

動薬協会発 38 号
平成24年1月31日

社団法人 日本動物用医薬品協会
会 員 各 位

社団法人 日本動物用医薬品協会
理事長 岡本 雄平
(公印省略)

「薬事法関係事務の取扱いについて」の一部改正について

当協会の業務運営につきましては、日頃からご支援、ご協力を頂きお礼申し上げます。
さて、標記のことについて、農林水産省動物医薬品検査所長より通知がありましたので
お知らせします。



23動薬第3367号
平成24年1月30日

社団法人 日本動物用医薬品協会理事長 殿

農林水産省動物医薬品検査所長



「薬事法関係事務の取扱いについて」の一部改正について

薬事法（昭和35年法律第145号）第83条第1項の規定により読み替えて適用される同法第14条第1項に基づく動物用医薬品等の製造販売承認申請の際に添付すべき資料を作成するための試験法のガイドライン等（以下「ガイドライン等」という。）については、「薬事法関係事務の取扱いについて」（平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知）の別添8により定めているところです。

今般、別添8の「8 安定性に関する試験」及び「9 動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン」について、そのガイドラインが適用される動物用医薬品の範囲を明確にするため及び「9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験」について、「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力」

（International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Resistration of Veterinary Medicinal Products。以下「VICH」という。）の既存の方針である動物福祉に関する3Rの原則を追加するために、別紙新旧対照表のとおり改正しましたので、貴会会員への周知方よろしくお願ひします。

なお、改正された「8 安定性に関する試験のガイドライン」については、平成25年1月30日以降に開始される安定性に関する試験に適用されます。



薬事法関係事務の取扱いについて（平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知）

改正案	現行
<p>別添8 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン 等</p> <p>目次</p> <p>1～7 (略)</p> <p>8 安定性に関する試験</p> <p>8-1～8-6 (略)</p> <p>8-7 安定性に関する試験</p> <p>9 動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン (削除)</p> <p>9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験</p> <p>(1) 試験への一般的アプローチ (VICH GL33)</p> <p>(2) 反復投与 (90日) 毒性試験 (VICH GL31)</p> <p>(3) 反復投与 (慢性) 毒性試験 (VICH GL37)</p> <p>(4) 生殖毒性試験 (VICH GL22)</p> <p>(5) 発生毒性試験 (VICH GL32)</p> <p>(6) 遺伝毒性試験 (VICH GL23)</p> <p>(7) がん原性試験 (VICH GL28R)</p> <p>(8) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の一般的アプローチ (VICH GL36)</p> <p>9-2 食用に供する動物を対象としない動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン</p> <p>(1) 急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験</p> <p>(2) 生殖・発生毒性試験</p> <p>(3) 変異原性試験</p> <p>(4) がん原性試験</p> <p>10～16 (略)</p>	<p>別添8 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン 等</p> <p>目次</p> <p>1～7 (略)</p> <p>8 安定性に関する試験</p> <p>8-1～8-6 (略)</p> <p>9 動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン <u>(1) 急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験</u> <u>(2) 生殖・発生毒性試験</u> <u>(3) 変異原性試験</u> <u>(4) がん原性試験</u></p> <p>9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験</p> <p>(1) 試験への一般的アプローチ (VICH GL33)</p> <p>(2) 反復投与 (90日) 毒性試験 (VICH GL31)</p> <p>(3) 反復投与 (慢性) 毒性試験 (VICH GL37)</p> <p>(4) 生殖毒性試験 (VICH GL22)</p> <p>(5) 発生毒性試験 (VICH GL32)</p> <p>(6) 遺伝毒性試験 (VICH GL23)</p> <p>(7) がん原性試験 (VICH GL28R)</p> <p>(8) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の一般的アプローチ (VICH GL36)</p> <p>10～16 (略)</p>

1 分析法バリデーションに関するテキスト
(略)

8 安定性に関する試験

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される安定性試験について、標準的な実施方法を示したものである。8-1は、新有効成分含有動物用医薬品(8-7が適用されるものを除く。以下「8 安定性に関する試験」において同じ。)の原薬及び製剤に適用する。8-2～8-6は、8-1に付属するガイドラインであり、8-1と共に利用するものである。8-2～8-6を適用される動物用医薬品の範囲は各ガイドライン中に示されている。8-7は、8-1～8-6が適用されない動物用医薬品に適用する。

(削除)

1 分析法バリデーションに関するテキスト
(略)

8 安定性に関する試験

(1) 安定性に関する試験の添付資料の提出範囲
本ガイドラインにおいて提出するものとす安定性試験資料は、「8-1 動物用新原薬及び製剤の安定性試験」(VICH GL3R)の試験資料をもって代えることができるものとする。

ア 「薬事法関係事務の取扱いについて」(平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知。以下「局長取扱い通知」という。)第3の2別表第3及び別表第4の区分の1、2、3又は5に該当する医薬品(同区分の3に該当する医薬品にあっては、剤型が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。)については、(2)のアの長期保存試験及びウの苛酷試験の試験成績を提出するものとする。

イ 局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の7、8、9、10、11又は12(同区分の9、10、11又は12に該当する生物学的製剤にあっては、菌(ウイルス)株、組成及び剤型が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。)に該当する医薬品については、(2)のアの長期保存試験の試験成績を提出するものとする。

ウ 局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の3、4、6、9、10、11、12又は13に該当する医薬品(同区分の3に該当する医薬品にあっては剤型が、同区分の9、10、11又は12に該当する生物学的製剤にあっては菌(ウイルス)株、組成及び剤型が既に承認されているものと同類のものに限る。)に係る長期保存試験については、品質を短期間で推定するには不相当と判断される場合又は3年を超えて安定であることを確認しようとする場合を除き、(2)のイの加速試験であって差し支えないものとする。

エ なお、局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の2に該当する医薬品のうち、国内において人用として承認され、かつ再審査が終了している

ものと同じ成分、組成、剤型（形状、容量及び重量を含む）、規格（原料規格を含む。）、製造方法、貯法、容器及び有効期間が当該人用医薬品と同じ場合において、人用の製造販売承認申請で添付された製剤の安定性試験成績を用いることで差し支えないこととする（原薬の安定性試験を添付する必要はない。）。

ただし、人用医薬品と主剤が同一であっても、安定剤、賦形剤等の種類又は量が異なる場合、あるいは安定性が異なると考えられる場合は、動物用申請製剤を用いた（2）のAの長期保存試験を実施することとする。

人用医薬品の安定性試験成績を添付する場合、当該資料の本文末尾等の余白部分に、人用医薬品の製造販売承認申請の際に使用された資料である旨の申請者等の陳述及び署名を記さなければならない。

オ また、有効期間の欄に同期間として1年以上を設定し、承認申請を行う場合にあっては、（2）のAの長期保存試験の途中であっても、1年以上の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

カ また、有効期間の欄に同期間として1年以上を設定し、承認申請を行う場合にあっては、（2）のAの長期保存試験の途中であっても、1年以上（生物学的製剤の場合、試験開始時を含め3時点の安定性試験成績があれば、6か月以上）の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

なお、生物学的製剤において、同一の製造販売業者で製造販売し、再審査が終了している既承認製剤とその有効成分の種は同一で製造用株のみが異なり、その他の成分及び分量、及び製造方法が同一である製剤を既承認製剤を製造している製造業者で製造する場合、承認申請時に安定性試験成績の添付を要しないこととし、既承認製剤と同じ保存条件下において暫定的に既承認製剤と同じ有効期間を設定して差し支えないこととする。安定性試験成績は、承認後に提出することとし、暫定的に定めた有効期間が担保できない場合は、安定性が確認できる期間まで短縮することとする。

（2）安定性に関する試験方法

ア 長期保存試験

検体：原則として最終製品（局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の1に該当する医薬品にあっては、原薬及び最終製品）

ただし、安定性が保証できれば、分包品又は内袋品を用いて差し支えない。また、包装材料及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も経時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のものを検体とする。

