OECD/OCDE

2006/03/23

試験ガイドライン No.425

急性経口毒性: 上げ下げ法

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. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, 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-425-2001.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

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

急性経口毒性試験　上げ下げ法（UDP）

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、科学的進歩や実際の評価法の変化を踏まえて定期的に見直している。上げ下げ法（UDP）の概念は最初に Dixon と Mood によって提唱された(1)(2)(3)(4)。1985 年、Bruce は化学物質の急性毒性の決定に上げ下げ法を用いることを提案した(5)。LD50 を推定する上げ下げ法の実験デザインは数種類ある。本ガイドラインは Bruce の方法に基づき 1987 年に ASTM によって採択され(6)、1990 年に改訂された。UDP、従来の LD50 試験、固定用量法（FDP、OECD 試験ガイドライン 420）で得られた結果を比較した試験は 1995 年に公表された(7)。Dixon と Mood の文献が初期に発表されてから生体計測学を応用した文献に掲載されており、本法の最適な使用条件が検討されている(8)(9)(10)(11)。1999 年のいくつかの専門委員会の推奨に基づき、更に改訂が考慮された。なぜなら、1）化学物質の分類のための LD50 の統一カットオフ値について国際的な合意が得られる。2）片性（原則として雌）試験で十分であると考えられる。3）意味のある点推定を得るため、推定信頼区間（CI）を得る必要があるからである。

2. 本ガイドラインの試験方法では、化学物質の急性経口毒性を推定するための動物数を最小限にすることができる。更に LD50 および信頼区間を推定するために、毒性の徴候を観察する。試験ガイドライン 425 の改訂は、試験ガイドライン 420 および 423 の改訂とともに行われた。

3. 目的に最も合った適切な試験方法を選択するガイダンスは、経口毒性試験のガイダンス文書(12)を参照すること。本ガイダンス文書にはガイドライン 425 の実施および解釈についても詳細を記載している。

4. 本ガイドラインで用いた定義を補遺 1 に提示する。

最初に考慮すべき事項

5. 試験実施機関では、試験実施前に被験物質に関する入手可能な全ての情報を検討する。その中には物質の同一性と化学構造、物理化学的特性、*in vitro* または *in vivo* 毒性試験結果、構造的に関連する物質または混合物の毒性データ、予想される化学物質の使用用途も含まれる。ヒトの健康や環境を守る上でその試験が役立つかどうかの懸念を払拭するのに必要であり、また適切な開始投与量設定の参考にもなる。

6. 方法では LD50 を信頼区間とともに推定し、急性毒性を生じる化学品の分類および表示に関する世界調和システム(16)に従って分類および等級付けすることを可能にする。

7. LD50 と用量反応曲線の傾きを予備的に推定するための情報がない場合、コンピュータシミュレーション結果から最良の結果をもたらすのは、開始用量約 175 mg/kg、投与量間隔 1/2 log 単位（用量進行係数 3.2 に相当）であることが提案されている。物質の毒性が高いと考えられる場合、開始用量を修正する。1/2 log 間隔によって用いる動物数が効果的になり、LD50

推定値の精度を高める。本方法では開始用量に偏るバイアスがあるため、開始用量は LD50 推定値未満とすること（逐次投与量と開始用量については段落 32 と補遺 2 を参照のこと）。ただし変動の大きい物質（用量反応傾きが小さい）では、バイアスは推定致死量でもみられ、他の急性毒性試験法と同様に LD50 の統計学的誤差が大きくなる。これを補正するために、主試験には観察の固定数よりも推定値を主とした中止判断が含まれる（段落 33）。

8. 本法は、1 または 2 日で死亡に至らしめる物質に用いる簡便な方法である。本法は遅延した死亡（5 日以上）が予期される場合には実用的ではない。

9. 試験の順序を確立し、最終的な推定値を得る個体別の計算にはコンピュータを用いる。

10. 腐食性や強い刺激作用により顕著な疼痛や苦痛を生じさせることが分かっている被験物質は、投与する必要がない。瀕死動物や、明らかに痛がったり、強い持続的な苦痛の徴候を示したりしている動物は安楽死させ、試験結果の解釈ではこれらを死亡動物と同じものとして扱う。瀕死動物や非常に苦しんでいる動物を屠殺する際の判断基準および予期される死亡、差し迫った死亡の見分け方については、別途 OECD ガイドライン文書(13)に記載する。

11. 限度試験は、毒性が低いと思われる物質の特定を効果的に行うことができる。

<u>限度試験の概要</u>

12. 限度試験は最大 5 匹の動物を用いる逐次試験である。投与量は 2000 mg/kg、例外として 5000 mg/kg である。2000 mg/kg と 5000 mg/kg の投与方法は、わずかに異なる（2000 mg/kg 限度試験は段落 23～25、5000 mg/kg 限度試験は段落 26～30 を参照）。逐次試験を選択すると統計検出力を増加させると同時に、LD50 が限度投与量に近い物質の限度試験を否定するバイアスをかける（すなわち、安全性の点で誤る）可能性がある。限度試験の実施計画書のとおり、実際の LD50 が限度投与量に近づくにつれて、物質を正しく分類する可能性は減少する。

<u>主試験の概要</u>

13. 主試験は投与される動物に単一の順序投与量進行係数を用いて実施し、1 回ごとに最低 48 時間の間隔を空ける。まず 1 匹目に LD50 最適推定値未満の投与量を投与する。動物が生存すれば、次の動物に元の投与量の 3.2 倍（係数）増加させた量を投与する。死亡すれば次の動物には同様に減量した量を投与する（3.2 倍は 1/2 log 単位の進行に相当するデフォルトの係数である。段落 32 には投与間隔係数の選択に関するガイダンスを記載する）。各動物を 48 時間まで注意深く観察し、次の動物に投与するか、また投与する場合には投与量を決定する。全ての動物について 48 時間までの生存状況に基づき決定する（投与間隔の選択について段落 31 および 35 参照）。中止基準の組み合わせにより、動物数を少なく保つよう用いる。開始用量が少ないか、または傾きが小さいことによる影響を軽減するよう投与パターンを補正する（段落 34 参照）。終了時の全動物の状況に基づき LD50 推定および信頼区間を算出する際、基準に 1 つでも該当すれば投与を中止する（段落 33 および 41 参照）。多く

