OECD/OCDE

1998/09/21

試験ガイドライン No.409

非齧歯類における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 (1998), Test No. 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070721-en.

©OECD(1998)

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

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

非げっ歯類における 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、科学的進歩を踏まえて定期的に見直されている。ガイドライン 409 の初版は、1981 年に採択された。今回の改訂版では、試験に用いた動物から更なる情報を得ることを目的として変更が行われた。

2. このガイドライン 409 改訂版は、1995 年 11 月 2～3 日にローマで開か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主に基づいている(1)。

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、急速な成長期から若齢成熟期に至る期間での反復暴露で生じる可能性のある健康に対するハザードについての情報が得られる。この試験によって、主な毒性影響に関する情報が得られ、標的器官と蓄積の可能性が明らかになり、更に有害影響がみられない暴露量（無毒性量）の推定値が得られる。この無毒性量は、慢性試験の用量設定とヒトにおける暴露の安全基準確立に用いることができる。

4. この改訂ガイドラインは化学物質暴露の有害影響を非げっ歯類において明らかにすることができるが、その使用は以下の場合に限るものとする。

- 他の試験で影響が認められ、第二の動物種の非げっ歯類でこれを明確化／特徴付けする必要性が示された場合。または、
- トキシコキネティクス試験により、特定の非げっ歯類が実験動物として最も関連性の高い選択肢であることが示された場合。または、
- 非げっ歯類の使用を正当化する他の特別な理由がある場合。

5. 用いた定義を補遺に示す。

試験の概要

6. 被験物質を、実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で 90 日間毎日経口投与する（1 群 1 用量）。投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験中の死亡または屠殺動

物は剖検し、試験終了時には生存動物も屠殺して剖検する。

試験方法

動物種の選択

7. 一般的に用いられる非げっ歯類はイヌである。品種のはっきりしたものとするが、ビーグル犬が用いられることが多い。ブタ、ミニブタなど、他の動物種を用いてもよい。霊長類は推奨されず、これを用いる場合にはその妥当性を示すこと。健康な若齢動物を用いる。イヌの場合、4～6 カ月齢で投与を開始することが望ましく、遅くとも 9 カ月齢を超えないものとする。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、両試験において同じ動物種／品種を使用する。

飼育および給餌条件

8. 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。なお、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生じる場合がある。ケージは動物種に合ったものとする。照明は人工照明が望ましく、12 時間明期、12 時間暗期とする。飼育および給餌条件は、当局の定める法律およびガイダンスが示す、その動物種に特異的な要件を満たすものとする(2)(3)(4)。

動物の準備

9. 以前に実験に供されたことのない健康な若齢動物を、飼育室環境に馴化した後に用いる。馴化期間は、選択した試験動物種とその供給元によるが、イヌや実験用ブタが施設内のコロニーから供給される場合は 5 日間以上、これらの動物が外部から供給される場合は 2 週間以上が推奨される。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重または月（週）齢を明らかにする。動物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を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。

投与の準備

10. 被験物質は飼料や飲水に混ぜて挿管法で、またはカプセルに封入して投与する。経口投与の方法は、試験の目的および被験物質の物理化学的性状に基づいて選択する。

11. 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が推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性が分かっていなければならない。また、投与条件下での被験物質の安定性を分析する。

手順

動物数および性

12. 各用量とも少なくとも 8 匹（雌 4 匹、雄 4 匹）の動物を用いる。中間屠殺を予定する場合には、試験終了前に計画殺する動物数をこれに追加する。試験終了時の動物数は、毒性影響の意味のある評価を行うのに十分な数でなければならない。また、被験物質や類縁物質に関する予備知識に基づき、投与期間後に毒性影響の可逆性や持続性を観察するため、対照群および最高用量群各 8 匹（4 匹／性）からなる追加のサテライト群を設けることを考慮する。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。

投与量

13. 限度試験を実施する場合（段落 16 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。被験物質の物理化学的性状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。その下の各用量段階は投与量と反応との関連性を明らかにし、最低用量で無毒性量（NOAEL）が得られるように設定する。用量段階の設定には公比 2～4 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ 6～10 を超える場合など）には、4 群目を追加した方がよいことが多い。

14. 対照群は未投与群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。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。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。被験物質の混餌投与で摂餌量の減少がみられるときには、嗜好性による減少か毒性学的変化かをその試験モデルで区別するために、給餌量を揃えた対照群が有用な場合がある。

15. 溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験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

16. 本ガイドラインに記載された方法で試験を行った結果、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、および構造的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、3 段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い用量の必要性が示唆されない限り、限度試験が適用される。

投与

17. 被験物質を動物に週 7 日、90 日間にわたって毎日投与する。週 5 日の投与など、その他の投与法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。挿管法による場合には、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて 1 日 1 回投与する。1 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、一般に投与容量は可能な限り小さくする。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、全用量で投与容量が一定になるようにする。

18. 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、動物の体重あ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かなければならない。挿管法またはカプセルでの被験物質投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行う。また、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。長期慢性毒性試験の予備試験として 90 日間試験を実施する場合には、両試験において同様の飼料を用いる。

観察

19. 観察期間は 90 日間以上とする。追跡観察を予定しているサテライト群の動物については、毒性影響の持続性や毒性影響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。

20. 一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行い、動物の状態を記録する。観察は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら、毎日同じ時刻に行うことが望ましい。また、少なくとも 1 日 2 回（通常、1 日の始めと終わりに）、全ての動物について病気の徴候および生死を確認する。

