OECD/OCDE

2018/06/25

試験ガイドライン No.408

齧歯類における90 日間反復経口投与毒性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2018), Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-408-2018.pdf.

©OECD(2018)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

OECD/OCDE **408**
採択
2018 年 6 月 25 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学の進歩、規制要件の変化および動物福祉の観点から定期的に再検討がなされる。ガイドライン 408 の初版は、1981 年に採択された。1998 年には、試験に用いた動物から更なる情報を得るため、1995 年にローマで開催された「亜慢性および慢性毒性試験に関する OECD 専門家協議会」の結果に基づき(1)、改訂版が採択された。

2. 今回の試験ガイドライン（TG）は 2018 年の改訂版であり、被験化学物質の内分泌活性の検出を改善することを目的として、内分泌に関する感度が高い評価項目が追加されており、TG 407（げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験）の更新が反映されている。

最初に考慮すべき事項

3. 化学物質の毒性評価では、急性試験や 28 日間反復投与毒性試験で毒性に関する最初の情報を得た後に、反復投与法を用いて亜慢性経口毒性を調べる場合がある。この 90 日間試験では、供試動物の離乳後の成熟・成長期から成熟後までを含む、より長期間の反復曝露で生じる可能性のある健康有害性についての情報が得られる。この試験により主な毒性作用に関する情報が得られ、被験化学物質の標的器官および蓄積の可能性が明らかになり、さらに無毒性量（NOAEL）の推定値が得られる。この NOAEL は、慢性試験の用量設定とヒトにおける曝露の安全基準確立に用いることができる。または、適切なモデル化法（ベンチマーク用量分析など）を用いて有害性評価の出発点を推定するために用いられる、用量相関性のある反応データが本試験によって得られる。

4. この改訂ガイドラインは、従来の神経系、免疫系および生殖器系への影響に対する感度と組み合わせつつ、さらに内分泌に関する評価項目に重きを置いている。また、可能な限り多くの情報が得られるように、動物の一般状態を注意深く観察することの必要性が強調されている。必要な評価項目は、

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

チロキシン（T4）、トリヨードチロニン（T3）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および甲状腺重量の測定である。これらの項目は甲状腺経路の撹乱に反応する(2)。また、血清総コレステロール、低比重リポ蛋白（LDL）および高比重リポ蛋白（HDL）については、その濃度が甲状腺ホルモンの直接作用によって制御され、（他の甲状腺評価項目とともに）甲状腺への影響の証拠となりうることから、これらの指標も測定すべきである(3)。任意の評価項目として、その他のホルモンの測定および精子パラメータの評価が含まれる。内分泌系への作用によって変化する可能性のある、必要な項目および任意の項目を補遺 B に示す。任意の測定項目については、被験化学物質、または類似した化学物質に関する既存の情報から、影響を受ける可能性が示唆される場合には、評価することを検討してもよい。または、本ガイドラインの一部として収集された必要な測定項目の所見から任意の測定項目の評価が促される場合もある。この試験によって、神経毒性、または内分泌系、免疫系、もしくは生殖器系の器官に対する影響を引き起こす可能性のある化学物質が明らかにでき、より詳細な検討を行う根拠にもなるであろう。

5. 内分泌関連項目について得られた結果は、「内分泌かく乱化学物質の試験と評価のための OECD の概念的枠組み（OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals）」(4)に照らして評価する。この概念的枠組みでは、レベル 4 の内分泌関連評価項目に対する有害作用についてデータが得られる *in vivo* 試験として TG 408 が含まれている。

6. 動物を用いる手順はすべて、動物管理基準に適合していなければならない。管理と処置に関する下記の説明は最小限の実施基準を示すものであり、規制が一層厳重な地域では代わりにその規制に従う。動物の人道的処置に関する詳細な指針は、「試験と評価に関する OECD シリーズ 19（OECD Series on Testing and Assessment 19）」(19)に記載されている。

7. この試験ガイドラインで用いた定義を補遺 A に示す。

試験の概要

8. 被験化学物質を、実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で少なくとも 90 日間毎日経口投与する（1 群 1 用量）。OECD の勧告に従い(19)、投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験中に死亡した動物、または安楽死させた動物は剖検し、全投与期間後に生存している動物についても安楽死させて剖検を行う。