検体数：3ロット、1ロット1検体以上（注1）
測定：繰返し回数：測定法の精度や再現性に基つき適切に決定する。（注2）
保存条件：室温（承認申請書に貯蔵方法として特別な条件を設定している場合には当該条件）

試験期間：承認申請する医薬品の有効期間、貯蔵方法、流通形態及び使用方法等を十分考慮に入れた期間とする。

測定時点：試験開始時、開始後2年目までは6か月を超えない範囲内で、その後は1年を超えない範囲内で定期的に行う。

測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目
ただし、経時的に変化しないことが明らかでない項目については、期間の途中における測定を省略できる。

イ 加速試験

検体：原則として最終製品

ただし、安定性が保証できれば、分包装又は内袋品を用いて差し支えない。また、包装材質及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も経時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のものを検体とする。

検体数：3ロット、1ロット1検体以上

測定：繰返し回数：測定法の精度や再現性に基つき適切に決定する。

保存条件：原則として40℃±2℃、75%RH±5%

ただし、水溶液剤又は密封容器の製品については、湿度条件を除外してよい。

試験期間：6か月間以上（事項変更承認申請の場合で変更前の最終製品と比較して試験する場合にあつては、3か月間以上）

測定時点：原則として試験開始時を含め4時点以上

測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかでない項目については、期間の途中における測定を省略できる。

ウ 苛酷試験

検体：原則として最終製品から包装を除いたもの（局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の1に該当する医薬品にあつては、原薬及び最終製品から包装を除いたもの）また、必要に応じて包装をした形態のものをおわせて用いる。

検体数：1ロット、1ロット1検体以上

保存条件：光、極端な温度変動や湿度変動及び凍結によって品質の変化が予想される製剤については、その影響を検出できる条件を設定する。

試験期間：原則として1か月間程度

測定時点：原則として試験開始時を含め4時点以上

測定項目：少なくとも承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目並びにその他分解生成物の検索及び品質管理上必要と判断される項目
ただし、経時的に変化しないことが明らかでない項目については、期間の途中を省略できる。

(注1) 検体とは、安定性試験を行うために選定したロットから採取し保存する原薬又は製剤をいう。

(注2) 測定は、測定回数とは、各検体から測定用に試料を採取する段階から測定を実施、終了するまでの全過程を繰り返す回数をいう。

8-1-1~8-6 (略)

8-7 安定性に関する試験

(1) 安定性に関する試験の添付資料の提出範囲

本ガイドラインにおいて提出するものとする安定性試験資料は、「8-1 動物用新原薬及び製剤の安定性試験」(VICH GL3R) 及びその付属文書(8-2~8-6)の試験資料をもって代えることができるものとする。

ア 「薬事法関係事務の取扱いについて」(平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知。以下「局長取扱い通知」という。) 第3の2別表第3及び別表第4の区分の3又は5に該当する医薬品(同区分の3に該当する医薬品にあっては、剤型が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。)については、(2)のアの長期保存試験及びウの苛酷試験の試験成績を提出するものとする。

イ 局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の7(安定性試験法ガイドライン8-1及び8-5が適用されるものを除く。)、8、9、10、11又は12(同区分の9、10、11又は12に該当する生物学的製剤にあっては、菌(ウイルス)株、組成及び剤型が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。)に該当する医薬品については、(2)のアの長期保存試験の試験成績を提出するものとする。

ウ 局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の3、4、6、9、10、11、12又は13に該当する医薬品(同区分の3に該当する医薬品にあっては剤型が、同区分の9、10、11又は12に該当する生物学的製剤にあっては菌(ウイルス)株、組成及び剤型が既に承認されているものと同類のものに限る。)については、(2)のアの長期保存試験の試験成績を提出するものとするが、品質を短期間で推定するには不適当と判断される場合又は3年を超えて安定であることを確認しようとする場合を除き、(2)のイの加速試験の試験成績で差し支えないものとする。

エ なお、局長取扱い通知第3の2別表第3及び別表第4の区分の2に該当する医薬品のうち、国内において人用として承認され、かつ再審査が終了しているものと同じ成分、組成、剤型（形状、容量及び重量を含む。）、規格（原料規格を含む。）、製造方法、貯法、容器及び有効期間が当該人用医薬品と同じ場合において、人用の製造販売承認申請で添付された製剤の安定性試験成績を用いることで差し支えないこととする（原薬の安定性試験を添付する必要はない。）。

ただし、人用医薬品と主剤が同一であっても、安定剤、賦形剤等の種類又は量が異なる場合、あるいは安定性が異なると考えられる場合は、安定性試験法ガイドライン8-1~8-6が適用される。

人用医薬品の安定性試験成績を添付する場合、当該資料の本文末尾等の余白部分に、人用医薬品の製造販売承認申請の際に使用された資料である旨の申請者等の陳述及び署名を記さなければならない。

オ また、有効期間の欄に同期間として1年以上を設定し、承認申請を行う場合にあっては、(2)のアの長期保存試験の途中であっても、1年以上の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までにその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

カ また、有効期間の欄に同期間として1年以上を設定し、承認申請を行う場合にあっては、(2)のアの長期保存試験の途中であっても、1年以上（生物学的製剤の場合、試験開始時を含め3時点の安定性試験成績があれば、6か月以上）の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までにその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

なお、生物学的製剤において、同一の製造販売業者で製造販売し、再審査が終了している既承認製剤とその有効成分の種は同一で製造用株のみが異なり、その他の成分及び分量、及び製造方法が同一である製剤を既承認製剤を製造している製造業者で製造する場合、承認申請時に安定性試験成績の添付を要しないこととし、既承認製剤と同じ保存条件下において暫定的に既承認製剤と同じ有効期間を設定して差し支えないこととする。安定性試験成績は、承認後に提出することとし、暫定的に定めた有効期間が担保できない場合は、安定性が確認できる期間まで短縮することとする。

(2) 安定性に関する試験方法

ア 長期保存試験

検体：原則として最終製品

ただし、安定性が保証できれば、分包品又は内袋品を用いて差し支えない。また、包装材料及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も経時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のものを検体とす

る。

検体数：3ロット、1ロット1検体以上（注1）
測定の繰り返し回数：測定法の精度や再現性に基づき適切に決定する。（注2）
保存条件：室温（承認申請書に貯蔵方法として特別な条件を設定している場合には当該条件）
試験期間：承認申請する医薬品の有効期間、貯蔵方法、流通形態及び使用方法等を十分考慮に入れた期間とする。
測定時点：試験開始時、開始後2年目までは6か月を超えない範囲内で、その後は1年を超えない範囲内で定期的に行う。
測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中における測定を省略できる。

イ 加速試験

検体：原則として最終製品

ただし、安定性が保証できれば、分包品又は内袋品を用いて差し支えない。また、包装材料及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のことを検体とする。

検体数：3ロット、1ロット1検体以上

測定の繰り返し回数：測定法の精度や再現性に基づき適切に決定する。

保存条件：原則として40℃±2℃、75%RH±5%

ただし、水溶液剤又は密封容器の製品については、湿度条件を除外してよい。

試験期間：6か月間以上（事項変更承認申請の場合で変更前の最終製品と比較して試験する場合には、3か月間以上）

測定時点：原則として試験開始時を含め4時点以上

測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中における測定を省略できる。

ウ 苛酷試験

検体：原則として最終製品から包装を除いたもの。また、必要に応じて包装をした形態のものをあわせて用いる。

検体数：1ロット、1ロット1検体以上

保存条件：光、極端な温度変動や湿度変動及び凍結によって品質の変化が予想される製剤については、その影響を検出できる条件を設定する。

試験期間：原則として1か月間程度

測定時点：原則として試験開始時を含め4時点以上

測定項目：少なくとも承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目並びにその他分解生成物の検索及び品質管理上必要と判断される項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中を省略できる。

