OECD/OCDE

2008/10/03

# 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 (2008), 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-425-2008.pdf.

©OECD (2008)

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

2008 年 10 月 3 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

## 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。上げ下げ法による試験法の概念は、最初に Dixon と Mood により説明された(1)(2)(3)(4)。1985 年、Bruce は化学物質の急性毒性の判定に上げ下げ法（UDP）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、1987 年に ASTM (6)により採択された Bruce の手順に基づいており、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が 1995 年に公表された(7)。Dixon と Mood の初期の論文発表以降、生体計測やその応用に関する文献に引き続き論文が掲載され、本法の最適な使用条件が検討されてきた(8)(9)(10)(11)。1999 年のいくつかの専門家委員会の推奨に基づき、タイムリーな追加改訂が次の 3 つの理由により考慮された。1）化学物質の分類に向けての調和のとれた LD50 カットオフ値について、国際的な合意が既に得られていたこと。2）片性（通常は雌）での試験で一般に十分であると考えられること。3）点推定値を意味のあるものにするには、信頼区間（CI）を推定する必要があること。

2. 本ガイドライン記載の試験法は、化学物質の急性経口毒性の推定に必要な動物数を最小限にする点で有用である。LD50 および信頼区間の推定に加え、本試験は毒性の徴候を観察できる。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 の改訂と同時に行われた。

3. 所定の目的に最も適した試験方法の選択に関するガイダンスは、経口毒性試験のガイダンス文書(12)に記載されている。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関する追加情報も記載されている。

4. 本ガイドラインとの関連で用いられた定義を補遺 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すべての情報を検討する。その情報には、被験物質の同一性および化学構造、その物理化学的特性、被験物質に関するそれ以外の *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類似混合物の毒性学的データ、ならびに被験物質の予測される用途が含まれる。この情報は、ヒトの健康および環境の保護に関し、本試験の妥当性を判断するのに有用であり、また適切な開始用量の選択に役立つ。

6. 本方法は信頼区間を用いて LD50 を推定でき、その結果から、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、物質の等級付けおよび分類を行える。

**© OECD, (2008)**
*出典が正式に言及されている場合、OECD からの事前の同意を求めることなく、この資料を個人的な非営利目的で自由に使用できる。この資料の営利的使用は、OECD の書面による許可を受けること。*

7. LD50 および用量反応曲線の傾きを予備的に推定する情報を入手できない場合、コンピュータシミュレーション結果から、175 mg/kg 付近から開始し用量間に 1/2 log 単位（係数 3.2 の用量進行［dose progression］に相当）を用いると、最良の結果をもたらすことが示唆されている。被験物質の毒性が高いと考えられる場合、この開始用量を変更する。1/2 log 間隔とすることで動物をより効率的に使用でき、LD50 値予測の正確度が高まる。本方法は開始用量に対するバイアスがあるため、初期の投与を推定 LD50 未満にすることが不可欠である（用量の順序および開始時の値の検討については、段落 32 および補遺 2 を参照のこと）。ただし、ばらつきの大きな化学物質（すなわち、用量-反応の傾きが緩やか）では、バイアスが推定致死量になお取り込まれる可能性があり、他の急性毒性試験法と同様に、LD50 の統計学的誤差は大きくなる。これを正すため、主試験には、試験観察結果の固定数よりも推定値の特性を重視した中止ルールが含まれる（段落 33 参照）。

8. 本方法は、1 日か 2 日以内で死亡する物質に最も適用しやすい。大幅な遅延性の死亡（5 日以上）が予測されうる場合、本方法を用いるのは実践的ではないと考えられる。

9. コンピュータを用いて試験の順序を確立し、最終的な推定値を示す個体別算出を容易にする。

10. 腐食作用または重度の刺激作用により、顕著な疼痛や苦痛を生じることが知られている用量では、被験物質を投与する必要はない。瀕死動物や、明らかな疼痛または重度の持続的な苦痛の徴候を示す動物は人道的に屠殺し、試験結果の解釈では、試験での死亡動物と同様にみなすものとする。瀕死動物または重度の苦しみを示す動物を屠殺する判断基準、および予測可能な死亡か差し迫った死亡かの認識に関するガイダンスは、別の OECD ガイダンス文書(13)のテーマとなっている。

11. 限度試験を効率的に用いることで、毒性が低いと考えられる化学物質を同定できる。

## 限度試験の概要

12. 限度試験は、最大 5 匹の動物を用いる逐次試験である。2000 mg/kg か例外的に 5000 mg/kg の試験用量を使用できる。2000 mg/kg と 5000 mg/kg の試験手順は、わずかに異なる（2000 mg/kg での限度試験については段落 23～25、5000 mg/kg での限度試験については段落 26～30 を参照）。逐次試験計画を選択すると、統計学的検出力が増大するが、限界量近くに LD50 を有する化合物の限度試験棄却に向け、本手順にバイアスを意図的にかけてもいる。すなわち、安全性の側面で誤りを犯している。あらゆる限度試験プロトコルと同様に、実際の LD50 がより限界量に近づきほぼ同程度になるにつれ、化合物を正しく分類する確率は低下する。

## 主試験の概要

13. 主試験は、最低 48 時間間隔で 1 匹ずつ動物に投与する、単一の順序での用量進行からなる。最初の動物には、LD50 の最適推定値より 1 段階低い用量を投与する。動物が生存すれば、次の動物の用量を元の用量の（係数）3.2 倍に増加する。死亡すれば、次の動物の用量を同様の用量進行により減少する（注：3.2 は 1/2 log 単位の用量進行に相当するデフォルト係数である。段落 32 に、用量間隔係数の選択に関するさらなるガイダンスを示す）。 各動物を最大 48 時間注意深く観察し、次の動物に投与するか否か、また投与する場合には用量を決定する。その決定は、最大 48 時間後のすべての動物を対象に、その時点での生存パターンに基づいて行う（投与間隔の選択については、段落 31 および 35 を参照）。中止基準の組み合わせを用い、開始時の値が適さないか傾きが小さいことによる影響を軽減するため、投与パターンを調整しながら少ない

動物数を維持する（段落 34 参照）。中止基準の 1 つを満たした場合には投与を中止し（段落 33 および 41 参照）、その時点で、終了時のすべての動物の状況に基づき、本試験での推定 LD50 および信頼区間を算出する。ほとんどの適用時には、動物の転帰に最初に逆転（reversal）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. 主試験での手順の結果は、実行可能な場合、信頼区間推定値を示すコンピュータ手順の出発点として機能する。本信頼区間の根拠の説明については、段落 45 に概説する。

## 試験方法

### 動物種の選択

15. 好ましいげっ歯類の種はラットであるが、他のげっ歯類を用いてもよい。通常雌ラットを用いる(12)。雌を用いる理由は、従来の LD50 試験に関する文献調査では通常感受性にほとんど性差がないものの、性差を認める場合、雌の方が一般にわずかに感受性が高いと示されているためである(7)。ただし、構造的に関連する化学物質の毒性やトキシコキネティクスの特性に関する知見から、雄の方が感受性が高い可能性を示す場合には雄を用いる。雄で試験を実施する場合は、適切な正当性を示す。