© OECD 2018

試験方法について

動物種の選択

9. 試験の動物種としてはラットが望ましいが、他のげっ歯類動物（マウスなど）を用いてもよい。この TG 408 で規定するパラメータを別のげっ歯類を用いて検討する場合には、当該種を選択する根拠を、パラメータの尺度への適応性とともに詳細に説明する。他の動物種でも毒性物質に対してラットと同じように応答するはずであるという考えは生物学的にもっともなことであるが、小型の動物種を用いると、摘出する器官が小型になるという技術的問題のために、評価項目の測定値の変動が大きくなることもある。一般に使用されている実験動物の系統の中から健康な若齢成熟動物を選択する。雌では未経産・非妊娠の動物を用いる。離乳後投与可能になれば直ちに、かつ、いかなる場合であっても 9 週齢未満で投与を開始する。動物の試験開始時の体重の変動幅を最小限に抑え、雌雄それぞれに平均体重から± 20%を超えないようにする。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、両試験とも同じ系統および同じ供給元の動物を使用する。

飼育および給餌条件

10. 実験動物管理に関する地域の基準に従って、すべての手順を行う。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%以上で 70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で明暗周期を 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よい。飲料水は自由に摂取させる。なお、被験化学物質を混餌投与する場合は被験化学物質とよく混合できる飼料を選択することが必要であろう。試験結果の解釈に影響を及ぼす傾向がある、または影響を及ぼす可能性のあるホルモン活性物質（植物エストロゲンなど）を、許容できないほど高濃度に含有している可能性のある飼料または床敷を避けるよう注意する。実験動物用飼料中に高濃度の植物エストロゲンが含まれると、げっ歯類の子宮重量が増加することが知られている。植物エストロゲンの摂取量の目安は、げっ歯類用飼料 1 g あたりゲニステイン相当量として 350 µg を超えないものとする。

11. 動物は同性の動物を少数ずつまとめて収容する。科学的根拠がある場合は個別に収容してもさしつかえないが、個別飼育期間は必要最低限の期間とする(5)(6)(7)。

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

供試動物の準備

12. 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。各個体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が最小限になるような方法で配置する。各個体には固有の識別番号を付与する。個体識別には、必ず侵襲性の最も低い方法を用いる。適切な方法として、足環、タグ、マイクロクチップの装着、生体認証などがある。

投与の準備

13. 被験化学物質は強制経口投与、混餌投与または混水投与する。経口投与の方法は、試験の目的および被験化学物質の物理的／化学的性状により決まる。

14. 被験化学物質は必要に応じて適切な溶媒に溶解するか、懸濁させる。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を推奨する。水以外の溶媒を使用する場合には、溶媒の毒性を把握しておかなければならない。また、投与条件下での被験化学物質の均一性および安定性を確認する。

試験の手順

動物数および性

15. 各用量で 20 匹以上（雌雄各 10 匹）の動物を用いる。中間安楽死を計画する場合には、動物数を試験終了前に計画屠殺する動物の数の分、増やしておく。被験化学物質や類縁物質に関する予備知識に基づき、投与期間後に毒性作用の可逆性または持続性を観察するために対照群と最高用量群に少なくとも各 10 匹（雌雄各 5 匹）からなるサテライト群の追加を考慮する。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。

用法

16. 限度試験を実施する場合（段落 18 参照）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、被験化学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。被験化学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（「試験と評価に関する OECD シリーズ 19」(19)）。その後は、用量を順次下げていき、用量相関的応答がみられるとともに最低用量では NOAEL となるような用量を設定する。用量段階の設定には通常公比 2～4 が最適であり、用量間隔が非常に大きい場合（公比がおよそ 6～10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよい場合が多い。

© OECD 2018

17. 対照群は未投与群または溶媒対照群（被験化学物質投与に溶媒を用いる場合）とする。対照群動物は、被験化学物質の投与以外、被験化学物質投与群と同様の方法で取り扱う。溶媒を使用する場合は、対照群には溶媒を最大容量で投与する。被験化学物質の混餌投与で摂餌量の減少がみられるときには、その供試動物において嗜好性による摂餌量減少か毒性学的変化かを区別するために、給餌量を揃えた対照群が有用な場合がある。

