OECD/OCDE

2015/07/28

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.

Reference:

OECD (2016), 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-421-2016.pdf.

©OECD(2015)

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

2015 年 7 月 28 日採択

OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

生殖／発生毒性スクリーニング試験

はじめに

1. 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は、科学の進歩に照らして定期的に見直される。このスクリーニング試験ガイドライン 421 の初版は、1990 年のロンドン(1)、1992 年の東京(2)の 2 回にわたる専門委員会において検討された「予備的生殖毒性スクリーニング試験」のプロトコールに基づいて、1995 年に採択された。

2. 本試験ガイドラインでは、内分泌かく乱化学物質関連の評価項目を更新した。今回の更新は、内分泌かく乱の可能性がある物質のスクリーニングおよび試験について、既存の各種試験ガイドラインを改訂し新規試験ガイドラインを作成するため、1998 年に OECD で開始された優先度の高い作業のフォローアップとして行われた(3)。これに関連して、試験ガイドライン 407（げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験）は、2008 年に被験物質の内分泌活性の検出に適したパラメータが強化された。今回、試験ガイドライン 421 を更新した目的は、内分泌かく乱化学物質の暴露期間が発生における感受期の一部（出生前期または出生後早期）に及ぶ場合、内分泌かく乱化学物質関連の一部評価項目を各種スクリーニング試験ガイドラインに含めることである。

3. 今回選択された内分泌かく乱化学物質関連の評価項目の追加分は、試験ガイドライン 443（拡張一世代生殖毒性試験）の一部でもあり、これらの評価項目の組み入れに関わる科学的・技術的疑問や、その組み入れに必要な試験デザインの適合可能性に取り組んだ実用化試験に基づいて、試験ガイドライン 421 に含められた(4)。

4. 本ガイドラインは、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、443 の代替法ではなく、それらを置き換えるものでもない。

© OECD, (2015)
本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、OECD に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

最初に考慮すべき事項

5. 本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、このガイドラインは、入手可能な毒性情報がほとんどないか全くない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、より広範な生殖／発生毒性試験の用量設定試験として、またはそれ以外に関連すると考えられる場合にも用いることができる。試験を実施する場合には、安全性評価に用いられる実験動物の人道的評価項目としての客観的な徴候の認識、評価、および使用に関する OECD ガイダンス文書 No. 19 (5)に概説された指針および考慮事項に従うこと。

6. この試験では、生殖発生についてすべての面の完全な情報が得られるわけではない。特に、出生前の暴露による影響の出生後の発現、または出生後の暴露で誘発される影響の検出手段としては限定的である。（他の理由もあるが）評価項目が限られ、試験期間が短いことから、本方法は生殖／発生への影響がないと明確に主張できる証拠を提供するものではない。加えて、他の生殖／発生毒性試験データがない場合、陽性結果は初期の危険有害性評価に有用であり、追加試験の必要性とその時期に関する決定に寄与する。

7. 内分泌かく乱化学物質関連のパラメータにより得られた結果は、「内分泌かく乱化学物質の試験および評価に関する OECD の概念的枠組み」(6)に照らして検討されるべきである。この概念的枠組みでは、強化された本試験ガイドライン 421 は、内分泌かく乱化学物質関連の評価項目の有害作用データを示す *in vivo* 試験法としてレベル 4 に相当する。しかし、内分泌かく乱化学物質のシグナルが 1 つ認められても、そのままこの被験物質が内分泌かく乱化学物質であるという十分な証拠とはみなせないと考えられる。

8. 本ガイドラインは、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。

9. ある混合物について規制目的を意図してデータを生成する場合、この試験ガイドラインを用いる前に、ガイドラインからその目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合の理由について検討する。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検討は不要である。

10. 用いた定義を補遺 1 に示す。

© OECD, (2015)

試験の概要

11. 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（交配前最短 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、交配／受胎能を観察し、併せて全体で少なくとも 4 週間の投与期間とし、続いて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。

12. 雌については、試験期間全体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 13 日間、すなわち屠殺予定日の前日まで（前日を含む）が対象となる。

