

医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について

(平成9年4月14日 薬審第316号
各都道府県衛生主管部(局)長あて 厚生省薬務局審査課長通知
平成12年12月27日 医薬審第1834号 一部改正)

医薬品の製造(輸入)承認申請に際し添付すべき毒性に関する資料のうち、生殖・発生毒性試験の標準的な実施方法については、平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」及び平成6年7月7日薬審第470号通知別添「医薬品の生殖毒性検索のための試験法ガイドライン」によりお知らせしているところであるが、このうち、平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」の「生殖・発生毒性試験」について別添のとおり改めたので、下記事項をご了知の上、貴管下医薬品製造(輸入販売)業者に対する周知方ご配慮煩わしい。

なお、平成6年7月7日薬審第470号厚生省薬務局審査課長通知「医薬品の生殖毒性試験検索のための試験法ガイドラインについて」は廃止する。

記

1 改定の背景

- (1) 近年、優れた医薬品の国際的な研究開発の促進及び患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的なハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。このような要請に応えるため、日・米・EU三極医薬品規制ハーモナイゼーション会議(ICH)が組織され、品質、安全性、有効性及び規制情報の4分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。
- (2) このうち、生殖発生毒性試験の標準的な実施方法については、平成5年に「ICH harmonized tripartite guideline -Detection of toxicity to reproduction for medical products」が合意されたことを受けて、従来のガイドラインに加え、平成6年7月7日薬審第470号通知によりICHガイドラインとして示した。
- (3) さらに、平成7年に、ICHガイドラインの雄の受胎能評価に関し「Toxicity to male fertility-An addendum to the ICH tripartite guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products」が合意された。
- (4) 今回の生殖発生毒性試験にかかるガイドラインの改定は、上記ICHにおける三極の合意結果を踏まえ、取りまとめたもので、併せて表現等の整備を行ったものである。

2 改定の要点

- (1) 最も実際の試験の組み合わせを、被検物質の投与期間を生殖発生過程の着床時点で分けて実施する「受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験」及び「出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験」、並びに被検物質の投与期間を着床から器官形成終了時期までの間として実施する「胚・胎児発生に関する試験」としたこと(三試験計画法)。
- (2) げっ歯類を用いた試験については、上記の三試験計画法を組み合わせた単一試験計画法および二試験計画法も可能としたこと。
- (3) キネティクス・データの活用を明記したこと。
- (4) 使用動物数は、試験データについて意味のある解釈が充分にできる匹数とし、特に明記していないこと。
- (5) 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
ア．雄受胎能の評価に関し、反復投与毒性試験等における生殖器官の病理組織学的検討、精子の検討等により、その障害の検出感度を向上させるとともに、雄の被検物質の交配前投与期間の短縮を可能としたこと。
イ．雌親動物の剖検時期を妊娠中期以降としたこと。
- (6) 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験
被検物質の投与期間を着床から離乳時まで連続させることにより、本試験において出生時に対する影響の観察を行うこととしたこと。
- (7) 胚・胎児発生に関する試験
親動物を分娩予定1日前に全例剖検することとし、本試験において出生時に対する影響の観察を行わないこととしたこと。

3 経過措置

平成10年4月14日以降申請される医薬品に添付される生殖毒性試験に関する資料は、本ガイドラインに基づいたものであること。ただし、平成9年5月6日までに実施され、または開始されている試験については、当分の間、原則として本ガイドラインに基づいた試験に代えてよいこと。

4 .その他

平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知の記の1(1)中「生殖・発生毒性試験」を「生殖発生毒性試験」に改める。

(別添)

{3}生殖発生毒性試験

1 .はじめに

(1) ガイドラインの目的

化学物質及び医薬品の生殖発生毒性の検索に用いられている試験法は、重複する部分が多い。この広範囲にわたる試験法を用いて効率的に試験を実施するための第一段階として、本ガイドラインは、医薬品の試験において現在用いられている試験計画を基にして、試験の実施方法を統合整理しようとしたものである。ガイドラインは次世代の発生に関する医薬品の安全性を十分に評価できるものでなければならない。動物の生殖発生の特定の段階に被験物質を投与する試験法は、医薬品に対するヒトでの曝露をよりよく反映し、どの生殖発生段階に危害を生じるおそれがあるかをより明確に識別することができると考えられている。こうしたアプローチは、大半の医薬品にとって有用であるが、低用量を長期間曝露するような医薬品の場合には、一世代あるいは二世代試験法がさらに有用な場合もあろう。