のアプリケーションでは、最初に逆転がみられた後 4 匹のみで試験は終了する。LD50 は最尤法を用いて算出する(14)(15)（段落 41 および 43 参照）。

14. 主試験手順の結果は、実行可能な信頼区間推定を示すコンピュータ手順の開始点となる。この CI の基礎詳細は段落 45 に示す。

試験方法

動物種の選択

15. 推奨する動物種としてはラットが望ましいが、他のげっ歯類を用いてもよい。原則として雌ラットを用いる(12)。従来の LD50 試験に関する文献調査では感受性にはほとんど性差がないものの、性差が認められる場合には雌の方が一般的にやや感受性が高いことが示されている(7)。ただし、構造的に類似する化学物質の毒性やトキシコキネティクスに関する知見から、雄が雌よりも感受性が高いと判断される場合には雄を用いる。雄で試験を実施する場合は、その妥当性を示す。

16. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を用いる。雌は未経産で非妊娠のものとする。各動物は投与開始時において 8～12 週齢とし、体重は先に投与された動物の平均体重の± 20%を超えないものとする。

飼育および給餌条件

17. 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。動物は個別に飼育する。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。

動物の準備

18. 動物を無作為に選び、個体識別ができるようにマークし、投与開始前に 5 日間以上飼育ケージで飼育して飼育室環境に馴化させる。他の逐次試験デザインと同様に、試験全体で適切なサイズと年齢範囲を確保できるよう努める。

投与の準備

19. 一般には投与液の濃度を変えることにより、試験する全投与量で被験物質を一定容量で投与する。ただし、溶液の最終製品または混合物を試験する際、希釈せずに用いる方が（一定の濃度）その物質のその後のリスク評価にとってより適切な場合があり、また一部の規制当局で要求している方法でもある。いずれの場合も最大容量を超えないこと。1 回に投与可能な液体の最大容量は、試験動物の大きさによって異なる。げっ歯類では体重 100 g あたり 1 mL を超えないようにするが、水溶液については体重 100 g あたり 2 mL まで考慮できる。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液／水性乳剤の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液／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、溶媒の毒性が分かっていなければならない。投与液の使用期間

中の安定性が既知で許容範囲内であることが示されていない限り、調整は投与直前に行う必要がある。

手順

投与

20. 被験物質を胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて単回経口投与する。一回で投与できないような例外的な場合には、24 時間以内に少量ずつ分割投与する。

21. 投与前に動物を絶食させる（ラットでは一晩、マウスでは 3〜4 時間、飼料を与えない。ただし、いずれも水は与える）。絶食期間後に体重を測定し、被験物質を投与する。各動物の絶食時体重を測定し、体重により投与量を算出する。投与後、ラットでは更に 3〜4 時間、マウスでは 1〜2 時間、飼料を与えない場合もある。なお一定時間内に分割投与する場合は、投与に要する時間により給餌・給水を行う必要があることがある。

限度試験および主試験

22. 被験物質が無毒性である可能性、すなわち規制された投与量以下の毒性を示すなど情報を得ている場合には予備的に限度試験を行う。被験物質の毒性についての情報は、毒性学的に重要であることが知られる成分の特定および割合を考慮し、試験を実施した類似物質、混合物や製品から得ることができる。毒性についての情報がほとんどないか全くない場合、または毒性が予測される場合は主試験を行う。

限度試験

2000 mg/kg での限度試験

23. 1 匹に試験投与量を投与する。死亡なら、LD50 を決定するために主試験を行う。生存なら更に 4 匹に投与し、合計で 5 匹試験する。3 匹が死亡したら、限度試験を中止して主試験を行う。3 匹以上が生存ならば、LD50 は 2000 mg/kg 以上とする。後に予期せずして動物が死亡したが他に生存動物もいる場合は投与を中止し、同様の観察期間で更に死亡する動物がいるかどうかを観察する（初期観察期間は段落 31 を参照）。後の死亡は他の死亡と同様に数える。結果を以下のとおり評価する（O=生存、X=死亡）

24. 3 匹以上が死亡なら、LD50 は試験投与量（2000 mg/kg）未満である。

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

3 匹目が死亡なら、主試験を行う。

25. 5 匹試験する。3 匹以上が生存なら、LD50 は試験投与量（2000 mg/kg）を超える。

O OO OO
O OO XO
O OO OX
O OO XX
O XO XO
O XO OO/X
O OX XO
O OX OO/X
O XX OO

5000 mg/kg での限度試験

26. 例外として、かつ特定の規制上の必要性から正当であると認められる場合に限り、5000 mg/kg の投与を考慮する（補遺 4 を参照）。動物愛護の観点から GHS 区分 5 の範囲（2000～5000 mg/kg）での動物試験は推奨されず、そのような試験は、その結果がヒトや動物の健康、または環境の保護に直接関係している可能性が高い場合にのみ検討されるべきである。

27. 1 匹に試験投与量を投与する。死亡なら、LD50 を決定するために主試験を行う。生存なら更に 2 匹を追加する。いずれも生存ならば、LD50 は限度用量以上として試験を終了する（追加の動物に投与せずに 14 日の観察を行う）。

28. 1 匹または 2 匹が死なら、更に一度に 2 匹を追加する。後に予期せずして動物が死亡したが生存動物もいる場合は投与を中止し、同様の観察期間で更に死亡する動物がいるかどうかを観察する（初期観察期間は段落 10 を参照）。後の死亡は他の死亡と同様に数える。結果を以下のとおり評価する（O=生存、X=死亡）

29. 3 匹以上が死亡なら、LD50 は試験投与量（5000 mg/kg）未満である。

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

30. 3 匹以上が生存なら、LD50 は試験投与量（5000 mg/kg）を超える。

O OO
O XO XO
O XO O
O OX XO
O OX O
O XX OO

主試験

31. 通常 1 匹に 48 時間間隔で被験物質を投与する。ただし、投与間隔は毒性徴候の発現、期間、程度に基づいて決定する。前投与量で動物が生存していることが確認されるまで、次の投与を遅延する。投与間隔は反応が不確定な場合などには適宜調節する。逐次投与では単一間隔を用いると試験が更に簡単になる。ただし、試験中に間隔期間が変更になったからといって、投与量または尤度比を再計算する必要はない。開始用量の選択にあたり、構造的に関連する物質および被験物質の他の毒性結果も含めた全ての有効な情報を、適切な LD50 と用量反応曲線の傾きに用いる。