18. 溶媒については、必要に応じて、被験化学物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験化学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

19. 本試験法の手順を用いて 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、かつ、構造的に関連のある化合物のデータからは毒性が予想されない場合には、3 用量段階を用いた完全な試験は必要ないであろう。ヒトへの曝露がより高用量の使用を示唆する場合を除き、限度試験が適用される。

投与

20. 被験化学物質を動物に週 7 日、90 日間以上、毎日投与する。その他の投与法（週 5 日の投与など）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。被験化学物質を強制経口投与する場合には、胃管または適切な挿管カニューレを用いて動物に単回投与する。1 回で投与できる液体の最大容量は供試動物の大きさによる。容量は体重 100 g 当たり 1 mL を超えてはならないが、水溶液の場合には例外的に体重 100 g 当たり 2 mL を投与してもよい。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物質または腐食性物質の場合を除いて、すべての用量で容量が一定になるように濃度を調節して、投与容量の変動を最小限にする。

21. 混餌投与または混水投与を行う物質では、含まれている被験化学物質の嗜好性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。被験化学物質を混餌投与する場合には、飼料中濃度（ppm）を一定にするか、必要に応じて動物の体重に対して一定用量（mg/kg 体重/day など）を維持するよう調整するか、いずれかの方法を用いる。代わりの方法を用いる場合には具体的に説明しなければならない。被験化学物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与を行い、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。

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

観察

22. 観察期間は 90 日間以上とする。サテライト群を設ける試験の場合、追跡観察を予定しているサテライト回復群の動物については、毒性作用の持続性や毒性作用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。

23. 一般状態の観察は 1 日 1 回以上、望ましくは毎日同時刻に行う。その際、予想される影響が投与後に最も強く表れるまでの期間を考慮する。各個体の一般状態の観察所見を記録する。また、少なくとも 1 日 2 回（通常、1 日の始めと終わりに）、すべての動物について症状および生死を確認する(19)。

24. 一般状態の観察を、少なくとも初回曝露前に 1 回（個体内比較のため）、およびその後は週 1 回、すべての動物について詳細に行う。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。また、可能であれば、試験施設ごとに明確に定めたスコアリングシステムを用いて、その結果を慎重に記録する。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、粘膜、分泌物、排泄物および自律神経系機能の変化（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。さらに、歩行、姿勢および動物の取扱い時の反応の変化、ならびに間代性もしくは強直性運動、常同行動（過度の毛づくろい、反復性旋回など）、または異常行動（自咬、後ろ向き歩行など）の有無も記録する(8, 19)。

25. 被験化学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。検査はすべ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する。眼の変化が認められた場合には、すべての動物を検査する。

26. 曝露期間終了に近い時点で（早くとも 11 週以降に）、種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激、固有感覚刺激など）(9)(10)(11)に対する感覚反応性の評価(5)、握力測定(12)および自発運動量の測定(13)を行う。従うべき手順の詳細は各参考文献に記載されている。ただし、参考文献に示された手順とは別の手順を用いてもよい。

27. 他の試験で得られた機能検査のデータがある場合、または 1 日 1 回の一般状態の観察で機能障害が認められなかった場合には、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。

28. 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所見から認められる群についても機能検査を省略してもよい。

体重および摂餌量／摂水量

29. 体重はすべての動物について週 1 回以上測定する。摂餌量は週 1 回以上測定する。被験化学物質を飲水投与する場合は、摂水量も週 1 回以上測定する。混餌または強制経口投与試験でも、摂水量の測定を考慮するとよい。

© OECD 2018

血液学的検査および臨床生化学検査

30. 血液試料は指定部位から採取し、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。

31. 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。すなわち、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、網状赤血球数、白血球数および白血球分画、血小板数、血液凝固時間／凝固能の測定である。