実際の試験法は以下の要因により決定しなければならない。

- 予想される医薬品の用法、特に生殖との関連
- 被験物質の形状及びヒトで予定されている投与経路
- 毒性、熱力学、キネティクス及び他の物質との構造/活性の類似性などに関するあらゆる既存データの利用

この考え方に基づいて適切に試験を実施するためには、柔軟性が必要である(注1)。起こり得るすべての事例をカバーする十分な情報を提供できるガイドラインは存在しない。したがって、最新の技術水準並びにヒト及び動物を用いる試験の倫理規範に基づき、試験法の改良について積極的に討議し考慮していかなければならない。

(2) 試験の目的

生殖発生毒性試験の目的は、活性物質の哺乳類の生殖発生に対するあらゆる影響を明らかにすることである。このためには、試験の施行及び結果の解釈においてあらゆる薬理学的及び毒性学的データと関連させて、ヒトにおける生殖発生への危険性が、他の毒性試験の結果から予見される危険性よりも大きいのか、小さいか、あるいは同等であるかを検討しなければならない。さらに、反復投与毒性試験は、生殖、特に雄の受胎能に及ぼす影響について、重要な情報を提供するであろう。試験結果をヒトへ外挿する(関連性を評価する)ためには、予想されるヒトへの曝露、キネティクスの比較及び生殖発生毒性の発現機序に関するデータが有用であろう。

試験を選択し、組合せることにより、成熟動物及び受精から性成熟までの発生の全過程にわたって薬物に曝露することが可能となる。薬物曝露の即時的及び遅発的効果を検出するためには、一つの完全な生命周期、すなわち一つの世代での受精から次の世代での受精までの間観察を継続して行わなければならない。

試験実施の便宜上、この連続的な生殖発生過程を以下の諸段階に区分することができる。

- A: 交尾前～受精(成熟雌雄動物の生殖機能、配偶子の発生及び成熟、交尾行動、受精)
- B: 受精～着床(成熟雌動物の生殖機能、着床前発生、着床)
- C: 着床～硬口蓋閉鎖(成熟雌動物の生殖機能、胚発生、主要な器官の形成)
- D: 硬口蓋閉鎖～妊娠終了(成熟雌動物の生殖機能、胎児の発生と成長、器官の発生と発達)
- E: 出生～離乳(成熟雌動物の生殖機能、新生児の子宮外生存への適応、離乳前の発生と成長)
- F: 離乳～性成熟(離乳後の発生と成長、独立生存への適応、完全な性機能の確立)

各段階の時期に関する取り決めについては、注2を参照すること。

(3) 試験の選択

本ガイドラインは、生殖発生に及ぼす何らかの影響を検出するための試験計画の策定支援に目標をおいている。試験計画に従って行われた試験において何らかの影響が認められたときは、必要に応じて、その影響の性質を十分に明らかにするために必要な追加試験を計画しなければならない(注3)。選択した試験の組合せについては論理的根拠を示し、投与量の設定理由についても説明しなければならない。

試験は最新の技術水準に応じて計画されなければならない。その際には、化学構造または薬効が類似する物質の生殖発生に及ぼす影響に関する既存の知識を考慮しなければならない。さらに、動物に苦痛を与えることを避け、試験全体の目的を達成するために必要な動物数を最小限にしなければならない。予備試験が実施された場合には、その結果を試験の評価に際して考慮し、考察に加えなければならない(注4)。

2. 使用動物の選択基準

使用する動物については、健康状態、受胎能、生殖能、異常の頻度、胚・胎児死亡及びそれぞれの試験間の均質性について、明確にしなければならない。同一試験内及び試験相互間において、試験開始時に年齢、体重、出産歴がほぼ同一である動物を用いなければならない。このためには、交配時点で若齢で成熟した動物を用い、雌については未交配の動物を用いることが望ましい。

(1) 動物種の選択及び数

試験には哺乳動物を使用しなければならない。一般的には、他の毒性試験で用いた同一の動物種及び系統を使用することが望ましい。げっ歯類としてラットが最も多用される理由は、実用的であること、この種を用いた他の試験結果との比較が可能なこと、大量の背景データが蓄積されていることである。

胚・胎児毒性試験に限り、2種類の哺乳動物を用いることが従来より要求されており、非げっ歯類としてはウサギが多用されている。胚・胎児毒性試験にウサギが用いられる理由は、背景データが豊富であること、入手し易く実用的なことである。ウサギが適切でない場合には、その他の非げっ歯類または第二のげっ歯類を使用してもよく、状況に応じて判断にしなければならない(注5)。