32. LD50 予備推定値未満の投与量を 1 匹目に投与する。動物が生存なら、更に高用量を 2 匹目に投与する。1 匹目が死亡か瀕死状態になったら、2 匹目は低用量を投与する。真数 1（用量反応曲線の推定傾き）となるように用量進行係数を選択し、試験中一定に維持する（進行係数 3.2 は傾き 2 に相当）。被験物質の傾きについて情報がない場合は、進行係数 3.2 を用いる。デフォルト進行係数を用いると投与量は 1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000 mg/kg（または特定の規制上の必要性から 1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750、5000 mg/kg）となる。物質の致死量推定値がない場合、投与量は 175 mg/kg から開始する。ほとんどの場合でこの投与量は致死未満の量であり、疼痛や苦痛のレベルを軽減させる。被験物質に対する動物の忍容性の変動が高い（傾きが 2.0 未満）と推定されるならば、投与開始前に対数スケールに基づくデフォルト 0.5（3.2 進行係数）を超えるよう、係数を増加することを考慮する。同様に、被験物質の傾きが急であることが既知の場合は投与進行係数はデフォルトより小さいものを選択する（開始用量 175 mg/kg で 1〜8 倍数の傾きの用量進行表を補遺 2 に示す）。

33. 全動物について決まった時間間隔（例えば 48 時間）での結果に基づき、投与を継続する。以下の中止基準に 1 つでも該当する場合、試験を中止する。

(a) 連続する 3 匹の動物が上限量で生存する
(b) 連続する動物 6 匹に投与したうち 5 匹に逆転がみられる
(c) 最初の逆転後 4 匹以上が続き、特定の尤度比が臨界値を越える（段落 44 および補遺 3 を参照。最初の逆転から 4 匹目の各投与後に算出）

LD50 と傾きの組み合わせは多数あるため、中止基準(c)は逆転後 4〜6 匹で該当する。用量反応曲線が緩やかな化学物質には追加動物が必要である（合計 15 匹まで）。

34. 中止基準に該当したら、段落 40 および 41 で記載された方法を用いて試験終了時の結果から推定 LD50 を算出する。

35. 人道的な理由で安楽死させた瀕死動物は、試験中に死亡した動物と同様に考える。試験後半に動物が予期せずして死亡したが同投与量以上で生存動物がいる場合は投与を中止し、同様の観察期間で死亡する動物がいないかを全動物について観察する。生存動物が死亡したら全投与量は LD50 を超えている可能性があり、死亡した用量から更に 2 段階低い用量から試験を再開するのが適切である（観察期間を増加する）。開始用量は LD50 未満からの方法が最も正確だからである。死亡した投与量以上を投与した動物が生存しているなら、死

亡した動物は生存動物よりも低用量での死亡として計算に含まれ LD50 が算出されるため、投与量進行の変更は必要ではない。

観察

36. 動物は投与後 30 分以内に少なくとも 1 回、24 時間以内は定期的に（最初の 4 時間は特に注意深く）、その後毎日 1 回、合計 14 日観察する。動物愛護のため、その個体を試験から除いて安楽死させるか、または死亡して発見された場合を除く。ただし観察期間は厳格に固定せず、毒性反応やその発現時間また回復期間の長さに基づいて決め、必要と考えられる場合には延長する。毒性徴候の発現時期と消失時期は、特に毒性徴候が遅れて発現する傾向にある場合は重要である(17)。各動物についての個別の記録を残すとともに、全ての観察結果を体系的に記録する。

37. 動物が毒性徴候を示し続けるなら、追加の観察が必要である。観察には皮膚、被毛、眼、粘膜、呼吸器系、循環器系、自立神経系、中枢神経系、体性運動および行動の変化を含む。振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠、昏睡についても注意を払う。人道的評価指標に関するガイダンス文書(13)にまとめられている原則および基準を考慮し、瀕死状態で発見された動物や高度の疼痛または強い持続性の苦痛の徴候を示している動物は安楽死させる。動物を安楽死させた場合、また死亡した状態で発見した場合には、その時刻を可能な限り正確に記録する。

体重

38. 動物の個体ごとの体重を被験物質投与直前と投与後に、少なくとも週 1 回測定する。体重変化を計算し記録する。試験終了時に生存動物の体重を測定し、安楽死させる。

病理学的検査

39. 全動物（試験中死亡した動物および動物愛護のため除外した動物を含む）について剖検を行い、肉眼病理学的所見を記録する。初回投与後 24 時間以上生存した動物の器官で肉眼病理学的変化が認められたものについては有用な情報が得られる場合があるため、病理組織学的検査を検討してもよい。

データおよび報告

データ

40. 動物の個体ごとのデータを示す。また、全てのデータを総括表にして、投与群について、使用動物数、毒性徴候を示した動物数(17)、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、死亡時期、毒性徴候の内容と経過と可逆性、剖検所見を示す。開始用量および用量増加の理由、ならびに選択に用いたデータを示す。

主試験での LD50 算出

41. 段落 42 で述べる例外を除き、LD50 は最尤法(14)(15)を用いて算出する。以下の統計方法は最尤推定法（推定 σ とともに）を実行するのに有用である。直後の死亡、遅延性の死亡、安楽死に限らず全ての死亡は最尤法解析の対象とする。Dixon(4)に従い、尤度関数は以下のとおりである。

$L=L_1L_2 \ldots. L_n$

L はμ、 σ 、全試験動物数 n を与えた試験結果の尤度である。
i 番目の動物が生存するなら $L_i=1-F(Z_i)$または
i 番目の動物が死亡したなら $L_i=F(Z_i)$