16. 一般に用いられている実験室系統の健康な若齢成熟動物を使用する。雌は未経産で非妊娠のものとする。投与開始時、各動物は 8～12 週齢とし、体重は、先に投与した動物の初回平均体重の±20%以内の間隔とする。

### 飼育および給餌条件

17. 実験での動物飼育室の温度は 22 ± 3°C とする。相対湿度は、飼育室清掃時を除き 30%以上、70%以下が望ましいが、目標値を 50～60%とする。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。動物は個別に飼育する。給餌には、通常のげっ歯類用実験室飼料を用いてよい。飲水の摂取は制限しない。

### 動物の準備

18. 動物を無作為に選択し、個体識別ができるようにマークを付け、投与前に 5 日間以上ケージで飼育し実験室の条件に馴化可能にする。他の逐次試験デザインと同様に、試験全体で適切な大きさと年齢範囲の動物の入手を確保するよう、注意しなければならない。

### 用量の調製

19. 一般に、被験物質については、検討する用量の範囲で投与液の濃度を変えることにより、一定の容量で投与する。ただし、液体の最終製品または混合物を検討する場合、未希釈の被験物質、すなわち一定濃度で用いる方が、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の要件になっている。いずれの場合も、最大容量を超えた投与をしないこと。1 回に投与可能な液体の最大容量は、被験動物の大きさにより異なる。げっ歯類では、容量は通常 1 mL/100 g 体重を超えるべきでないが、水溶液の場合 2 mL/100 g 体重を考慮できる。投与液の調剤に関しては、可能な限り、水溶液／水性懸濁液／水性乳剤を使用し、次に油性（コーン油など）の溶液／懸濁液／乳剤を優先し、その後に、可能性として他の溶媒の溶液とすることが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性学的特性を明らかにする。


© OECD, (2008)

投与液の使用予定期間中の安定性が既知で、許容可能であることが示されない限り、用量の調製は投与直前に行わなければならない。

手順

用量の投与

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強制経口投与する。単回投与が不可能な例外的な状況では、24 時間以内の期間に、用量を少量ずつ分割投与できる。

21. 投与前に動物を絶食させる（例えば、ラットでは一晩水は与えるが食餌を与えず、マウスでは 3～4 時間水は与えるが食餌を与えない）。絶食期間後に動物の体重を測定し、被験物質を投与する。各動物の絶食時体重を測定し、体重に従って用量を算出する。被験物質投与後、ラットではさらに 3～4 時間、マウスでは 1～2 時間、食餌を控えることができる。ある用量を一定時間に分割投与する場合には、その時間の長さに応じて動物に食餌と水を与える必要が生じうる。

限度試験および主試験

22. 限度試験は、被験物質が無毒性である可能性があること、すなわち、規制上の限界量未満の毒性であることを示す情報を実験者が得ている場合に主に用いられる。被験物質の毒性に関する情報は、毒性学的重要性があると知られている成分の同一性および割合を考慮し、類似の被験化合物または類似の被験混合物もしくは被験製品に関する知識から得ることができる。その毒性に関する情報がほとんどないか全くない場合、または被験物質に毒性があると予測される場合には、主試験を実施する。

限度試験

**2000 mg/kg での限度試験**

23. 1 匹に試験用量を投与する。動物が死亡した場合、LD50 決定のため主試験を実施する。動物が生存している場合、さらに 4 匹に順次投与し、合計 5 匹で検討する。ただし、3 匹が死亡した場合、限度試験を終了し主試験を実施する。3 匹以上が生存している場合、LD50 は 2000 mg/kg 超とする。本試験の後期に 1 匹が予想外に死亡し他の動物が生存している場合は、投与を中止し、同様の観察期間中に他の動物も死亡するか調べるため、すべての動物を観察することが適切である（初期観察期間については段落 31 を参照）。後期の死亡は、他の死亡と同様に計数する。結果を以下のとおり評価する（O = 生存、X = 死亡）。

24. 3 匹以上が死亡した場合、LD50 は試験用量（2000 mg/kg）未満とする。

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

3 匹目が死亡した場合、主試験を実施する。

25. 5 匹検討する。3 匹以上が生存している場合、LD50 は試験用量（2000 mg/kg）超とする。

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により正当化される場合に限り、用量 5000 mg/kg の使用を考慮できる（補遺 4 参照）。動物愛護に関する懸念を理由に、GHS 区分 5 の範囲（2000～5000 mg/kg）での動物試験は抑制され、その試験結果が、ヒトや動物の健康または環境の保護に直接関連しているという可能性が高い場合にのみ考慮すべきである。

27. 1 匹に試験用量を投与する。動物が死亡した場合、LD50 決定のため主試験を実施する。動物が生存している場合、さらに 2 匹に投与する。両動物が生存している場合、LD50 は限界量超とし本試験を終了する（すなわち、追加の動物に投与せず、14 日間の十分な観察に移行する）。

28. 1 匹または両動物とも死亡した場合、さらに 2 匹を追加し 1 匹ずつ投与する。本試験の後期に 1 匹が予想外に死亡し他の動物が生存している場合は、投与を中止し、同様の観察期間中に他の動物も死亡するか調べるため、すべての動物を観察することが適切である（初期観察期間については段落 10 を参照）。後期の死亡は、他の死亡と同様に計数する。結果を以下のとおり評価する（O = 生存、X = 死亡、U = 不要）。

29. 3 匹以上が死亡した場合、LD50 は試験用量（5000 mg/kg）未満とする。

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

30. 3 匹以上が生存している場合、LD50 は試験用量（5000 mg/kg）超とする。

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


© OECD, (2008)

主試験

31. 通常、1匹に48時間間隔で順次投与する。ただし、投与間隔は毒性徴候の発現、持続期間、重症度により決定する。次の用量を動物に投与するのは、先に投与した動物の生存を確信するまで延期する。時間間隔は、反応が不確定な場合など、必要に応じ調整できる。本試験の実施は、逐次投与の意思決定に単一の時間間隔を用いると、より簡単になる。それでも、試験の中間で時間間隔を変更した場合、投与量または尤度比を算出し直す必要はない。開始用量の選択については、構造的に関連する物質の情報や被験物質の他の毒性試験結果を含め、入手可能なすべての情報を用い、LD50および用量反応曲線の傾きを概算する。

32. 1匹目の動物には、LD50の予備的な最適推定値より1段階低い用量を投与する。動物が生存している場合、より高用量を2匹目に投与する。1匹目が死亡したか瀕死状態にみえる場合、2匹目にはより低用量を投与する。用量進行係数（dose progression factor）は、真数1/（用量反応曲線の傾きの推定値）となるよう選択し、試験全体を通じ一定に維持する（用量進行3.2倍は傾き2に相当）。検討対象の被験物質の傾きに関する情報がない場合は、用量進行係数3.2を用いる。デフォルトの進行係数を用いると、用量は1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000（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）の順序から選択されることが考えられる。被験物質の推定致死量を入手できない場合、175 mg/kgで投与を開始する。ほとんどの場合この用量は致死量以下に当たるため、疼痛および苦しみのレベルの軽減に役立つ。被験化学物質に対する動物の忍容性に大きなばらつきが予測される（すなわち、傾きが2.0未満であると予測される）場合、本試験開始前に対数用量尺度上のデフォルト値0.5（すなわち進行係数3.2）を超える用量進行係数の増加を考慮する。同様に、きわめて急な傾きであることが既知の被験物質の場合、デフォルト値未満の用量進行係数を選択する（開始用量175 mg/kgでの範囲1〜8の整数の傾きについて、用量進行の表を補遺2に示す）。