21. 少なくとも初回暴露前に 1 回（個体内比較のため）、およびその後は週 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。これらの観察は、可能であれば飼育ケージの外の観察台上で行うが、毎回ほぼ同じ時刻にすることが望ましい。また、観察条件の変動は最小になるようにする。毒性徴候を、発現時期、程度および持続期間を含めて、注意深く記録する。観察内容は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の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、常同行動（身づくろいの変化、旋回など）および異常行動も記録する。

22. 被験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。検査は全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し、投与に関連した眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。

体重および摂餌量／摂水量

23. 全ての動物について、少なくとも週 1 回体重を測定する。また、摂餌量を少なくとも週 1 回測定する。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量も少なくとも週 1 回測定する。混餌

または強制経口投与試験でも飲水行動の変化がみられた場合には、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

24. 指定部位から血液試料を採取し、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。

25. 試験開始時、その後は1カ月ごとまたは試験期間の中間時点、最後に試験期間終了時に、以下に示す血液学的検査を行う。ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、総および型別白血球数、血小板数、血液凝固能に関連する項目（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間など）。

26. 試験開始時、その後は1カ月ごとまたは試験期間の中間時点、最後に試験期間終了時に、全ての動物から採取した血液試料について、組織における主な毒性影響、特に腎臓および肝臓に対する影響を調べるため、臨床生化学的検査を行う。考慮すべき検査分野は、電解質バランス、炭水化物代謝および肝機能と腎機能であるが、どの検査を選択するかは被験物質の作用様式に関する観察の結果によって異なる。採血前には、その動物種に適した期間、動物を絶食させる。検査項目として提案されるものは以下の通りである。カルシウム、リン、塩素、ナトリウム、カリウム、絶食時血糖、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、オルニチンデカルボキシラーゼ、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ、尿素窒素、アルブミン、血中クレアチニン、総ビリルビン、血清総蛋白。

27. 少なくとも試験開始時、中間時および最後に終了時に、一定時間の採取尿について尿検査を行う。尿検査では以下の項目を検査する。外観、尿量、浸透圧または比重、pH、蛋白、糖、血液／血球。また、認められた影響について更に検討するため、必要に応じて、追加項目の検査を行ってもよい。

28. 更に、一般的な組織障害に関するマーカーの検査も考慮する。適切な毒性学的評価のため必要とされる場合のあるその他の項目には、脂質、ホルモン、酸／塩基平衡、メトヘモグロビン、コリンエステラーゼ阻害などがある。また、認められた影響について更に検討するため、必要に応じて、追加の臨床生化学的検査を行ってもよい。検査すべき項目は化学物質の種類ごとに、また個々の場合に応じて決める必要がある。

29. 結局、それぞれの化合物については、その種類と、観察または予測される影響に応じて、柔軟な取組み方が必要ということである。

病理学的検査

剖検

30. 試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内臓の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。全ての動物（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）の胆嚢を含む肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、甲状腺（上皮小体を含む）、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。

31. 以下に示す組織を、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関して最も適切な固定液中で保存する。全ての肉眼病変、脳（大脳、小脳および延髄／橋を含む代表的な部位）、脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）、下垂体、眼、甲状腺、上皮小体、胸腺、食道、唾液腺、胃、小腸および大腸（パイエル板を含む）、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、気管および肺、大動脈、生殖腺、子宮、副生殖器、雌の乳腺、前立腺、膀胱、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）、骨髄の一部（または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方）、皮膚。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、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。

病理組織学的検査

32. 少なくとも対照群および高用量群の全ての動物について、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場合には、他の全ての用量群の動物についても検査する。

33. 全ての肉眼病変を検査する。

34. サテライト群を設けた場合には、投与群での影響の発現が明らかになった器官および組織について、病理組織学的検査を行う。

データおよび報告

データ

35. 動物の個体ごとのデータを示す。また、全データを総括表にし、各試験群について、試験開始時動物数、試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽死させた動物数、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）、病変を示した動物数、病変の種類、ならびに各病変を示した動物の割合を示す。

36. 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的結果を評価する。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ものとする。

試験報告書

37. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
－物理的性質、純度、物理化学的特性
－特定データ

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
－使用した動物種および系統
－動物数、月（週）齢、性
－供給元、飼育条件、飼料など
－試験開始時の個体ごとの体重

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、調製物の安定性および均一性
－被験物質投与の詳細
－実際の用量（mg/kg 体重/day）、また必要に応じて、飼料／飲水中の被験物質濃度（ppm）から実際の用量への換算係数
－飼料および水の質の詳細

結果
－体重／体重変化
－測定した場合、摂餌量、摂水量
－性および用量ごとの毒性反応データ（毒性徴候を含む）
－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）
－眼科学的検査結果
－血液学的検査結果および関連基準値
－臨床生化学的検査結果および関連基準値
－最終体重、器官重量、器官重量／体重比
－剖検所見
－全ての病理組織学的所見に関する詳細な記述
－測定した場合、吸収データ
－必要に応じて、結果の統計処理方法

結果の考察

結論

参考文献

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

(2) 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.

(3) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(4) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

補遺

定義

用量とは、投与される被験物質の量をいう。被験物質の重量（g、mg）、試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kgなど）、または一定の飼料中濃度（ppm）で表わす。

投与量とは、用量、投与頻度および投与期間からなる一般的な用語である。

NOAELとは、無毒性量の略で、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。