F=累積標準分布
$Z_i=[log(d_i)-\mu]/\sigma$
d_i＝i 番目の動物の投与量
σ =投与量対数での標準偏差（対数標準偏差ではない）

真の LD50 推定が尤度 L を最大化するμによって示される（段落 43 参照）。

σ 0.5 の推定値は、一般値または特定値が有効でない場合に用いる。

42. ある環境下では、統計計算は不可能になるか誤結果を算出する。推定 LD50 を決定／報告する特別な方法は以下の環境で可能である。

(a) 段落 33 の基準(a)に基づき試験を中止した（限度量を反復投与した）か、または上限投与量で試験を中止した場合、LD50 が上限を超える値として報告される。この根拠に基づき分類が完了する。
(b) 全死亡動物で全生存動物よりも投与量が高い（またはほとんどありえないが、全生存動物で全死亡動物よりも投与量が高い）なら、LD50 は死亡動物と生存動物の投与量の間である。LD50 正確値について、観察からは情報が得られない。また LD50 最尤推定法から σ 値の存在が得られる。段落 33 の中止基準(b)はそのような状況を示す。
(c) 生存および死亡動物に共通した 1 投与量のみが投与され、他の全死亡動物で投与量が高く他の全生存動物で投与量が低いか、または逆の場合、LD50 はその 1 投与量である。関連物質を試験するときは、少ない投与進行にて実行する。

上記の状況に該当しない場合、LD50 を最尤法で算出する。

43. 最尤法計算は、参照 3 の補遺 1D で解説する SAS(14)（PROC NLIN）または BMDP(15)（プログラム AR）コンピュータプログラムパッケージを用いて実施する。他のコンピュータプログラムを用いてもよい。パッケージの一般的な使用法は ASTM 標準 E1163-87(6)の付属に

示す[（BASIC プログラムで用いる σ (6)は OECD 試験ガイドライン 425 のパラメータを反映するため編集する必要がある）]。プログラムのアウトプットは log（LD50）および標準誤差の推定値である。

44. 段落 33 の尤度比中止基準(c)は 3 つの試験進行測定に基づく。これは段落 41 の異なるμを伴う尤度形式をしている。段落 33 の基準(a)(b)を満たさない 6 番目以降の各動物を試験後に比較する。尤度比基準に等しいものを補遺 3 に記載する。比較は自動的に容易に実施でき、繰り返し実行できる。例えば補遺 3 に示すような表計算によってできる。基準が合致したら試験を中止し、LD50 を最尤法によって算出する。

<u>信頼区間の計算</u>

45. 主試験と推定 LD50 算出後、LD50 の区間推定を計算することが可能である。信頼区間は、実施した主試験の信頼性および有用性に関する価値ある情報を提供するものである。信頼区間が広ければ、推定 LD50 に伴う不確実性が増す。推定 LD50 の信頼性は低くなり、推定 LD50 の有用性は最低となる。信頼区間が狭ければ推定 LD50 の信頼性は高くなり、不確実性は低くなる。推定 LD50 の信頼性は高くなり、有用性は高くなる。このことは主試験を繰り返した場合に新たな推定 LD50 は元の推定 LD50 に近く、いずれの推定値も真の LD50 に近いことを意味する。

46. 主試験の結果に基づき、真の LD50 区間推定 2 種のうち 1 種を計算する。

- 3 種類以上の投与量を試験し、中間量で 1 匹以上生存し、1 匹死亡したなら真の LD50 95%を含むと予測される信頼区間を求めるために、プロファイル尤度に基づく計算手法を用いる。しかし、少ない動物数を用いることが予測されることから、実際の信頼区間は正確ではない(18)。無作為の中止基準によって試験の変動条件に対応するよう改善されたが、報告された信頼区間と実際の信頼区間が異なる原因ともなる(19)。
- 全動物がある投与量以下で生存し、次用量で全動物が死亡したなら、全動物が生存した最高用量が下限値であり、死亡した投与量が上限値であるよう区間を計算する。区間は「およそ」の値とする。この区間に関連する正確な信頼区間は特定できない。ただし、このような種類の反応は用量反応が大きい場合にのみ起こることが多く、真の LD50 は計算された区間内におさまるか、近いことが推測される。この区間は比較的狭く、ほとんどの利用に十分な精度である。

47. 0 を下限値、無限大を上限値またはいずれも含むが、信頼区間は無限大と報告されることがある。このような区間は、例えば、全動物が死亡または生存したときにみられる。この手順を実行するには USEPA または OECD から得た専用プログラムの使用、もしくは USEPA または OECD から得た技術の詳細による特定の計算が必要である(20)。得られた区間範囲および専用プログラムの特性を報告(21)に記載する。これは USEPA でも有用である。

試験報告書

48. 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、関連があれば物理化学的特性（異性化を含む）
- CAS 番号を含む特定データ

溶媒（必要に応じて）
- 水以外の場合、溶媒選択の妥当性

供試動物
- 使用した動物種／系統
- 分かっている場合、動物の微生物学的状況
- 動物数、週齢、性（必要であれば、雌ではなく雄を用いた理由を含む）
- 供給元、飼育条件、飼料など

試験条件
- 開始用量、投与量進行係数、追跡投与量の選択理由
- 投与物質の物理学的性状の詳細を含む被験物質の詳細
- 投与容量および投与期間を含む被験物質投与の詳細
- 飼料および水の質の詳細（飼料の種類／供給元、水の供給元を含む）

結果
- 体重データおよび体重変化
- 各動物の反応データおよび用量（性質、程度、期間、死亡を含む毒性徴候を示した動物）の表
- 投与日、その後 1 週間ごと、死亡または屠殺時の個体ごとの体重
- 各動物の毒性徴候の発現経過およびその可逆性
- 各動物の剖検所見および必要に応じて病理組織学的所見
- LD50 データ
- 結果の統計処理（通常使用するコンピュータおよび計算算出表の詳細）

結果の考察および解釈

結論

参考文献

(1) Dixon W.J. and A.M. Mood. (1948). A Method for Obtaining and Analyzing Sensitivity Data. J. Amer. Statist. Assoc., 43, 109-126.

(2) Dixon W.J. The Up-and-Down Method for Small Samples (1965). J. Amer. Statist. Assoc. 60, 967-978.

(3) Dixon W.J. (1991). Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method. Neurosci. Biobehav. Rev., 15, 47-50.

(4) Dixon W.J. (1991) Design and Analysis of Quantal Dose-Response Experiments (with Emphasis on Staircase Designs). Dixon Statistical Associates, Los Angeles CA, USA.

(5) Bruce R.D. (1985). An Up-and-Down Procedure for Acute Toxicity Testing. Fundam. Appl. Tox., 5, 151-157.

