OECD/OCDE

1995/07/27

# 試験ガイドライン No.421

生殖／発生毒性スクリーニング試験

**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 (1995), Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 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-421-1995.pdf.

©OECD(1995)

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

**1995 年 7 月 27 日理事会にて採択**

## 生殖／発生毒性スクリーニング試験

### はじめに

1. 1990 年 1 月にロンドンで開かれた生殖毒性のスクリーニング法に関する特別専門家委員会において、既存化学物質の初期評価に有用な「予備的生殖毒性スクリーニング試験」のプロトコールについて討議が行なわれ、合意が得られた(1)。

2. ここに述べる試験ガイドラインはロンドン会議で合意されたプロトコールの改訂版で、1992 年 10 月に東京で開かれた生殖毒性のスクリーニング法に関する指名専門家会議により得られたものである(2)。その内容は、加盟各国が改訂前の方法を用いて既存の高生産量化学物質について行なった試験と、陽性対照化学物質について行なった探索的試験から得た経験に基づいている。

3. このガイドラインは、被験物質が雌雄の生殖能、すなわち生殖腺の機能、交尾行動、受胎、受胎産物の発生、分娩などに与える影響について限定的な情報を得られるように計画されている。ただし、既存の試験ガイドライン 414、415、416 の代替法ではなく、それらを置き換えるものでもない。

### 最初に考慮すべき事項

4. このスクリーニング試験ガイドラインを用いることにより、化学物質の毒性評価の初期段階で、または懸念のある化学物質について、生殖や発生に対する影響の可能性に関する初期情報を得ることができる。また、毒性情報がほとんどないか、完全に欠如している既存化学物質の初期スクリーニング試験の組合せの一部として、より詳細な生殖／発生毒性試験の用量設定試験として、更にその他の関連する場合にも用いることができる。

5. この試験は、生殖と発生のあらゆる点に関して完全な情報を提供するものではない。特に、出生前暴露の徴候が出生後に発現したり、出生後暴露によって影響が生じたりする場合の検出方法としては限定的である。（他にも理由はあるが）用量群の動物数が比較的少ないこと、評価項目が限られていること、および試験期間が短いことから、この方法は影響がないと断定的に主張するための根拠とはならない。このため、陰性データからは生殖や発生に関する絶対的な安全性は示されないが、実際の暴露量が無毒性量（NOAEL）相当の用量より明らかに小さい場合には、それらの情報はある程度の保証にはなるであろう。また、他の生殖／発生毒性試験データがない場合、陽性結果は初期のハザード評価に有用であり、追加試験の必要性とその時期の決定に役立つ。

6. このガイドラインは被験物質の経口投与を前提としている。他の暴露経路を用いる場合には、修正が必要となる場合がある。

7. 用いた定義を補遺 1 に示す。

## 試験の概要

8. 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。雄については、屠殺予定日の前日まで（前日を含む）少なくとも 4 週間（交配前 2 週間、交配期間中および交配後約 2 週間）投与を行う。雄における交配前の投与期間が限られているため、受胎能は精巣毒性に関する特に高感度な指標とはならない可能性がある。このため、精巣の詳細な組織学的検査が必須である。交配前に 2 週間の投与期間を設け、その後、全体で少なくとも 4 週間の投与を行ないながら交配／受胎能を観察し、更に雄の生殖腺の詳細な病理組織学的検査をすることで、雄の受胎能および精子形成に対する大部分の影響を十分に検出できると考えられる。

9. 雌については、試験期間を通じて投与を行う。これには交配前 2 週間（少なくとも性周期全体を 2 回分含むようにするため）、受胎までの期間（個体ごとに異なる）、妊娠期間および分娩後少なくとも 4 日間を含み、屠殺予定日の前日まで（前日を含む）投与を続ける。

10. 馴化後の試験期間は雌の生殖能にもよるが、約 54 日間である［交配前期間 14 日間（以上）、交配期間 14 日間（最長）、妊娠期間 22 日間、哺育期間 4 日間］。

11. 投与期間中は毎日、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験期間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を屠殺して剖検する。

## 試験方法

### 動物種の選択

12. この試験ガイドラインは、ラットを用いるように計画されている。他の動物種を用いる場合には、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分かっている系統は用いない。試験には以前実験に供されたことのない、健康な未交配動物を用いる。供試動物については、動物種、系統、性、体重または週齢を明らかにする。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

13. 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、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。

14. 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。群飼いでは 1 ケージあたりの動物数を 5 匹以下とする。交配にはその目的に合ったケージを用いる。妊娠した雌は個

別飼育とし、巣材を与える。

動物の準備

15. 健康な若齢成熟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。各動物には個体識別を施し、試験開始前に 5 日間以上ケージで飼育して飼育室環境に馴化させる。