32. 組織に対する主要な毒性作用、特に腎臓および肝臓に対する影響を検討するために、各個体（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）を屠殺する直前または屠殺手順の一部としてすべての動物から採取した血液試料について、臨床生化学検査を行う。血液学的検査と同様に、臨床生化学検査用の中間採血を行ってもよい。採血前には各個体を一晩絶食させるよう勧告する[1]。血漿または血清を用いて、ナトリウム、カリウム、血糖、総コレステロール、HDL、LDL、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 3 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ペプチダーゼ、ソルビトール脱水素酵素など）を測定する。場合によっては有用な情報が得られることがある、（肝臓やその他の組織由来の）追加の酵素および胆汁酸、ならびにビリルビンの測定を含めてもよい。

33. 臨床生化学検査は、一般的な組織損傷のマーカーとして評価を行う。被験化学物質の既知の性質から、関連する代謝プロファイルへの影響があると考えられる、または疑われる場合には、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の他の項目も測定する。検査すべき項目は化学物質の種類ごとに、または個々の場合に応じて決めることができる。

34. 試験終了時に、主試験群、ならびにサテライト群および／または回復群

[1] 血清および血漿の測定項目の多く（特に血糖）については、一晩の絶食が望ましいであろう。これを望ましいとする主な理由は、非絶食条件では必然的に変動が大きくなり、その結果、より軽微な影響が覆い隠されて解釈が困難になると予想されるためである。しかしその一方で、一晩の絶食により動物の全身的な代謝に影響を与える可能性があり、また、特に混餌投与試験では、被験化学物質に対する毎日の曝露が妨げられかねない。なお、一晩の絶食を行う場合には、当該試験における機能検査実施後に臨床生化学検査を行うものとする。

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

の各個体から採取した試料を用いて、血清中の総 T4 値、総 T3 値および総 TSH 値を測定する。テストステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）など他のホルモンについては、個々の場合に応じて検討する。他の評価項目（臓器重量、組織学的検査など）から得られた結果に基づいて分析が最も有用なホルモンを決定するまで、血清を凍結保存しておくとよい。妥当なバリデーションデータおよび背景データが得られる場合は、血漿中のホルモンを測定してもよい。

35. 以下の因子はホルモン測定の変動および絶対的濃度に影響する可能性がある。

- 安楽死時間（ホルモン濃度には日内変動があるため）
- 発情周期の時期
- 安楽死方法（ホルモン濃度に影響する可能性のある過度のストレスを避ける）
- ホルモン濃度測定キット（標準曲線により異なる可能性がある）

36. ホルモン測定専用の血液試料の採取は、ほぼ同時刻に行う。ホルモン濃度測定で得られる数値は市販の測定キットにより異なる。したがって、一貫性のある背景データに基づいて性能基準を設定することができない可能性がある。偶発的な変化と投与に関連した変化とを判別するために、ホルモン濃度の対照値（同一施設にて、同一のげっ歯類系統を用いて、同一方法により得られた測定値）を考慮する。可能である場合には必ず、血液試料の採取、取り扱いおよび分析には最良実施例を用いる(23)。変動係数については可能な限り、T_3およびT_4は 25 未満、TSH は 35 未満に維持されるよう努める。濃度単位はすべて ng/mL にて記録する。選択した保存条件下でのT_3、T_4および TSH の安定性については、ホルモン濃度測定のバリデーションの一環として試験を実施する。

37. 随意ではあるが、試験の最終週に採尿時間を設定して採取した尿を用いて、外観、尿量、浸透圧または尿比重、pH、蛋白、糖、潜血／血液細胞などの尿検査を行ってもよい。

38. 基準となる背景データが妥当なデータでない場合には、投与開始前に血液学的および臨床生化学検査項目を測定すべきかを検討する。ただし、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(14)。

病理学的検査

39. 試験終了時、すべての雄動物について精巣および精巣上体の重量を測定・記録する。雄の個体ごとに少なくとも片側の精巣上体を病理組織学的検査用に保存する。残った精巣上体は、任意で実施する精巣上体尾部の貯蔵精子数の計数、精子の形態、または精子運動性の評価に使用することができる(15)。