(注1) 検体とは、安定性試験を行うために選定したロットから採取し保存する原薬又は製剤をいう。

(注2) 測定の繰り返し回数とは、各検体から測定用に試料を採取する段階から測定を実施、終了するまでの全過程を繰り返す回数をいう。

9 動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される毒性試験について、標準的な実施方法を示したものである。9-1は、食用に供する動物を対象とする動物用医薬品に適用し、動物用医薬品が残留する食品を採取したヒトの安全性を確保するために実施する毒性試験の標準的な方法を定める。9-2は、食用に供する動物を対象としない動物用医薬品及び食用動物を対象とする動物用医薬品の急性毒性試験に適用する。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要があることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資するものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

(削除)

9 動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される毒性試験について、標準的な実施方法を示し、動物用医薬品の安全性の適正な評価に資することを目的とする。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要があることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資するものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

(1) 急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

原則として全ての新動物用医薬品について、小動物を用いて試験を実施すること。

ア 試験動物

(ア) 種及び系統の選択に当たっては、寿命、各種自然発生病患の発生頻度、毒性が既知の物質に対する感受性等を考慮する。

(イ) 同一検体について急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用することが望ましい。

イ 試験方法

(ア) 急性毒性試験

① 動物

1種以上の順調に発育した動物とする。通常、未経産で非妊娠のラットの雌が用いられる。

② 動物数

試験の目的に合致する適当な数とする。

③ 投与経路

原則として、経口投与とする。臨床適用経路が非経口の場合には、当該臨床適用経路についても実施する。なお、臨床適用経路が特殊で動物での実験が不可能な場合には他の適切な経路とする。

また、経口投与は原則として強制経口投与とし、この場合には、通常検体投与前に一定時間動物を絶食させるものとする。

④ 用量段階

用量-反応関係及びおおよその50%致死量(LD₅₀)を求めめるに足る用量段階を設定する。なお、通常、投与上限量は2,000mg/kgとする。

⑤ 投与回数

原則として1回とする。

⑥ 観察期間

原則として14日間とする。

⑦ 検索方法

a 全例について、少なくとも投与後30分以内に1回、24時間までは定期的に、その後は毎日、一般状態を観察する。

b 体重は投与直前と、少なくとも週に1回以上測定する。

c 観察期間終了時(又は死亡時)に全例を剖検し、全部の器官・組織を肉眼的に観察し、所見を記録する。

(イ) 亜急性毒性試験

① 動物

1種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。

一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

雌雄各々について、1群5匹以上とする。

動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。

④ 用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

急性毒性試験又は予備的な短期間の連続投与試験の結果を参考に、有害反応の種類と強度を明らかにし、中毒量、最小中毒量及び無毒性

量 (No Observable Adverse Effect Level : NOAEL) を求め得る投与量及び群数とする。なお、中毒量は、一部の動物を致死させるか又ははつきりした毒性変化が現れる量とし、最小中毒量は何らかの毒性変化が現れる量とする。また、無毒性量 (NOAEL) は、いずれの動物にも毒性変化が現れない量とする。

飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥ 投与期間

3週間以上とし、投与は週7日とする。

⑦ 検索方法

a 各群の全例について、一般状態を詳細に毎日観察し、体重を週1回以上測定する。

b 投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を週1回以上測定する。

c 投与期間中、各群の全部又は一部の例について、1回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、検体の化学構造、薬理作用及び一般状態から類推して、適切な臨床検査を加えることが望ましい。

d 投与期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。

e 投与期間中に死期の迫った例については、速やかにと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。

なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが望ましい。

f 投与終了時の生存例については、24時間後にと殺剖検し、全例について器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、できる限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それぞれ国際的に採用されている方法及び測定単位を採用する。

また、筋肉、脂肪、肝臓、腎臓等について検体等の残留量を測定することが望ましい。

(ウ) 慢性毒性試験

① 動物

1 種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。
一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

雌雄各々について、原則として1群10匹以上とする。

動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。

③ 投与経路

臨床適用経路又は経口投与とする。

経口投与の場合には、飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法又は強制投与による方法がある。

④ 用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

重急性毒性試験の結果を参考に、何らかの毒性変化が現れる量及び無毒性量 (NOEL) を求め得る投与量及び群数を決定する。

飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥ 投与期間

3か月以上とし、投与は週7日とする。

⑦ 検査方法

a 各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

b 投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

c 投与期間中、各群ごとに一定数の例を任意に選び、1回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、必要があればその他の臨床検査を実施する。

d 投与期間の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検査を行う。

病理組織学的検査の対象となる器官・組織は次のとおりであるが、肉眼所見等からその必要性が認められないと判断される場合には、その一部を省略できる。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、
胸腺、気管・肺及び気管支、心臓*、甲状腺及び上皮小体、舌、
食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓*、脾臓*、腎臓*、
副腎*、膀胱、精囊、前立腺*、精巣*、卵巣*、子宮、
陰、脳*、下垂体*、脊髄、眼球、ハダ腺、その他肉眼で変
化が認められた器官・組織

上記の器官・組織のうち*印を付したものについては、その重
量を測定する。

e 投与期間中に死期の迫った例については、速やかにと解剖検し、
dのとおり器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学
的検索を行う。

なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学
的検査を行うことが望ましい。

f 投与終了時の生存例については、と解剖検し、dのとおり各群
の全例について器官・組織の肉眼的観察及び重量の測定を行う。
病理組織学的検索は、原則として対照群及び最高用量群の全例に
ついて行うが、他の試験群において、肉眼で変化が認められた器
官・組織がある場合又は最高用量群で観察された変化から考えて
必要性のある場合には、他の試験群の全例についても当該器官・
組織の病理組織学的検索を行う。なお、と殺時に血液を採取して、
血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、でき
る限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それ
ぞれ国際的に採用されている方法及び測定単位を採用する。

(2) 生殖・発生毒性試験

原則として新動物用医薬品について、「(ア) 催奇形性試験」を実施すること。
本試験の成績により必要と考えられる場合又は別に知られている知見等から雌雄
動物の生殖能力や分娩など生殖の過程に対して悪影響を及ぼすことが疑われる動物
用医薬品については、「(イ) 一世代生殖毒性試験」を実施すること。妊娠前から離
乳期までにわたる生殖過程の期間を3区分し、それぞれを投与期間として、「(ア) 周
妊娠前及び妊娠初期投与試験」、「(イ) 胎仔の器官形成期投与試験」及び「(ウ) 周
産期及び授乳期投与試験」を実施することにより、生殖・発生への悪影響を正確に
把握できるように配慮した試験法を採用しても差し支えない。

ア 試験動物

(ア) 種及び系統の選択に当たっては、受胎能などの生殖に関する知見、自然発生
奇形の発生頻度、生殖・発生に悪影響を及ぼすことが明らかにされている物質
に対する感受性等を考慮する。

(イ) 奇形子の自然発現率の低い種及び系統を選択することが望ましい。

(ウ) (イ) 及び (ウ) の試験に共通して用いられる動物においては、種及び系統が同一であることが望ましい。

イ 試験方法

(ア) 催奇形性試験

① 動物

ラット又はマウスなどのげっ歯類及びウサギなどの非げっ歯類からそれぞれ選んだ各1種以上の雌動物とする。

一般には、試験が比較的容易にでき、かつ、一般的な代謝様式等が比較的知られている動物種が用いられる。

② 動物数

ラット又はマウスでは1群20匹以上、ウサギでは1群8匹以上とする。動物数は、妊娠が成立した個体の数を意味する。

ラット、マウス又はウサギ以外の動物種を用いる場合には、原則として評価に耐える知見が得られると期待される動物数とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制経口投与を原則とする。

強制投与方法は、確実に一定量を投与できる点などで飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法に勝っている。

臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。

④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、母動物及び胎仔の両方ともに障害が現れない量とする。中間用量(複数のこともある。)は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。用量段階のうちには、当該使用動物で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、原則としてそのみを与える群とする。なお、陽性対照には催奇形性を有することが明らかとされている物質を、比較対照には、化学構造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

胎子の器官形成期の間連日投与を行う。

⑦ 検索方法

- a 試験期間中、母動物については、各群の全例についてその生死及び一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。
- b 母動物は全例を妊娠末期に剖検し、妊娠の成立、胎子の死亡の有無を検索し、かつ、生存胎子については体重などの測定及びその形態学的検索を行う。死亡胎子については、できる限り死亡時期を推定する根拠となる所見を記録する。また、母動物については、器官・組織の肉眼的観察を行う。

(イ) 一代生殖毒性試験

① 動物

げっ歯類から選んだ1種以上の雌雄の動物とする。
一般的にはラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

1群 20 匹以上の雄と妊娠末期において原則として1群 20 匹以上の妊娠動物を確保するために必要な雌とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。

④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、親動物、胎子又は出生子のいずれにも障害が現れない量とする。中間用量（複数のこともある。）は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。

用量段階のうちには、当該使用動物で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等が必要とする場合には、原則としてそのみを与える群とする。なお、陽性対照には生殖に悪影響を及ぼすことが明らかになっている物質を、比較対照には、化学構造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

雌雄とも8週齢時から8週間以上連日投与してから交配に当てる。交配

は3週間を限度として同一の雄と雌を1対1で同居させる。

雄については、交配期間中も連続投与し、雌については、交配期間中、妊娠期間中及び分娩後3週間における新生子の離乳までの期間投与を続ける。

⑦ 検索方法

a 試験期間中、各群の全例についてその生死及び一般状態を観察し、母動物については、体重及び摂餌量を測定する。

b 交配期間の終了した雄はと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。交尾が成立しなかった雌雄についてはその原因を調査する。

交尾率及び受胎率を求める。

これらは、通常次の算出法による。

交尾率 = (交尾動物 / 同居動物) × 100

受胎率 = (受胎動物 / 交尾動物) × 100

c 各群の全例を分娩哺育させる。

分娩に際しては、分娩の障害や遅延の徴候などについて観察する。出産率を求める。

これは、通常次の算出法による。

出産率 = (生子出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

d 新生子については、産子数、その生死、性別及び外表における変化などを検索し、体重を測定する。

同腹生子数を調整する場合には、生後比較的早い時期に、1母体当たり雄と雌がほぼ同数から成る一定匹数を無作為に採り、余分な子を淘汰する。ラット又はマウスでは、通常生後4日齢で8匹程度にする。

e 出生子については、成長及び発達並びに特異な症状の有無や行動の異状などに関する検索を行う。

出生子に異常所見が見いだされた場合には、必要に応じて、新たに乳母哺育試験などを行って生後のいずれの時期における影響によるかを分析すべきである。

成長及び発達については、形態、機能及び行動に関する検索を行う。また、必要に応じて更に長期間の観察を行う。出生から離乳までの間に出生率、生存率及び離乳率を求める。

これらは通常次の算出法による。

出生率 = (出産生子数 / 着床頭数) × 100

4日生子率 = (生後4日の生子数 / 出産子数) × 100

離乳率 = (離乳時生子数 / 生後4日の生子数又は淘汰直後の生子数) × 100

f 処置された母動物については、適当な時期に剖検し、器官・組織の

肉眼的観察を行う。なお、必要に応じて検体の投与を続けて多世代に
関する検査を行う。

(3) 変異原性試験

原則として新動物用医薬品について、遺伝子突然変異誘発性を指標とする
「(ア) 細菌を用いる復帰変異試験」及び染色体異常誘発性を指標とする「(イ)
哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験」を実施すること。ただし、(ア) 又
は (イ) の試験の結果、変異原性が疑われる場合には「(ウ) マウスを用いる小
核試験」を実施すること。

なお、以上の試験及び他の毒性試験の結果並びに薬理作用に関する試験の結
果から必要と認められる場合には、その他の変異原性試験を追加して行うこと
が望ましい。

試験方法

(ア) 細菌を用いる復帰変異試験

① 菌株

ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) の TA1535、TA1537、TA98、TA100
など及び大腸菌 (*E. coli*) の WP2uvrA などの数菌株とする。

② 用量段階

5～6段階の試験用量を設定するとともに、別に対照を置く。
最高用量は原則として5 mg/プレートを限度とし、抗菌性を示す薬
物では抗菌性を示す用量とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知
変異原物質 (S9 mix を必要としない物質と必要とする物質) を用いる。

④ 代謝活性化

S9 mix を加えた試験と加えない試験とを平行して行う。哺乳類 (通
常ラット) に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S9
を調製する。この S9 に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。

⑤ 試験方法

プレインキュベーション法又はプレート法のいずれかとする。

抗生物質など特に強い抗菌性を示す薬物については、試験に用いる
菌とインキュベートした後洗浄し、更に、菌を再び懸濁して突然変異
誘発数と生存菌数とから突然変異誘発頻度を求めることが望ましい。

⑥ 結果

復帰変異コロニー数の実測値とその平均を表示 (図を含む。) する。

(イ) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

① 細胞

哺乳類の初代又は継代培養細胞を用いる。
チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞 (CHL、CHO) など、できるだけ感受性の高いものを使用することが望ましい。

② 用量段階

3段階以上の試験用量を設定する。
最高用量は細胞増殖(又は分裂)が50%抑制される濃度を指標とし、その前後の用量を用いる。
細胞毒性が認められない場合は、0.01mol/L相当又は5 mg/mLの濃度を限度とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。
陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知染色体異常誘発物質を用いる。

④ 代謝活性化

適切な代謝活性化法を併用することが望ましい。
哺乳類(通常ラット)に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓からS9を調製する。このS9に補酵素などを加えたS9 mixを用いる。

⑤ 検索方法

検体処理後、適切な時期に染色体標本作製する。
原則として、用量当たり2系列の培養を用いる。
1系列当たり100個の分裂中期像について、染色体の形態異常及び倍索性細胞について検索する。
形態異常では染色分体又は染色体に見られる構造異常の種類を明記する。

⑥ 結果

染色体異常を持つ細胞の出現頻度又は細胞当たりの染色体異常頻度を表示(図を含む。)する。

(ウ) マウスを用いる小核試験

げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験で代行してもよい。

① 動物

原則として純系又は均一の雄を用いる。

② 動物数

1群5匹以上とする。

③ 投与経路

腹腔内投与又は経口投与とする。

経口投与は、原則として強制投与とする。

④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定する。
最高用量は、体重増加の抑制など何らかの毒性徴候が現れる用量とする。毒性徴候が現れない場合には、2,000mg/kgを最高用量とする。

⑤ 対照群

陰性及び陽性対照を置く。
陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質を用いる。

⑥ 投与回数

単回及び4～5回の連続投与を行う。ただし、連続投与する場合は適切な単一用量を設定する。

⑦ 検索方法

a 検体投与後、適切な時期に各群の全例をと殺し、骨髓塗抹標本を作製する。

b 原則として個体当たり1,000個の多染性赤血球について、小核の有無を検索する。同時に全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を求める。多染性赤血球の代わりに網〔状〕赤血球の頻度を求めてもよい。

⑧ 結果

小核を有する多染性赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を表示する。

陽性結果が得られた場合には、用量依存性について図示する。

(4) がん原性試験

原則として次のいずれかによりがん原性が疑われる場合には、がん原性試験を実施すること。

(イ) 化学構造又は薬理作用

(ロ) 毒性試験の結果

(ハ) その他

ア 試験動物

① 種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、自然発生腫瘍の発生頻度、既知がん原性物質に対する感受性を考慮する。

② 同一検体についてがん原性予備試験及びがん原性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用する。

