OECD/OCDE

2001/01/22

試験ガイドライン No.414

出生前発生毒性試験

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 (2001), Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, 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-414-2001.pdf.

©OECD(2001)

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

2001 年 1 月 22 日採択

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

出生前発生毒性試験

はじめに

1. 1995 年 6 月にコペンハーゲンで開かれた生殖発生毒性に関する OECD のワーキンググループにおいて、OECD の当時の生殖発生毒性試験ガイドラインを更新し、そこに取り上げられていない評価項目を含む新しいガイドラインを作成する必要性が協議された。このワーキンググループでは、米国の提案に基づいて発生毒性試験ガイドラインの改訂が推奨され(1)、そのすべての主要な改訂内容について合意に達した。

ガイドラインの目的

2. この発生毒性試験ガイドラインは、出生前暴露が妊娠被験動物および発生中の生物に与える影響について全般的な情報を得られるように計画されている。この情報には、胎児の死亡、構造異常、または発育異常と同様に母体への影響の評価などが含まれる。機能不全は発生の重要な要素であるが本ガイドラインには含まれず、別の試験、または当該試験の補足として、発生神経毒性に関するガイドラインに基づき検討される。機能不全および他の出生後影響に関する試験の情報については、二世代生殖毒性試験および発生神経毒性試験を参照のこと。

3. 本ガイドラインは、被験物質の物理化学的または毒性学的特性といった特定の知識に基づき、個別に調節が必要となる場合がある。こうした調節は、より情報量の多い試験が実施できることが説得力のある科学的証拠によって示唆される場合に許容される。この場合、その科学的証拠を必ず試験報告書に記録すること。

4. 使用する定義は補遺に示す。

試験の概要

5. 通常、妊娠動物への被験物質の投与は、少なくとも着床から屠殺予定日の前日までとする。屠殺予定日は、早産によるデータ欠損のリスクがなく正常な出産日に可能な限り近い日とすること。本ガイドラインは、器官形成期（たとえば、げっ歯類 5～15 日目、ウサギ 6～18 日目）だけでなく、適宜、着床前から妊娠の全期間を経て帝王切開前日までの作用も検討

の対象とする。帝王切開後は速やかに雌を屠殺して子宮内容物を検査し、胎児について内臓や骨格の異常を評価する。

試験の準備

動物種の選択

6. 試験では最も妥当な動物種を用い、出生前発生毒性試験で一般的に用いられている実験動物種および系統を使用することが推奨される。試験の動物種としては、げっ歯類種はラット、非げっ歯類種はウサギが望ましい。別の動物種を使用する場合には、その妥当性を示すこと。

飼育および給餌条件

7. 動物飼育室の温度は、げっ歯類 22 ± 3°C、ウサギ 18 ± 3°C とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、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 12 時間明期、12 時間暗期とする。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。

8. 交配にはその目的に合ったケージを用いる。交配した動物は個別飼育が好ましいが、少数匹ずつ飼育してもよい。

動物の準備

9. 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。現実的に可能な限り、全試験群の動物の体重および週齢を均一にする。各用量レベルにて、若齢未経産雌を使用すること。同種同系統の動物を交配させ、兄妹交配は避ける。げっ歯類では膣栓または膣垢中の精子が観察された日、ウサギでは交尾日または、人工授精を行なった場合はその実施日を妊娠 0 日とする。交配した雌は、対照群と投与群に無作為に割付ける。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。交配した雌は対照群と試験群に無作為に割付け、雌をバッチで交配した場合は、各バッチの雌を全群に均一に分配する。同様に、同一の雄で人工授精を行なった雌は全群に均一に分配する。

手順

動物数および性

10. 各投与群および対照群には、剖検の時点で着床部位のある雌がおよそ 20 匹得られるように十分な数の雌を含める。着床部位のある雌が 16 匹未満の場合、その群は妥当とみなされない場合がある。母体死亡率が 10%を超えない限り、試験は無効とはならない。

投与の準備

11. 投与を円滑にするために溶媒または他の添加物を使用する場合は、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留、排泄に対する影響、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。溶媒は、発生毒性のないもの、および生殖への影響のないものを使用すること。

投与量

12. 通常、被験物質は着床（たとえば、交配後 5 日目）から予定帝王切開の前日まで毎日投与する。予備試験が実施されている場合、着床前損失の可能性が高いことが示唆されていない限り、交配から屠殺予定日の前日まで期間を延長して、全妊娠期間を投与期間としてもよい。妊娠中の不適切な取り扱いやストレスは、出生前死亡に至る可能性のあることが知られている。投与と無関係な要因による胎児死亡を防ぐため、妊娠動物の不必要な取り扱いや騒音などの外的因子によるストレスを回避すること。

13. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。健康な動物を対照群と試験群に無作為に割付ける。用量レベルの間隔は、毒性作用に差が生じるよう設定する。被験物質の物理化学的性質や生物学的影響による制限がない限り、最高用量は一定の発生毒性や母体毒性（臨床徴候または体重減少）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。中間用量は少なくとも 1 用量において、最小の毒性作用が観察できるレベルとする。最小用量は、母体毒性または発生毒性のどちらの徴候も生じることのないレベルとする。その下の各用量段階は、投与量と影響との関連性を明らかにし、無毒性量（NOAEL）か、またはベンチマーク用量を決定できるような検出限界に近い用量を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 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。母体 NOAEL の設定が目的であるものの、これを設定しない試験も実施可能である(2)。

14. 用量段階の設定では、被験物質や関連物質についてその時点で得られているあらゆる毒性データ、ならびに代謝やトキシコキネティクスに関する追加情報を考慮する。この情報は投与法の適切さを示す根拠ともなる。

15. 同時対照群を設けるが、この群は偽処置対照群または被験物質投与に溶媒を用いる場合には溶媒対照群とする。すべての群に同一量の被験物質または溶媒を投与する。対照群の動物は、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒対照群には、用いられる最大量の溶媒を投与すること（最小投与群と同様）。

限度試験

16. 本ガイドラインに記載された方法で経口投与試験を行なった結果、1000 mg/kg 体重/day 以上の 1 用量において毒性がみられなかった場合、および構造的または代謝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る。ヒトの予想暴露量から、限度試験においてより高い経口用量を使用する必要性が示唆されることもある。吸入や経皮など、他の投与方法については、多くの場合、被

験物質の物理化学的性質が最高投与可能量を決定するであろう（たとえば、皮膚投与は重度の局所毒性を生じない）。

投与

17. 被験物質または溶媒は通常、挿管にて経口投与する。他の投与経路を用いる場合は、試験実施者はその選択について妥当性と理由を明らかにする。またこの場合、試験方法を適宜修正すること(3)(4)(5)。被験物質は毎日ほぼ同じ時刻に投与する。

18. 各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するが、妊娠後期の投与量調整には注意を払う。過度な母体毒性を防ぐために、用量選択には既存のデータを用いる。しかし、処置母動物に過度の毒性がみられた場合は、該当する動物を人道的に安楽死させる。複数の妊娠動物が過度な毒性の徴候を示す場合は、その用量群を終了することを考慮すること。被験物質の強制経口投与では、胃チューブまたは適当な挿管カニューレを用いて単回投与することが望ましい。1回に投与する液体の量は被験動物の大きさに合わせて調節し、体重 100g 当たり 1 mL を超えないようにする。ただし、水溶液については体重 100g 当たり 2 mL まで投与してもよい。コーンオイルを溶媒として用いる場合は、体重 100g 当たり 0.4 mL を超えないようにすること。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。

母動物の観察

19. 臨床観察は少なくとも 1 日 1 回、投与後に作用がピークに達する時間を考慮してなるべく毎日同一時刻に実施し、その結果を記録する。死亡、瀕死、関連する行動変化、および明らかな毒性徴候など、動物の状態を記録すること。

体重および摂餌量

20. 妊娠 0 日（外部の繁殖業者から交配済み動物を入手する場合は妊娠 3 日目まで）、投与初日、投与期間中（少なくとも 3 日おき）、および屠殺予定日に体重を測定する。

21. 体重測定と同じ日に 3 日間隔で摂餌量を記録する。

剖検

22. 雌を出産予定日の前日に屠殺する。屠殺予定日より前に流産または早産の徴候を示す雌は屠殺し、肉眼による精密検査に供する。

23. 試験終了時または死亡の場合は、母動物について、構造異常や病理学的変化の有無を肉眼検査する。帝王切開中の母動物の評価、およびその後の胎児分析は、偏りを最小限にする

ために投与群をふせたまま実施することが望ましい。

子宮内容物の検査

24. 試験終了後ただちに、または死亡後可能な限り速やかに子宮を摘出し、動物の妊娠状態を確認する。一見して非妊娠と思われる子宮は、非妊娠状態を確認するためにさらに検査する（たとえば、げっ歯類では硫化アンモニウム染色、ウサギでは Salewski 染色または他の適当な代替法を用いる）(6)。

