

ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験

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。

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。

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 $\pm 20\%$ 以内とする。

1-3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 5 匹以上とする。なお、途中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、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。

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。

2—3 投与期間

28 日間投与する。

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する(注 6)。また、共食いや自己融解による被験動物の減少を防ぐ。

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)

3—3 血液検査

3—3—1 血液学的検査(注 8)

3—3—2 血液生化学的検査(注 9)

3—4 尿検査(注 10)

3—5 病理学的検査

3—5—1 肉眼的検査及び器官重量(注 11)

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)

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にとよりまとめ、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当な統計的手法を用いて処理する。

注1 5あるいは6週齢の動物が得られない場合には、離乳後で8週齢を超えないものでもよい。

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。

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。

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。

- (1) 28日間の投与終了時までには重大な毒性が認められる場合
- (2) 高用量群において毒性影響が認められない場合

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。

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期、程度、持続時間をみる。

必要に応じて器具、機械等を使つて行う。

注7 週1回以上測定する。

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、ヘマトクリット、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などがある。

このほか、化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、網状赤血球数などについても検査する。

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。

このほか、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。

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。

尿検査は、投与期間中1回以上行う。

注11 試験に使用したすべての動物は、体表、開孔部、頭蓋、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、骨髄（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。

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器官と認められた器官・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。