投与の準備

16. 他の投与経路がより適切と考えられない限り、被験物質の経口投与が推奨される。経口経路を選択した場合、被験物質は通常強制経口投与されるが、混餌または飲水投与してもよい。

17. 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、溶媒中での被験物質の安定性を分析する。

手順

動物数および性

18. 各群とも各性 10 匹以上で開始することが推奨される。これにより、顕著な毒性影響がみられる場合を除き、各群 8 匹以上の妊娠雌動物が得られると予想される。これは、通常 1 群あたりの妊娠雌動物数として許容できる最小数である。その目的は、受胎、妊娠、母性および授乳行動、ならびに $F_1$ 出生児の受胎から分娩後 4 日までの成長および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および出生児数を得ることである。

投与量

19. 一般には少なくとも 3 投与群と 1 対照群を設ける。用量は急性毒性試験の情報や反復投与試験結果に基づいて設定する。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。被験物質の投与に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。

20. 用量設定の際には、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。最高用量は毒性影響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。次に、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、その下の各用量段階を設定する。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。

限度試験

21. 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状が最高投与可能量を決定するであろう。

投与

22. 被験物質を動物に週 7 日、毎日投与する。強制経口投与する場合には、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、体重 100 g あたり 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 100 g あたり 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。

23. 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。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あたりの用量を一定に保つ。

試験スケジュール

24. 雌雄とも 5 日間以上馴化させた後、交配の少なくとも 2 週間前に投与を開始する。動物が完全に性成熟に達した後、速やかに交配が行なわれるように試験の予定を立てる。その時期はラットの系統や施設によってやや異なる場合があるが、例えば Sprague Dawley 系ラットでは 10 週齢時、Wistar 系ラットでは約 12 週齢時である。母動物と出生児は、分娩後 4 日またはその直後に屠殺する。なお、出生日（分娩完了日）を分娩後 0 日とする。交尾が確認されない雌は、交配期間終了日の 24～26 日後に屠殺する。交配期間中は雌雄とも投与を継続する。雄については、総投与期間が最低でも 28 日間になるまで交配期間後も更に投与を続ける。雄はその後屠殺するか、または必要に応じて 2 回目の交配実施に備え、飼育および投与を継続する。

25. 雌親動物に対しては、妊娠期間中および少なくとも分娩後 3 日まで（3 日目を含む）、または屠殺前日まで、毎日投与を継続する。被験物質を吸入または経皮経路で投与する試験では、少なくとも妊娠 19 日まで（妊娠 19 日目を含む）投与を継続する。

26. 試験スケジュールの概略図を補遺 2 に示す。

交配手順

27. 本試験では通常 1 対 1 交配（雄 1 匹と雌 1 匹の交配）を行う。ただし、雄で死亡がみられた場合には例外もあり得る。妊娠するまで、または 2 週間が経過するまで、雌を同じ雄と同居させる。精子または膣栓の有無について毎朝雌を検査し、膣栓または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。

観察

28. 試験期間を通じて少なくとも 1 日 1 回、また毒性徴候がみられた場合にはより頻繁に、一般状態の観察を行う。投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮に入れ、毎日同じ時刻に観察を行うことが望ましい。関連行動の変化、分娩困難や分娩長期化の徴候および生死を含む全ての毒性徴候を記録する。これらの記録には毒性徴候の発現時期、程度および持続期間を含める。

29. 妊娠 0 日から計算した妊娠期間を記録する。出産後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、矮小児（対応する対照児動物に比して明らかに小型の児動物）数、ならびに肉眼的異常の有無を確認する。

30. 分娩後 24 時間以内（分娩後 0 または 1 日）および分娩後 4 日に生存児数と性別を調べ、同腹ごとの体重を測定する。親動物の観察（段落 28 参照）に加え、出生児の異常行動も記録する。

体重および摂餌量／摂水量

31. 雌雄について、投与開始日、その後は少なくとも週 1 回、更に屠殺時に体重を測定する。妊娠期間中の雌については妊娠 0、7、14 および 20 日に、また分娩後 24 時間以内（分娩後 0 または 1 日）と分娩後 4 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。

32. 交配前期間ならびに妊娠および哺育期間中、摂餌量を少なくとも週 1 回測定する。交配期間中の摂餌量の測定は任意とする。被験物質を飲水投与する場合には、これらの期間について摂水量も測定する。

病理学的検査

剖検

33. 親動物について、屠殺時または試験中の死亡時に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。着床痕数を記録する。また、黄体数の計数が強く推奨される。

34. 全ての雄親動物について、精巣および精巣上体重量を測定する。

35. 死亡児動物および分娩後 4 日またはその直後に屠殺した児動物について、少なくとも外表の肉眼的異常を注意深く検査する。

36. 全ての親動物について、卵巣、精巣、精巣上体、副生殖腺および肉眼病変がみられた全器官を保存する。ホルマリン固定は精巣および精巣上体の通常検査用として推奨されない。これらの組織について許容される方法としては、ブアン固定液の使用がある。

