OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.452

慢性毒性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2009), Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, 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-452-2009.pdf.

©OECD(2009)

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

2009 年 9 月 7 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

慢性毒性試験

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドライン（TG）は、科学的進歩、実際の評価法の変化および動物愛護に関する配慮を踏まえて定期的に見直されている。ガイドライン 452 の初版は 1981 年に採択されたが、動物愛護の分野と規制要件における最近の変化を反映するため、改訂版の作成が必要と考えられた(1)(2)(3)(4)。TG 452 の改訂は、試験ガイドライン 451「癌原性試験」および 453「慢性毒性／癌原性併合試験」の改訂と並行して行われ、試験に用いた動物から更なる情報を得ることと、用量設定に関する記載をより充実させることを目的としていた。なお、本試験ガイドラインは、農薬および工業用化学物質を含む広範囲の化学物質の試験に用いられるように計画されている。

2. 大部分の慢性毒性試験はげっ歯類を用いて実施されるため、本試験ガイドラインは主にこれらの種で行われる試験への適用を意図している。しかし、非げっ歯類の種で慢性毒性試験を行う必要がある場合でも、慢性毒性および癌原性試験の計画と実施に関する OECD のガイダンス文書 No. 116 (6)に示すように、本ガイドラインにまとめた原則および手順は、OECD TG 409「非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験」(5)にまとめた原則および手順と併せて、適切に修正を加えながら適用することができる。

3. 慢性毒性試験で用いられる 3 つの主な投与経路は、経口、経皮および吸入である。投与経路の選択は、被験物質の物理的および化学的特性とヒトの主たる暴露経路による。暴露経路の選択に関しては、更なる情報が OECD のガイダンス文書 No. 116 (6)に示されている。

4. 本ガイドラインは、慢性毒性試験で最も一般的に用いられる経口での暴露に焦点を絞っている。経皮または吸入経路での暴露による長期慢性毒性試験は、ヒトの健康に対するリスク評価で必要となったり、ある種の規制制度下で要求されたりすることもあろうが、両暴露経路は技術的にかなり複雑な部分があるため、そのような試験は個別に計画する必要がある。ただし、ここにまとめた経口投与による慢性毒性評価のためのガイドラインは、推奨される投与期間や臨床および病理学的検査項目などの点で、吸入試験や経皮試験のプロトコールの基礎となるであろう。被験物質の吸入(6)(7)および経皮経路(6)での投与に関する OECD のガイダンスも発行されている。吸入経路による暴露を用いた長期試験を計画する際には、TG 412 (8)および TG 413 (9)と、急性吸入試験についての関連する OECD ガイダンス文書(7)を併せて特に参考にすること。また、経皮経路で実施する試験の場合には、TG 410 (10)を参考にすること。

5. 慢性毒性試験では、用いる動物種の生涯のかなりの部分にわたって反復暴露したときに生じる可能性のある健康に対するハザードについての情報が得られる。この試験により毒性影響に関する情報が得られ、標的器官と蓄積の可能性が明らかになり、更に有害影響がみられない量（無

© OECD（2009 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

毒性量）の推定値が得られる。この無毒性量は、ヒトにおける暴露の安全基準確立に用いることができる。なお、可能な限り多くの情報が得られるように、動物の一般状態を注意深く観察することの必要性も強調されている。

6. 本試験ガイドラインで取り扱う試験の目的は以下のとおりである。

- 化学物質の慢性毒性の検出
- 標的器官の検出
- 用量反応関係の確認
- 無毒性量（NOAEL）またはベンチマークドーズ（BMD）確立のための開始点の決定
- ヒトの暴露量における慢性毒性影響の予測
- 作用機序に関する試験仮説へのデータ提供(6)