(2) 他の試験系

他の試験系としては、*in vitro* または *in vivo* で分離して生育させた哺乳類または非哺乳類の細胞、組織、器官または個体の培養系が考えられる。これらの試験系は、丸ごとの動物を用いる試験と組合せることにより、化学構造または薬効が類似する物質の中から医薬品の優先候補を選択するための試験、あるいは作用機序を解明するための二次的試験として、貴重な情報を提供するであろう。また、実験に使用する動物数の削減になるであろう。しかし、これらの試験系は、発生過程の複雑性及び母体と胚・胎児間の動的な相互関係が欠如している。これらの試験系では、被験物質の影響がないという確証は得られず、薬物曝露と危険性に関する予見性がない。すなわち、1. に掲げた目的で行われる生殖発生毒性試験については、現在のところ、丸ごとの動物を用いた試験の代替となる試験系はない(注6)。

3. 投与に関する一般的推奨事項

(1) 投与量

投与量の設定は、生殖発生毒性試験の計画において、最も重要な事項の一つである。高用量は、入手可能なあらゆる試験のデータ(薬理、急性及び慢性毒性、及びキネティクス試験、注7)を参考にして設定しなければならない。2 - 4週間の反復投与毒性試験と分節方式の生殖発生毒性試験の投与期間は近似している。十分な情報がない場合には予備試験を行うことが望ましい(注4)。

高用量を決定したのち、段階的に低用量を決定する。用量間隔はキネティクス及び他の毒性要因に基づいて設定する。「無毒性量」を設定できることが望ましいが、用量反応関係を明らかにできるように、十分に狭い用量間隔を設定することを優先させなければならない(注8)。

(2) 投与経路及び頻度

一般的には、投与経路はヒトで予定されている適用経路と同じものとする。異なった投与経路においても、同様な分布(キネティクスプロフィール)を示すことができる場合は、単一の投与経路でもよいであろう(注9)。投与頻度は通常1日1回とするが、キネティクスを考慮に入れて投与回数をより多くまたは少なくすることも考慮しなければならない(注10)。

(3) キネティクス

生殖発生毒性試験を開始する前にキネティクスに関する何らかの情報を得ることが望ましい。この情報によって、動物種の選択、試験計画や投与方法の調整が必要となることがある。この時点における情報は、詳細なものである必要はなく、また妊娠あるいは授乳中の動物を用いたものでなくてもよい。ただし、試験を評価する時点においては、得られた試験結果によっては、妊娠または授乳期動物でのキネティクスの詳細な情報が必要となろう(注10)。

(4) 対照群

対照群の動物には、被験物質投与群の動物と同様の方法で、溶媒のみを投与することが望ましい。溶媒そのものによる影響の可能性、または溶媒が被験物質の作用に影響を及ぼす可能性がある場合は、第二の対照群(模擬あるいは無処置)の設定を考慮しなければならない。

4. 試験計画 - 試験の組み合わせ

最も適切な試験の計画及び実施方法は、被験物質及び化学構造または薬効が類似する物質に関する入手し得るすべての薬理的、キネティクス及び毒性学的データを考慮して決定しなければならない。

医薬品に関する既存のガイドラインと極端に異ならない計画(最も実的な選択、すなわち三試験計画

法)が最初に考慮されることが予想される。ほとんどの医薬品については三試験計画法が通常適切であろう。その他の試験方策、試験の組合せ及び試験計画は、状況によっては「最も実的な選択」と同等かそれ以上に有用なこともある。重要なことは、全体として生殖発生過程の全段階にわたって、各段階の間に切れ目がなく、直接的あるいは間接的な評価が行えるようにすることである(注11)。

採用した試験方法の妥当性について述べなければならない。

(1) 最も実的な選択(三試験計画法)

最も実的な選択は、以下の事象に及ぼす影響に関する試験の組合せであると考えられる。

- 受胎能及び初期胚の発生
- 出生前及び出生後の発生並びに母体機能
- 胚・胎児発生

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

目的

交配前(雌雄)から交尾、着床に至るまでの被験物質の投与に起因する毒性及び障害を検索する。本試験は生殖発生過程の段階A及びBの評価を含むものである(1の②を参照)。雌では性周期、受精、卵管内輸送、着床、及び着床前段階の胚発生に及ぼす影響を検索する。雄では生殖器の病理組織学的検査では検出されない機能的影響(例えば性的衝動、精巣上体内の精子成熟)を検索する(注12)。