13. 馴化および投与前の性周期評価後の試験期間は雌の生殖能にもよるが、約 63 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 13 日間］。

14. 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

15. この試験ガイドラインは、ラットによる実験を想定している。この試験ガイドライン 421 内で指定されたパラメータを、別のげっ歯類種において検討する場合には、その妥当性の詳細について示すこと。試験ガイドライン 407 の場合、内分泌かく乱化学物質の検出に関する国際的バリデーションプログラムで使用された動物種はラットのみであった。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。試験には以前に実験手順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、体重および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。試験を長期間の予備試験または全世代試験として実施する場合、両試験には同じ系統かつ同じ供給元の動物を用いるのが望ましい。

© OECD, (2015)

飼育および給餌条件

16. すべての手順について、実験動物の地域管理基準に従うこと。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、被験物質に合った混合を確保する必要性により、飼料の選択は影響を受けることがある。

17. 同性の動物を少数の群単位で飼育する。なお、科学的妥当性がある場合には、個別飼育してもよい。群飼いでは 1 ケージあたりの動物数を 5 匹以下とする。交配手順はその目的に合ったケージにおいて行う。妊娠雌動物は個別飼育とし、巣材を与える。哺育中の雌は、出生児とともに個別飼育する。

18. 餌の夾雑物について定期的に分析する。飼料のサンプルは、試験報告書の完成まで保管すること。

動物の準備

19. 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の可能性が最小限になるようケージを配置する。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

20. 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、代わりに混餌または飲水投与してもよい。

21. 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使用について検討することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、その溶媒の毒性について知っておくこと。また、溶媒中での被験物質の安定性および均一性について判定すること。

© OECD, (2015)

手順

動物数および性

22. 各群とも雄 10 匹以上、雌 12～13 匹で開始することが推奨される。雌の暴露前の性周期を評価し、典型的な 4～5 日の周期を示さない動物は使用しない。したがって、1 群あたりの雌を 10 匹にするため、雌の追加が推奨される。これにより、顕著な毒性作用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 13 日までの成長および発生に対して被験物質が与える影響の可能性について、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

23. 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できる。対照群の動物は、被験物質の投与を除き、投与群の動物と同一に取り扱う。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。

24. 用量は、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して選択する。妊娠動物と非妊娠動物の感受性の差も考慮する。最高用量は毒性作用を生じさせる目的で選択されるが、死亡も重度の苦痛も引き起こさない用量とする。次に、投与量依存性の反応および最低用量において無毒性量（NOAEL）を求めるために、用量を降順に選択する。用量を降順に設定する場合、2～4 倍間隔で通常最適になるが、きわめて大きな投与量間隔（10 倍を超える場合など）を用いる場合、4 番目の投与群追加が望ましい。

25. 一般毒性（体重減少、肝臓、心臓、肺、もしくは腎臓に関する影響など）、または、毒性反応ではないと考えられるそれ以外の変化（摂餌量の減少、肝腫大など）が認められた場合、観察された影響への内分泌系の関与について慎重に考察する。

限度試験

26. 1000 mg/kg 体重/day 以上の 1 用量による経口投与試験、または、混餌投与により飼料中あるいは飲水中でこれに相当する割合とした経口投与試験を行い、この試験用に記載された手順を用いて毒性作用が認められない場合で、かつ構造的に関連する物質のデータに基づいて毒性なしと予測され得る場合には、複数の用量を用いた完全な試験は不要と判断してよい。ヒトの暴露量からより高い経口用量使用の必要性が示されない限り、この限度試験

© OECD, (2015)

が適用される。吸入や経皮の適用など、他の投与方法については、被験物質の物理化学的性状により、達成可能な最高濃度によることが多い。

投与

27. 被験物質を動物に週 7 日、毎日投与する。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 回に投与可能な最大液量は供試動物の大きさによって左右されるが、体重 100 g あたり 1 mL を超えないこと。ただし、水溶液の場合は例外とし体重 100 g あたり 2 mL を使用してもよい。通常高濃度ほど悪影響を示すと考えられる刺激性または腐食性の被験物質を除き、濃度を調節して被験物質の量のばらつきを最小限にし、すべての用量で用量が一定になるようにする。

28. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、含まれる被験物質量が正常な栄養や水のバランスを妨げ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、動物の体重単位で用量を一定にする方法を用いることができるが、いずれを用いたか明記すること。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い、少なくとも週 1 回調整して動物の体重単位の用量を一定に保つ。

試験スケジュール

29. 雌雄とも 5 日間以上馴化させ、雌の正常な性周期のスクリーニング（2 週間の投与前期間）を行った後、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、速やかに性周期の評価が開始されるように試験を計画する。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 13 日またはその直後に屠殺する。出生日（すなわち分娩完了日）を分娩後 0 日とする。交尾の証拠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、少なくとも交配期間後もさらに投与する。雄はその後屠殺するか、または、別の選択肢として適切であると考えられる場合には、2 回目の交配実施の可能性に備え、飼育および投与を継続する。

30. 雌親動物に対しては、妊娠期間全体および少なくとも分娩後 13 日まで（13 日を含む）、すなわち屠殺前日まで（前日を含む）、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 日を含む）投与を継続し、投与は生後 4 日までに可能な限り速やかに再開する。

31. 試験スケジュールの概略図を補遺 2 に示す。

© OECD, (2015)

交配手順

32. 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、時に雄で死亡がみられた場合には例外もあり得る。交尾の証拠が認められるまで、または、2 週間が経過するまで、雌を同じ雄と同居させる。精子または膣栓の存在について毎朝雌を検査する。交配の証拠が確認された日（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備え、同じ群の生殖能力が確認されている雄と雌の再交配を考慮することがある。

同腹児数

33. 生後 4 日目においては、児動物数を調節してもよい。その際には、使用したラットの系統で通常得られる同腹児数に応じ、一腹当たりの児動物数ができる限り雌雄各 4～5 匹に近づく様に、余剰な児動物を無作為選択して取り除く。余剰の児動物 2 匹から血液試料を採取、プールし、血清 T4 濃度の測定に用いる。体重や肛門･生殖突起間距離（AGD）などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切ではない。一腹あたり雌雄各 4～5 匹を確保できない場合は、雄 6 匹と雌 4 匹などの調整が許容される。~~一腹児数が少なくて余剰な児動物を 2 匹得られない場合には、予定通り飼育されている児動物の内の 2 匹を、血清 T4 測定用の採血に用いることができる。~~**同腹の児動物数が淘汰水準（一腹あたり 8 匹もしくは 10 匹）を下回った場合には、児動物の除去は行わない。もし、同腹の児動物数が淘汰水準より 1 匹しか多くなかった場合には、1 匹だけを除去して、予定されている血清 T4 測定用の採血に充てる。**~~同腹の児動物数が淘汰水準（一腹あたり 8 匹もしくは 10 匹）を下回った場合には、生後 13 日に行われる乳頭保持の評価により多くの雄の児動物を確保するため、生後 4 日には、雌を優先して児動物 2 匹を除去して採血に充てる。ただし、できる限り、続いて試験に供される雌の児動物数は、一腹当たり 2 匹未満にしないこと。~~［訳注：ENV/JM/TG(2016)27 (13-Apr-2016)による修正。取消線は原文からの削除、太字は追記を意味する。］

34. 同腹児数を調節しない場合、一腹につき児動物 2 匹を生後 4 日に屠殺し、血清甲状腺ホルモン濃度測定用の血液試料を採取する。~~可能であれば、乳頭保持の評価に充てる雄の児動物を確保するため、ここで選ばれる一腹につき 2 匹の仔動物は雌とする。~~**一腹当たりの児動物数が 8 匹もしくは 10 匹（使用したラットの系統で通常得られる一腹児数による）を下回った場合には、児動物の屠殺は行わない。もし、児動物の数が通常の一腹児数より 1 匹しか多くなかった場合には、1 匹だけを除去して、予定されている血清 T4 測定用の採血に充てる。**［訳注：ENV/JM/TG(2016)27 (13-Apr-2016)による修正。取消線は原文からの削除、太字は追記を意味する。］