最初に考慮すべき事項

7. 化学物質の毒性学的特性の評価では、試験計画の焦点を絞って最小限の使用動物数でより効率よく慢性毒性を検討することができるように、試験機関は試験実施前に被験物質に関して入手可能なあらゆる情報を考慮する。試験計画に役立つ情報としては、被験物質の特定データ、化学構造および物理化学的性質、作用機序に関する情報、*in vitro* または *in vivo* 毒性試験の結果、予想される用途およびヒトへの暴露の可能性、（定量的）構造活性相関データおよび構造類似物質の毒性データ、トキシコキネティクスデータ（単回投与、また可能であれば反復投与時のキネティクスデータ）ならびに他の反復暴露試験で得られたデータなどがある。慢性毒性の評価は、28 日または 90 日間反復投与毒性試験で毒性に関する最初の情報が得られてからはじめて実施する。要するに、慢性毒性試験のための段階的方法は、その化学物質の健康に対する有害作用の総合的評価の一環として考える(11)(12)(13)(14)。

8. 実験計画と目的からみて結果の解析に最適な統計手法を試験開始前に確立する。考慮すべき事項としては、生存率の補正および 1 つまたは複数の群が途中で終了した場合の解析を統計手法に含めるか、といったことがある。適切な統計解析法についてのガイダンスおよび世界的に認められている統計手法に関する主要文献は、ガイダンス文書 No. 116 (6)ならびに慢性毒性および癌原性試験の解析と評価に関するガイダンス文書 No. 35 (15)に示されている。

9. 慢性毒性試験の実施にあたっては、安全性評価に用いる実験動物での、人道的評価項目としての症状の認識、評価および使用に関する OECD のガイダンス文書 No. 19 (16)にまとめられた基本理念と考察、特にその段落 62 に常に従うこと。この段落には*「反復投与を行う試験において動物が進行性の症状を示し、状態が次第に悪化していくような場合は、人道的殺処分を行うべきか否かを十分な情報に基づいて決定する。決定に際しては、その動物を試験で生かしておくことによって得られる情報の価値を、その個体の全体的な状態との対比の上で考慮する。動物を生かしておくと決めた場合は、必要に応じて観察頻度を増やす。また、投与の中断で疼痛や苦痛を軽減できるときは、試験目的に悪影響を与えることなく一時的に投与を中断したり、試験用量を減量したりすることも可能な場合がある」*と述べられている。

10. 慢性毒性および癌原性試験における用量設定の原則に関する詳細なガイダンスと考察は、ガイダンス文書 No. 116 (6)および国際生命科学研究機構（ILSI）の 2 つの出版物(17)(18)にみることができる。用量設定で中核となる戦略は試験の主要目的による（段落 6）。適切な用量段階の設定には、ハザードのスクリーニングと、低用量での反応およびその意義の評価との間でバランスをとる必要がある。これは特に慢性毒性／癌原性併合試験（TG 453）を実施しようとするときに重要である（段落 11）。

11. 慢性毒性試験（TG 452）と癌原性試験（TG 451）を別々に行うよりも、慢性毒性／癌原性併合試験（TG 453）を行うことを考慮する。併合試験では、2 つの試験を別々に行うのに比べて時間と費用の点で効率がよく、かつ慢性毒性部分でも癌原性部分でもデータの質が損なわれることはない。ただし、慢性毒性／癌原性併合試験（TG 453）を行う場合には、用量設定の原則（段落 9、20～25）について慎重に考慮すること。また、一部の規制体制では個別の試験を要求される場合がある。

12. 本試験ガイドラインで用いた定義はガイダンス文書 No. 116 に示されている。

試験の概要

13. 被験物質を､実験動物からなるいくつかの群に段階的な用量で通常 12 カ月間毎日投与する。規制要件によっては期間をより長く、または短くしてもよい（段落 33 参照）。この期間は、蓄積毒性の影響が現われるほど十分に長いが加齢性変化による影響は受けないように設定する。暴露期間を 12 カ月としない場合（特により短期間の場合）は、その妥当性を示すこと。被験物質は通常経口投与とするが、吸入または経皮による試験を行ってもよい。また、試験計画に 1 回または複数回の中間屠殺（3 および 6 カ月時など）を含めてもよく、そのための追加動物群を設けることがある（段落 19 参照）。投与期間中、動物の毒性徴候を注意深く観察する。試験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