(6) ASTM (1987). E 1163-87, Standard Test Method for Estimating Acute Oral Toxicity in Rats. American Society for Testing and Materials, Philadelphia Pa, USA.

(7) Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I., Goddard M., Segal L., Springer J.A., and Myers R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50 and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol., 33, 223-231.

(8) Choi S.C. (1990). Interval estimation of the LD50 based on an up-and-down experiment. Biometrics 46, 485-492.

(9) Vågerö M. and R. Sundberg. (1999). The distribution of the maximum likelihood estimator in upand-down experiments for quantal dose-response data. J. Biopharmaceut. Statist. 9(3), 499-519.

(10) Hsi B.P. (1969). The multiple sample up-and-down method in bioassay. J. Amer. Statist. Assoc. 64, 147-162.

(11) Noordwijk van A.J. and van Noordwijk J. (1988). An accurate method for estimating an approximate lethal dose with few animals, tested with a Monte Carlo procedure. Arch. Toxicol. 61, 333-343.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity . Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(14) SAS Institute Inc. (1990). SAS/STAT® User's Guide. Version 6, Fourth Ed. or later. Cary, NC, USA.

(15) BMDP Statistics Software, Inc. (1990). BMDP Statistical Software Manual. W.J. Dixon, Chief Ed. 1990 rev. or later. University of California Press, Berkeley, CA, USA.

(16) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmentla Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, pg 11. [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(17) Chan P.K. and Hayes A.W. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

(18) Rosenberger W.F., Flournoy N. and Durham S.D. (1997). Asymptotic normality of maximum likelihood estimators from multiparameter response-driven designs. Journal of Statistical Planning and Inference 60, 69-76.

(19) Jennison C. and Turnbull B.W. 2000. Group Sequential Methods with Application to Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton, FL. USA.

(20) Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0, 2001. [http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-524-nodirectorate-no-24-6775-8,FF.html]

(21) Westat. 2001. Simulation Results from the AOT425StatPgm Program. Report prepared for U.S. E.P.A. under Contract 68-W7-0025, Task Order 5-03.

補遺 1

定義

急性経口毒性：物質の単回経口投与または 24 時間以内の複数回投与によって生じる有害な影響。

遅延性の死亡：動物が投与後 48 時間以内に死亡または瀕死の状態にならず、その後の 14 日間の観察期間中に死亡する。

投与量：投与される被験物質の量。重量（g、mg）または単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kg）で表す。

投与進行係数：投与間隔因子とも言う。生存した動物に増量（投与進行）する倍数、または死亡した動物に減量する除数。投与進行係数には 1/（用量反応曲線の推定傾き）が推奨される。進行係数のデフォルトは 3.2（真数 0.5 = 真数 1/2）が推奨される。

GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム。OECD（ヒトの健康および環境）、国連危険物輸送専門委員会（物理化学的危険性）、国際労働機関（ILO、危険有害性周知）の共同作業による。化学物質の適正管理のための国際機関間プログラム（IOMC）が調整。

差し迫った死亡：次の観察予定時間前に瀕死状態になるか、死亡することが予測されるとき。げっ歯類でこの状態を示す徴候には、痙攣、側臥位、横臥、振戦などが挙げられる（人道的評価指標に関するガイダンス文書(13)を参照）。

LD50（経口半数致死量）：単回経口投与により 50%の動物が死亡すると予測される化学物質の量で、統計学的に求められる。試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kg）で表す。

限界用量：投与量の上限（2000 または 5000 mg/kg）。

瀕死状態：死につつあるか、たとえ治療しても生存できない状態（人道的評価指標に関するガイダンス文書（13）を参照）。

基準サンプル数：試験動物総数から逐次開始時に反応を示した数未満を減少させた数か、試験数を最大として最初の逆転がみられた一対を含まない数を減少させた数。例えば、X と O（X は 48 時間以内に死亡、O は生存）が反対の結果を OOOXXOXO のパターンで示した場合、試験動物総数（従来ではサンプル数）が 8 匹であり、基準サンプル数は 6 匹である。この特別な例として逆転後 4 匹がみられた。ガイドラインの特定の部分での計数が基準サンプル数なのか試験総数なのかを注意する。例えば、最大試験数は 15 匹である。試験を最大数で中止すると、基準サンプル数は 15 匹または 15 匹以下である。基準サンプルの動物は（r-1）番目から開始する（逆転ペアの 2 番目以前）（逆転は以下を参照）。

予期される死亡：この先のある時期（試験終了予定前）の死亡を示唆する症状が認められる状態。例えば、水や飼料に到達できないなど（人道的評価指標に関するガイダンス文書(13)を参照）。

Probit：「積分変換確率」の略語であり、probit 用量反応モデルは、予測される反応の標準分布（平均の中央で標準偏差を計測する σ）に対する投与量（通常は対数単位）の分析を可能にし、σ の逆数傾きをもつ直線であるかのように示す。標準致死量分布は対称的であり、平均は真の LD50 または中央値である。

逆転：ある投与量で反応がみられないが、次用量で反応が観察される状況、またはその反対（無反応の後に反応がある）。逆転は無反応と反応の一対から成る。最初の一対は r-1 番目と r 番目でみられる。

σ：化学物質に関する忍容性範囲を示す対数標準曲線の標準偏差（化学物質が被験動物の忍容性を超えているならば反応可能であることが予測される）。推定 σ は、投与量全範囲での反応における動物間の変動推定値である。傾きと probit を参照のこと。

（用量反応曲線の）傾き：投与量軸を上昇する用量反応曲線での角度に関連する値。probit 分析では、対数単位で投与量に対する probit スケールについて反応を分析すると、曲線は直線になる。また、傾きは試験動物の忍容性の標準偏差である σ の逆数となり、通常予想される分布である。probit と σ を参照のこと。

中止基準：本ガイドラインでは同意語として、1）特別な中止基準、2）試験段階の終了を決定する全基準の総合がある。特に主試験では中止基準は 7 段落に示し、臨界値の割合を比較することによって基準を簡略化する。

補遺 2

投与手順

主試験の投与量

1. 上げ下げ法：各投与時には 1 回、通常 48 時間間隔で行う。最初の動物に LD50 最適推定値よりも低い量を投与する。最終推定での開始用量を**決定するのに LD50 から離れる**傾向にあるバイアスを補正するものである（段落 7 を参照）。結果のパターンから各動物の投与量を調節するように安定化できる。以下段落 3 には、投与間隔係数の選択についてのガイダンスを示す。