© OECD, (2015)

生存中の観察

一般状態観察

35. 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死亡を含むすべ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。

体重および摂餌量／摂水量

36. 雌雄について、投与開始日、その後は少なくとも週 1 回、および終了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）、ならびに少なくとも分娩後 4 日および 13 日に体重を測定する。各成熟動物について、個体ごとにその測定結果を報告する。

37. 交配前、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、これらの期間中摂水量も測定する。

性周期

38. 通常の性周期を有する供試雌動物を選択するため、投与開始前に性周期をモニターする（段落 22 参照）。投与期間開始から交配の証拠が認められるまで、毎日膣垢によるモニターも行う。投与開始により性周期の変動を生じ得る急性のストレス作用が懸念される場合、供試動物に 2 週間暴露させた後、交配前期間中、毎日膣垢を採取して最低 2 週間性周期をモニターし、交配期間に交配の証拠が認められるまで引き続きモニタリングすることも可能である。膣／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(7) (8)。

出生児のパラメータ

39. 妊娠期間を記録し、妊娠 0 日から算出する。分娩後可能な限り速やかに各同腹児を検査し、児動物の数および性、死産児数、生存産児数、矮小児数（対応する対照児動物より顕著に小型の児動物）、ならびに肉眼的異常について確認する。

© OECD, (2015)

40. 生存児動物の数および性別を確認し、児動物は分娩後 24 時間以内（分娩後 0 または 1 日）、ならびに少なくとも分娩後 4 日および 13 日に体重を測定する。段落 35 記載の観察に加え、出生児の異常行動があれば記録する。

41. 各児動物の AGD を出生後同じ日（生後 0〜4 日の間）に測定する。AGD を測定した日に児動物の体重を測定し、AGD を児動物のサイズ、望ましくは体重の立方根で補正する(9)。OECD ガイダンス文書 151 (10)に推奨されているとおり、生後 12 日または 13 日に雄の児動物の乳頭数／乳輪数を計数する。

<u>血液生化学検査</u>

42. 次のスケジュールに基づいて、定められた部位から血液試料を採取する。
- 生後 4 日、腹あたり児動物 2 匹以上から
- 13 日の終了時、すべての母動物あたり児動物 2 匹以上から
- 終了時、すべての成熟雄動物から

すべての血液試料を適切な条件下で保存する。13 日の児動物および成熟雄動物から採取した血液試料について、血清甲状腺ホルモン（T4）濃度を評価する。関連性がある場合には、母動物および 4 日の児動物から採取した血液試料の T4 について、さらに評価する。関連性がある場合には、任意に他のホルモンを測定してもよい。甲状腺ホルモン分析用に、児動物の血液を同腹ごとにプールできる。甲状腺ホルモン（T4 および TSH）は「総濃度」として測定するのが望ましい。

43. 以下の要因はホルモン測定結果のばらつきおよび絶対的濃度に影響する可能性がある。
- 屠殺時間（ホルモン濃度には日内変動があるため）
- 屠殺方法（動物に対し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）
- ホルモン濃度測定用検査キット（標準曲線により異なる可能性がある）

44. ホルモン測定目的専用の血漿試料は当日のほぼ同時刻に採取する。ホルモン濃度分析時に得られる数値は市販の各種測定キットにより異なる。

<u>病理学的検査</u>

剖検

45. 成熟動物について、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。性周期を判

© OECD, (2015)

定し、卵巣の病理組織学的検査との相関の有無を可能にするため、剖検日の朝に膣垢検査を行う。

46. すべての成熟雄動物について、精巣および精巣上体（加えて肛門挙筋＋球海綿体筋の複合体、カウパー腺、陰茎亀頭）の重量を測定する。

47. 死亡児動物および分娩後 13 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。特に外部生殖器に注意を払い、発生の変化の徴候について検査する。13 日に同腹あたり雄の児動物 1 匹および雌の児動物 1 匹の甲状腺を保存する。