14. 本ガイドラインは主にげっ歯類を用いた慢性毒性の評価法について述べている（段落 2 参照）。ただし、ある種の規制制度下では、非げっ歯類を用いた同様の試験が要求されることがある。種の選択については妥当性を示すこと。非げっ歯類における慢性毒性試験の計画および実施（要求される場合）は、本ガイドラインにまとめた原則と、OECD TG 409「非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験」(5)にまとめた原則とに基づいて行う。なお、ガイダンス文書 No. 116 (6)には動物種と系統の選択に関する追加情報が示されている。

15. 本ガイドラインではげっ歯類の種はラットが望ましいとしているが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いてもよい。ラットおよびマウスは、寿命が比較的短いこと、薬理試験や毒性試験において広く用いられていること、腫瘍の誘発に対して感受性があること、および十分に特性の

© OCDE（2009 年）

はっきりした系統が入手可能であることから、好ましい実験モデルとされてきた。このような特徴の結果、その生理と病理については豊富な情報が存在する。試験では、一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。慢性毒性試験は、より短期間の予備的な毒性試験と同じ系統および供給元の動物を用いて行う。また、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

飼育および給餌条件

16. 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が、個別飼育は科学的に妥当性のある場合のみ検討する(19)(20)(21)。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。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、飼料は、供試動物種の栄養学的要件を全て満たすとともに、試験結果に影響を与える可能性のある汚染物質（残留農薬、難分解性の汚染有機物、植物エストロゲン、重金属およびカビ毒を含むが、それのみとは限らない）の濃度が可能な限り低いものであること。栄養および飼料中の汚染物質濃度については定期的（少なくとも試験開始時および使用バッチの変更時）に分析し、その情報を最終報告書に含める。試験に用いた飲料水の分析情報も同様に示す。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て動物の栄養学的要件にも合った飼料を選択する必要が生じる場合がある。

動物の準備

17. 以前に実験に供されたことのない健康な動物を、飼育室環境に 7 日間以上馴化した後に用いる。げっ歯類の場合、離乳および馴化後可能な限り速やかに投与を開始する（8 週齢前の開始が望ましい）。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重および週齢を明らかにする。また、試験開始時、使用動物の雌雄別の体重のばらつきは最小限とし、各性の全供試動物の平均体重の ± 20%を超えないこととする。動物は対照群と投与群に無作為に割り付ける。無作為化後は雌雄とも各群の平均体重間に有意差があってはならず、統計学的有意差がみられた場合は、可能であれば再度無作為化を行う。各動物には固有の識別番号を付し、その番号を入墨、マイクロチップの埋め込み、その他適切な方法で永続的に表示する。

手順

動物数および性

18. 雌雄の動物を用いる。また、試験終了時に各群とも詳細な生物学的および統計学的評価が可能なだけの動物が得られるように、十分な数の動物を用いる。このため、げっ歯類の場合は通常 1 群あたり少なくとも雌雄各 20 匹とする。また、非げっ歯類の場合は 1 群あたり雌雄最低各 4 匹とすることが推奨される。なお、マウスの試験では、要求されている全ての血液学的検査を行うため、各用量群に追加動物が必要かもしれない。

中間屠殺、サテライト群およびモニター動物の設定

19. 科学的妥当性があれば、毒性学的変化の進行に関する情報とメカニズム的な情報を得るため、中間屠殺（6カ月時など）を設定してもよい（1群あたり少なくとも雌雄各10匹）。ただし、先に行ったその物質の反復投与毒性試験においてそのような情報がすでに得られている場合には、中間屠殺は科学的に妥当であるとはいえない可能性がある。また、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるため、サテライト群を設けることもできる。サテライト群は通常、試験の最高用量および対照群のみとする。更に、必要であれば、試験中の疾病状態の監視のため、追加のモニター動物群（通常雌雄各5匹）を設けてもよい(22)。なお、中間屠殺やサテライト群／モニター群を計画している場合には、試験完了前に計画殺する動物数を試験計画に含める動物数に追加する。これらの動物については、通常、体重、摂餌量／摂水量、血液学的および臨床生化学的検査ならびに病理学的検査など、主試験の慢性毒性部分の動物と同じ検査を行う。ただし、（中間屠殺群では）神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行ってもよい。

