OECD/OCDE

2001/01/22

試験ガイドライン No.416

二世代生殖毒性試験

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. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070868-en.

©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

二世代生殖毒性試験

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、米国およびドイツの提案に基づいて二世代生殖毒性試験ガイドラインの改訂が推奨され、そのすべての主要な改訂内容について合意に達した(1)。

ガイドラインの目的

2. この二世代生殖毒性試験ガイドラインは、被験物質が雌雄の生殖器系の健全性および生殖能に与える影響、すなわち生殖腺の機能、性周期、交尾行動、受胎、妊娠、分娩、哺育、離乳などに与える影響、ならびに出生児の成長および発達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。また、被験物質が新生児の罹病率や死亡率に与える影響についての情報、ならびに出生前および出生後の発生毒性に関する予備的データを提供し、その後に行う試験の参考としても使用できるであろう。このガイドラインでは、F1 世代の成長および発達の検討に加えて、雌雄の生殖器系の健全性および生殖能ならびに F2 世代の成長および発達の評価も意図している。発生毒性や機能異常について更に情報を得るには、発生毒性試験や神経発生毒性試験のガイドラインに従ってこのプロトコール中に他の試験を取り込むこともできるし、それぞれのガイドラインに従ってこれらの評価項目を別の試験で評価することもできるであろう。

試験の概要

3. 被験物質を、段階的な用量で雌雄動物からなるいくつかの群に投与する。P 世代の雄については、精子形成に対するあらゆる有害な影響を引き出すため、成長期間中、少なくとも 1 精子形成サイクル全体（マウスで約 56 日間、ラットで約 70 日間）を含む期間にわたって投与を行う。多くの精子パラメータ（精子の形態、運動性など）および組織切片の詳細な病理組織学的検査により、精子に対する影響を評価する。先に行なわれた十分な期間にわたる反復投与試験（90 日間試験など）で精子形成に関するデータが得られている場合には、P 世代の雄について評価を行う必要はない。ただし、後日行う評価が可能となるように、P 世代の精子を標本またはデジタル記録として保存しておくことが推奨される。P 世代の雌については、性周期の正常な発現に対する被験物質のあらゆる有害な影響を検出するため、成長期間中、性周期全体を数回分含む期間にわたって投与を行う。親（P）動物に対しては、交配期間中およびその後の妊娠期間から F1 児の離乳まで被験物質の投与を行う。離乳後は、F1 児に対して成熟までの成長期間中、交配期間中および F2 世代の出生を経て F2 世代の離乳まで被験物質投与を続ける。

4. 全動物について状態観察および病理学的検査を行ない、特に雌雄の生殖器系の健全性および生殖能、ならびに出生児の成長および発達に対する影響に重点を置いて、毒性徴候の有無を調べる。

試験方法－試験の準備

動物種の選択

5. 試験の動物種としては、ラットが望ましい。他の動物種を用いる場合には、その妥当性を明らかにするとともに、試験方法を適宜修正する必要がある。受胎率が低い系統や発生異常の頻度が高いことがわかっている系統は用いない。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の 20%を超えないこととする。

飼育および給餌条件

6. 動物飼育室の温度は 22℃ ± 3 ℃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。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。

7. 動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育する。交配にはその目的に合ったケージを用いる。交尾確認後、交配した雌を分娩用ケージに個別に収容する。または少数匹ずつ収容し、分娩 1～2 日前に個別飼育にしてもよい。分娩が近づいたら、確かな品質の適切な巣材を与える。

動物の準備

8. 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 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。兄妹交配を避けるため、同腹関係を知っておく。対照群と投与群への動物の割付けは無作為とする（体重層別法が推奨される）。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。P 世代については、投与開始前に識別番号を割付ける。F1 世代については、交配用に選抜された動物について離乳時に識別番号を付す。また、選抜された全 F1 動物について母動物の記録を保存する。なお、児動物の個体ごとの体重測定や機能検査を予定している場合には、生後可能な限り速やかに個体識別を行うことが推奨される。

9. 親（P）動物には、約 5～9 週齢で投与を開始する。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。

手順

動物数および性

10. 各投与群および対照群には、分娩前後の時点でなるべく 20 匹以上の妊娠した雌が得られるように十分な数の動物を含めることとする。ただし、投与によって望ましくない影響（不妊、高用量における過度な毒性など）を生じる物質では、この条件を満たせない場合もあろう。上記の目的は、受胎、妊娠、母動物の行動と授乳、F1 出生児の受胎から性成熟までの成長および発達、ならびにその児動物（F2）の離乳までの発達に対して被験物質が与える影響について、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。したがって、要求されている妊娠動物数（20 匹）が得られない場合でも、その試験が無効になるとは限らず、状況に応じて評価すべきである。