48. すべての成熟動物について、卵巣、精巣、副生殖器（子宮および子宮頸部、精巣上体、前立腺、精嚢＋凝固腺）、甲状腺ならびに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、ブアン固定液または改変デビッドソン固定液の使用が挙げられる(11)。固定液の急速な浸透を可能にするため、精巣の両極の位置で徐々に、かつ浅く白膜に針で穿刺すること。

病理組織学的検査

49. 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質細胞の構造の病理組織学的検査に重点を置く）。必要に応じて児動物および成熟動物の甲状腺など他の保存器官を検査してもよい。甲状腺の重量については、固定後測定することが考えられる。切り出しもきわめて慎重に行い、組織損傷を避けるため固定後のみとする。組織損傷により病理組織学的分析が損なわれる可能性がある。最高用量群で変化が認められた場合には、他の投与量群の動物に検査を拡大する。内分泌系組織の切開、固定、切片および病理組織学的検査のさらなる情報については、病理組織学的検査に関するガイダンス文書(11)に詳述されている。

データおよび報告

データ

50. 動物の個体ごとのデータを示す。また、全データを表形式に要約し、各投与群について、試験開始時動物数、試験中に死亡し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、妊娠雌動物数、毒性徴候を示した動物数、認められた毒性徴候の内容（毒性作用の発現時期、持続期間、重症度を含む）、病理組織学的変化の種類、

© OECD, (2015)

および同腹ごとのすべ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であることが証明されている総括表の形式を補遺 3 に示す。

51. 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」の検定形式の統計解析を行っても、その価値は限定的である。統計解析を行う場合は、検討対象の変数の分布に適した方法を選択し、かつ、その選択を試験開始前にすること。AGD および乳頭保持の統計解析は、児動物の個体別データに基づき、同腹ごとの影響を考慮に入れる。適切な場合、同腹児を解析単位にする。児動物の体重の統計解析は、児動物の個体別データに基づき、同腹児数を考慮に入れる。群の大きさが小さいため、入手可能であれば既存対照データ（同腹児数などについて）を使用することが試験の解釈の一助として役立つ可能性もある。

結果の評価

52. この毒性試験の結果は、観察された影響、剖検および顕微鏡検査所見に照らして評価する。評価では、被験物質の用量と異常（肉眼病変、確認された標的器官、不妊、一般状態の異常、影響を受けた生殖能および同腹ごとの能力、体重変化、死亡に対する影響その他の毒性作用など）の有無、頻度、重症度との関連性などを対象とする。

53. 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を考慮する。入手可能であれば生殖／発生に関する既存対照データ（同腹児数、AGD、乳頭保持、血清 T4 濃度など）を使用することが試験の解釈の一助として役立つ可能性もある。

54. 品質管理上、既存対照データを収集し、数値データ（特に内分泌かく乱化学物質の検出に関連するパラメータ）の場合、変動係数を算出することが提唱される。実際の試験において評価する場合、これらのデータは比較を目的として使用できる。

試験報告書

55. 試験報告書には、以下の情報を含める。

被験物質：

- 入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 既知の場合、被験物質の安定性

単一成分物質：

- 外観、水溶性およびその他の関連する物理化学的性質

© OECD, (2015)

- 化学的識別情報、例えばIUPACまたはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式、純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的同定など

多成分物質、UVCB物質（組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質）、混合物：

- 構成成分の化学的同定（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの特徴付け

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
- ラット以外の場合は、その種の妥当性

試験条件：

- 用量設定根拠
- 被験物質調合／被験物質混合飼料の調製方法、達成濃度、調製物の安定性および均一性の詳細
- 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
- 調整する場合、調整用の児動物選択の無作為化手順に関する詳細な記述

結果：

- 体重／体重変化
- 入手可能な場合、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、その他の毒性徴候など）
- 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
- 一般状態観察結果の種類、重症度および期間（可逆性の有無に関して）
- 正常または異常な性周期の成熟雌動物数および性周期の期間
- 生存産児数、着床胚・胎児死亡数

