRBC に対する感作）
- 最初に測定系をセッティングする実験室が、最適化過程で TDAR 法の成績を確認するとともに、すべての実験室が定期的に（例えば毎年）これを確認する。
- 結果に基づいた、データの総合的な解釈に関する考察（被験物質が発達免疫毒性を引き起こしたのか否かに関する結論および NOAEL を含む）

#### 結果の考察

結論（親動物および出生児に対する影響についての NOAEL を含む）

試験中に得られたのではないが結果の解釈に有用なすべての情報（既知の神経毒性物質との影響の類似性など）も提示するものとする。

#### 結果の解釈

81. 拡張世代生殖毒性試験では、必要に応じて、生殖世代周期のすべての相を通じてある物質に反復曝露されたときの影響に関する情報を得ることができる。特に、生殖系ならびに PND 90 までの出生児の発生、成長、生存および機能的評価指標に関する情報を得ることができる。



82. 試験結果の解釈は、物理化学的性質、TK およびトキシコダイナミクス特性、構造類似対に関する入手可能な関連情報、および先に行われた被験物質を用いた毒性試験の結果（急性毒性、反復投与後の毒性、メカニズム試験、および in vivo/in vitro 代謝特性において実質的な定性的および定量的種差があるか否かを評価する試験など）を含んで、被験物質に関する入手可能なすべての情報を考慮に入れなければならない。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。出生児の成長の低下は、乳汁の組成に対する被験物質の影響と関連付けて考慮される場合がある(29)。

### コホート2（発達神経毒性）

83. 神経行動学および神経病理学的結果は、すべての所見との関連で証拠の重み付けによって専門家判断をもって解釈する。行動学および形態学的所見の型（みられる場合）ならびに用量反応関係について考察する。この特性解析には、ヒトにおける疫学的研究や症例報告および実験動物を用いた試験（トキシコキネティクスデータ、構造活性相関情報、他の毒性試験データなど）を含む発達神経毒性評価を含める。生物学および統計学的な関連性に関する評価も含める。また評価には、観察された神経病理学的変化と行動学的変化の関連性（あれば）に関する評価を含める。発達神経毒性試験結果の解釈に関するガイダンスについては、OECD TG426(35)および Tyl et al.,2008(31)を参照のこと。

### コホート3（発達免疫毒性）

84. TDAR（T 細胞依存抗体産生）で評価した場合、免疫機能の抑制または亢進は、実施したすべての観察との関連で評価する。免疫学的に関連する指標（骨髄細胞充実性、リンパ組織の重量および病理組織学的検査、リンパ球サブセットの分布など）に関する他の影響によって TDAR の結果の意義が裏付けられる場合がある。より低い曝露濃度において他の毒性がみられる場合には、TDAR によって確認された影響は意義が薄れる場合がある。

85. 生殖毒性および神経毒性の結果の解釈の助けとして OECD ガイダンス文書 43 を参照すること(26)。

## LITERATURE

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), “A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment”, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.
- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), “Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets”, *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), “Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group”, *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), “Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment”, *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), “Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey”, *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), “Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356- 369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). “Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats - overview of the studies”, *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), “Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology”, *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), “The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies”, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), “Cycles and Seasons”, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), “Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights”, *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), “Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat”, *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

- (14) Ladics, G.S. (2007), "Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), "Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
- (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, [ENV/JM/MONO\(2008\)16](#), OECD, Paris.
- (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

- (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), “A ‘Best Practices’ Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today”, *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), “Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components”, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
- (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), “Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats”, *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), “Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints”, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
- (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
- (33) OECD (1997), *Neurotoxicity Study in Rodents*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No.424, OECD, Paris.
- (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OECD, Paris.
- (35) OECD (2007), *Developmental Neurotoxicity Study*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 426, OECD, Paris.
- (36) OECD (2007), *Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term Screening Test for Oestrogenic Properties*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 440, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 441, OECD, Paris.
- (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
- (39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, OECD, Paris.
- (40) OECD (2011), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris (not yet available)

## 補遺 A

### 機能観察試験一式（コホート 2A）に含まれる測定および観察

<u>ホームケージおよびオープンフィールド</u>	<u>操作的</u>	<u>生理学的</u>
姿勢 不随意的間代性または強直	移動させやすさ	体温 体
性運動 眼瞼閉鎖状態	取扱い易さ 筋	重 瞳孔
立毛	緊張 近接反応	反射 瞳
流涎	接触反応 聴覚	孔径
流涙	反応 痛覚反応	
啼鳴	正向反射 着地	
立ち上がり	開脚幅 前肢握	
歩行障害	力測定 後肢握	
覚醒 常同	力測定	
行動 異常		
行動 染み		
呼吸異常		