投与の準備

11. 他の投与経路（経皮、吸入など）がより適切と考えられない限り、被験物質の経口（混餌、飲水、強制）投与が推奨される。

12. 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／乳剤を、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、溶媒の毒性がわかっていなければならない。また、溶媒中での被験物質の安定性を分析する。

投与量

13. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。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。ただし、予期しない死亡がみられた場合でも、親（P）動物の死亡率が約 10%に満たなければ、通常その試験は許容されるであろう。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。なお、混餌試験の用量間隔は公比 3 を超えないようにする。用量段階の設定では、その時点で得られているあらゆる毒性データ、特に反復投与試験の結果を考慮する。被験物質やその関連物質の代謝および動態に関する情報も、すべて考慮に入れる。これらの情報は投与法の適切さを示す根拠ともなる。

14. 対照群は無処置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や食餌効率の低下がみられる場合には、それに対応した対照群を設けることが必要と考えられる場合がある。同時対照群で給餌量を揃える代わりに、摂餌量の減少が生殖項目に与える影響を評価するように計画した対照試験のデータを用いることもできる。

15. 溶媒その他の添加物については、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、あるいは混餌または飲水による投与ではそれに相当する飼料中または飲水中濃度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、数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経口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。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（溶解性など）が最高投与可能量を決定するであろう。

投与

17. 被験物質を動物に週 7 日投与する。経口（混餌、飲水、強制）投与が望ましい。他の投与経路を用いる場合には、その妥当性を明らかにする。またこの場合、試験方法を適宜修正する必要があるかもしれない。適切な実験期間を通じ、全動物に同じ方法で投与する。被験物質を強制経口投与する場合には、胃ゾンデを用いる。1 回に投与する液体の量は、体重 100 g 当たり 1 mL（コーン油の場合は、体重 100 g 当たり 0.4 mL）を超えないようにする。ただし、水溶液については体重 100 g 当たり 2 mL まで投与してもよい。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。なお、強制経口投与試験では、離乳時に直接投与を開始するまで、児動物は通常乳汁を通じて間接的にしか被験物質を摂取しない。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。

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かなければならない。被験物質の強制経口投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行ない、少なくとも週 1 回、投与量を調整して体重当たりの用量を一定に保つ。体重に基づいて強制経口投与量を調整する際には、胎盤への分布に関する情報を考慮に入れる。

試験スケジュール

19. 雌雄の親（P）動物に対して、5～9 週齢で毎日の投与を開始する。F1 の雌雄に対しては、離乳時に毎日の投与を開始する。ただし、飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合、被験物質に対する F1 児の直接暴露は哺育期間中にすでに始まっているであろう点に留意する。雌雄（P および F1）とも、交配期間前に少なくとも 10 週間投与を行ない、さらに 2 週間の交配期間中投与を継続する。雄については、生殖に対する影響の評価に不要となった時点で安楽死させ、検査に供する。雌親（P）動物については、妊娠期間を通じ、さらに F1 児の離乳まで投与を継続する。得られている毒性データ、代謝誘導、生体内蓄積など、被験物質に関する入手可能な情報に基づいて、投与スケジュールを修正することも考慮する。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。

20. P および F1 の雌雄については、屠殺時まで投与を継続する。P および F1 の雌雄の親動物は、生殖に対する影響の評価に不要となった時点で安楽死させる。交配用に選抜されなかった

F1 児および全 F2 児については、離乳時に安楽死させる。

交配手順

親動物（P）の交配

21. 各交配では、それぞれの雌を同じ用量群の雄 1 匹と交尾するまで、または 2 週間が経過するまで同居させる（1 対 1 交配）。精子または膣栓の有無について毎日雌を検査し、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。交配が成功しなかった場合には、同じ群の生殖能力が確認されている雄との再交配を考慮してもよい。交配対については、データ中に明確に記載する。兄妹交配は避ける。

F1 動物の交配

22. F1 児の交配では、離乳時に各母動物から少なくとも雌雄各 1 匹の児動物を選び、同じ用量群の異なる母動物から選んだ児動物と交配させて F2 世代を得る。同腹児の体重や外観に顕著な差がない場合には、各母動物から無作為に児動物を選抜する。差がみられた場合には、同腹児中で最も代表的な児動物を選抜する。実際には体重に基づいて選ぶのが最もよいが、外観に基づいた方がよい場合もある。F1 児は完全に性成熟に達してから交配する。