33. すべての動物について、その時点までの固定時間間隔（例えば48時間）での転帰に応じ投与を継続する。以下の中止基準の1つを最初に満たした項目がある場合、試験を中止する。

(a) 連続する3匹の動物が上限量で生存している。
(b) 検討対象の連続6匹の動物中5匹に逆転が生じている。
(c) 最初の逆転後4匹以上の動物が続き、特定の尤度比が臨界値を超えている（段落44および補遺3参照。最初の逆転から4匹目に投与後、投与ごとに算出する）。

LD50と傾きの組み合わせは様々であるため、中止ルール(c)は、試験での逆転後4〜6匹で満たされることになる。用量反応曲線の傾きが緩やかな化学物質の一部の例では、追加の動物（試験は合計15匹を限度）が必要となりうる。

34. 中止基準に達した場合、段落40および41記載の方法を用い、試験終了時の動物の転帰から推定LD50を算出する。

35. 人道的理由で屠殺された瀕死動物は、試験中に死亡した動物と同様にみなされる。本試験の後期に1匹が予想外に死亡し、その用量以上で他の動物が生存している場合は、投与を中止し、同様の観察期間中に他の動物も死亡するか調べるため、すべての動物を観察することが適切である。その後の生存動物も死亡し、かつ、すべての投与量がLD50を超えているように思われる場合、開始用量がLD50未満であると本方法は最も正確であるため、死亡時の最低用量より2段階以上低い用量を起点に試験の再開（および観察期間の延長）を行うのが最も適切であると考えられる。その後の動物が死亡動物の用量以上で生存している場合、現在死亡している動物の情報がその後の生存動物より低用量での死亡として算出に組み入れられ、LD50 を引き下げるため、

用量進行を変更する必要はない。

観察

36. 動物は投与後最初の 30 分間に少なくとも 1 回、最初の 24 時間には定期的に（最初の 4 時間は特に注意深く）、その後は 1 日 1 回、合計 14 日間個体別に観察するが、動物愛護の理由により動物を試験から除外し人道的に屠殺する必要があるか、または死亡しているのを発見した場合は除く。一方、観察期間は厳格に固定すべきでない。毒性反応および発現時期、ならびに回復期間の長さにより判断すべきであるため、必要と考えられる場合には延長できる。毒性徴候の発現時期と消失時期は、特に毒性徴候が遅延して発現する傾向にある場合は重要である(17)。各動物について個体別の記録を残すとともに、すべての観察結果を体系的に記録する。

37. 動物が引き続き毒性徴候を示す場合、追加の観察が必要であると考えられる。観察には皮膚および被毛、眼および粘膜に加え、呼吸器系、循環器系、自律神経系および中枢神経系、ならびに体性運動活動および行動パターンの変化も含める。振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠、昏睡の観察に注意を向ける。人道的エンドポイントに関するガイダンス文書(13)に要約されている原則および基準を考慮する。瀕死状態で発見された動物、および重度の疼痛または重度の苦痛の持続的な徴候を示している動物は、人道的に屠殺する。動物が人道的な理由で屠殺された場合、または死亡した状態で発見された場合には、死亡時刻を可能な限り精密に記録する。

体重

38. 動物の個体ごとの体重を、被験物質投与直前とその後少なくとも週 1 回測定する。体重変化を算出し記録する。本試験終了時に生存動物の体重を測定後、人道的に屠殺する。

病理学的検査

39. すべての動物（試験中死亡した動物または動物愛護の理由で本試験から除外された動物を含む）について、肉眼的剖検を行う。各動物について、すべての肉眼的病変を記録する。顕微鏡検査から有用な情報が得られることがあるため、初回投与後 24 時間以上生存した動物を対象に、肉眼的な病理学的検査の証拠を示す臓器の顕微鏡検査を検討することもできる。

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。さらに、すべてのデータを表形式に要約し、試験用量ごとに、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か人道的理由のため屠殺された動物数、動物の個体別死亡時期、毒性作用および可逆性の記述および時間的経過、ならびに剖検所見を示す。開始用量および用量進行の根拠、ならびにこの選択の裏付けに用いたデータを示す。


© OECD, (2008)

主試験での **LD50** 算出

41. LD50 は、段落 42 記載の例外的ケースを除き、最尤法(14)(15)を用いて算出する。以下の統計学に関する詳細は、提唱される最尤法での算出（および推定 σ）を実行する際に有用であると考えられる。即時の死亡、遅延性の死亡、人道的屠殺のいずれであっても、すべての死亡を最尤法解析の目的で組み入れる。Dixon (4)に従うと、尤度関数は以下のとおり記述される。

$L = L_1 L_2 ....L_n$

ここで
$L$ は、μ、σ、検討した動物の総数 n を所与とした場合の実験での転帰の尤度である。

i 番目の動物が生存している場合 $L_i = 1 - F(Z_i)$、または
i 番目の動物が死亡した場合 $L_i = F(Z_i)$

ここで
$F$ = 累積標準正規分布
$Z_i = [\log(d_i) - \mu] / \sigma$
$d_i$ = i 番目の動物に投与された用量、および
σ = 用量の対数単位での標準偏差（対数標準偏差ではない）

真の LD50 の推定値は、尤度 L を最大化する μ の値により与えられる（段落 43 参照）。

より優れた一般的な値も事例固有の値も入手できない場合、σ の推定値には 0.5 を用いる。

42. 状況によっては、統計学的算出が不可能か、誤った結果を示す可能性があると考えられる。こうした状況では、以下のとおり、推定 LD50 を決定／報告する特別な手段を利用できる。

(a) 段落 33 の基準(a)（すなわち、上限量を繰り返し検討）に基づき試験を中止した場合、または、上限量で試験を終了した場合、LD50 は上限量を超えると報告される。この基準で分類が終了する。

(b) すべての死亡動物がすべての生存動物よりも高用量であった場合（または、事実上可能性は低いが、すべての生存動物がすべての死亡動物よりも高用量であった場合）、LD50 は生存動物と死亡動物の用量の間にある。これらの観察結果は、LD50 の正確な値についてさらなる情報を示さない。それでも、σ の値が存在すれば、最尤法での LD50 推定値を得ることができる。段落 33 の中止基準(b)は、そうした状況を説明している。

(c) 生存動物と死亡動物に共通する用量が 1 つのみあり、その他すべての死亡動物ではこれより高用量、かつその他すべての生存動物ではこれより低用量である場合、またはその逆の場合、LD50 は共通するその用量に等しい。類縁物質を検討する場合、試験はより少ない用量進行により続行する。