イ 試験方法

① 動物

2種以上の雌雄の動物とする。なお、同一週齢で、順調に発育した6

週齢までの動物を用いることが望ましい。

現在のところ、一般には、ラット、マウス又はハムスターが用いられる。

離乳後できるだけ早い時期に開始することが望ましい。

② 動物数

雌雄各々について、1群50匹以上とする。各群への動物の割付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。

検体を飼料に混入して投与する場合には、飼料中の検体濃度は最高5%までとする。

④ 用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は予備試験の血急性毒性試験で定めたとし、最低用量として当該使用動物種で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量を勘案して設定する。中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましい。

一般には、最低用量は、最高用量の10%以上であることが望ましい。ただし最低用量と推定臨床常用量とが著しく掛け離れている場合には、最高用量の10%未満の用量を別途設けてもよい。

検体を飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量又は飲水量を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は3か月に1回以上測定し、検体採取量を算出する。なお、試験開始前及び試験中に適宜検体の純度、安定性及び夾雑物を可能な限り定性的又は定量的に分析する。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、そのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥ 投与期間

ラットでは24か月以上30か月以内、マウス及びハムスターでは18か月以上24か月以内とし、投与は原則として週7日とする。

強制投与の場合、実務的な見地から週5日以上の投与でも容認される。

⑦ 試験期間

投与終了時又は投与終了後1～3か月までとする。ただし、試験の最長期間は、ラットでは30か月、マウス及びハムスターでは24か月とし、最低用量群又は対照群の累積死亡率が75%になった場合には、その時点で生存例をと殺し、試験を終了する。

腫瘍以外の原因による死亡率が、投与開始後ラットでは24か月、マウス及びハムスターでは18か月の時点で50%以上であることを要する。

いずれの群においても、動物の10%以上が自己融解、共食い又は飼育上の問題で失われないこと。

したがって、試験期間中に衰弱動物や死期の迫った動物が見いだされた場合には、隔離又はと殺解剖等の配慮が必要である。

⑧ 検索方法

a 各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

b 試験期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

病理組織学的検査は、次の器官・組織について行う。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、椎骨又は大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管・肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、眼球、脳、下垂体、脊髄、その他肉眼で腫瘍性病変が認められた器官・組織。

腫瘍性病変の記載に際しては、腫瘍発生に至る各種変化（前がん病変）の所見も付け加える必要がある。

c 試験期間中に死期の迫った例については、速やかに隔離又はと殺剖検し、bのとおり器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。

d 試験終了時の生存例については、速やかに剖検し、各群の全例について、bのとおり器官・組織の肉眼的観察を行う。

病理組織学的検索は、原則として試験群及び対照群について行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標

本を検索する。

9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験

(1) 試験への一般的アプローチ (VICH GL33)

ア 緒言

(ア) 目的

このガイドラインは、動物用医薬品を投与した動物に由来する食品を摂取したヒトにおける食品の安全性を確保するに当たっての試験へのアプローチを概説する。これらの試験は、試験に用いる動物の数を少なくし、かつ、資源を保護しながらヒト食品の安全性を確保するに十分な量の毒性学的データを提供するはずである。

VICH は、3R の原則に基づき、被験動物を最小とすよう努める。3R の原則とは、研究に使用する動物の代替（動物を使用しない試験系又はより生物系統発生的に低い種で代替する）、改善（動物の苦痛を減少又は消滅させる）、及び削減（必要な試験動物数を削減する）である。VICH が表明する目標の一つは、動物用医薬品の承認のための規制の要求の調和を通じて不必要な試験及びその繰り返しをなくす努力をすることであり、製品の開発及び承認のために使用される動物数の減少に確かに通じる目標である。可能な限り、柔軟性、最少の動物数並びに *in vivo* 及び *in vitro* 代替試験が推奨される。

以下に推奨する試験を計画及び実施する際には、被験動物の福祉のため、のしかるべき配慮がなされることが推奨される。以下に述べる試験における動物の使用は、これらのプロトコールに忠実に、一般的な倫理規範及び実験動物の使用と保護に関する国の基準に従ってなされるべきである。

代替試験のプロトコールのバリデーションは VICH に付託されていないが、VICH は、その国際的な地位と影響力がバリデートされた代替法の使用を奨励する独特の機会を提供することを認識している。この目的のために、動物実験を含むこれらのガイドラインを作成した安全性専門家作業部会は、動物福祉、特に動物試験の代替、改善、削減を考慮するという責務を果たす。

VICH は、バリデートされた代替試験法のプロトコールの開発を考慮に入れるために、ガイドラインを定期的に見直し、適切であれば、最近開発された代替試験法に合うようにガイドラインを改正する。

(イ) ~ (ウ)

(略)

9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験

(1) 試験への一般的アプローチ (VICH GL33)

ア 緒言

(ア) 目的

このガイドラインは、動物用医薬品を投与した動物に由来する食品を摂取したヒトにおける食品の安全性を確保するに当たっての試験へのアプローチを概説する。これらの試験は、試験に用いる動物の数を少なくし、かつ、資源を保護しながらヒト食品の安全性を確保するに十分な量の毒性学的データを提供するはずである。可能な限り、柔軟性、最少の動物数並びに *in vivo* 及び *in vitro* 代替試験が推奨される。

(イ) ~ (ウ)

(略)

イ ガイドライン

試験には、全身毒性、生殖毒性、発生毒性、遺伝毒性、がん原性、及びヒト腸内細菌叢に及ぼす影響が含まれる。一般に、経口投与が *in vivo* 試験での選択すべき経路である。このガイドラインは、どうしてこのようなデータを提出する必要がないかという科学的な理由を含めて、安全性を同等に保証するであろう代替アプローチの可能性を排除するものではない。

このガイドラインに記載されている試験は国内スタンダード及び/又は GLP 対応を受けべきである。

(ア) 基本的試験

- ① 反復投与毒性試験 (VICH GL31 及び VICH GL37)
反復投与毒性試験は、a) その化合物及び/又はその代謝物に対する反復及び/又は蓄積ばく露による毒性作用、b) ばく露の用量及び/又は期間と影響の出現率及び重度との関連性、c) 毒性及び生物応答を伴う用量、及び d) NOAEL を明らかにするために実施する。

- ② 生殖毒性試験 (VICH GL22)
哺乳動物の生殖に及ぼすあらゆる影響を検出するために、多世代生殖試験が計画される。この試験には、雌雄の生殖能、交尾、受胎、着床、妊娠維持期間、分娩、哺乳、生存、出産から哺乳までの子の成長と発育、性的成熟及びその後の成熟動物としての子の生殖機能に及ぼす影響が含まれる。

- ③ 発生毒性試験 (VICH GL32)
発生毒性試験の目的は、着床から妊娠全期間を通して帝王切開前日までばく露した後の妊娠雌及び胚と胎子の発生に及ぼすあらゆる有害作用を検出することにある。このような有害作用には、非妊娠雌に観察される毒性に対応する毒性の増加、胚一胎子死、胎子成長の変化及び胎子の構造的変化が含まれる。

- ④ 遺伝毒性試験 (VICH GL23)
遺伝毒性試験の組合せは、細胞内の遺伝的情報損傷能を有する物質を識別するために用いられる。遺伝毒性があると考えられる物質は、潜在的がん原性物質とみなされる。初期胚細胞に遺伝的損傷をもたらし物質は、生殖/発生にも影響を及ぼす可能性がある。

(イ) 追加試験

これらの試験は、化合物の構造、系統、作用機序に基づく安全性の懸念に対応するために要求される。これらの試験の例を以下に示す。

- ① ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響試験 (VICH GL36)
抗菌活性のある化合物については、残留薬剤のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにするための情報の情報が要求される。

イ ガイドライン

試験には、全身毒性、生殖毒性、発生毒性、遺伝毒性、がん原性、及びヒト腸内細菌叢に及ぼす影響が含まれる。一般に、経口投与が *in vivo* 試験での選択すべき経路である。このガイドラインは、どうしてこのようなデータを提出する必要がないかという科学的な理由を含めて、安全性を同等に保証するであろう代替アプローチの可能性を排除するものではない。