25. 頚部を含む妊娠子宮の重量を測定する。試験中に死亡した動物では、妊娠子宮の重量は測定しない。

26. 各妊娠動物の黄体数を測定する。

27. 子宮内容物について、胚死亡または胎児死亡および生存胎児の数を調べる。受胎産物の相対死亡時期を推定するために、再吸収の程度を記載する（定義は補遺を参照）。

胎児の検査

28. 各胎児の性別および体重を調べる。

29. 各胎児について外表異常を調べる(7)。

30. 胎児について、骨格および内臓の異常（変異および奇形・異常など）を検査する(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)。胎児変化を分類することが望ましいが、必須ではない。分類を行なう場合は、各分類を定義する判定基準を明確に示すこと。特に生殖器系に注意を払い、発生変化の徴候の有無を調べる。

31. げっ歯類では、1腹仔のおよそ半数について骨格変化の有無を検査する。残りの半数については、一般に認められているか所定の連続切片作製法を用いるか、詳細な全体解剖を用いて内臓異常を検査する。

32. ウサギなどの非げっ歯類では、全胎児について内臓および骨格異常を検査する。これらの胎児の体について、内臓異常を詳細な解剖で評価し、適宜、心臓の内部構造をさらに評価する(26)。この方法で検査した半数の胎児の頭部を分離して、標準的な連続切片作製法(27)または同等に高感度の方法にて処理し、内臓異常（眼、脳、鼻道、および舌）を評価する。頭部を分離した胎児を含めた全胎児の体について、げっ歯類と同一の方法にて骨格異常を検査する。

データおよび報告

データ

33. 各試験群および各世代について、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、妊娠動物数、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）、胎児観察の種類、ならびに母動物ごとのすべての関連データを、個体ごとおよび総括表として示す。

34. データ分析の単位として母動物を用い、適切な統計方法により数値データを評価する。一般に認められた統計方法を用い、統計方法は試験計画で定めておく。予定屠殺日までに死亡した動物のデータも報告する。これらのデータは、関連性が認められれば群平均に含めてもよい。こうした動物のデータの関連性および群平均に含めるか除外するかの判断は、個別に行なう。

結果の評価

35. 出生前発生毒性試験の結果は、認められた影響に基づいて評価する。評価には下記の情報を含める。

- 被験物質への動物の暴露と、すべての所見の発生率および重症度との関係の有無の評価を含む、母体および胎児試験結果
- 胎児の外表異常、内臓異常、および骨格異常を分類した場合、その分類に使用した基準
- 必要に応じて、試験結果の解釈に役立つ対照背景データ
- すべての百分率および指数の計算に使用した数値
- 必要に応じて、独立した審査者または統計担当者が解析結果を再評価および再構成できるよう、解析方法の十分な説明を含む、試験結果に関する適当な統計解析結果。

36. 毒性作用がないことを実証する試験では、被験物質の吸収および生物学的利用能を確立するためにさらなる調査の実施を考慮する。

試験報告書

37. 試験報告書には、以下の具体的な情報を含まなければならない。

被験物質
– 物理的性質、また必要に応じて物理化学的特性
– 特定データ（あれば／確定していれば CAS 番号を含む）
– 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
– 使用した動物種および系統
– 動物数および週齢
– 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
– 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/day）への換算方法
– 環境的条件
– 飼料品質および水質の詳細

結果
以下のような用量別の母体毒性反応データ
– 試験開始時の動物数、生存動物数、妊娠数、流産数、早産動物数
– 試験中の死亡日または試験終了までの生存の可否
– 予定屠殺日までに死亡した動物のデータは報告対象であるが、群間統計比較には含めない
– 各異常臨床徴候の観察日とその後の経過
– 体重、体重変化、妊娠子宮重量（オプションとして妊娠子宮重量で補正した体重変化を含む）
– 摂餌量、および測定してあれば摂水量
– 剖検所見（子宮重量を含む）
– 母体影響および発生影響の NOAEL 値を報告する。

以下を含む、着床を認めた 1 腹の用量別発生評価項目
– 黄体数
– 着床数、生存胎児、死亡胎児および再吸収の数と割合
– 着床前および着床後損失の数と割合

以下を含む、生存胎児を認めた 1 腹の用量別発生評価項目
– 生存出生仔の数と割合
– 性比
– 胎児体重（できれば性別ごとおよび雌雄合わせて）
– 外表、内臓、骨格の奇形、および他の関連する変化
– 妥当ならば、分類の基準
– 何らかの外表、内臓、骨格の異常を有する胎児および 1 腹仔の総数と割合、ならびに個別の異常および他の関連する変化の種類と発生率

結果の考察

結論

結果の解釈

38. 出生前毒性試験では、妊娠中にある物質を反復経口投与したときの影響について情報を得ることができる。試験結果は、亜慢性試験、生殖試験、トキシコキネティクス試験その他の試験の所見と合わせて解釈する。一般毒性および発生毒性の両方の評価項目に重点が置かれるため、本試験の結果では、一般毒性のないときに生じる発生影響と、母動物でも毒性を認めるレベルでのみ発現する発生影響との識別が可能である(28)。