40. 任意で行う精子形態の評価については、精巣上体（または精管）の精子

© OECD 2018

試料の固定標本または湿標本を調べ、1 試料につき少なくとも 200 個の精子を正常（頭部および中央部／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、頭部および／または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。精子の運動性については、安楽死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、視覚的に、またはコンピュータで運動解析を行うことにより求めることができる。

41. 精子パラメータの解析は、対照群および高用量群の雄に限定してもよい。ただし、投与に関連した影響が認められた場合は、より低い用量群についても評価する必要がある。

42. 剖検時に、すべての雌から膣垢塗抹標本を採取して発情周期を決定する。このような観察から、安楽死時における発情周期の時期が分かり、エストロゲン感受性組織の組織学的評価が促進される（OECD のガイダンス文書 106 第 3 部(17)を参照のこと）。

剖検

43. すべての供試動物について、体表、すべての開口部、頭蓋腔・胸腔・腹腔および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病理検査を行う。すべての動物の肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺＋凝固腺を含む精嚢腺全体（または精嚢／凝固腺を含む前立腺全体の重量を最初に測定し、その後、別途、前立腺重量を測定する）、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。下垂体の重量は、摘出直後の新鮮な状態で測定しても固定後に測定してもよい。前立腺複合組織のトリミングに際しては、液が充満した精嚢の穿刺を避けるよう注意しなければならない。別の方法として、固定後に精嚢と前立腺の切り出しを行い、重量を測定してもよい。

44. 甲状腺は組織が損傷しやすいことから、その重量測定は特に慎重に行わなければならない（指針としては、参考文献 20 を参照のこと）。組織損傷により病理組織学的評価が損なわれる可能性がある。したがって、甲状腺のトリミングおよび重量測定は非常に慎重に行うべきであり、組織損傷を避けるために固定後に行うことが望ましい。

45. 以下に示す組織は、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最も適した固定液に保存する(16, 17)。すなわち、すべての肉眼病変、脳（大脳、小脳および延髄／橋を含む代表的な部位）、脊髄（頸部、中胸部および腰部の 3 カ所）、下垂体、甲状腺、上皮小体、胸腺、食道、唾

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

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、卵巣、子宮、子宮頸部、膣部、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、凝固腺、乳腺（雄および雌）、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）、骨格筋、骨および骨髄（切片、または新鮮吸引骨髄）、皮膚、眼（眼科学的検査で変化が認められた場合）である。精巣はブアン（Bouin）固定液または改変デビッドソン（Davidson）固定液に浸漬して固定することを推奨する。病理組織学的評価では、精細管横断切片を用いた所定の方法により(16)、病期分類について検討する。内分泌器官の固定と組織学的評価については、OECD のガイダンス文書 106(17)も参照されたい。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、被験化学物質の既知の性質から標的器官として考えられる器官についてはすべて評価を行う。

46. 既報の通り(14)、精巣の病理組織学的評価は、時期特異的な変化に注意して行う。精子細胞の停滞、胚細胞層の消失または胚細胞の種類の欠損、多核巨細胞、腔内への精子形成細胞の脱落など、投与に関連した影響を特定するために、詳細な病理組織学的検査を実施する(21)。内分泌器官の固定と組織学的評価に関する OECD のガイダンス文書 106(17)も参照されたい。

病理組織学的検査

47. 対照群および高用量群のすべての動物について、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組織については、他のすべての用量群の動物についても検査する。

48. 肉眼病変はすべて検査する。

49. サテライト群を設けた場合には、投与群で影響が認められた組織および器官について病理組織検査を行う。

データおよび報告

データ

50. 個体ごとのデータを示す。さらに、試験開始時の動物数、試験中に死亡または人道的理由により安楽死させた動物数および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）、病変が認められた動物の数、病変の種類、ならびに認められた病変の種類ごとの動物の割合について、全データを群ごとに総括表にまとめる。

51. 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値データを評価する。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。

© OECD 2018

52. データの品質管理のために、同じ施設、動物種および系統にて同等の条件下で収集された背景データと対照群のデータとを比較するよう推奨する。さらに、補遺 B に示した内分泌活性に関する連続パラメータについて変動係数を算出する。これらのデータは試験間の比較に用いることができる。背景データを評価する際には、ラットの系統間での差異を考慮する。

