

新旧対照表

○ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験

(傍線部分は改正部分)

改 正 案	現 行
<p>目的 本試験は、動物に被験物質を一定期間毎日反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。</p> <p>1. 試験動物 1-1 動物種及び性 原則として、ラットの雄及び雌を用いる。</p> <p>1-2 年齢 ラットでは5あるいは6週齢（注1）とし、体重のそろった動物を用いる。体重の変動範囲は、<u>それぞれ雌雄の平均体重の±20%以内とする。</u></p> <p>（注1）5あるいは6週齢の動物が得られない場合には、<u>9週齢を超えないものでもよい。</u></p> <p>1-3 動物数 各群雄及び雌それぞれ5匹以上とする。なお、中間で屠殺して検査を行う場合は、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。また、投与終了後少なくとも14日間飼育し変化の可逆性、持続性、並びに<u>遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ5匹以上で構成されるサテライト群を、対照群及び高用量群にそれぞれ設ける。</u></p>	<p>目的 本試験は、動物に被験物質を一定期間毎日反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。</p> <p>1. 試験動物 1-1 動物種及び性 原則として、ラットの雄及び雌を用いる。</p> <p>1-2 年齢 5あるいは6週齢（注1）とし、体重のそろった動物を用いる。体重の変動は、平均体重の±20%以内とする。</p> <p>（注1）5あるいは6週齢の動物が得られない場合には、<u>離乳後で8週齢を超えないものでもよい。</u></p> <p>1-3 動物数 各群雄及び雌それぞれ5匹以上とする。なお、中間で屠殺して検査を行う場合は、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。また、<u>原則として、回復試験を行う群（回復群）を設ける（注2～4）。回復群の動物数は、1群雄及び雌それぞれ5匹以上とする。</u></p> <p><u>（注2）被験物質の投与を終了した後、回復試験を2週間行う。</u></p> <p><u>（注3）回復群の用量は、高用量群の用量とする。動物の観察・検査は、28日間投与試験で認められた高用量群における毒性影響に関して行う。</u></p> <p><u>（注4）回復群の観察・検査を省略することができる場合は、次のとおりである。</u> <u>1) 28日間の投与終了後までに重大な毒性が認められる場合</u> <u>2) 高用量群において毒性影響が認められない場合</u></p>

2. 被験物質

2-1 投与方法

被験物質の投与は、原則として、経口投与で行う（注2）。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

（注2）経口投与の方法として、強制経口投与、混餌投与、飲水投与がある。事前に、被験物質の媒体中での安定性を測定する。

2-2 用量

投与量は3段階以上を設定する。最高用量は、被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に1段階以上の中間用量を設け、別に対照群をおく。

混餌投与又は飲水投与の場合の被験物質摂取量は、動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

なお、最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000mg/kgの用量で、また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は飼料又は飲料水から摂取される被験物質の量が 1000mg/kg に相当する用量（注3）とし、この量で何ら毒性が認められないときは3用量を用いる試験は必要としない。

（注3）ラットの場合、1000mg/kgの用量に相当する飼料又は飲料水中の濃度は、投与期間等により変わることもあるが、一応、2%を目安とする。

2-3 投与期間

28日間毎日投与とする。

3. 観察・検査

毎日少なくとも1回、可能な限り同じ時刻で、投与後の予測される影響のピーク時を考慮し、すべての動物の一般状態を観察・記録する。また、共食いや自己融解による被験物質の減少を防ぐため、少なくとも1日に2回は死亡について観察を行う。更に、最初に被験物質を投与する前に1回、その後少なくとも週に1回、すべての動物についての詳細な観察を行い、記録する（注4、5）。

投与4週目に、すべての動物について機能検査を行い、異常が認められた場合には、サテライト群についてもすべての動物について機能検査を行う（注6）。

2. 被験物質

2-1 投与方法

原則として、経口投与で行う。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

2-2 用量

投与量は3段階以上を設定する。高用量は、被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、高用量と低用量の間に1段階以上の中間用量を設け、別に対照群をおく。

実際の被験物質摂取量は動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

なお、強制経口投与の場合は、体重 kg 当たり 1gの用量で、また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は飼料又は飲料水から摂取される被験物質の量が 体重 kg 当たり 1g に相当する用量（注5）で、何ら毒性が認められないときは3用量を用いる試験は必要としない。

（注5）ラットの場合、体重 1kg 当たり 1gの用量に相当する飼料又は飲料水中の濃度は、投与期間等により変わることもあるが、一応、2%を目安とする。

2-3 投与期間

28日間投与とする。

3. 観察・検査

毎日少なくとも1回、動物の一般状態を綿密に観察・記録する（注6）。また、共食いや自己融解による被験物質の減少を防ぐ。

（注6）一般状態として次の項目を観察する。皮膚・被毛、眼・粘膜、呼吸器系、循環器系、自律神経系、中枢神経系、運動及び行動パターンなど。これらについて症状の発現時間、程度、持続時間を見る。必

(注4) 観察は飼育室内あるいはそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場において行う。試験機関で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験のばらつきを最小にするよう配慮する。また、観察は投与について知らされていない観察者が実施することが望ましい。