病理組織学的検査

37. 最高用量群および対照群の動物の卵巣、精巣および精巣上体について、詳細な病理組織学的検査を実施する（特に精子形成のステージおよび精巣間細胞の構造に注意を払う）。必要に応じて他の保存器官を検査してもよい。最高用量群で変化が認められた場合には、他の用量群の動物についても検査を実施する。

データおよび報告

データ

38. 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、各投与群について、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、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全ての関連データを示す。生殖／発生に対する影響の評価に非常に有用とされている総括表の形式を補遺 3 に示す。

39. 試験規模が限られているため、多くの評価項目（特に生殖関連項目）については、「有意性」の検定という形の統計解析はあまり意味がない。統計解析を行う場合は、解析する変数の分布に適した方法を選択し、かつ、その選択は試験開始前に行うものとする。群の大きさが小さいため、可能であれば背景対照データ（産児数など）を使用することも試験の解釈に役立つ可能性がある。

結果の評価

40. この毒性試験の結果は、観察された影響ならびに剖検および病理組織学的所見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、不妊、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、程度との関連性などを明らかにする。

41. 雄の投与期間が短いため、雄の生殖影響を評価する際には、受胎能のデータとともに精巣および精巣上体の病理組織学的検査結果も合わせて考慮しなければならない。

試験報告書

42. 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

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）から実際の用量（mg/kg 体重/day）への換算方法
－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（受胎、妊娠、その他の毒性徴候）
－妊娠期間
－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
－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）
－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、矮小児数
－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
－着床数、黄体数（推奨）、産児数、記録時の同腹ごとの体重
－親動物の屠殺時体重および器官重量
－剖検所見
－雄の生殖器およびその他の組織（検査した場合）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

## 結果の解釈

43. この試験では、反復投与による生殖／発生毒性を評価する。この試験によって更なる検討の必要性が示唆される場合もあり、また後に続く試験を計画する上での手引きともなる。

## 参考文献

(1) OECD, Paris (1990). Room Document No. 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee.

(2) OECD, Paris (1992). Chairman’s Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992.

## 補遺1

### 定義

生殖毒性とは、子孫に対する有害な影響、または雌雄の生殖機能や生殖能力の障害、もしくはその両方をいう。

母動物毒性：妊娠雌動物に対する有害な影響。特異的に生じるもの（直接影響）と、非特異的に生じるもの（間接影響）がある。

受胎障害とは、雄または雌の生殖機能や生殖能力の異常をいう。

発生毒性：生殖毒性の徴候で、子孫における出生前、周産期、出生後の構造的または機能的異常をいう。

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あ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。