上記の状況のいずれにも該当しない場合、LD50 は最尤法を用いて算出される。

43. 最尤法の算出は、参考文献 3 の付録 1D 記載の SAS (14)（例えば PROC NLIN）か BMDP (15)（例えばプログラム AR）いずれかのコンピュータプログラムパッケージを用いると

実施できる。他のコンピュータプログラムを用いてもよい。これらのパッケージに関する典型的な指示は、ASTM 規格 E 1163-87(6)の付録に示されている（(6)の BASIC プログラムで用いられるσは、本 OECD 試験ガイドライン 425 のパラメータを反映するには、編集を要すると考えられる）。プログラムのアウトプットは、log(LD50)の推定値およびその標準誤差である。

44. 段落 33 の尤度比による中止ルール(c)は、μが様々な値を伴う段落 41 の尤度の形式からなる、試験進行の 3 つの基準に基づいている。段落 33 の基準(a)も(b)も既に満たさない、6 匹目より後の各動物を検討してから比較する。この尤度比の基準に関する等式を補遺 3 に示す。これらの比較は自動化された方法での実施が最も容易で、例えば補遺 3 にも示したものなど、表計算ソフトのルーチンにより繰り返し実行できる。この基準が満たされた場合、試験を中止し、LD50 を最尤法により算出できる。

信頼区間の算出

45. 主試験および推定 LD50 の算出後、LD50 の区間推定を算出可能と考えられる。こうした信頼区間はいずれも、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。信頼区間が広ければ、推定 LD50 に関連する不確実性はより高いことを示す。推定 LD50 の信頼性が低くなり、推定 LD50 の有用性は限界となりうる。信頼区間が狭ければ、推定 LD50 に関連する不確実性は比較的低いことを示す。推定 LD50 の信頼性が高くなり、推定 LD50 の有用性は良好となる。このことは、主試験を繰り返した場合、新たな推定 LD50 が元の推定 LD50 に近似するはずであり、これらの推定値のいずれも真の LD50 に近似するはずであることを意味する。

46. 主試験の転帰に応じ、真の LD50 について 2 種類ある区間推定の 1 つを算出する。

- 3 種類以上の用量を検討し、中間の用量で動物が少なくとも 1 匹生存し 1 匹死亡した場合、プロファイル尤度に基づく算出手順を用い、その時点の真の LD50 を 95%含むと予測される信頼区間を得る。ただし、用いる動物数が少ないと予測されることから、実際の信頼水準は概して正確ではない(18)。ランダムな中止ルールにより、根底にある条件のばらつきに対応する試験全体の能力は向上するが、報告された信頼水準と実際の信頼水準とが若干異なる原因にもなる(19)。

- 所定の投与量以下ですべての動物が生存し、その次のより高い投与量で投与されるとすべての動物が死亡した場合、すべての動物が生存した最大の検討用量を下限とし、すべての動物が死亡した投与量を上限とする区間を算出する。この区間は「近似値」として表示される。 この区間に関連する正確な信頼水準は、具体的に決定できない。ただし、この種の反応は用量反応が急な場合にのみ生じると考えられるため、ほとんどの場合、真の LD50 は算出された区間内におさまるか、その区間にきわめて近似すると予測される。この区間は比較的狭く、最も実践的な使用に十分な正確度であると考えられる。

47. 一部の例では信頼区間は無限大と報告され、その場合、下限として 0 か上限として無限大のいずれか、またはその両方となる。こうした区間は、例えば、すべての動物が死亡したか、すべての動物が生存した場合に生じうる。この一連の手順を実行するには、米国環境保護庁（USEPA）または OECD から入手可能な専用プログラムを用いるか、USEPA または OECD から入手可能な技術的詳細に従って開発されたか、いずれかの特殊な算出を必要とする(20)。これらの区間の達成範囲および専用プログラムの特性は、こちらも USEPA を通じ入手可能な報告書(21)に記載されている。


© OECD, (2008)

**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、および関連する場合は物理化学的特性（異性化を含む）
- CAS 番号を含む識別データ。

溶媒（該当する場合）：

- 水以外の場合、溶媒選択の正当性。

被験動物：

- 使用した動物種／系統
- 判明している場合、動物の微生物学的状況
- 動物の数、週齢、性別（該当する場合、雌ではなく雄を用いる根拠を含む）
- 供給元、飼育条件、飼料など。

試験条件：

- 開始時の投与量選択、用量進行係数、追跡時の投与量の根拠
- 投与した物質の物理学的形状の詳細を含む被験物質の剤形の詳細
- 投与容量および投与期間を含む被験物質投与の詳細
- 食餌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／体重の変化
- 各動物（すなわち、性質、重症度、影響期間、死亡などの毒性徴候を示した動物）の反応データおよび投与量の表
- 投与日、その後週 1 回の間隔、および死亡時または屠殺時の動物の個体別体重
- 毒性徴候発現の時間的経過、および各動物におけるこれらの徴候に関する可逆性の有無
- 入手可能な場合、各動物の剖検所見および病理組織学的所見
- LD50 データ
- 結果の統計処理（用いたコンピュータルーチンおよび表計算ソフトの算出表に関する説明）。

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 up-and-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.


© OECD, (2008)

(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：ある物質を単回経口投与後、または 24 時間以内に複数回投与後に生じる有害な影響。

遅延性の死亡：動物が 48 時間以内に死亡しないか瀕死状態にみえるが、その後 14 日間の観察期間中に死亡すること。

用量：投与される被験物質の量。用量は、重量（g、mg）または被験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（例えば mg/kg）で表す。

用量進行係数（dose progression factor）：時に用量間隔係数（dose spacing factor）とも呼ばれ、動物が生存している場合の用量増加の倍数（すなわち用量進行）、または動物が死亡した場合の用量減少の除数をいう。用量進行係数は、真数 1/（用量反応曲線の傾きの推定値）とすることが推奨される。用量進行係数のデフォルト値は 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家委員会（物理化学的性質）、国際労働機関（ILO、危険有害性周知）の共同活動であり、化学物質の適正管理のための国際機関間プログラム（IOMC）により調整されている。

差し迫った死亡：次に予定された観察時間より前に、瀕死状態か死亡が予測されること。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と考えられる（詳細については、人道的エンドポイントに関するガイダンス文書(13)を参照）。

LD50（経口半数致死量）：経口経路により投与された場合に、動物の 50%に死亡を生じると予測可能な物質について統計学的に導き出された単回用量。LD50 値は、被験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kg）で表す。