このガイドラインに記載されている試験は国内スタンダード及び/又は GLP 対応を受けべきである。

(ア) 基本的試験

- ① 反復投与毒性試験
反復投与毒性試験は、a) その化合物及び/又はその代謝物に対する反復及び/又は蓄積ばく露による毒性作用、b) ばく露の用量及び/又は期間と影響の出現率及び重度との関連性、c) 毒性及び生物応答を伴う用量、及び d) NOAEL を明らかにするために実施する。

- ② 生殖毒性試験
哺乳動物の生殖に及ぼすあらゆる影響を検出するために、多世代生殖試験が計画される。この試験には、雌雄の生殖能、交尾、受胎、着床、妊娠維持期間、分娩、哺乳、生存、出産から哺乳までの子の成長と発育、性的成熟及びその後の成熟動物としての子の生殖機能に及ぼす影響が含まれる。

- ③ 発生毒性試験
発生毒性試験の目的は、着床から妊娠全期間を通して帝王切開前日までばく露した後の妊娠雌及び胚と胎子の発生に及ぼすあらゆる有害作用を検出することにある。このような有害作用には、非妊娠雌に観察される毒性に対応する毒性の増加、胚一胎子死、胎子成長の変化及び胎子の構造的変化が含まれる。

- ④ 遺伝毒性試験
遺伝毒性試験の組合せは、細胞内の遺伝的情報損傷能を有する物質を識別するために用いられる。遺伝毒性があると考えられる物質は、潜在的がん原性物質とみなされる。初期胚細胞に遺伝的損傷をもたらし物質は、生殖/発生にも影響を及ぼす可能性がある。

(イ) 追加試験

これらの試験は、化合物の構造、系統、作用機序に基づく安全性の懸念に対応するために要求される。これらの試験の例を以下に示す。

- ① ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響試験
抗菌活性のある化合物については、残留薬剤のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにするための情報の情報が要求される。

② 薬理作用試験

一部の動物用医薬品は、毒性応答がなくとも、又は毒性を誘発するのに必要な容量よりも低い用量で薬理作用を引き起こす。薬理学的NOAELは識別され、薬剤のADI設定に取り入れられるべきである。

③ 免疫毒性試験

β -ラクトラム抗生物質のような一部の系統の薬剤については、感受性個体においてアレルギー反応を誘発する可能性を調査すべきである。その他の動物用医薬品についても、他の試験の成績が免疫学的ハザードの可能性を示している場合には、免疫毒性試験が要求されることがある。

④ 神経毒性試験

反復投与毒性試験において神経毒性の可能性が認められることがあり、さらなる試験、例えば、OECDテストガイドライン 424 "Neurotoxicity Study in Rodents" に従った試験が行われるきっかけになる場合がある。

⑤ がん原性試験 (VICH GL28)

潜在的がん原性物質と考えられる化合物については、経口投与によるがん原性試験が要求される。がん原性試験を要するとの判断は、遺伝毒性試験成績、構造活性相関 (SAR) の情報、並びに反復投与及び成績を含む、あらゆる入手可能なデータに基づく。がん原性試験は、がん原性バイオアッセイを用いて実施することが勧められる。しかしながら、がん原性と慢性毒性を組み合わせた情報も受け入れられよう。

(ウ) 特殊試験

特殊試験とは、その薬物の作用機序を理解するために実施され、基本的及び/又は追加試験で得られたデータの関連性の説明、又は評価を助けるために行われる試験を指している。

(エ) 引用文献

1.OECD.1997. Test Guideline 424. Neurotoxicity Study in Rodents. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

(2) 反復投与 (90日) 毒性試験 (VICH GL31)

(略)

9-2 食用に供する動物を対象としない動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される毒性試験について、標準的な実施方法を示し、動物用医薬品の安全性の適正な評価に資する

② 薬理作用試験

一部の動物用医薬品は、毒性応答がなくとも、又は毒性を誘発するのに必要な容量よりも低い用量で薬理作用を引き起こす。薬理学的NOAELは識別され、薬剤のADI設定に取り入れられるべきである。

③ 免疫毒性試験

β -ラクトラム抗生物質のような一部の系統の薬剤については、感受性個体においてアレルギー反応を誘発する可能性を調査すべきである。その他の動物用医薬品についても、他の試験の成績が免疫学的ハザードの可能性を示している場合には、免疫毒性試験が要求されることがある。

④ 神経毒性試験

反復投与毒性試験において神経毒性の可能性が認められることがあり、さらなる試験、例えば、OECDテストガイドライン 424 "Neurotoxicity Study in Rodents" に従った試験が行われるきっかけになる場合がある。

⑤ がん原性試験

潜在的がん原性物質と考えられる化合物については、経口投与によるがん原性試験が要求される。がん原性試験を要するとの判断は、遺伝毒性試験成績、構造活性相関 (SAR) の情報、並びに反復投与及び成績を含む、あらゆる入手可能なデータに基づく。がん原性試験は、がん原性バイオアッセイを用いて実施することが勧められる。しかしながら、がん原性と慢性毒性を組み合わせた情報も受け入れられよう。

(ウ) 特殊試験

特殊試験とは、その薬物の作用機序を理解するために実施され、基本的及び/又は追加試験で得られたデータの関連性の説明、又は評価を助けるために行われる試験を指している。

(2) 反復投与 (90日) 毒性試験 (VICH GL31)

(略)

ことを目的とする。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起ることとも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるとは限らず、また、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができないものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではない。

(1) 急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

原則として全ての動物用医薬品について、小動物を用いて試験を実施すること。

ア 試験動物

(ア) 種及び系統の選択に当たっては、寿命、各種自然発生疾患の発生頻度、毒性が既知の物質に対する感受性等を考慮する。

(イ) 同一検体について急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用することが望ましい。

イ 試験方法

(ア) 急性毒性試験

① 動物

1種以上の順調に発育した動物とする。通常、未経産で非妊娠のラットの雌が用いられる。

② 動物数

試験の目的に合致する適当な数とする。

③ 投与経路

原則として、経口投与とする。臨床適用経路が非経口の場合には、当該臨床適用経路についても実施する。なお、臨床適用経路が特殊で動物での実験が不可能な場合には他の適切な経路とする。

また、経口投与は原則として強制経口投与とし、この場合には、通常検体投与前に一定時間動物を絶食させるものとする。

④ 用量段階

用量-反応関係及びおおよその50%致死量(LD₅₀)を求めるに足る用量段階を設定する。なお、通常、投与上限量は2,000mg/kgとする。

⑤ 投与回数

原則として1回とする。

⑥ 観察期間

原則として14日間とする。

⑦ 検索方法

a 全例について、少なくとも投与後30分以内に1回、24時間までは定期的に、その後は毎日、一般状態を観察する。

- b 体重は投与直前と、少なくとも週に1回以上測定する。
- c 観察期間終了時（又は死亡時）に全例を剖検し、全部の器官・組織を肉眼的に観察し、所見を記録する。

(イ) 亜急性毒性試験

- ① 動物
 - 1 種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。
 - 一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。
- ② 動物数
 - 雌雄各々について、1群5匹以上とする。
 - 動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。
- ③ 投与経路
 - 原則として臨床適用経路とする。
 - 経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。
- ④ 用量段階
 - 雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。
 - 急性毒性試験又は予備的な短期間の連続投与試験の結果を参考に、有害反応の種類と強度を明らかにし、中毒量、最小中毒量及び無毒性量 (No Observable Adverse Effect Level : NOAEL) を求め得る投与量及び群数とする。なお、中毒量は、一部の動物を致死させるか又ははつかりした毒性変化が現れる量とし、最小中毒量は何らかの毒性変化が現れる量とする。また、無毒性量 (NOAEL) は、いずれの動物にも毒性変化が現れない量とする。
 - 飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。
- ⑤ 対照群
 - 陰性対照を置く。
 - 陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、そのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。
- ⑥ 投与期間
 - 3週間以上とし、投与は週7日とする。
- ⑦ 検索方法
 - a 各群の全例について、一般状態を詳細に毎日観察し、体重を週1回以上測定する。