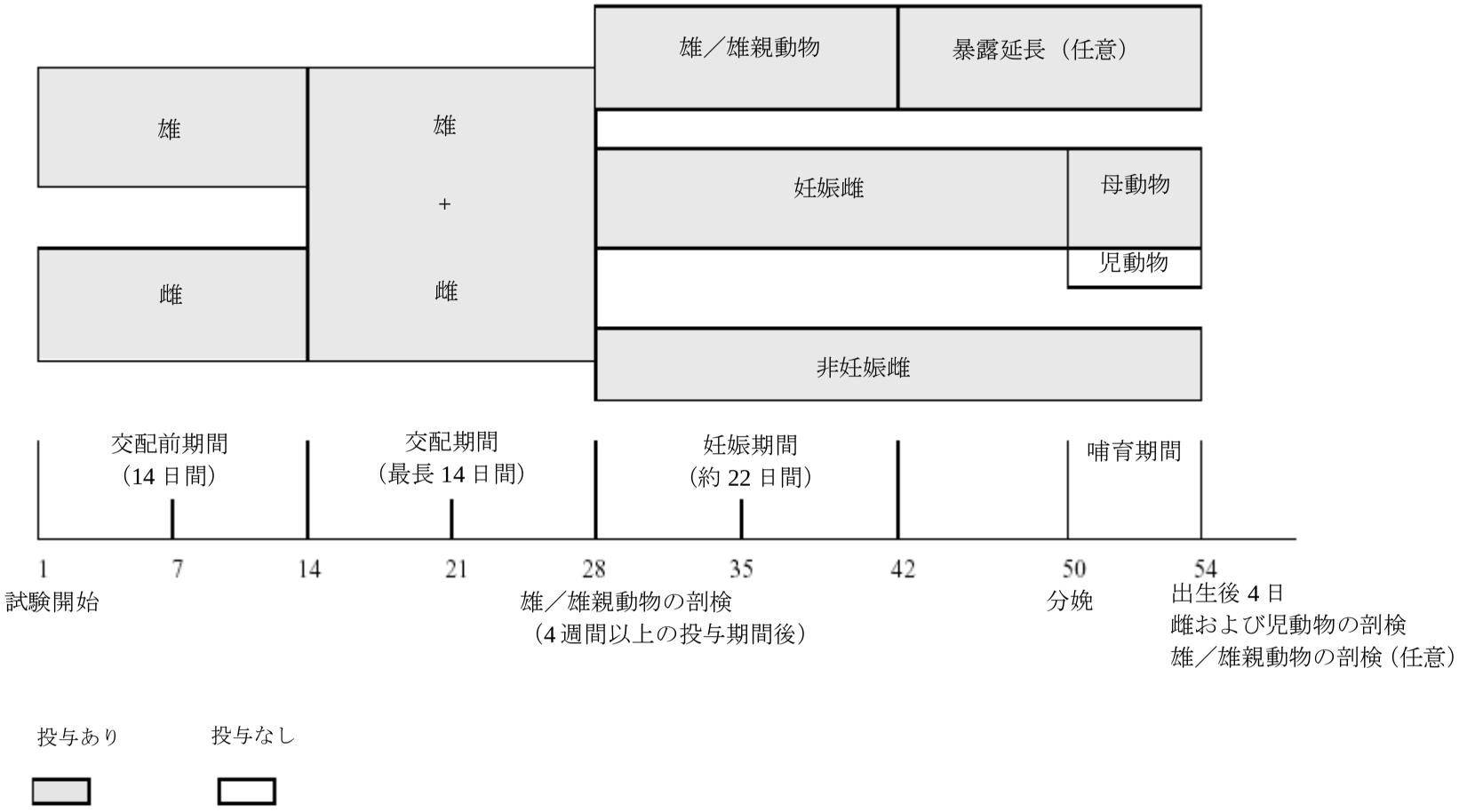
投与量とは、用量、投与頻度および投与期間からなる一般的な用語である。

明らかな毒性とは、被験物質投与後の明確な毒性徴候を示す一般的な用語である。これらは有害性評価に十分なものでなければならず、投与する用量を増加させることで高度な毒性徴候が発現し、おそらくは死に至ることが予測されるものでなければならない。

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。

**補遺 2**

**試験スケジュールの概略図（14 日間の交配期間を全て使った場合の最長の試験期間を示す）**



**補遺 3**

生殖／発生に対する影響の総括表

| 観察項目 | 値 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 用量（単位）… | **0**（対照） | … | … | … | … |
| 開始時交配対（N） | | | | | |
| 交尾が確認された雌（N） | | | | | |
| 妊娠した雌（N） | | | | | |
| 妊娠1～5日（N） | | | | | |
| 妊娠6～…[(1)] 日（N） | | | | | |
| 妊娠期間21日以下（N） | | | | | |
| 妊娠期間22日（N） | | | | | |
| 妊娠期間23日以上（N） | | | | | |
| 生存産児を有する母動物（N） | | | | | |
| 分娩後4日に生存児を有する母動物（N） | | | | | |
| 黄体数／母動物（平均） | | | | | |
| 着床数／母動物（平均） | | | | | |
| 出生時の生存児数／母動物（平均） | | | | | |
| 4日の生存児数／母動物（平均） | | | | | |
| 出生時の性比（雄／雌）（平均） | | | | | |
| 4日の性比（雄／雌）（平均） | | | | | |
| 出生時の同腹ごとの体重（平均） | | | | | |
| 4日の同腹ごとの体重（平均） | | | | | |
| 出生時の児動物の体重（平均） | | | | | |
| 4日の児動物の体重（平均） | | | | | |
| **異常児動物** | | | | | |
| 異常児動物 0 匹の母動物 | | | | | |
| 異常児動物 1 匹の母動物 | | | | | |
| 異常児動物 2 匹以上の母動物 | | | | | |
| **胚／胎児／出生児の損失／死亡** | | | | | |
| **着床前（黄体数 – 着床数）** | | | | | |
| 損失数 0 の雌 | | | | | |
| 損失数 1 の雌 | | | | | |
| 損失数 2 の雌 | | | | | |
| 損失数 3 以上の雌 | | | | | |
| **出生前／着床後（着床数 – 生存産児数）** | | | | | |
| 損失数 0 の雌 | | | | | |
| 損失数 1 の雌 | | | | | |
| 損失数 2 の雌 | | | | | |
| 損失数 3 以上の雌 | | | | | |
| **出生後（生存産児数 – 生後4日の生存児数）** | | | | | |
| 死亡数 0 の雌 | | | | | |
| 死亡数 1 の雌 | | | | | |
| 死亡数 2 の雌 | | | | | |
| 死亡数 3 以上の雌 | | | | | |

(1) 交配期間最終日