試験報告書

53. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験化学物質：

- IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
- 入手先、ロット番号、使用期限（入手可能である場合）
- 既知であれば、被験化学物質の安定性
- 物理的性質、関連性がある場合は、物理化学的性状
- 既知である、または確定している場合は、CAS 番号などの識別データ
- 純度

単一成分物質：

- 外観、水溶解度およびその他の関連する物理化学的性状

多成分物質、UVBC および混合物：

- 成分の化学的識別情報（上記参照）、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的性状によって可能な限り特徴付けること

溶媒（該当する場合）：

- 水以外の場合は、溶媒選択の妥当性

供試動物：

- 使用した動物種および系統
- 動物数、週齢および性別
- 供給元、飼育条件、飼料など
- 試験開始時の個体ごとの体重
- ラット以外の場合は、動物種選択の妥当性

試験条件：

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

- 用量設定根拠
- 被験化学物質溶液／被験化学物質混合飼料の調製方法の詳細、濃度の実測値、調製物の安定性および均一性
- 被験化学物質投与の詳細
- 実際の用量（mg/kg 体重/day）、また該当する場合には、飼料／飲料水中の被験化学物質濃度（ppm）から実際の用量への換算係数
- 飼料の品質および水質の詳細

結果：

- 体重および体重変化
- 摂餌量、および該当する場合は、摂水量
- 性別および用量別の毒性反応データ（毒性徴候を含む）
- 一般状態の観察所見の種類、程度および期間（可逆性の有無を含む）
- 眼科学的検査結果
- 検査した場合、感覚運動反応、握力および自発運動量の評価結果
- 関連するベースライン値を含む血液学的検査結果
- 関連するベースライン値を含む臨床生化学検査結果
- 血中甲状腺ホルモン値（T4、T3、TSH［必須］）
- その他のホルモンの測定値（任意）
- ホルモン値の測定方法（測定法の種類、供給者、手順など）
- 最終体重、臓器重量、臓器重量対体重比
- 剖検所見
- 最終腟細胞診
- すべての病理組織学的所見の詳細な説明
- 精巣上体尾部の総精子数、前進運動精子率、正常形態精子率、および認められた異常ごとの精子率（任意）
- 分析した場合は吸収（ADME または TK 情報など）データ
- 必要に応じて、結果の統計処理
- 試験期間終了前に安楽死させた個体については、その決定の理論的根拠を報告する
- 試験期間中に死亡した状態で発見された個体については、可能であれば死因を特定する

結果の考察

結論

© OECD 2018

参考文献

(1) OECD (Rome, 1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing.

(2) OECD (2006). Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 57

(3) Kovanen P.T. (1987). Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors. Am Heart J. 113(2 Pt 2):464-9.

(4) OECD (2018). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal, 29, L358, 18th December 1986.

(6) National Research Council (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Edition. NIH Publication. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(7) Andersen M.L., D'Almeida V., Ko G.M., Martins P.J.F., Tufik S. (2016) Care and Maintenance of Laboratory Animals. In: Andersen M., Tufik S. (eds) Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research. Springer, Cham

(8) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(9) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(10) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health, 9, 691-704.

(11) Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

© OECD 2018

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 日付けにて作成された手順書に従い、「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。

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(14) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29: 198-201.

(15) 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.R. 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(3):237–244.

(16) Russell, L.D; R.A. Ettlin; A.P. Sinha Hikim; E.D. Clegg. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River, Clearwater, FL (1990).

(17) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 106.Parts 1-6. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407 Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 59. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(20) US EPA (2005) Guidance for Thyroid Assay in Pregnant Animals, Fetuses and Postnatal Animals and Adult Animals. US EPA Office of Pesticide Programs, Washington, DC. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/thyroid_guidance_assay.pdf

(21) Creasy DM. (2002) Histopathology of the male reproductive system II: interpretation. Curr Protoc Toxicol. Nov;Chapter 16:Unit16.4.

(22) Mondal S, Govindasamy M. 2017. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action. Mol Cell Endoc. 458: 91-104.