用量群および投与量

20. 用量設定と用量間隔のあらゆる面についてのガイダンスは、ガイダンス文書 No. 116 (6)に示されている。限度試験を実施する場合（段落27参照）を除き、少なくとも3段階の用量および同時対照を設ける。用量は一般により短期の反復投与試験や用量設定試験に基づいて設定するが、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。

21. 被験物質の物理化学的性質や生物学的作用による制限がない限り、最高用量は通常、主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とする。すなわち、最高用量は、以下の段落22に示す点を考慮しながら、体重増加抑制（約10%）などで示される明らかな毒性が得られるように設定する。

22. 試験目的（段落6参照）によっては、明らかな毒性を示す用量より低い用量を最高用量とすることもある（ある用量で問題となる有害作用が発現するが、その作用自体は寿命や体重にほとんど影響を与えない場合など）。また、最高用量は1000 mg/kg体重/dayを超えないこととする（限度用量、段落27参照）。

23. 用量とその間隔は、用量反応関係を確立するために、また最低用量においてNOAELその他試験で意図する成果（BMDなど、段落25参照）を得るために設定される場合もある。低用量の設定で考慮すべき点としては、予測される用量反応曲線の傾き、代謝や毒性作用機序に重要な変化が生じる用量、予測される閾値、また予測される低用量の外挿の開始点などがある。

24. 用量間隔の設定は被験物質の特性によるため、このガイドラインで規定することはできないが、公比2～4で用量を下げていくとしばしば良好な試験成績が得られる。用量間隔が非常に大きい場合（公比がおおよそ6～10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。一般に10を超える公比は避けるべきで、用いる場合には妥当性を示す必要がある。

© OCDE（2009年）

25. ガイダンス文書 No. 116 (6)で更に述べているように、用量設定にあたって考慮すべき点には以下のようなものがある。

- 用量反応関係における既知の非線形性または変化点、もしくはそれらの可能性
- トキシコキネティクスと、代謝の誘導、飽和または投与用量と体内用量の非線形関係がみられる／みられない用量範囲
- 前駆病変、影響のマーカー、背景にある主要な生物学的過程の進行を示す指標
- 作用機序における主要な局面（またはそれが疑われるもの）。例えば、細胞毒性の発現、ホルモン濃度の乱れ、恒常性維持機構の崩壊などがみられる用量。
- 用量反応曲線のうち、特に頑健な推定が必要となる領域（予測される BMD または閾値と考えられる値を含む範囲など）
- ヒトで予測される暴露量に関する考察

26. 対照群は未投与群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、全用量群のうちで用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。被験物質の混餌投与で嗜好性の悪化のため摂餌量の顕著な減少がみられるときには、より適切な対照として、給餌量を揃えた追加の対照群が有用な場合がある。

27. 予備試験の情報から、本ガイドラインに記載された方法で試験を行ったときに 1000 mg/kg 体重/day 以上に相当する 1 用量において有害作用がみられそうにないと予測される場合、および構造的に関連する物質のデータから毒性がないと予想される場合には、3 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用量の必要性が示唆されない限り、限度用量の 1000 mg/kg 体重/day が適用できる可能性がある。

被験物質投与の準備および投与

28. 被験物質は通常飼料や飲水を介して、または強制的に経口投与する。投与経路と投与方法に関しては、追加の情報がガイダンス文書 No. 116 (6)に示されている。投与経路および投与方法は、試験の目的、被験物質の物理化学的性状、生物学的利用性およびヒトの主な暴露経路と暴露方法による。投与経路と投与方法についてはその選択根拠を示すこと。なお、動物愛護の観点から、強制経口投与法は、通常、この投与経路と投与方法がヒトで起こりうる暴露に相当すると考えるのが妥当な物質（医薬品など）の場合のみ選択する。農薬など、食物または環境中の化学物質については、飼料や飲水を介しての投与が一般的である。ただし、状況によっては（職業暴露など）、その他の経路による投与がより適切な場合もある。

29. 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。溶媒その他の添加物については、必要に応じて、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質

に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や摂水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。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る必要がある。また、投与条件下（飼料中など）での被験物質の安定性および投与溶液または調製飼料の均一性（該当する場合）に関する情報を示す。