© OECD, (2015)

- 児動物の体重データ
- すべての児動物の AGD（および AGD 測定日の体重）
- 雄の児動物の乳頭保持状況
- 13 日の児動物および成熟雄動物の甲状腺ホルモン濃度（測定した場合には母動物および 4 日の児動物も）
- 肉眼的に視認可能な異常を有する児動物数、外性器の肉眼的評価結果、矮小児数
- 試験中の死亡時期、または試験終了までの動物の生存状況
- 記録時の着床数、同腹児数と同腹ごとの体重
- 親動物の屠殺時体重および器官重量に関するデータ
- 剖検所見
- 病理組織学的所見に関する詳細な記述
- 吸収データ（入手可能な場合）
- 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

56. この試験では、反復投与による生殖／発生毒性を評価する（段落 5 および 6 参照）。この試験はさらなる検討の必要性を示す場合があり、後に続く試験を計画する際には手引きとなる。生殖および発生に関する結果の解釈には、OECD ガイダンス文書 43 (12)を参照すると有用である。また、げっ歯類における内分泌系および生殖器系の試験の組織学的評価に関する OECD ガイダンス文書 106 (11)は、この試験ガイドラインに役立つと考えられる（内分泌系）諸器官および膣垢の作製および評価について情報を提供している。

© OECD, (2015)

参考文献

1) OECD (1990). Room Document No. 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No. 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, .Paris.

6) OECD (2011). 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.

7) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

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

9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L..(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

© OECD, (2015)

補遺 1

定義（OECD ガイダンス文書 150 (6)も参照）

アンドロゲン性とは、化学物質が哺乳動物で天然のアンドロゲンホルモン（テストステロンなど）のように働く能力のことである。

抗アンドロゲン性とは、化学物質が哺乳動物で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、化学物質が哺乳動物で天然のエストロゲンホルモン（エストラジオール 17β 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、化学物質が哺乳動物で天然の甲状腺ホルモン（T_3 など）の作用を抑制する能力のことである。

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。

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。

用量とは、投与される被験物質の量をいう。用量は、1 日あたり、供試動物の単位体重あたりの被験物質重量（mg/kg 体重/day など）または一定の飼料中濃度として表わされる。

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。これらの徴候については、危険有害性評価基準を満たし、かつ投与量の増加により重度の毒性徴候および死亡の可能性が生じることを予測できることとする。

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。

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。

NOAEL とは、無毒性量の略語で、投与に起因する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。

© OECD, (2015)