23. 次世代が得られなかった交配対については、検査を行なって不妊の原因と考えられるものを明らかにする。その手順としては、生殖能力が確認されている雄または雌との追加交配、生殖器の顕微鏡検査、性周期や精子形成の検査などがある。

2 回目の交配

24. 場合によっては（初回の交配で被験物質により出生児数が変化したり、あいまいな影響がみられたりした場合など）、P または F1 の親動物を再交配し、第二産児を得ることが推奨される。また、児動物が得られなかった雌または雄は、生殖能力が確認されている雄または雌と再交配することが推奨される。第二産児を得る必要があると考えられる場合には、いずれの世代も最後の産児の離乳後約 1 週間で動物を再交配する。

同腹児数

25. 動物には通常通り出産させ、出生児を離乳まで育てさせてよい。同腹児数の調整は任意である。調整を行う場合には、使用した方法を詳細に記載する。

観察

状態観察

26. 一般状態の観察を毎日行う。強制経口投与の場合には、投与後、影響が最大になると予想される時間を考慮に入れて観察する。行動の変化、分娩困難や分娩長期化の徴候、およびすべての毒性徴候を記録する。さらに、各動物についてより詳細な検査を少なくとも週 1 回実施するが、これは体重測定時に行うとよい。1 日 2 回（問題がなければ、週末は 1 日 1 回）、すべての動物について病気の有無および生死を確認する。

親動物の体重および摂餌量／摂水量

27. 親動物（P および F1）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。加えて、雌の親動物（P および F1）については、少なくとも妊娠 0、7、14、20 または 21 日と、哺育期間中は児動物の体重測定と同じ日に、さらに屠殺日に体重を測定する。各親動物について、個体ごとに測定結果を報告する。また、交配前期間および妊娠期間中、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、摂水量を少なくとも週 1 回測定する。

性周期

28. P および F1 の雌について交配前に、また交配期間中も交配が確認されるまで（任意）、性周期の長さおよび正常な発現の有無を膣垢塗抹標本で評価する。膣や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(2)。

精子パラメータ

29. P および F1 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し、各器官の片側を病理組織学的検査（39、42、44 段落参照）用に保存する。P および F1 の雄のうち、各群少なくとも 10 匹について、残りの精巣および精巣上体を用い、それぞれ均質化抵抗性精子細胞数および精巣上体尾部の貯蔵精子数を計測する。また、これと同じ動物から精巣上体尾部または精管の精子を採取し、精子の運動性および形態を評価する。投与による影響が認められた場合や、他の試験で精子形成に対する影響を示唆する結果が得られている場合には、各用量群のすべての雄について精子評価を実施する。それ以外の場合には、P および F1 の雄の対照群および高用量群についてのみ計数を行なえばよい。

30. 均質化抵抗性精子細胞および精巣上体尾部精子の総数を求める(3)(4)。尾部の貯蔵精子数は、定性評価に用いた懸濁液中の精子の濃度および量と、残りの尾部組織を細切または均質化して得た精子数から求める。ビデオまたはデジタル記録するか、標本を凍結して後日分析する場合を除き、全用量群の選抜された雄について屠殺後ただちに計数を行う。後日分析する場合には、対照群および高用量群をまず解析してもよい。投与による影響（精子数、運動性または形態に対する影響など）が認められない場合には、他の用量群を解析する必要はない。高用量群で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。

31. 精巣上体（または精管）の精子の運動性については、屠殺後ただちに評価するか、またはビデオに録画する。損傷を最小限にするよう精子を取り出し、一般に認められている方法で希釈して運動性を解析する(5)。前進運動精子率を、主観的または客観的に求める。コンピュータで運動解析を行う場合(6)(7)(8)(9)(10)(11)、前進運動はユーザーが設定した進行方向性速度の平均値と直進性または線形指数の閾値によって決まる。剖検時に試料をビデオに録画するか(12)、他の方法で画像を記録する場合、投与による影響が認められない限り、その後の解析は P および F1 の雄の対照群および高用量群についてのみ行なえばよい。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。ビデオやデジタル画像を記録しない場合には、剖検時に全用量群の全試料について解析する。

32. 精巣上体（または精管）の精子試料について形態評価を行う。精子（1 試料当たり 200 個以上）を固定した湿標本の状態で検査し(13)、正常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／尾部の奇形などが挙げられる。評価は全用量群の選抜された雄について屠殺後ただちに行うか、またはビデオやデジタル記録に基づいて後日行う。固定した塗抹標本も、後日の評価が可能である。後日行う場合には、対照群および高用量群をまず解析する。投与による影響（精子の形態に対する影響など）が認められない場合には、他の用量群を解析する必要はない。高用量群で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。