30. 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り、混餌投与による長期毒性試験では、栄養の不均衡を防ぐため、飼料中の化学物質濃度は通常、全飼料の 5%（上限）を超えないこととする。また、被験物質の混餌投与では、飼料中濃度（mg/kg 飼料または ppm）を一定にする方法か、動物の体重あたりの用量（mg/kg 体重、週 1 回算出）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く。

31. 経口投与の場合は、被験物質を動物に毎日（週 7 日）、通常 12 カ月間にわたって投与する（段落 33 も参照のこと）。ただし、規制要件によってはより長い期間が必要な場合もある。また、週 5 日の投与など、その他の投与法を用いる場合には、その妥当性を明らかにする必要がある。経皮投与の場合は、TG 410 (11)に示すように、被験物質を動物に通常少なくとも 1 日 6 時間、週 7 日、12 カ月間にわたって適用する。吸入経路による暴露は 1 日 6 時間で週 7 日行うが、妥当性が示されれば週 5 日暴露も可能である。いずれの場合も、暴露期間は通常 12 カ月間とする。なお、ラット以外のげっ歯類の種を鼻部暴露する場合には、種特異的な苦痛を最小限にするため、最長暴露時間を調整してもよい。ただし、1 日 6 時間より暴露時間を短くする場合には、その根拠を示す。TG 412 (8)も参照すること。

32. 被験物質を動物に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毎日ほぼ同じ時刻に投与する。通常は 1 日 1 回一度に全量を投与するが、化合物が局所刺激性物質である場合などは、分割投与（1 日 2 回投与）することで 1 日あたりの用量を維持することも可能である。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、可能な限り少量とし、げっ歯類に対しては通常体重 100 g あたり 1 mL を超えないようにする(23)。また、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。ただし、腐食性または刺激性物質の可能性のあるものは例外で、局所への高度な影響を避けるため希釈する必要がある。消化管に対して腐食性または刺激性を示す恐れのある濃度での試験は避けること。

試験期間

33. 本試験ガイドラインは主に 12 カ月間慢性毒性試験として計画されているが、特定の規制制度の要件によっては、また特定のメカニズム的な目的によっては、この試験計画でより短い（6 または 9 カ月など）、もしくは長い（18 または 24 カ月など）試験を行ってもよいし、実際にそれらに適用が可能である。ただし、暴露期間を 12 カ月としない場合（特により短期間の場合）には、その妥当性を示すこと。なお、被験物質による毒性学的変化の可逆性を調べるために設けるサテライト群は、暴露終了後、4 週間以上かつ全試験期間の 1/3 以下の期間、投与を行わずに飼育する。試験の生存率についての考察を含め、更なるガイダンスはガイダンス文書 No. 116 (6)に示されている。

© OCDE（2009 年）

観察

34. 全ての動物について、通常、1 日の始めと終わり（週末および祝日を含む）に、病気の徴候および生死を確認する。加えて、一般状態の観察を少なくとも 1 日 1 回行う。この観察は毎日同じ時刻に行うことが望ましく、強制経口投与の場合は、投与後、予想される影響が最大になる期間を考慮しながら行う。

35. 少なくとも初回暴露前に 1 回（個体内比較のため）、試験第 1 週の終わり、およびその後は月 1 回、全ての動物について詳細な状態の観察を行う。観察のためのプロトコールは、各観察者間のばらつきが最小限で、試験群とも無関係になるように作成する。これらの観察は飼育ケージの外で行うが、観察台上で、かつ毎回ほぼ同じ時刻にすることが望ましい。その結果は、可能であれば、試験を行う研究所ごとに明確に定めた尺度基準による採点法を用い、注意深く記録する。観察条件の変動は最小になるようにする。観察すべき徴候は、皮膚、被毛、眼および粘膜の変化、分泌物および排泄物の有無、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常など）であるが、それに限るものではない。更に、歩行、姿勢および動物の取り扱い操作に対する反応の変化、ならびに間代性または強直性の動き、常同行動（身づくろいの変化、旋回など）および異常行動（自咬、後ずさりなど）も記録する(24)。