(23) Kucheryavenko O, Lurman G, Lehman A, Bras J, Niemann L, Terron A, Chahoud I, Mantovani A, Håkansson H, Schneider S, Ritz V, Solecki R. (2018) Report from the BfR Expert Hearing on Practicability of Hormonal Measurements. Arch Toxicol. (*in prep.)* [see: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm]

© OECD 2018

補遺 A

定義

アンドロゲン性とは、哺乳動物において、化学物質が天然のアンドロゲンホルモン（テストステロンなど）のように作用する能力のことである。

抗アンドロゲン性とは、哺乳動物において、化学物質が天然のアンドロゲンホルモン（テストステロンなど）の作用を抑制する能力のことである。

抗エストロゲン性とは、哺乳動物において、化学物質が天然のエストロゲンホルモン（エストラジオールなど）の作用を抑制する能力のことである。

抗甲状腺活性とは、哺乳動物において、化学物質が天然の甲状腺ホルモン（T3 など）の作用を抑制する能力のことである。

用法とは、用量、投与頻度および投与期間からなる一般用語である。

用量とは、投与する被験化学物質の量をいう。被験化学物質の重量（g、mg）、もしくは供試動物の単位体重当たりの被験化学物質重量（mg/kg など）、または一定の飼料中濃度として（ppm）で表される。

明らかな毒性とは、被験化学物質の投与後に認められる明確な毒性徴候を表す一般用語である。これは危険有害性評価の実施に十分な毒性徴候であり、かつ投与量の増加に伴って重度の毒性徴候が発現し、死亡に至る可能性があると予想されうる毒性徴候でなければならない。

HDL：高比重リポ蛋白

LDL：低比重リポ蛋白

NOAEL とは、no-observed-adverse-effect level（無毒性量）の略であり、投与に関連した有害所見が認められない最高用量をいう。

エストロゲン性とは、哺乳動物において、化学物質が天然のエストロゲンホルモン（エストラジオールなど）のように作用する能力のことである。

T3：トリヨードチロニン-甲状腺ホルモンの活性型

T4：チロキシン-血中の主な甲状腺産物は T3 に変換される

甲状腺活性とは、哺乳動物において、化学物質が天然の甲状腺ホルモン（T3 など）のように作用する能力のことである。

TSH とは、Thyroid Stimulating Hormone（甲状腺刺激ホルモン）の略であり、甲状腺ホルモンの産生および甲状腺からの放出に関わる下垂体ホルモンのことである。

バリデーションとは、試験法の操作上の要求事項および限界を特徴付けるとともに、特定の目的に対する試験法の信頼性および妥当性を証明するためにデザインされた科学的な検証プロセスのことである。

© OECD 2018

補遺 B.

内分泌活性の検出に推奨される評価項目

必須項目	任意項目
臓器重量	
精巣 精巣上体 副腎 前立腺＋凝固腺を含む精嚢腺全体 子宮 卵巣 下垂体 甲状腺	
病理組織学的検査	
甲状腺および上皮小体 副腎 下垂体 [2] 精巣 精巣上体 前立腺腹葉および背側葉 精嚢および凝固腺 卵巣 [2] 子宮頸部 [2] 膣 [2] 子宮 [2] 発情周期の時期を判定するための膣垢塗抹標本（剖検時に採取）[2] 乳腺（雌および雄）[2]	膵島
血清／血漿生化学検査	
総コレステロール HDL LDL	
血清中／血漿中ホルモン濃度測定	
チロキシン（T4） TSH T3	FSH LH エストラジオール テストステロン
精子指標	
	精巣上体尾部の貯蔵精子数 精子の運動性 精子の形態

[2]雌のエストロゲン感受性臓器の状態を評価する際は、明らかな病理学的変化ではないが、卵巣周期の時期から予想される状態とは異なる組織学的変化が内分泌活性検査薬によって引き起こされる可能性があることから、試験期間終了時の発情周期の時期を考慮に入れて行うこと。

出典：（OECD ガイダンス文書 106 第 3 部および第 4 部［17］）。

© OECD 2018