33. 上記の精子パラメータのうち、全身毒性を評価する 90 日以上の試験ですでに検査されたものがある場合には、二世代試験でこれを繰り返す必要はない。ただし、必要に応じて後日評価ができるように、P 世代の精子の試料またはデジタル記録を保存しておくことが推奨される。

<u>児動物</u>

34. 出産後（哺育 0 日）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の有無を確認する。0 日に死亡して発見された児動物については、浸軟していない限り、異常の有無および死因を調べ、保存することが望ましい。生存児については匹数を数え、出生時（哺育 0 日）、哺育 1 日およびその後は定期的な体測日（哺育 4、7、14、21 日など）に個体ごとに体重を測定する。母動物および出生児に認められた身体的異常や行動の異常を記録する。

35. 出生児の身体的発達を主に体重増加量により記録する。他の身体的項目（耳介展開、眼瞼開裂、切歯萌出、毛生など）から追加情報が得られることもあるが、これらのデータは性成熟のデータ（膣開口時または陰茎亀頭と包皮の分離時の日齢および体重など）との関連で評価することが望ましい(14)。別の試験で離乳前または離乳後に F1 児の機能検査（運動機能、感覚機能、反射の発達など）を行なわない場合には、これらの検査、特に性成熟に関する検査を行うことが推奨される。交配用に選抜された F1 離乳児について、膣開口および包皮分離の日齢を確認する。F1 の性比や性成熟の時期の変化から必要と考えられる場合には、F2 児について生後 0 日に肛門・生殖結節間距離を測定する。

36. 他に明らかな毒性徴候（有意な体重増加抑制など）が認められている群については、機能検査を省略してもよい。機能検査を実施する場合、交配用に選抜された児動物は検査に用いない。

剖検

37. すべての親動物（P および F1）、外表異常や一般状態の異常がみられたすべての児動物、ならびにF1およびF2の両世代から無作為に選んだ同腹につき少なくとも雌雄各1匹の児動物について、屠殺時または試験中の死亡時に形態異常や病理学的変化の有無を肉眼的に検査する。検査では特に生殖器系の器官に注意を払う。瀕死状態で安楽死させた児動物および死亡した児動物（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。

38. すべての初産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り着床痕の有無および数を調べる。

器官重量

39. P および F1 の全親動物について、屠殺時に体重および以下の器官重量を測定する（両側性の器官は左右別々に測定する）。

- 子宮、卵巣
- 精巣、精巣上体（全体および尾部）
- 前立腺
- 精嚢（凝固腺および内容液を含み、全体を一つの器官として）
- 脳、肝臓、腎臓、脾臓、下垂体、甲状腺、副腎、既知の標的器官

40. 剖検用に選抜された F1 児および F2 児について最終体重を測定し、さらに無作為に選んだ同腹につき雌雄各 1 匹（段落 37 参照）の児動物について脳、脾臓および胸腺重量を測定する。

41. 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。

病理組織学的検査

親動物

42. 病理組織学的検査のため、親（P および F1）動物について以下の器官および組織、またはその代表的な試料を固定し、適切な保存液に保存する。
- 膣、子宮（頸部を含む）、卵巣（適切な固定液に保存）
- 片側の精巣（ブアン液またはそれと同等の固定液に保存）、片側の精巣上体、精嚢、前立腺、凝固腺
- P および交配用に選抜された F1 の全動物における、先に確認された標的器官

43. P および交配用に選抜された F1 の対照群および高用量群の全動物について、段落 42 に示す保存器官・組織の詳細な病理組織学的検査を行う。ただし、P 動物の卵巣の検査は任意である。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、低および中間用量群についても検査を行う。さらに、低および中間用量群で受胎能の低下が疑われる動物（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など）の生殖器官についても病理組織学的評価を行う。さらに、すべての肉眼病変（萎縮や腫瘍など）を検査する。

44. 詳細な精巣の病理組織学的検査（ブアン固定、パラフィン包埋、厚さ 4〜5 μm の横断切片を使用）を行ない、精子細胞の停滞、胚細胞層の消失およびその種類、多核巨細胞、腔内への精子形成細胞の剥脱など、投与による影響を明らかにする(15)。精巣上体全体の検査には頭部、体部および尾部の検査が含まれるが、これは縦断切片を評価することで可能となる。精巣上体については、白血球浸潤、優勢な細胞種の変化、異常細胞種の出現、および精子食作用の有無を評価する。雄の生殖器の検査には PAS・ヘマトキシリン染色を用いてもよい。