36. 被験物質の初回投与前に、全ての動物について検眼鏡その他の適切な器械を用いて眼科学的検査を行う。試験終了時にも全ての動物について同検査を行うことが望ましいが、少なくとも高用量群および対照群については実施し、投与に関連した眼の変化が認められた場合には、全ての動物を検査する。なお、構造解析やその他の情報から眼毒性が示唆される場合には、眼科学的検査の頻度を増やす。

37. 先に行われた 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において神経毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験開始前、試験開始後 3 カ月に 1 回（12 カ月時まで）、および試験終了時（12 カ月より長い場合）に、種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激など）(25)(26)(27)に対する感覚運動反応の検査(24)、握力測定(28)、および自発運動量の測定(29)を行ってもよい。従うべき手順の詳細は各参考文献に記載されている。ただし、参考文献に記載された以外の手順を用いることも可能である。

38. 先に行われた 28 日間または 90 日間反復投与毒性試験において免疫毒性学的影響を惹起する可能性が認められた化学物質については、任意検査として、試験終了時にこの評価項目に関する更なる検討を行ってもよい。

体重、摂餌量／摂水量および食餌効率

39. 全ての動物について、投与開始時、最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回体重を測定する。また、摂餌量および食餌効率を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回求める。被験物質を飲水投与する場合には、摂水量を最初の 13 週間は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも月 1 回測定する。更に、試験において飲水行動の変化がみられた場合にも、摂水量の測定を考慮する。

血液学的検査および臨床生化学的検査

40. げっ歯類を用いた試験では、血液学的検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹の常に同じ動物について 3、6、12 カ月時および試験終了時（12 カ月より長い場合）に行う。マウスでは、要求されている全ての血液学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない（段落 18 参照）。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、より少数の動物（イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど）から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で血液学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の測定を行う必要はない。検査では麻酔下で指定部位から血液試料を採取する（心臓穿刺または眼窩静脈叢からの採血など）。

41. 以下の項目を検査する(30)：総および型別白血球数、赤血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値（PCV）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC)、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間。物質の毒性によっては、ハインツ小体その他の赤血球の形態異常やメトヘモグロビンなど、上記以外の血液学的検査項目を測定することが適当な場合もある。要するに、それぞれの物質については、観察または予測される影響に応じて柔軟な取組み方を適用すべきということである。また、その化学物質が造血器系に影響を与える場合には、網状赤血球数と骨髄細胞像の検査の必要性も示唆される場合がある。ただし、これらの検査を日常的に行う必要はない。

42. 組織における主な毒性影響、特に腎臓および肝臓に対する影響を調べるため、臨床生化学的検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹の常に同じ動物から採取した血液について、血液学的検査の項に示したのと同じ間隔で行う。マウスでは、要求されている全ての臨床生化学的検査を行うために、サテライト動物が必要かもしれない。非げっ歯類の試験では、げっ歯類について述べた中間サンプリング時および終了時に、より少数の動物（イヌの試験では各群雌雄 4 匹ずつなど）から採血を行う。ただし、げっ歯類、非げっ歯類とも、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で臨床生化学的検査項目に影響がみられなかった場合は、3カ月時の測定を行う必要はない。採血前には動物（マウスを除く）を一晩絶食させることが推奨される [1]。以下の項目を検査する(30)：血糖、尿素（尿素窒素）、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、総コレステロール、肝細胞の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、総胆汁酸）(31)および肝胆道の評価のための少なくとも 2 種類の適切な検査（アルカリフォスファターゼ、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、総ビリルビン、総胆汁酸）(31)。物質の毒性によっては、空腹時トリグリセリド、特定のホルモンおよびコリンエステラーゼなど、上記以外の臨床化学的検査項目を測定することが適当な場合もある。要するに、それぞれの物質については、観察または予測される影響に応じて柔軟な取組み方が必要ということである。

43. 尿検査を各群少なくとも雄 10 匹、雌 10 匹について、血液学的および臨床化学的検査と同じ間隔でサンプルを採取して実施する。ただし、先に同程度の用量で実施した 90 日間試験で尿検査に影響がみられなかった場合は、3 カ月時の検査を行う必要はない。臨床病理検査に関する専門家の推奨に含まれていた項目は、外観、尿量、浸透圧または比重、pH、総蛋白および糖である(30)が、その他の項目として、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血などもある。認められた影響について検討を進めるために必要な場合には、更なる項目の検査を行ってもよい。