限界量：試験における上限の用量（2000 または 5000 mg/kg）。

瀕死状態：治療しても死亡しつつあるか生存不能な状態にあること（詳細については、人道的エンドポイントに関するガイダンス文書(13)を参照）。

名目上のサンプルサイズ：一連の試験開始時に同様の反応の数から 1 を減じるか、または、逆転を生じるペアまで（ただし最初の逆転を生じたペアは含まない）の被験動物数を減じた被験動物総数。例えば、X と O が動物の反対の転帰（例えば、X は「48 時間以内に死亡」、O は「生存」と考えた場合）を OOOXXOXO のパターンで示す一連の試験の場合、被験動物総数（すなわち、従来の意味でのサンプルサイズ）は 8 匹であるが、名目上のサンプルサイズは 6 匹である。この特殊な例では、逆転に従った動物が 4 匹であることを示す。ガイドラインの特定の部分での計数が、名目上のサンプルサイズか被験動物総数か、いずれに言及しているか留意されたい。例えば、実際の最大被験動物数を 15 匹とする。試験をこの最大数に基づいて中止した場合、名目上のサンプルサイズは 15 匹以下である。名目上のサンプルのメンバーは、（r-1）番目の動物（逆転を生じたペアのうち 2 番目の 1 つ前の動物）から開始する（以下の逆転を参照）。


© OECD, (2008)

予測可能な死亡：計画された実験終了前の今後の既知時点で、例えば、水や食餌に到達できないなど、死亡を示唆する臨床徴候を呈すること（詳細については、人道的エンドポイントに関するガイダンス文書(13)を参照）。

プロビット：「確率積分変換（probability integral transformation）」という用語の略語で、プロビットによる用量反応モデルでは、用量（通常は対数尺度）について、予測される反応の標準正規分布（すなわち、平均値を中心とし標準偏差 σ を尺度とする分布）を解析でき、σ の逆数の傾きを持つ直線であるかのように解析する。致死量の標準正規分布は左右対称であるため、その平均値は、真の LD50 または反応の中央値でもある。

逆転（reversal）：ある用量では無反応と認められ、その次の試験用量では反応が認められる状況、またはその逆の状況（すなわち、反応を認めた後に無反応となる）。したがって、逆転は複数の反応のペアからなる。最初にこうしたペアが生じるのは、r-1 番目と r 番目の動物である。

σ：（被験化学物質の用量が被験対象の耐性を超えても、被験対象が反応可能と予測される場合、）被験化学物質に対する被験対象の耐性の範囲を示した、対数正規曲線の標準偏差。推定 σ は、すべての用量範囲に対する被験動物間のばらつきの推定値を示す。
傾きおよびプロビットの項を参照。

（用量反応曲線の）傾き：用量反応曲線が用量の軸から上昇する角度との関係を示す値。プロビットでの解析の場合、対数尺度の用量に対しプロビット尺度で反応を解析すると、この曲線は直線になると考えられ、その傾きは、被験対象の根底にある耐性（正規分布を想定）の標準偏差 σ の逆数となる。プロビットおよび σ の項を参照。

中止ルール：本ガイドラインでは、1）具体的な中止基準、および 2）試験手順終了時に判定するすべての基準の収集結果と同じ意味で用いる。特に、主試験では、臨界値に対する比の比較に依拠する基準の簡略化法として、中止ルールが段落 7 で用いられる。

## 補遺 2

## 投与手順

主試験での用量の順序

1. 上げ下げ法での投与手順：実施ごとに、通常 48 時間間隔で 1 匹ずつ動物に投与する。最初の動物には、LD50 の最適推定値より 1 段階低い用量を投与する。この選択は、最終的な推定の際、初回開始用量**の方向に LD50 から離れる**バイアス傾向の調整を反映している（本ガイドラインの段落 7 参照）。投与がその後の動物ごとに調整されることから、転帰のパターン全体は安定すると予測される。以下の段落 3 には、用量間隔係数の選択についてさらなるガイダンスを示す。

2. デフォルト値での用量進行：開始用量と用量間隔を決定したら、毒性学者は上限（通常 2000 または 5000 mg/kg）を含む考えられるすべての用量をリストにする。上限に近い用量は進行から除外する。TG425 のデザインの段階的な性質により、最初の一部用量については自動調整順として機能できる。正のバイアス傾向のため、被験物質について不明の場合、開始用量 175 mg/kg が推奨される。デフォルト値での手順を主試験に用いることになる場合、投与は 175 mg/kg から開始し、用量は対数用量尺度で 0.5 倍間隔とする。用いる用量は、1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000、または、特定の規制上の必要性がある場合、1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750、5000 である。毒性が高い特定の物質については、投与順序をより低い値に拡大する必要があると考えられる。

3. デフォルト値以外の用量進行係数が適切とみなされる場合、1 から 8 まで傾きの整数倍の用量進行について表 1 に示す。


© OECD, (2008)

**表 1　OECD 試験ガイドライン 425 の用量進行**
**傾きを選択し列を読む**
**用量の単位はすべて 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 |

*より低い用量が必要な場合、より低い用量への進行を継続する


© OECD, (2008)

## 補遺 3

### 尤度比による中止ルールの算出

1. 本ガイドラインの段落 33 に記載のとおり、3 つの中止基準の最初の該当項目に基づいて、主試験を終了できる。いずれの場合も、中止基準を 1 つも満たさなくても、15 匹に投与したら投与を中止することが考えられる。表 2～5 には、情報なしで試験を開始した場合について例示しているため、推奨される開始時のデフォルト値 175 mg/kg、および推奨される用量進行係数のデフォルト値 3.2 すなわち 1/2 log が用いられている。これらの表のフォーマットは、説明用にすぎないことに留意されたい。

2. 3 匹の動物が 2000 mg/kg の限界量で生存している場合の主試験の中止方法について、表 2 に示す。同様の状況で、限界量 5000 mg/kg を用いた場合について、表 3 に示す（これらは、限度試験が事前に適切でなかったと考えられる状況を示している）。 被験動物 6 匹中 5 匹の逆転という特殊な順序がどのように生じ、また試験を終了可能としうるかについて、表 4 に示す。最後に、基準(a)と基準(b)のいずれも満たさず、反応の逆転を生じた後に被験動物 4 匹が続き、その結果、基準(c)も評価しなければならない状況について、表 5 に示す。

3. 基準(c)は、各動物の検討について、逆転後 4 匹目の検討開始後に評価される尤度比による中止ルールに関する要求事項である。「試験進捗に関する測定値」を 3 つ算出する。技術的には、進捗に関するこれらの測定値は、LD50 の最尤推定法で推奨されている尤度である。この手順は、尤度に基づく手順による信頼区間の算出と密接に関連している。

4. この手順の基盤となっているのは、十分なデータが収集されている場合、尤度を用いた統計学的裏付けが定量化されていれば、LD50 の点推定値はその点推定値の上下の値より強く裏付けられるはずであるということである。したがって、算出される 3 つの尤度値は、LD50 点推定値での尤度（今回の例では、概算推定値または用量平均化による推定値と呼ばれる）、点推定値を下回る値での尤度、点推定値を上回る値での尤度とする。具体的には、下回る値は点推定値を 2.5 で除して求め、上回る値は点推定値に 2.5 を乗じて得る。

5. 尤度比を算出後、これらの尤度比（LR）が臨界値を超えるか否かを判定することにより、尤度値を比較する。この点推定値の尤度比が他方の各尤度の 2.5 倍を超える場合、このことから、この点推定値について比較的強力な統計学的裏付けを示すことが導かれ、試験を中止する。したがって、この点推定値と 2.5 で除した点推定値の尤度比（LR）、および、この点推定値と 2.5 倍した点推定値の尤度比の 2 種類の尤度比を算出する。