2. デフォルト投与量進行：開始用量と投与間隔を決定したら、毒性学者は上限（通常 2000 または 5000 mg/kg）を含む全投与量をリストに掲載する。上限に近い投与量は進行からは除外する。TG425 デザインの投与段階では、自動調節として機能する最初の数投与量を示す。陽性バイアスの傾向から化学物質についての既知の情報がない場合、開始用量は 175 mg/kg が推奨される。デフォルト手順を主試験に当てはめる場合、投与量は 175 mg/kg から開始し、対数単位で 0.5 ずつ増量する。すなわち 1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000 mg/kg（または 1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750、5000 mg/kg）となる。毒性の高い物質では、投与量は更に低い量に変更する必要がある。

3. デフォルト以外の進行係数が適切な場合に、1～8 の全倍数傾きを用いた進行を表 1 に示す。

表 1　OECD 試験ガイドライン 425 の投与量進行
傾きを選択し縦列を読む　全用量は mg/kg 体重

傾き = 1	2	3	4	5	6	7	8
0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*
						0.24	0.23
				0.275	0.26		
			0.31			0.34	0.31
		0.375			0.375		
							0.41
				0.44		0.47	
	0.55		0.55		0.55		0.55
				0.69		0.65	
							0.73
		0.81			0.82		
			0.99			0.91	0.97
				1.09	1.2		
						1.26	1.29
1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
						2.4	2.3
				2.75	2.6		
			3.1			3.4	3.1
		3.75			3.75		
				4.4			4.1
						4.7	
	5.5		5.5		5.5		5.5
				6.9		6.5	
							7.3
		8.1			8.2		
			9.9			9.1	9.7
				10.9	12		
						12.6	12.9
17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
						24	23
				27.5	26		
			31			34	31

表1（続き）

傾き = 1	2	3	4	5	6	7	8
		37.5			37.5		
				44			41
						47	
	55		55		55		55
						65	
				69			73
		81			82		
			99			91	97
				109	120		
						126	129
175	175	175	175	175	175	175	175
						240	230
				275	260		
			310			340	310
		375			375		
				440			410
						470	
	550		550		550		550
						650	
				690			730
		810			820		
			990			910	970
				1090	1200		
						1260	1290
1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
						2400	2300
				2750	2600		
			3100				3100
					3750	3400	
							4100
5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

*低い投与量が必要な場合、更に低い用量へと進行を継続する。

補遺 3

尤度比中止基準の計算

1. ガイドライン段落 33 に記載したとおり、3 つの中止基準のうち 1 つが該当すれば主試験は中止する。中止基準に該当しなくとも、いずれも 15 匹に投与した時点で中止とする。表 2-5 には情報のない化学物質を試験する場合の例を示し、デフォルト開始用量が 175 mg/kg、推奨されるデフォルト進行係数 3.2 または 1/2 log を用いている。このような表のフォーマットは、実例のために掲載している。

2. 表 2 に、主試験で 2000 mg/kg を投与した動物 3 匹が生存した場合に中止する基準を示す。表 3 には、5000 mg/kg を投与した同様の場合を記載する（限度試験の*推測*が適切とは考えられなかった場合を図示）。表 4 には投与動物 6 匹中 5 匹に逆転がみられた特殊性と、中止する場合を示す。最後に表 5 にはいずれの基準(a)にも(b)にも合致せず、逆転後に 4 匹を試験したとき(c)についても同様に評価する。

3. 基準(c)は各動物試験後に評価する尤度比中止基準が必要であり、逆転後の 4 匹目から開始する。3 つの「進行測定」を計算する。LD50 の最尤推定法に推奨されるように、理論的には進行測定は尤度である。手順は尤度に基づく手順による信頼区間の算出に深い関連がある。

4. 手順の基本として十分なデータがあること、点推定の上下値よりも LD50 の点推定が強く支持され、尤度を用いた統計学的な手法で算出されることが挙げられる。LD50 点推定の尤度（例として概算推定と呼ばれるまたは投与量平均推定）、点推定未満の尤度、点推定以上の尤度の 3 尤度値を計算する。特に低い値は 2.5 で除した点推定値、高い値は 2.5 倍にした点推定値とする。

5. 尤度値は尤度比を計算することによって比較する。また、尤度比（LR）が臨界値を超えるかについて決定する。点推定の統計を強く支持することを示すための係数 2.5 による各尤度を点推定尤度比が超える場合、試験を中止する。したがって、点推定と 2.5 で除した点推定の尤度比、点推定と 2.5 倍した点推定の尤度比の 2 つの尤度比（LR）を算出する。

6. LD50 算出のみであれば、通常可能な機能で表計算できる。表計算の実行を模倣した図を補遺 3 の表 5 に示す。上限 5000 mg/kg を用いた計算手順を図示するが、2000 mg/kg を上限としたときと同じ方法で実行する。代替として、動物のデータ入力欄があり、LD50 推定と信頼区間の計算式が組み込まれている自動掲載のソフトウェアは、OECD および US EPA ウェブサイトから直接ダウンロードできる。表 6 にはソフトウェアのスクリーン画像を示す。

上限 5000 mg/kg を用いた仮例（表 5）

7. 上限 5000 mg/kg を用いた仮例では、動物 9 匹を試験した後 LR 中止基準に合致した。最初の「逆転」は 3 匹目の動物でみられた。LR 中止基準を逆転後に試験した 4 匹で検証する。この例では逆転後の 4 匹目、実際には 7 匹目となる。したがってこの例では、表計算は 7 匹目の試験後のみに必要であり、データをその時点で入力する。その後 7、8、9 匹目の試験後に LR 中止基準を検証する。9 匹目を試験した後、最初に LR 中止基準に合致する。

A. 動物別の用量反応情報を入力する。

縦列 1：段階を 1〜15 まで番号付ける。15 匹以上は試験しない。
縦列 2：各試験動物に I を入力する。
縦列 3：i 番目の動物に投与した投与量を入力する。
縦列 4：動物が反応したか（X）しなかったか（O）を示す。