© OCDE（2009 年）

44. 一般に、イヌの試験では投与前に基準となる血液学的および臨床生化学的検査値が必要であるが、げっ歯類の試験では測定しておく必要はないと考えられている(30)。しかし、基準となる背景データ（段落 50 参照）が不適切な場合には、これらのデータを得ておくことを考慮する。

病理学的検査

剖検

45. 通常、試験に供した全ての動物について、体表、全ての体孔、ならびに頭蓋腔、胸腔および腹腔とその内部臓器の注意深い検査を含む、完全かつ詳細な肉眼剖検を行う。ただし、（中間屠殺またはサテライト群では）神経毒性や免疫毒性など特殊な主要項目に限定して検査を行ってもよく（段落 19 参照）、これらの動物については剖検および以下の段落に述べるその後の手順を行う必要はない。また、モニター動物については、試験責任者の判断により、個々の場合に応じて剖検が必要になることがある。

46. 段落 45 の後半部分で除外された動物を除く全ての動物について、器官重量を測定する。具体的には、全ての動物（瀕死状態で発見された動物および試験途中の屠殺動物を除く）の副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、脾臓、精巣、甲状腺（固定後秤量、上皮小体を含む）および子宮について、必要であれば周囲の組織を取り除き、その湿重量を測定する。重量測定は乾燥を防ぐため、摘出後可能な限り速やかに行う。なお、マウスの試験での副腎重量の測定は任意とする。

47. 以下に示す組織を、組織の種類およびその後に予定している病理組織学的検査の双方に関して最も適切な固定液中で保存する(32)（［］内の組織は任意）。

全ての肉眼病変	心臓	膵臓	胃（前胃、腺胃）
副腎	回腸	上皮小体	［歯］
大動脈	空腸	末梢神経	精巣
脳（大脳、小脳および延髄／橋の一部を含む）	腎臓	下垂体	胸腺
盲腸	涙腺（外涙腺）	前立腺	甲状腺
子宮頸	肝臓	直腸	［舌］
凝固腺	肺	唾液腺	気管
結腸	リンパ節（表在および深部の両方）	精嚢	膀胱
十二指腸	乳腺（雌は必須、雄は肉眼的に採取可能な場合）	骨格筋	子宮（頸部を含む）
精巣上体	［上気道（鼻、鼻甲介および副鼻腔を含む）］	皮膚	［尿管］
眼（網膜を含む）	食道	脊髄（3カ所：頸部、中胸部および腰部）	［尿道］
［大腿骨および関節］	［嗅球］	脾臓	膣
胆嚢(ラット以外の種)	卵巣	［胸骨］	骨髄の一部または新鮮吸引骨髄、あるいはその両方
ハーダー腺			

両側性の器官（腎臓、副腎など）は両側とも保存する。一般状態その他の所見から、追加組織の検査の必要性が示唆される場合もある。また、被験物質について分かっている性質から標的器官と考えられるものも全て保存する。経皮投与の試験では、経口投与で示した器官の保存に加え、適用部位の皮膚を特に採取して保存する必要がある。吸入試験では、呼吸器の保存および検査組織はTG 412 (8)とTG 413 (9)の推奨に従うこととし、その他の器官／組織については（特に保存した呼吸器の組織に加えて）経口投与で示したものを検査する。

© OCDE（2009年）

病理組織学的検査

48. 毒性病理検査の実施にあたっての最良の方法についてはガイダンスが出されている(32)。最低限、次の病理組織学的検査を行う。

- 高用量群および対照群の全組織
- 試験中の死亡または屠殺動物の全組織
- 肉眼的異常がみられた全組織
- 標的組織または高用量群で投与に関連する変化が認められた組織があるとき、他の全ての用量群の全ての動物から採取したそれらの組織
- 両側性の器官（腎臓、副腎など）は、両側とも検査する。

データおよび報告

データ

49. 評価した全項目について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、各試験群について、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、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）、病変を示した動物数、病変の種類、ならびに各病変を示した動物の割合を示す。総括表には、病変の程度に加え、毒性影響または病変がみられた動物の平均と標準偏差（連続データの場合）を示す。