参考文献

(1) OECDの生殖発生毒性に関する専門家ワーキンググループ報告書草案。コペンハーゲン（デンマーク）、1995年6月13日～14日。
(2) Kavlock R.J. et al. (1996). A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Anal. 16, 399-410.
(3) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990). Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundam. Appl. Toxicol. 14, 386-398.
(4) Wong, B.A., et al. (1997). Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17, 1-8.
(5) US Environmental Protection Agency (1985). Subpart E - Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
(6) Salewski, E. (1964). Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 247, 367.
(7) Edwards, J.A. (1968). The External Development of the Rabbit and Rat Embryo. In: Adv. Teratol. D.H.M. Woolam (ed.), Vol. 3. Academic Press, NY.
(8) Inouye, M. (1976). Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congen. Anom. 16, 171-173.
(9) Igarashi, E. et al. (1992). Frequency of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected By the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congen. Anom. 32, 381-391.
(10) Kimmel, C.A. et al. (1993). Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47, 229-242.

(11) Marr, M.C. et al. (1988). Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37, 476.
(12) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969). A Rapid Method For Detecting Malformations in Rat Foetuses. J. Morphol. 127, 291-306.
(13) Fritz, H. (1974). Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11, 313-320.
(14) Gibson, J.P. et al. (1966). Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicol. Appl. Pharmacol. 9, 398-408.
(15) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973). Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8, 309-316.
(16) Marr, M.C. et al. (1992). Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46, 169-181.
(17) Monie, I.W. et al. (1965). Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.
(18) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928). The Order and Time of Appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, With Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. Am. J. Anat. 41, 411-445.
(19) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964). Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOHAlizarin Red S Method for Fetal Bone. Stain Technol. 39, 61-63.
(20) Strong, R.M. (1928). The Order, Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus norvegicus albinus) Skeleton. Am. J. Anat. 36, 313-355.
(21) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984). Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 4, 181-188.
(22) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957). The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.
(23) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In: Teratology: Principles and Techniques, J.G. Wilson and J. Warkany (eds.), University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
(24) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds.) (1977). Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.
(25) Varnagy, L. (1980). Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28, 233-239.
(26) Staples, R.E. (1974). Detection of Visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9, 37-38.

(27) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977). A Dissecting Procedure For the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology (eds. D. Neubert, H.J. Merker and T.E. Kwasigroch). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(28) US Environmental Protection Agency (1991). Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Fed. Register 56, 63798-63826.

(29) Wise, D.L. et al. (1997). Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1). Teratology 55, 249-292.

補遺

発生毒性学：受胎前、出生前発生中、または出生後から性成熟期までの暴露の結果として生じうる、発生中の生物に対する有害作用の研究。発生毒性の主な徴候には、1）生物の死亡、2）構造異常、3）発育異常、および4）機能不全がある。以前は発生毒性学を奇形学と呼ぶことが多かった。

有害作用：生物が生存、生殖または環境に適応する能力を低下させる、ベースラインからのあらゆる処置関連変化。発生毒性学においては、非常に広義的には、出生前および出生後の両方で受胎産物の正常な発生に干渉するあらゆる作用を含む。

発育異常：出生児の臓器重量、体重またはサイズの変化。

形態変化（異常）：奇形および変異の両方を含む、発生における構造変化(29)。

> **奇形／**重度異常：動物にとって有害と考えられ（致命的である可能性もある）、通常は稀にしかみられない構造変化。
> **変異／**軽度異常：動物にとってほとんどまたは全く有害作用がないと考えられる構造変化。一過性のものや、対照集団で相対的に高頻度に生じるものなど。

受胎産物：受精から出生までのあらゆる発生段階でみられる、受精した卵子からの派生物の総称。胚体外膜、胚、胎児を含む、

着床：胚盤胞の子宮上皮への侵入、子宮内膜への包埋を含む、胚盤胞の子宮上皮細胞層への付着。

胚：あらゆる生物体の初期または発生段階。特に、長軸の出現後およびすべての主要構造が揃うまでに認められる、受精卵の発生中の産物。

胚毒性：胚の正常な構造、発生、成長、または生存能力に有害。

胎児：後胚期の出生前の児。

胎児毒性：胎児の正常な構造、発生、成長、または生存能力に有害。

流産：受胎産物（胚または生存能力のない胎児）の、子宮からの早期の娩出。

再吸収：子宮に着床した後に死亡し、再吸収中であるかまたは再吸収された受胎産物。

> **初期再吸収：**識別可能な胚または胎児を伴わない着床の証拠。
> **後期再吸収：**外的縮退変化を伴う死亡した胚または胎児。

NOAEL：無毒性量の略語であり、投与関連の有害な所見が観察されない最高用量である。