6. 単独での LD50 算出については、正規確率関数により、いずれの表計算ソフトでも実施は容易である。その算出結果をこの補遺 3 の表 5（表計算ソフトの実行結果を再現した構成）に示す。算出ステップについては、上限用量が 5000 mg/kg の例を用いて示すが、この算出ステップは、上限の限界用量が 2000 mg/kg の場合と同じ方法で実施される。別の方法として、動物のデータ入力欄があり、LD50 推定と信頼区間算出に必要な式が組み込まれた内蔵型ソフトウェアを、OECD および USEPA のウェブサイトから直接ダウンロードできる。このソフトウェアの画面イメージを表 6 に示す。

上限用量 5000 mg/kg を用いた仮説に基づく例（表 5）

7. 上限の限界用量 5000 mg/kg を用いた仮説に基づく例では、動物 9 匹の検討後 LR による中止基準を満たした。最初の「逆転」は 3 匹目の被験動物で生じた。LR による中止基準は、逆転後 4 匹を検討したときに確認する。この例では、逆転後 4 匹目の被験動物は、実際の被験動物の 7 匹目に当たる。したがって、この例では、7 匹目の動物が検討済みでデータをその時点で入力できた後、表計算ソフトによる算出のみ必要である。その後、7、8、9 匹目を検討後、LR による中止基準が確認されたと考えられる。この例で LR による中止基準が最初に満たされるのは、9 匹目の検討後である。

A. 動物別の用量反応情報を入力。

列 1： ステップに 1～15 の番号が付いている。15 匹以下の動物を検討できる。
列 2： 各動物を検討するとき、この列に I を入力する。
列 3： i 番目の動物に投与した用量を入力する。
列 4： 動物が反応したか（X で提示）、反応しなかったか（O で提示）を示す。

B. 名目上および実際のサンプルサイズ。

8. 名目上のサンプルは、最初の逆転を示した 2 匹の動物（ここでは 2 匹目と 3 匹目）と、その後のすべての被験動物からなる。ここで列 5 は、所定の動物が名目上のサンプルに含まれるか否かを示す。

名目上のサンプルサイズ（名目 *n*）は、行 16 に現れる。これは、名目上のサンプルにおける動物数で、この例の名目 *n* は 8 である。
実際の被験数は、行 17 に現れる。

C. LD50 の概算推定値。

9. 現在の名目上のサンプルにおける動物の用量の幾何平均値を、LD50 の進捗測定の概算推定値として用いる。この表では、これを「用量平均化による推定値（DAE）」と呼び、 被験動物ごとに更新する。初期に一連の反応か初期に一連の無反応のいずれかを生じうる、初期試験用量に適さない選択を考慮するため、この平均値は名目上のサンプルに限定される（ただし、その下の最終的な LD50 算出に向けた尤度の算出には、すべての動物の結果を用いる）。 *n* 個の数の幾何平均値はこの *n* 個の数の積であり、指数 1/*n* に合わせて上昇することを想起されたい。

用量平均化による推定値は行 18 に現れる（例えば、$(175 * 550 * \ldots * 1750)^{1/8} = 1292.78$）。
行 19 は、行 18 の値の対数（底：10）を示す（例えば、$\log_{10} 1292.8 = 3.112$）。

D. LD50 の概算推定値の尤度。

10. 尤度とは、データが LD50 または他のパラメータの推定値を、どの程度強く裏付けるかを示す統計学的尺度である。尤度比の値は、データが LD50 の様々な推定値を、どれほど十分に裏付けるかの比較に用いることができる。

11. 列 8 では、ステップ C の LD50 の概算推定値の尤度を算出する。尤度（行 21）は個別の動物に関する尤度への寄与の積である（本ガイドライン段落 41 参照）。i 番目の動物の尤度への寄与は $L_i$ で示す。


© OECD, (2008)

12. 列 7 には、用量 $d_i$ での反応の確率の推定値（$P_i$ で示す）を入力する。$P_i$ は用量反応曲線から算出する。プロビットでの用量反応曲線のパラメータは傾きと LD50 であるため、これらのパラメータのそれぞれに値が必要であることに留意されたい。LD50 については、行 18 の用量平均化による推定値を用いる。この例の傾きには、デフォルト値である 2 を用いている。以下のステップを用いると、反応の確率 $P_i$ を算出できる。

1. 用量 $d_i$ の底 10 の log を算出する（列 6）。

2. 各動物について、次の式を用いて、$Z_i$ で示される z スコア（この表には示されていない）を算出する。
   $\sigma = 1 /$ *傾き*
   $Z_i = ( \log_{10}( d_i ) - \log_{10}( LD50 ) ) / \sigma$

   例えば、最初の動物（行 1）では、
   $\sigma = 1 / 2$
   $Z_1 = ( 2.243 - 3.112 ) / 0.500 = -1.738$

3. i 番目の用量では、推定での反応の確率は以下のとおりである
   $P_i = F( Z_i )$

ここで、$F$ は標準正規分布（すなわち、平均 0 および分散 1 の正規分布）の累積分布関数を示す。

例えば（行 1）、

$$P_1 = F( -1.738 ) = 0.0412$$

関数 $F$（またはそれにきわめて近いもの）は通常、統計表の正規分布に与えられるが、この関数は、表計算ソフトの関数としても広く使用可能である。この関数は名称が異なっても、例えば、Lotus1-2-3 の@NORMAL 関数(1)、Excel の@NORMDIST 関数(2)において使用可能である。ソフトウェアで使用可能な関数を正しく用いたことを確認するには、$F(1.96) \approx 0.975$ または $F(1.64) \approx 0.95$ など周知の値を検証するのが望ましいと考えられる。

13. 列 8：尤度への寄与の自然対数（$\ln( L_i )$）を算出する。$L_i$ は、単に i 番目の動物で実際に観察された反応の確率である。

反応した動物：$\ln( L_i ) = \ln( P_i )$
無反応の動物：$\ln( L_i ) = \ln( 1 - P_i )$

ここでは自然対数（ln）を用いているが、別の箇所では、底 10 の（常用）対数が用いられたことに留意されたい。こうした選択は、所与の条件下で通常予測されることである。

上記ステップを各動物について実施する。最終的には以下のとおりである。

行 20：列 8 の対数で示した尤度への寄与を合計。
行 21：行 20 の対数尤度値に当てはめた exp 関数を適用して、尤度を算出
（例えば、$\exp(-3.389) = e^{-3.389} = 0.0337$）。

E. <u>概算推定値の上下 2 つの用量の値について、尤度を算出。</u>

14. データから正確な推定が可能な場合、その推定値が LD50 の合理的な推定値であれば、この推定値から離れた値の尤度に比べ、尤度は高いはずであると予測される。用量平均化による推定値（1292.8、行 18）の尤度を、この値と 2.5 倍異なる値（すなわち、1292.8*2.5 および 1292.8/2.5）と比較する。算出（列 9～12 に表示）は、LD50 に 1292.8 ではなく 517.1（= 1292.8/2.5）および 3232.0（= 1292.8*2.5）という値を用いたことを除き、上述の方法と同様に実施する。尤度および対数尤度値が行 20～21 に表示される。