50. 背景データは試験結果の解釈に有用な場合がある（同時対照群から得られたデータが、同じ試験施設／コロニーの対照動物の最近のデータと比較して明らかにはずれている場合など）。背景データを評価に用いる場合には、同じ施設において当該試験以前の 5 年間に得られた同一齢／系統の動物のデータを提出する。

51. 必要に応じて、適切かつ一般的に認められている統計方法を用いて数的結果を評価する。統計方法と解析するデータは試験計画の段階で選択するものとする（段落 8）。選択にあたっては、必要な場合に生存率による補正もできるようにする。

試験報告書

52. 試験報告書には、以下の情報を含む。

被験物質：

- 物理的性質、純度、物理化学的特性
- 特定データ
- 物質の供給元
- バッチ番号
- 化学分析証明書

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／系統および選択の妥当性
- 試験開始時の動物数、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：

- 投与経路の選択根拠、用量設定根拠
- 必要に応じて、データ解析に用いた統計手法
- 被験物質溶液／被験物質混合飼料の調製方法の詳細
- 調製物の濃度、安定性および均一性の分析データ
- 投与経路および被験物質投与の詳細
- 吸入試験の場合、鼻部暴露か、全身暴露か
- 実際の用量（mg/kg 体重/day）、また必要に応じて、飼料／飲水中の被験物質濃度（mg/kg または ppm）から実際の用量への換算係数
- 飼料および水の質の詳細

結果：（データの総括表および個体ごとのデータを示す）：

- 生存率データ
- 体重／体重変化
- 摂餌量／算出した場合、食餌効率／測定した場合、摂水量
- 性および用量ごとの毒性反応データ（毒性徴候を含む）
- 一般状態の変化の種類、発生頻度（およびスコア化した場合はその程度）ならびに期間（一過性か、永続的か）
- 眼科学的検査結果
- 血液学的検査結果
- 臨床生化学的検査結果
- 尿検査結果
- 神経毒性または免疫毒性に関する検査結果（あれば）
- 最終体重
- 器官重量（および必要に応じてその比）
- 剖検所見
- 投与に関連した全ての病理組織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（以下を含む）：

- 用量反応関係
- 作用機序に関する情報についての考察
- モデリング手法に関する考察
- BMD、NOAEL または LOAEL の決定
- 背景データ
- ヒトにおける意義

© OCDE（2009 年）

結論

参考文献

1. OECD (1995), *Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995)*, internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
2. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32, 163-208.
3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.
4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.
5. OECD (1998), *Repeat Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-Rodents,* Test Guideline No. 409, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
6. OECD (2009), Draft Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guidelines at *www.oecd.org/env/testguidelines*.
7. OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
8. OECD (2009), *Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study,* Test Guideline No. 412, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
9. OECD (2009), *Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study,* Test Guideline No. 413, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
10. OECD (1981), *Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study*, Test Guideline No. 410, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
11. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36, 1-7.
12. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36, 9-35.
13. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36, 37-68.
14. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36, 69-98.
15. OECD (2002), *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies*, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
16. OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation,* No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
17. Rhomberg, LR, Baetcke, K, Blancato, J, Bus, J, Cohen, S, Conolly, R, Dixit R, Doe, J, Ekelman, K, Fenner-Crisp, P, Harvey, P, Hattis, D, Jacobs, A, Jacobson-Kram, D, Lewandowski, T, Liteplo, R, Pelkonen, O, Rice, J, Somers, D, Turturro, A, West, W, Olin, S. Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9) 729 - 837 (2007).
18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

© OCDE（2009 年）

19. EEC Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal, 29, L358, 18th December 1986.
20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2. http://www.gv-solas.de/publ/heft1_1988.pdf
22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems. http://www.gv-solas.de/auss/hyg/hyg-p7_e.html
23. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23. Available at: http://www.ff.up.pt/farmacologia/pdf/good_practice_lab_animals.pdf
24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
25. Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.
26. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health, 9, 691-704.
27. Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.
28. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.
29. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.
30. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol., 29: 198-201.
31. EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32, 126-131.