45. 授乳期後の卵巣は大きな授乳期の黄体に加え、原始卵胞と発育卵胞を含むはずである。病理組織学的検査では、この原始卵胞の減少を定性的に検出する。また F1 の雌については原始卵胞の定量的な評価を行うが、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。検査では原始卵胞数（小型の発育卵胞と合わせてもよい）を計測し、投与群と対照群の卵巣を比較する(16)(17)(18)(19)(20)。

離乳児

46. 外部異常や一般状態の異常がみられたすべての児動物、ならびに F1 および F2 両世代の交配用に選抜されなかった動物（段落 37 参照）から無作為に選んだ同腹につき少なくとも雌雄各 1 匹について、肉眼的に異常な組織および標的器官を固定し、適切な保存液に保存して病理組織学的検査を行う。保存した組織について、特に生殖器系の器官に重点を置いて詳細な病理組織学的検査を行う。

データおよび報告

データ

47. 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、受胎動物数、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）、病理組織学的変化の種類、ならびに同腹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。

48. 一般に認められた適切な統計方法により、数値データを評価する。統計方法は試験計画で定めておく。データの解析には、用量-反応の統計モデルが有用な場合がある。第三者の審査官や統計学者が解析を再評価・再構成できるように、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

49. 二世代生殖毒性試験の結果は、剖検および病理組織学的所見を含むあらゆる認められた影響に基づいて評価する。評価では、被験物質の用量と異常（肉眼病変、判明した標的器官、受胎率の変化、一般状態の異常、生殖能および同腹ごとの成績の変化、体重変化、死亡率に対する影響その他の毒性など）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。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トキシコキネティクスデータを考慮に入れる。

50. 適切に実施された生殖毒性試験により、無作用量の十分な推定と、生殖、分娩、哺育、出生後の成長および発達、ならびに性的な発達に対する有害な影響の理解が可能となるはずである。

試験報告書

51. 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、また必要に応じて物理化学的特性
- 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、巣材など
- 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
- 飼料および水質の詳細

結果
- P および F1 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）および被験物質摂取量。ただし、同居期間中および少なくとも哺育後期 1/3 の期間を除く。
- 吸収データ（測定した場合）
- P および交配用に選抜された F1 動物の体重データ
- 母動物ごとおよび各児動物の体重データ
- 親動物の屠殺時体重および絶対／相対器官重量
- 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）
- 試験終了時まで生存したか、また試験中に死亡した場合にはその時期
- 性および用量ごとの毒性反応データ。交尾率、受胎率、出産率、出生率、生存率、哺育率を含む。各指数の算出に用いた数値も報告書中に示す。
- 生殖、出生児、出生後の成長などに対する毒性その他の影響
- 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

- 正常な性周期を示すPおよびF1の雌動物の数および性周期の長さ
- 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、各種異常精子率。
- 交配までの期間。交尾までの日数を含む。
- 妊娠期間
- 着床数、黄体数、産児数
- 生存産児数、着床後胚損失率
- 肉眼的異常を有する児動物数。わかる場合には、矮小児数も報告する。
- 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。なお、身体指標については評価の妥当性を述べる。
- 児動物および成熟動物の機能検査データ（検査した場合）
- 必要に応じて、結果の統計処理方法

結果の考察

結論（母動物および出生児に対するNOAELを含む）

結果の解釈

52. 二世代生殖毒性試験では、生殖周期のすべての相を通じてある物質に反復暴露されたときの影響に関する情報、特に生殖関連項目および出生児の発生、成長、生存に関する情報を得ることができる。試験結果は、亜慢性試験、出生前の発生に関する試験、トキシコキネティクス試験その他、入手可能な試験の所見と合わせて解釈する。ある化学物質について、さらに試験を必要とするかはしばしば本試験の結果から判断される。一方、試験結果のヒトへの外挿については、その妥当性が限られている。したがって、これらは無影響量およびヒトでの許容暴露量に関する情報を提供するものとして用いることが最も適当である(21)(22)(23)(24)。

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) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(3) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(4) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(5) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44.

(6) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10:237-244.

(7) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(8) Klinefelter**,** G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration**.** *Journal of Andrology* 13:409-421.

(9) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(10) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(11) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10:401-415.

(12) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.

(13) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.

(14) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298303.

(15) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(16) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(17) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary,* A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(18) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology,* A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

(19) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.

(20) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment,* G. Daston and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(21) Thomas, J.A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(22) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(24) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.