F. 尤度比を算出。

15. 3 つの尤度値（行 21）を用い、2 つの尤度比（行 22）を算出する。尤度比を用いて、1292.8 という推定値の統計的裏付けと、別の値である 517.1 および 3232.0 のそれぞれの裏付けとを比較する。したがって、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の判定。

16. 高い尤度比は、LD50 の点推定値の裏付けが比較的高いことを示すと導かれる。ステップ F で算出した尤度比（4.21 および 3.44）は、いずれも臨界尤度比である 2.5 を超えている。したがって、LR による中止基準を満たし、試験を中止する。このことは、行 24 の「真」の表示、および、「LR による中止基準を満たす」という表計算ソフトの例の上段の注記により示される。

## 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.


© OECD, (2008)

表 2. 2000 mg/kg を用いた場合の中止基準(a)の例。

3 匹の動物（3〜5 匹目）が 2000 mg/kg の限度で生存しているため、5 匹目より後は中止する。

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ステップ | I：組み入れ<br>E：除外 | 用量 | X：反応<br>O：無反応<br>OK | 名目 *n* への組み入れ | $\log_{10}$ 用量 | LD50 =<br>反応の確率 | #DIV/0!<br>尤度への寄与（ln *Li*） | LD50 =<br>反応の確率 | #DIV/0!<br>尤度への寄与（ln *Li*） | LD50 =<br>反応の確率 | #DIV/0!<br>尤度への寄与（ln *Li*） |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | I | 550 | O | no | 2.7404 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 5 | I | 2000 | O | no | 3.3010 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 6 | E | | | | - | すべての算出セルを無視する。反応の方向に逆転なし。 | | | | | |
| 7 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | E | | | | 最尤法の算出は終了できない。<br>LD50 は 2000 mg/kg 超である。 | | | - | - | - | - |
| 14 | E | | | | | | | - | - | - | - |
| 15 | E | | | | | | | - | - | - | - |
| 名目上のサンプルサイズ = | | | | 0 | | | | | | | |
| 実際の被験数 = | | | | 5 | | | | | | | |

算出された LD50 の最尤推定値 = なし

表 3. 5000 mg/kg を用いた場合の中止基準(a)の例。

3 匹の動物（4〜6 匹目）が 5000 mg/kg の限度で生存しているため、6 匹目より後は中止する。

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ステップ | I：組み入れ<br>E：除外 | 用量 | X：反応<br>O：無反応<br>OK | 名目 *n* への組み入れ | $\log_{10}$ 用量 | LD50 = | #DIV/0! | LD50 = | #DIV/0! | LD50 = | #DIV/0! |
| | | | | | | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | I | 550 | O | no | 2.7404 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | I | 1750 | O | no | 3.2430 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 5 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 6 | I | 5000 | O | no | 3.6990 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 7 | E | | | | - | すべての算出セルを無視する。反応の方向に逆転なし。 | | | | | |
| 8 | E | | | | - | | | | | | |
| 9 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | E | | | | - | 最尤法の算出は終了できない。 | | | - | - | - |
| 13 | E | | | | - | LD50 は 5000 mg/kg 超である。 | | | - | - | - |
| 14 | E | | | | - | | | | - | - | - |
| 15 | E | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 名目上のサンプルサイズ = | | | | 0 | | | | | | | |
| 実際の被験数 = | | | | 6 | | | | | | | |

算出された LD50 の最尤推定値 = なし



© OECD, (2008)

表 4. 中止基準(b)の例

連続する被験動物 6 匹（2〜7 匹目）中 5 匹に逆転がみられたため、7 匹目より後は中止する。

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ステップ | I：組み入れ<br>E：除外 | 用量 | X：反応<br>O：無反応<br>OK | 名目 *n* への組み入れ | $\log_{10}$ 用量 | LD50 = | 31.0 | LD50 = | 12.4 | LD50 = | 77.6 |
| | | | | | | 反応の確率 | 尤度への寄与 (ln *Li*) | 反応の確率 | 尤度への寄与 (ln *Li*) | 反応の確率 | 尤度への寄与 (ln *Li*) |
| 1 | 1 | 175 | X | no | 2.2430 | 0.9335 | -0.0688 | 0.9892 | -0.0108 | 0.7602 | -0.2742 |
| 2 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 3 | I | 17.5 | O | yes | 1.2430 | 0.3095 | -0.3703 | 0.6174 | -0.9607 | 0.0980 | -0.1031 |
| 4 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 5 | I | 17.5 | O | yes | 1.2430 | 0.3095 | -0.3703 | 0.6174 | -0.9607 | 0.0980 | -0.1031 |
| 6 | I | 55 | X | yes | 1.7404 | 0.6905 | -0.3703 | 0.9020 | -0.1031 | 0.3826 | -0.9607 |
| 7 | I | 17.5 | O | 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 | | | | - | - | - | - | - | - | - |
| 名目上のサンプルサイズ = | | | | 6 | | | | | | | |
| 実際の被験数 = | | | | 7 | | | | | | | |
| 用量平均化による推定値 | | | | 31.02 | | | | | | | |
| $\log_{10}$ = | | | | 1.492 | | | | | | | |
| 対数尤度合計： | | | | | | | -2.2906 | | -3.2021 | | -3.4655 |
| 尤度： | | | | | | | 0.1012 | | 0.0407 | | 0.0313 |
| 尤度比： | | | | | | | | | 2.4880 | | 3.2378 |
| 個々の尤度比は臨界値を超えているか？ | | | | 臨界値 = | 2.5 | | | | 偽 | | 真 |
| 両方の尤度比が臨界値を超えているか？ | | | | | | | | | 偽 | | |
| 算出された LD50 の最尤推定値 = | | | | | 29.6 | | | | | | |