(注5) 観察項目は、少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の状態、自律神経系の活動の出現（流涎、流涙、立毛、瞳孔の大きさ、異常呼吸等）、歩行・姿勢・ハンドリングへの反応、間代性・強直性痙攣、常同行動（過度の身づくろい、反復旋回運動等）、異常行動（自傷行動、後ずさり等）等の有無を確認する。

(注6) 投与4週目において、異なる種類の感覚への刺激に対する運動反応（聴覚、視覚、固有感覚等）、握力の測定、及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って行う。

更に、次の事項について検査を行う。

3-1 死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）（注7）

（注7）週1回以上測定する。

3-3 血液検査

3-3-1 血液学的検査（注8）

（注8）すべての動物（瀕死又は途中死亡を除く。）について行う。血液学的検査として次の項目を検査する。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数その他の血液凝固能の指標など。なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間等がある。この他、化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば網状赤血球数、メトヘモグロビン等についても検査する。

3-3-2 血液生化学的検査（注9）

（注9）すべての動物（瀕死又は途中死亡を除く）について行う。採血前に一晩絶食することが望ましい。

要に応じて器具、機械等を使って行う。

更に、次の事項について検査を行う。

3-1 死亡率

3-2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水添加の場合）（注7）

（注7）週1回以上測定する。

3-3 血液検査

3-3-1 血液学的検査（注8）

（注8）血液学的検査として次の項目を検査する。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数その他の血液凝固能の指標など。なお、凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間等がある。この他、化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば網状赤血球数等についても検査する。

3-3-2 血液生化学的検査（注9）

（注9）血液生化学的検査として次の項目を検査する。総蛋白、A/G比、血糖、トリグリセライド、総コレステロール、尿素

血液生化学的検査として次の項目を検査する。
総蛋白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す2種以上の酵素（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、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ等）など。この他、化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、胆汁酸等についても検査する。

3-4 尿検査（注10）

（注10）毒性影響が予想されるか、尿の外観の観察結果によってそれが示唆されるときには、試験の最終週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、pH、潜血、蛋白、糖、沈渣等の尿検査を実施する。

3-5 病理学的検査

3-5-1 肉眼的検査及び器官重量（注11）

（注11）試験に使用したすべての動物は、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔とその内容の観察を含む肉眼的検査を十分に行う。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な保存液中に保存する。

すべての肉眼的病変部、脳*（大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位）、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓*、気管及び肺、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、副腎*、胃、小腸及び大腸（パイエル板を含む）、生殖腺（精巣*又は卵巣*）、副生殖器（子宮又は前立腺、精巣上体*）、膀胱、リンパ節（投与経路に関連するもの、投与経路から離れたもの）、筋肉に近い末梢神経（坐骨神経又は脛骨神経）、骨髓（大腿骨）及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官・組織。なお、*印を付した諸器官は、その重量を測定する。

3-5-2 病理組織学的検査（注12）

（注12）最高用量群と対照群のすべての動物で、保存したすべての器官・組織について行う。特に、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が見られた器官・組織については、他のすべての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査を行う。サテライト群でも、28日間の投与後に影響が見られた器官・組織について病理組織学的検査を行う。なお、基本的に肉眼的病変部については、すべて検査する。

窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、P、GOT、GPT、 γ -GTP、アルカリホスファターゼなど。この他、化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、LDH、コリンエステラーゼ、ホルモン、酸/塩基平衡、メトヘモグロビン、オルニチンデカルボキシラーゼ、総ビリルビンなどについても検査する。

3-4 尿検査（注10）

（注10）毒性影響が予想されるか、尿の外観の観察によってそれが示唆されるときには、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体の検査、必要に応じて尿量測定及び沈渣の顕微鏡的検査を行う。

3-5 病理学的検査

3-5-1 肉眼的検査及び器官重量（注11）

（注11）試験に使用したすべての動物は、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔とその内容の観察を含む肉眼的検査を十分に行う。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適当な保存液中に保存する。

脳*、下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺、肝臓*、腎臓*、脾臓*、副腎*、胃、精巣*又は卵巣*、膀胱、骨髓（大腿骨）及び肉眼所見、臓器重量などから標的器官と認められた器官・組織。なお、*印を付した諸器官は、その重量を測定する。

3-5-2 顕微鏡的検査（必要に応じて電子顕微鏡による検査、組織化学的検査を行う。）（注12）

（注12）病理組織学的検査は、高用量群と対照群の保存した器官・組織のうち少なくとも次のものについて行う。心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎及び肉眼所見、臓器重量などから標的臓器と認められた器官・組織。
このほか、3. 観察・検査の結果及び化学構造等により毒性影響が示唆されるものについても検査する。
高用量群で変化が認められた器官や組織については、他の用量群及び回復群についても実施する。

3-6 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、できるだけその死因を調べる。
また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺剖検を行う。

4. 結果のまとめ

試験の結果は様式4によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。また、可能な項目については、適切な統計学的手法を用いて処理する。

3-6 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、できるだけその死因を調べる。
また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに屠殺剖検を行う。

4. 結果のまとめ

試験の結果は様式1によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて処理する。