B. 基準および実際のサンプル数

8. 基準サンプル数は最初の逆転（ここでは 2 番目と 3 番目）を示した 2 匹の動物＋その後の全試験動物から構成される。ここでは、縦列 5 に試験動物が基準サンプルに含まれるかを示す。

基準サンプル数（基準 n）は列 16 に示す。これは基準サンプルの動物数で、例えば、基準 n は 8 である。

実際の試験数を列 17 に示す。

C. 概略 LD50 推定

9. 現在の基準サンプルの動物について、投与量幾何平均を、進捗を計るための概略 LD50 推定に用いる。表では「投与量平均推定値」として試験する度に更新する。最初の反応または無反応の一連を生じる開始用量の選択がわずかなため、平均は基準サンプルのみに制限される（ただし、全動物の結果を最終 LD50 計算の尤度計算に用いる）。n 数幾何平均は n 数の結果であり、1/n 検出力まで上げることに留意する。

投与量平均推定を列 18 に示す（例えば、$175*550*\ldots1750)^{1/8}=1292.78$）。
列 19 には列 18 の対数（Log_{10}）を示す（例えば、Log_{10} 1292.8=3.112）。

D. 概略 LD50 推定尤度

10. LD50 または他のパラメータの推定を、データがどの程度支持するかを示す統計的測定が尤度である。尤度比は LD50 の異なる推定をデータがどの程度支持するかを比較するのに用いる。

11. 縦列 8 には、ステップ C の概略 LD50 推定の尤度を計算する。尤度（列 21）は各動物の尤度貢献の結果である（ガイドライン段落 41 を参照）。i 番目の動物の尤度は L_i で示す。

12. 縦列 7 には投与量 d_i での反応の可能性（P_i で示す）を推定する。P_i は用量反応曲線から算出する。probit 用量反応曲線のパラメータは傾きと LD50 であることに留意すると、これらのパラメータに必要な値である。列 18 の投与量平均推定を LD50 に用いる。本例では傾きにデフォルト 2 を用いる。以下の段階を反応の可能性 P_i の算出に用いる。

1. 投与量 d_i の $\log_{10}$ を算出する（縦列 6）。

2. Z_i で示される各動物の Z スコア（表には示さず）を算出するには以下の式を用いる。

σ =1/傾き
Z_i =($\log_{10}(d_i)$-$\log_{10}$(LD50))/ σ
例えば、最初の動物（列 1）では
σ =1/2
Z_1=(2.243-3.112)/0.500=-1.738

3. i 番目の投与の推定反応可能性は $P_i = F(Z_i)$

F は標準正常分布の累積分布機能（平均 0 と変数 1 の標準分布）を示す。

例えば（列 1）
$P_1=F$(-1.738)=0.0412

機能 F（またはそれに近い）は通常統計表では標準分布として示すが、機能は表計算としても利用可能である。異なる名前、例えば Lotus1-2-3(1)の@NORMAL 機能、エクセル(2)の@NORMDIST 機能で有効である。ソフトウェアで有効な機能を正しく用いることを確認するため、F(1.96)=約 0.975 または F(1.64)=約 0.95 などに近い値を求める。

13. 縦列 8。尤度貢献の自然対数（ln(Li)）を算出する。Li は i 番目の動物で実際に観察された反応可能性である。

反応動物：ln(L_i)=ln(P_i)
無反応動物：ln(L_i)=ln(1-P_i)

自然対数（ln）を用いるか Log_{10}（縦列）を用いる。与えられた条件で通常予測される選択肢を選ぶ。

各動物に手順を実施する。最終的には

列 20：縦列 8 の log 尤度貢献を総計する。
列 21：列 20 の log 尤度に当てはめてた指数関数により尤度を算出する。（例えば、exp(-3.389)=$e^{-3.389}$=0.0337）

E. <u>概略推定の上限下限値の尤度算出</u>

14. データから正確な推定が可能ならば、正当な LD50 推定値の尤度はこの推定値から離れた値の尤度よりも高くなることが予想される。投与量平均推定の尤度（1292.8、列 18）とこの

値を 2.5 の係数で変えた値（1292.8*2.5 または 1292.8/2.5）の尤度を比較する。1292.8 の代わりに LD50 として 517.5（1292.8/2.5）と 3232.0（1292.8*2.5）を用いることを除き、計算（縦列 9～12 に示す）は上述した方法と同様の方法で実施する。尤度と log 尤度を列 20～21 に示す。

F. 尤度比の算出

15. 3 つの尤度（列 21）を 2 つの尤度比を計算するのに用いる（列 22）。尤度比は 1292.8 の推定統計的支持と、他の値 517.1 および 3232.0 とを比較するために用いる。2 つの尤度比は以下のとおりである。

LR1= 1292.8 の尤度/517.1 の尤度=0.0337/0.0080=4.21
および
LR2= 1292.8 の尤度/3232.0 の尤度=0.0337/0.0098=3.44

G. 尤度比が臨界値を超えるか決定する

16. 高い尤度比が LD50 の点推定の支持を示すために用いられる。F で算出した尤度比は、いずれも（4.21 および 3.44）2.5 の臨界尤度比を超えた。したがって LR 中止基準を満たし、試験を中止する。列 24 の TRUE によっても示され、LR 基準に合致することを表計算例の最初に示す。

参考文献

(1) Lotus Development Corporation (1999). Lotus. 1-2-3. Version 9.5, Millenium Edition. Cambridge, MA, USA.

(2) Microsoft Corporation (1985-1997). Microsoft. Excel Version 5.0 or later. Seattle, WA, USA.