エストロゲン性とは、化学物質が哺乳動物で天然のエストロゲンホルモン（エストラジオール 17β など）のように働く能力のことである。

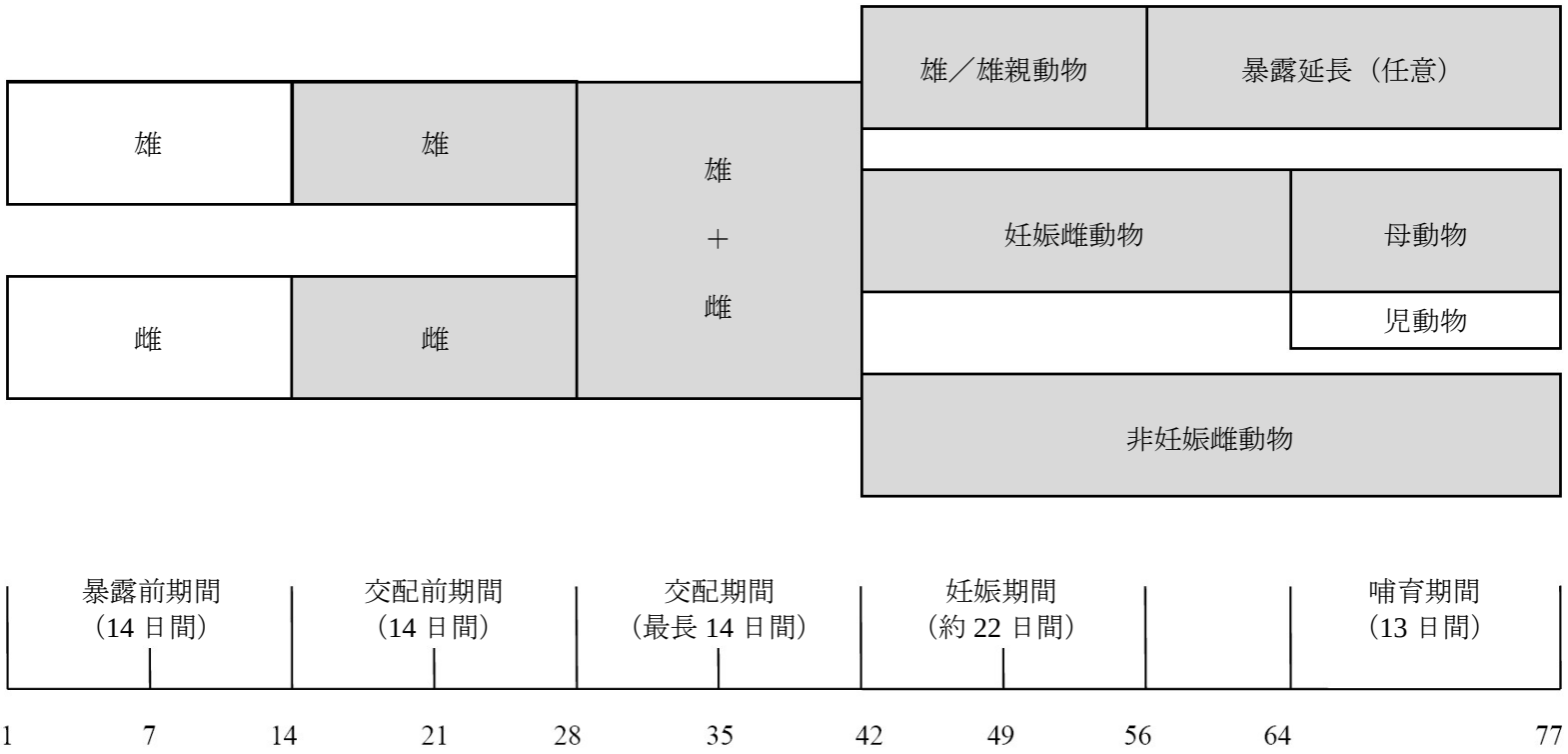
生殖毒性とは、子孫に対する有害な影響、または雌雄の生殖機能や生殖能力の障害、またはその両方をいう。

甲状腺活性とは、化学物質が哺乳動物で天然の甲状腺ホルモン（T_3 など）のように働く能力のことである。

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、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, (2015)

補遺 2　試験スケジュールの概略図（14 日間の交配期間をすべて使った場合の最長の試験期間を示す）



© OECD, (2015)

補遺 3

生殖／発生に対する影響の総括表

観察項目	値				
投与量（単位）	**0（対照）**				
開始時交配対（N）					
性周期（少なくとも平均期間および不規則な周期の頻度）					
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）					
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）					
出生時の一腹総児動物体重（平均）					
4 日の一腹総児動物体重（平均）					
出生時の児動物の体重（平均）					
AGD 測定時の児動物の体重（雄の平均、雌の平均）					
出生日～生後 4 日の同じ日における児動物の AGD（雄の平均、雌の平均、生後日数の記録）					
4 日の児動物の体重（平均）					
13 日の雄の児動物における乳頭保持状況（平均）					
13 日の児動物の体重（平均）					
異常児動物					
0 匹の母動物					
1 匹の母動物					
2 匹以上の母動物					
出生児の死亡					
出生前／着床後（着床数－生存産児数）					
0 匹の雌					
1 匹の雌					
2 匹の雌					
3 匹以上の雌					
出生後（生存産児数－生後 13 日の生存児数）					
0 匹の雌					
1 匹の雌					
2 匹の雌					
3 匹以上の雌					

(1) 交配期間最終日

© OECD, (2015)