- b 投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を週1回以上測定する。
- c 投与期間中、各群の全部又は一部の例について、1回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、検体の化学構造、薬理作用及び一般状態から類推して、適切な臨床検査を加えることが望ましい。
- d 投与期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。
- e 投与期間中に死期の迫った例については、速やかに殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。
なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが望ましい。
- f 投与終了時の生存例については、24時間後にと殺剖検し、全例について器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、できる限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それぞれ国際的に採用されている方法及び測定単位を採用する。

また、筋肉、脂肪、肝臓、腎臓等について検体等の残留量を測定することが望ましい。

(ウ) 慢性毒性試験

① 動物

1 種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。
一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

雌雄各々について、原則として1群10匹以上とする。
動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。

③ 投与経路

臨床適用経路又は経口投与とする。
経口投与の場合には、飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法又は強制投与による方法がある。

④ 用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

亜急性毒性試験の結果を参考に、何らかの毒性変化が現れる量及び無毒性量 (NOAEL) を求め得る投与量及び群数を決定する。

飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、そのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥ 投与期間

3か月以上とし、投与は週7日とする。

⑦ 検索方法

a 各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

b 投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

c 投与期間中、各群ごとに一定数の例を任意に選び、1回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、必要があればその他の臨床検査を実施する。

d 投与期間の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

病理組織学的検索の対象となる器官・組織は次のとおりであるが、肉眼所見等からその必要性が認められないと判断される場合には、その一部を省略できる。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管・肺及び気管支、心臓*、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓*、脾臓、脾臓*、腎臓*、副腎*、膀胱、精囊、前立腺*、精巣*、卵巣*、子宮、陰茎*、下垂体*、脊髓、眼球、ハーダー腺、その他肉眼で変化が認められた器官・組織

上記の器官・組織のうち*印を付したものについては、その重量を測定する。

e 投与期間中に死期の迫った例については、速やかにと殺剖検し、dのとおり器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが望ましい。

f 投与終了時の生存例については、と殺剖検し、dのとおり各群の全例について器官・組織の肉眼的観察及び重量の測定を行う。

病理組織学的検索は、原則として対照群及び最高用量群の全例について行うが、他の試験群において、肉眼で変化が認められた器

官・組織がある場合又は最高用量群で観察された変化から考えて
必要性のある場合には、他の試験群の全例についても当該器官・
組織の病理組織学的検査を行う。なお、と殺時に血液を採取して、
血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、でき
る限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それ
ぞれ国際的に採用されている方法及び測定単位を採用する。

(2) 生殖・発生毒性試験

原則として新動物用医薬品について、「(ア) 催奇形性試験」を実施すること。
本試験の成績により必要と考えられる場合又は別に知られている知見等から雌
雄動物の生殖能力や分娩など生殖の過程に対して悪影響を及ぼすことが疑われる
動物用医薬品については、「(イ) 一世代生殖毒性試験」を実施すること。妊娠前
から離乳期までにわたる生殖過程の期間を3区分し、それぞれを投与期間として、
「(ア) 妊娠前及び妊娠初期投与試験」、「(イ) 胎仔の器官形成期投与試験」及び
「(ウ) 周産期及び授乳期投与試験」を実施することにより、生殖・発生への悪
影響を正確に把握できるように配慮した試験法を採用しても差し支えない。

ア 試験動物

(ア) 種及び系統の選択に当たっては、受胎能などの生殖に関する知見、自然発
生奇形の発生頻度、生殖・発生に悪影響を及ぼすことが明らかにされている
物質に対する感受性等を考慮する。

(イ) 奇形子の自然発現率の低い種及び系統を選択することが望ましい。

(ウ) (イ) 及び (ウ) の試験に共通して用いられる動物においては、種及び系
統が同一であることが望ましい。

イ 試験方法

(ア) 催奇形性試験

① 動物

ラット又はマウスなどのげっ歯類及びウサギなどの非げっ歯類からそ
れぞれ選んだ各1種以上の雌動物とする。

一般には、試験が比較的容易にでき、かつ、一般的な代謝様式等が比
較的知られている動物種が用いられる。

② 動物数

ラット又はマウスでは1群20匹以上、ウサギでは1群8匹以上とす
る。

動物数は、妊娠が成立した個体の数を意味する。

ラット、マウス又はウサギ以外の動物種を用いる場合には、原則とし
て評価に耐える知見が得られると期待される動物数とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制経口投与を原則とする。
強制投与法は、確実に一定量を投与できる点などで飼料若しくは飲料
水に混入して自由に摂取させる方法に勝っている。

臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。
④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。
最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性
徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候
が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、母動物及
び胎仔の両方ともに障害が現れない量とする。中間用量（複数のことも
ある。）は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。用量段
階のうちには、当該使用動物で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量
と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。
陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等が必要とする場合
には、原則としてそのみを与える群とする。なお、陽性対照には催奇
形性を有することが明らかになっている物質を、比較対照には、化学構
造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

胎子の器官形成期の間連日投与を行う。

⑦ 検索方法

a 試験期間中、母動物については、各群の全例についてその生死及
び一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。

b 母動物は全例を妊娠末期に剖検し、妊娠の成立、胎子の死亡の有
無を検索し、かつ、生存胎子については体重などの測定及びその形
態学的検索を行う。死亡胎子については、できる限り死亡時期を推
定する根拠となる所見を記録する。また、母動物については、器官

・組織の肉眼的観察を行う。

(イ) 一世代生殖毒性試験

① 動物

げっ歯類から選んだ1種以上の雌雄の動物とする。

一般的にはラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

1群20匹以上の雄と妊娠末期において原則として1群20匹以上の妊
娠動物を確保するために必要な雌とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。
経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。

④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。
最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、親動物、胎子又は出生子のいずれにも障害が現れない量とする。中間用量（複数のこともある。）は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。
用量段階のうちには、当該使用動物で薬理効果が見られる量又は推定臨床常用量と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。
陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、原則としてそのみを与える群とする。なお、陽性対照には生殖に悪影響を及ぼすことが明らかにされている物質を、比較対照には、化学構造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

雌雄とも8週齢時から8週間以上連日投与してから交配に当てる。交配は3週間を限度として同一の雄と雌を1対1で同居させる。

雄については、交配期間中も連続投与し、雌については、交配期間中、妊娠期間中及び分娩後3週間における新生子の離乳までの期間投与を続ける。

⑦ 検索方法

a 試験期間中、各群の全例についてその生死及び一般状態を観察し、母動物については、体重及び摂餌量を測定する。

b 交配期間の終了した雄はと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。交尾が成立しなかった雌雄についてはその原因を調査する。

交尾率及び受胎率を求めらる。

これらは、通常次の算出法による。

交尾率 = (交尾動物 / 同居動物) × 100

受胎率 = (受胎動物 / 交尾動物) × 100

c 各群の全例を分娩哺育させる。

分娩に際しては、分娩の障害や遅延の徴候などについて観察する。出産率を求めらる。

これは、通常次の算出法による。

出産率 = (生子出産雌数 / 妊娠雌数) × 100

d 新生子については、産子数、その生死、性別及び外表における変化などを検索し、体重を測定する。

同腹生子数を調整する場合には、生後比較的早い時期に、1母体当たり雄と雌がほぼ同数から成る一定匹数を作作為に採り、余分な子を淘汰する。ラット又はマウスでは、通常生後4日齢で8匹程度にする。

e 出生子については、成長及び発達並びに特異な症状の有無や行動の異状などに関する検索を行う。

出生子に異常所見が見いだされた場合には、必要に応じて、新たに乳母哺育試験などを行って生後のいずれの時期における影響によるかを分析すべきである。

成長及び発達については、形態、機能及び行動に関する検索を行う。

また、必要に応じて更に長期間の観察を行う。出生から離乳までの間に出生率、生存率及び離乳率を求めらる。

これらは通常の算出法による。

出生率 = (出産生子数 / 着床頭数) × 100

4日生子率 = (生後4日の生子数 / 出産子数) × 100

離乳率 = (離乳時生子数 / 生後4日の生子数又は淘汰直後の生子数) × 100

f 処置された母動物については、適当な時期に剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、必要に応じて検体の投与を続けて多世代に関する検索を行う。