3匹（3〜5番目）が2000 mg/kgで生存しているため5番目以降に中止

表 2　2000 mg/kg を用いた中止基準（a）例

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
段階	I 含む E 除く	投与量	X 反応 O 無反応 OK	基準 n を含む	$\log_{10}$ 投与量	LD50=	#DIV/0!	LD50=	#DIV/0!	LD50=	#DIV/0!
						反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）	反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）	反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）
1	I	175	○	no	2.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	○	no	2.7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	2000	○	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	2000	○	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	2000	○	no	3.3010	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	E				-	-	-	-	-	-	-
7	E				-	-	-	-	-	-	-
8	E				-	-	-	-	-	-	-
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-	-	-	-	-	-	-
13	E				-	-	-	-	-	-	-
14	E				-	-	-	-	-	-	-
15	E				-	-	-	-	-	-	-
基準サンプル数= 実際の試験動物数=				0 5							

全ての計算セルを無視する。反応の傾向を示す逆転なし。

最尤法計算は終了できない。LD50は2000 mg/kgよりも大きい。

計算されたLD50の最尤推定＝なし

3匹（4〜6番目）が5000 mg/kgで生存しているため6番目以降に中止

表3　5000 mg/kgを用いた中止基準（a）例

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
段階	I含む E除く	投与量	X反応 O無反応 OK	基準nを含む	$\log_{10}$投与量	LD50=	#DIV/0!	LD50=	#DIV/0!	LD50=	#DIV/0!
						反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）	反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）	反応可能性	尤度貢献（$\ln L_i$）
1	I	175	○	no	2.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	○	no	2.7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	1750	○	no	3.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	5000	○	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	5000	○	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	E	5000	○	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E				-	-	-				
8	E				-	-	-	-	-	-	-
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-	-	-	-	-	-	-
13	E							-	-	-	-
14	E							-	-	-	-
15	E				-	-	-	-	-	-	-
基準サンプル数= 実際の試験動物数=				0 6							

全ての計算セルを無視する。反応の傾向を示す逆転なし。

最尤法計算は終了できない。LD50は5000 mg/kgよりも大きい。

計算されたLD50の最尤推定＝なし

連続する 6 匹で（2〜7 番目）5 の逆転がみられたため 7 番目以降に中止

表 4　中止基準（b）例

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
段階	I 含む E 除く	投与量	X 反応 O 無反応 OK	基準 n を含む	$\log_{10}$ 投与量	LD50=	31.0	LD50=	12.4	LD50=	77.6
						反応可能性	尤度貢献 ($\ln L_i$)	反応可能性	尤度貢献 ($\ln L_i$)	反応可能性	尤度貢献 ($\ln L_i$)
1	I	175	×	no	2.2430	0.9335	-0.0688	0.9892	-0.0108	0.7602	-0.2742
2	I	55	×	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
3	I	17.5	○	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
4	I	55	×	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
5	I	17.5	○	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
6	I	55	×	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607
7	I	17.5	○	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031
8	E				-	-	-	-	-	-	-
9	E				-	-	-	-	-	-	-
10	E				-	-	-	-	-	-	-
11	E				-	-	-	-	-	-	-
12	E				-	-	-	-	-	-	-
13	E				-	-	-	-	-	-	-
14	E				-	-	-	-	-	-	-
15	E				-	-	-	-	-	-	-
基準サンプル数= 実際の試験動物数=				6 7							
投与量平均推定 $\log_{10}$=				31.02 1.492							
Log 尤度合計 尤度 尤度比							-2.2906 0.1012		-3.2021 0.0407 2.4880		-3.4655 0.0313 3.2378
各率は臨界値を超えるか いずれの率も臨界値を超えるか				臨界値=	2.5				FALSE FALSE		TRUE
計算された LD50 最尤推定=					29.6						

自動計算、この例では関連しない

最尤法計算から得た最終推定

LR 基準が最初に合致したら中止、ここでは 9 番目の動物。
6 番目から LR 基準を検討する。

表 5　中止基準（c）例

予測傾き	2	σ =	0.5

収束基準パラメータ	
臨界 LR	2.5
LD50 係数	2.5

結果：LR 基準に合致する

1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
段階	I 含む E 除く	投与量	X 反応 O 無反応 OK	基準 n を含む	$\log_{10}$ 投与量	DAE 貢献	LD50=	1292.8	LD50=	517.1	LD50=	3232.0
							反応可能性	尤度貢献 $(\ln L_i)$	反応可能性	尤度貢献 $(\ln L_i)$	反応可能性	尤度貢献 $(\ln L_i)$
1	I	175	○	no	2.2430	0.0000	0.0412	-0.0421	0.1733	-0.1903	0.0057	-0.0057
2	I	550	○	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
3	I	1750	×	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
4	I	550	○	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
5	I	1750	×	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
6	I	550	○	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
7	I	1750	○	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.9257	0.8552	-1.9323	0.2971	-0.3525
8	I	5000	×	yes	3.6990	3.6990	0.8800	-0.1279	0.9756	-0.0247	0.6477	-0.4344
9	I	1750	×	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
10	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
11	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
12	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
13	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
14	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
15	E				-	0.0000	-	-	-	-	-	-
基準サンプル数=				8								
実際の試験動物数=				9								
投与量平均推定 $\log_{10}$=				1292.78 3.112								
Log 尤度合計								-3.3894		-4.8270		-4.6260
尤度								0.0337		0.0080		0.0098
尤度比										4.2104		3.4436
各率は臨界値を超えるか				臨界値=		2.5				TRUE		TRUE
いずれの率も臨界値を超えるか										TRUE		

表 6　OECD ガイドライン 425 の自動搭載ソフトウェアからの中止基準（c）例



補遺 4

試験を必要とせずに被験物質を推定 LD50 値 2000 mg/kg 超と分類されるための基準

1. 有害性区分 5 の判定基準は化学物質の急性毒性は比較的低いが、ある状況下では高感受性集団に対して危険を及ぼすような物質を識別できるようにすることを目的としている。こうした物質は経口または経皮 LD50 が 2000～5000 mg/kg、また他の経路でも同程度の投与量があると推定されている。被験物質は、以下のような場合に 2000 mg/kg<LD50<5000 mg/kg と定義される有害性区分（GHS 区分 5）に分類される。

   a) LD50 が区分 5 に該当するか、または他の試験やヒトでの毒性からヒトの健康に急性被害を及ぼすことが示されている。

   b) 探索の段階で、データの推定または測定からさらなる危険性が示されず、
      - ヒトでの重大な毒性を示す信頼できる情報があり、または経口投与により区分 4 の数値に至るまで試験したところ、死亡が認められた。
      - 区分 4 の数値に至るまで試験したところ、下痢、立毛、不十分な身づくろいを除く毒性徴候を専門家が認めた。
      - 他の動物試験から、意味のある急性毒性の可能性を示す信頼できる情報があると確認された。

2000 mg/kg 超の投与量での試験

2. 動物愛護の観点から、区分 5 で試験する動物数を減少し、その結果がヒトの健康の保護に直接関連している可能性が非常に高い場合のみに検討されるべきである。