自動算出、この例では関連しない。

最尤法算出から得た最終的な推定値

表 5. 中止基準(c)の例

LR による中止基準を最初に満たした時点で中止する。ここでは 9 匹目の動物。6 匹目から LR による中止基準を確認する。

| | | | |
|---|---|---|---|
| 仮定上の傾き | 2 | シグマ = | 0.5 |

| | |
|---|---|
| 収束基準パラメータ | |
| 臨界 LR | 2.5 |
| LD50 の係数 | 2.5 |

結果：LR による中止基準を満たす

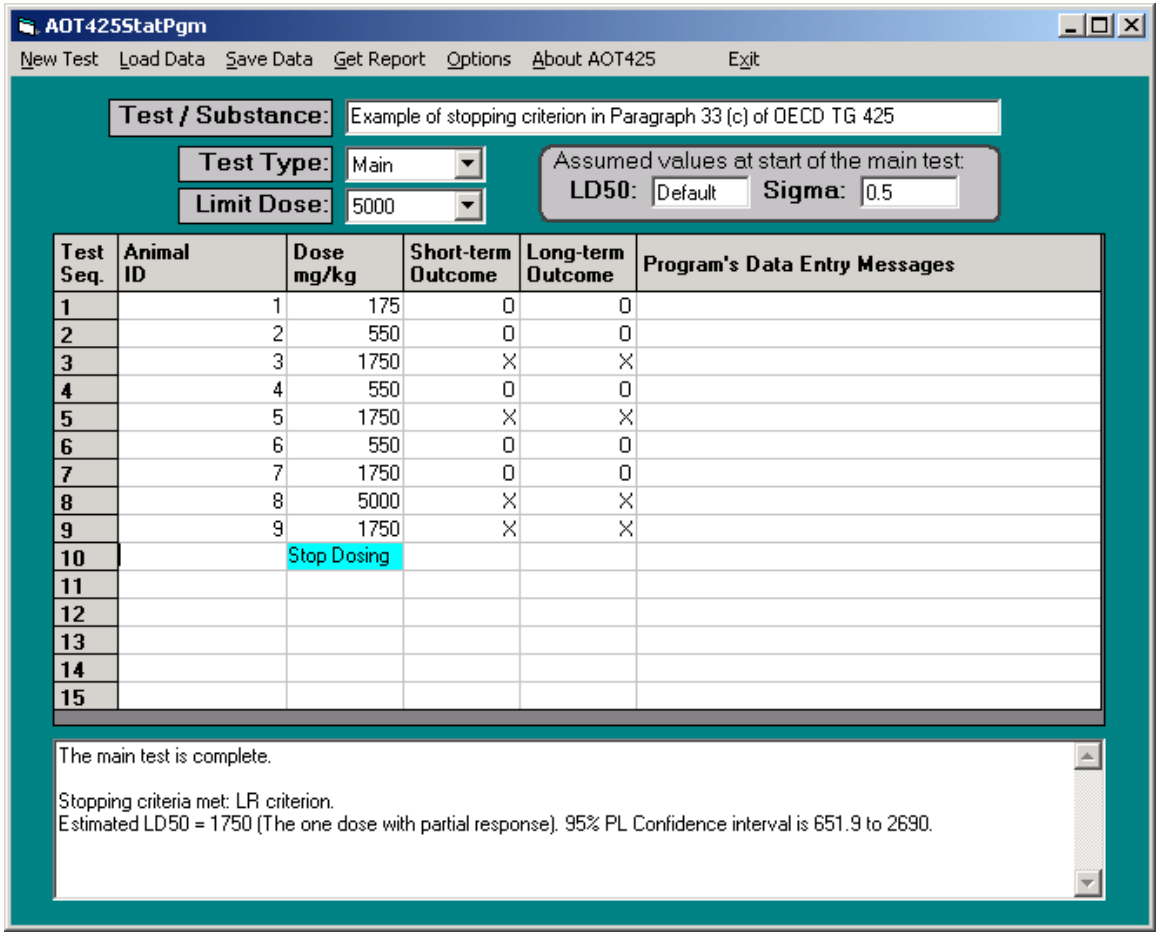
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ステップ | I：組み入れ<br>E：除外 | 用量 | X：反応<br>O：無反応<br>OK | 名目 *n* への組み入れ | $\log_{10}$ 用量 | DAE への寄与 | LD50 = | 1292.8 | LD50 = | 517.1 | LD50 = | 3232.0 |
| | | | | | | | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） | 反応の確率 | 尤度への寄与（ln *Li*） |
| 1 | I | 175 | O | no | 2.2430 | 0.0000 | 0.0412 | -0.0421 | 0.1733 | -0.1903 | 0.0057 | -0.0057 |
| 2 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 3 | I | 1750 | X | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.5046 | 0.8552 | -0.1564 | 0.2971 | -1.2138 |
| 4 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 5 | I | 1750 | X | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.5046 | 0.8552 | -0.1564 | 0.2971 | -1.2138 |
| 6 | I | 550 | O | yes | 2.7404 | 2.7404 | 0.2289 | -0.2600 | 0.5214 | -0.7368 | 0.0620 | -0.0640 |
| 7 | I | 1750 | O | yes | 3.2430 | 3.2430 | 0.6037 | -0.9257 | 0.8552 | -1.9323 | 0.2971 | -0.3525 |
| 8 | I | 5000 | X | yes | 3.6990 | 3.6990 | 0.8800 | -0.1279 | 0.9756 | -0.0247 | 0.6477 | -0.4344 |
| 9 | I | 1750 | X | 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 | - | - | - | - | - | - |
| 名目上のサンプルサイズ = | | | | 8 | | | | | | | | |
| 実際の被験数 = | | | | 9 | | | | | | | | |
| 用量平均化による推定値 | | | | 1292.78 | | | | | | | | |
| $\log_{10}$ = | | | | 3.112 | | | | | | | | |
| 対数尤度合計： | | | | | | | | -3.3894 | | -4.8270 | | -4.6260 |
| 尤度： | | | | | | | | 0.0337 | | 0.0080 | | 0.0098 |
| 尤度比： | | | | | | | | | | 4.2104 | | 3.4436 |
| 個々の尤度比は臨界値を超えているか？ | | | | 臨界値 = | 2.5 | | | | | 真 | | 真 |
| 両方の尤度比が臨界値を超えているか？ | | | | | | | | | | 真 | | |
| 算出された LD50 の最尤推定値 = | | | | | | 1329.6 | | | | | | |

最尤法算出から得た最終的な推定値



© OECD, (2008)

表 6. OECD ガイドライン 425 の内蔵型ソフトウェアによる中止基準(c)の例



## 補遺 4

### 試験を必要とせずに LD50 推定値が 2000 mg/kg 超となる被験物質の分類基準

1. 危険有害性区分 5 の基準は、急性毒性の危険有害性は比較的低いが、特定の状況下で脆弱な集団に危険となりうる被験物質について、同定可能にすることを目的としている。こうした物質は、経口または経皮経路での LD50 が 2000～5000 mg/kg の範囲か、それ以外の経路でも、同等の用量であると予測される。被験物質は、以下の場合、2000 mg/kg < LD50 < 5000 mg/kg と定義される危険有害性区分（GHS 区分 5）に分類されると考えられる。

a) LD50 が区分 5 の値の範囲内にあることを示す、信頼できる証拠が既に得られている場合、あるいは、他の動物試験またはヒトでの毒性作用から、ヒトの健康に急性の性質を有するとの懸念が示されている場合。

b) より危険な区分への割り当てが正当化されない場合、データの外挿、推定、または測定を通じ、
   - ヒトでの重大な毒性作用を示す信頼できる情報が得られている。または、
   - 経口経路により区分 4 の値を限度に検討したところ、死亡が認められている。または、
   - 区分 4 の値を限度に検討したところ、下痢、立毛、身づくろいをしていない外観を除き、専門家の判断により毒性の重大な臨床徴候が確認されている。または、
   - 専門家の判断により、他の動物試験から、重大な急性作用の可能性を示す信頼できる情報が確認されている。

**2000 mg/kg 超の用量での試験**

2. 動物愛護に関する保護の必要性を認識すると、区分 5 の範囲での動物試験は抑制され、その試験結果が、ヒトの健康の保護に直接関連していると考えられるという可能性が高い場合にのみ考慮すべきである。


© OECD, (2008)