(3) 変異原性試験

原則として新動物用医薬品について、遺伝子突然変異誘発性を指標とする「(イ) 細菌を用いる復帰変異試験」及び染色体異常誘発性を指標とする「(イ) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験」を実施すること。ただし、(ア)又は(イ)の試験の結果、変異原性が疑われる場合には「(ウ) マウスを用いる小核試験」を実施すること。

なお、以上の試験及び他の毒性試験の結果並びに薬理作用に関する試験の結果から必要と認められる場合には、その他の変異原性試験を追加して行うことが望ましい。

試験方法

(ア) 細菌を用いる復帰変異試験

① 菌株

ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) の TA1535、TA1537、TA98、TA100 など及び大腸菌 (*E. coli*) の WP2uvrA などの数菌株とする。

② 用量段階

5～6段階の試験用量を設定するとともに、別に対照を置く。最高用量は原則として5 mg/プレートを限度とし、抗菌性を示す薬物では抗菌性を示す用量とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知変異原物質 (S9 mix を必要としない物質と必要とする物質) を用いる。

④ 代謝活性化

S9 mix を加えた試験と加えない試験とを平行して行う。哺乳類 (通常ラット) に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S9 を調製する。この S9 に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。

⑤ 試験方法

ブレインキュベーション法又はプレート法のいずれかとする。

抗生物質など特に強い抗菌性を示す薬物については、試験に用いる菌とインキュベートした後洗浄し、更に、菌を再び懸濁して突然変異誘発数と生存菌数とから突然変異誘発頻度を求めることが望ましい。

⑥ 結果

復帰変異コロニー数の実測値とその平均を表示 (図を含む。) する。

(イ) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

① 細胞

哺乳類の初代又は継代培養細胞を用いる。

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞 (CHL、CHO) など、できるだけ感受性の高いものを使用することが望ましい。

② 用量段階

3段階以上の試験用量を設定する。

最高用量は細胞増殖 (又は分裂) が 50% 抑制される濃度を指標とし、その前後の用量を用いる。

細胞毒性が認められない場合は、0.01 mol/L 相当又は 5 mg/mL の濃度を限度とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知染色体異常誘発物質を用いる。

④ 代謝活性化

適切な代謝活性化法を併用することが望ましい。
哺乳類（通常ラット）に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓からS9を調製する。このS9に補酵素などを加えたS9 mixを用いる。

⑤ 検索方法

検体処理後、適切な時期に染色体標本を作製する。
原則として、用量当たり2系列の培養を用いる。
1系列当たり100個の分裂中期像について、染色体の形態異常及び倍数性細胞について検索する。

形態異常では染色分体又は染色体に見られる構造異常の種類を明記する。

⑥ 結果

染色体異常を持つ細胞の出現頻度又は細胞当たりの染色体異常頻度を表示（図を含む。）する。

(ウ) マウスを用いる小核試験
げっ歯類の骨髓細胞を用いる染色体異常試験で代行してもよい。

① 動物

原則として純系又は均一の雄を用いる。

② 動物数

1群5匹以上とする。

③ 投与経路

腹腔内投与又は経口投与とする。
経口投与は、原則として強制投与とする。

④ 用量段階

3段階以上の試験群を設定する。
最高用量は、体重増加の抑制など何らかの毒性徴候が現れる用量とする。毒性徴候が現れない場合には、2,000mg/kgを最高用量とする。

⑤ 対照群

陰性及び陽性対照を置く。
陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質を用いる。

⑥ 投与回数

単回及び4～5回の連続投与を行う。ただし、連続投与する場合には適切な単一用量を設定する。

⑦ 検索方法

a 検体投与後、適切な時期に各群の全例をと殺し、骨髓塗抹標本を作製する。

標本の作製は検体投与後、18 ～ 30 時間目に行うことが望ましい。

い。

b 原則として個体当たり 1,000 個の多染性赤血球について、小核の有無を検索する。同時に全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を求める。多染性赤血球の代わりに網〔状〕赤血球の頻度を求めてもよい。

⑧ 結果

小核を有する多染性赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を表示する。

陽性結果が得られた場合には、用量依存性について図示する。

(4) がん原性試験

原則として次のいずれかによりがん原性が疑われる場合には、がん原性試験を実施すること。

(イ) 化学構造又は薬理作用

(ロ) 毒性試験の結果

(ハ) その他

ア 試験動物

① 種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、自然発生腫瘍の発生頻度、既知がん原性物質に対する感受性を考慮する。

② 同一検体についてがん原性予備試験及びがん原性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用する。

イ 試験方法

① 動物

2 種以上の雌雄の動物とする。なお、同一週齢で、順調に発育した 6 週齢までの動物を用いることが望ましい。

現在のところ、一般には、ラット、マウス又はハムスターが用いられる。離乳後できるだけ早い時期を開始することが望ましい。

② 動物数

雌雄各々について、1 群 50 匹以上とする。各群への動物の割付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。

検体を飼料に混入して投与する場合には、飼料中の検体濃度は最高 5 % までとする。

④ 用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は予備試験の亜急性毒性試験で定めた量とし、最低用量として当該使用動物種で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量を勘案して設定する。中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましい。

一般には、最低用量は、最高用量の10%以上であることが望ましい。ただし最低用量と推定臨床常用量が著しく掛け離れている場合には、最高用量の10%未満の用量を別途設けてもよい。

検体を飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量又は飲水量を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は3か月に1回以上測定し、検体摂取量を算出する。なお、試験開始前及び試験中に適宜検体の純度、安定性及び夾雑物を可能な限り定性的又は定量的に分析する。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥ 投与期間

ラットでは24か月以上30か月以内、マウス及びハムスターでは18か月以上24か月以内とし、投与は原則として週7日とする。

強制投与の場合、実務的な見地から週5日以上の投与でも容認される。

⑦ 試験期間

投与終了時又は投与終了後1～3か月までとする。ただし、試験の最長期間は、ラットでは30か月、マウス及びハムスターでは24か月とし、最低用量群又は対照群の累積死亡率が75%になった場合には、その時点で生存例をと殺し、試験を終了する。

腫瘍以外の原因による死亡率が、投与開始後ラットでは24か月、マウス及びハムスターでは18か月の時点で50%以上であることを要する。

いずれの群においても、動物の10%以上が自己融解、共食い又は飼育上の問題で失われないこと。

したがって、試験期間中に衰弱動物や死期の迫った動物が見いだされた場合には、隔離又はと殺解剖等の配慮が必要である。

⑧ 検索方法

a 各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後3か月間は週1回以上、その後は4週に1回以上測定する。

b 試験期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

病理組織学的検査は、次の器官・組織について行う。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、椎骨又は大腿骨（骨髄を含む。）、胸腺、気管・肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、卵巣、子宮、陰、眼球、脳、下垂体、脊髓、その他肉眼で腫瘍性病変が認められた器官・組織。

腫瘍性病変の記載に際しては、腫瘍発生に至る各種変化（前がん病変）の所見も付け加える必要がある。

c 試験期間中に死期の迫った例については、速やかに隔離又はと殺剖検し、bのとおり器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。

d 試験終了時の生存例については、速やかに剖検し、各群の全例について、bのとおり器官・組織の肉眼的観察を行う。

病理組織学的検索は、原則として試験群及び対照群について行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。