評価項目

- 生殖細胞の成熟
- 交尾行動
- 受精
- 胚の着床前段階
- 着床

動物

少なくとも1種。ラットが望ましい。

動物数

1群あたりの雌雄動物数は、意味のあるデータ解釈が十分にできる数とする(注13)。

投与期間

特に精子形成に及ぼす影響に関する試験では、毒性試験で得られたデータ(例えば、病理組織学的所見、生殖器の重量、ある場合にはホルモン測定データ及び遺伝毒性データ)が有効に利用できるであろう。少なくとも2週間の反復投与毒性試験で影響が認められなかった場合には、雌で2週間、雄で2週間の交配前投与期間を設定することができる(注12)。交配前投与期間の設定については、理由を明記し、妥当性を記載しなければならない。投与は交配期間中を通して、さらに雄では試験終了まで、雌では少なくとも着床までの期間継続する。この投与計画によって反復投与毒性試験における病理組織学的検査では検出できない雄の受胎能に及ぼす機能的な影響及び雌雄の交尾行動に及ぼす影響が評価できる。他の試験データで、雄または雌の生殖器の重量あるいは組織学的所見に影響が認められる場合、試験の精度が疑わしい場合、あるいは他に試験データがない場合には、より広範囲にわたる試験実施の必要性について検討しなければならない(注12)。

交配

雌雄1対1の交配比が望ましい。児の親動物が識別できる方法を採用しなければならない(注14)。

親動物のと殺

雌は妊娠中期以後いずれの時期にと殺してもよい。雄は交尾成立後いずれの時期にと殺してもよいが、と殺前に妊娠を成立させたことを確認することが望ましい(注15)。

観察

- 症状及び生死: 少なくとも1日1回
- 体重及び体重変化: 少なくとも週2回(注16)
- 摂餌量: 少なくとも週1回(交配期間中は除く)
- 膣垢塗沫標本: 交尾または交尾成立前の期間に及ぼす影響の有無を調べるために、少なくとも交配期間中は毎日記録すること。
- 全親動物の剖検(肉眼検査)
- 肉眼的変化が認められた組織・器官は保存し、必要に応じて病理組織学的評価を行うこと。比較検討のために十分な数の対照群の同じ組織・器官を保存すること。
- 状況に応じて全動物から精巣、精巣上体、卵巣、子宮を保存し、病理組織学的検査と評価を行うこと。
- 黄体数及び着床数(注16)
- 生存胚数及び死亡胚数
- 他の毒性試験の結果より、観察する意義が認められる項目

精子検査は、観察された影響を確認するため、またはその影響をより詳細に特徴づけるため利用可能な検査である（注12）。

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

目的

着床から離乳までの間、雌動物に被験物質を投与し、妊娠／授乳期の雌動物、受胎産物及び出生児の発生に及ぼす悪影響を検索する。本試験期間中に誘発される影響は遅れて発現する可能性があるため、観察は出生児が性成熟期に達するまで継続する（1.の(2)に掲げた段階 C-F の評価）（注17及び18）。

評価対象となる悪影響

- 非妊娠雌動物と比較した毒性の増強
- 出生前及び出生後の児（胚／胎児／出生児）の死亡
- 成長及び発達の変化
- 行動、成熟（春機発動期）及び生殖(F1)を含む出生児の機能障害

動物

少なくとも1種。ラットが望ましい。

動物数

1群あたりの動物数は、意味のあるデータ解釈が十分にできる数とする（注13）。

投与期間

投与期間は、着床から離乳時までとする（1.の(2)に掲げた段階 C-E）。

試験方法

雌動物は分娩させ、離乳まで出生児を哺育させる。離乳時に1腹につき雌雄各1匹の出生児を選抜し（選抜法を記述すること）、性成熟に至るまで飼育し、さらに生殖能を評価するために交配する（注19）。

観察

母動物

- 症状及び生死：少なくとも1日1回
- 体重及び体重変化：少なくとも週2回（注16）
- 摂餌量：分娩までの期間は少なくとも週1回
- 他の毒性試験の結果より、観察する意義が認められる項目
- 妊娠期間
- 分娩

母動物及び該当する場合は出生児

- 全成熟動物の剖検（肉眼的検査）
- 肉眼的変化が認められた組織・器官は保存し、必要に応じて病理組織学的評価を行うこと。比較検討のために十分な数の対照群の同じ組織・器官を保存すること。
- 着床（注16）
- 形態異常
- 出生時生存児
- 出生時死亡児
- 出生時体重
- 離乳前及び離乳後の生存率、成長／体重（注20）、成熟及び受胎能
- 身体的発達（注21）
- 感覚機能及び反射（注21）
- 行動（注21）

胚・胎児発生に関する試験

目的

着床から硬口蓋の閉鎖までの期間中雌動物に被験物質を投与し、妊娠動物及び胚・胎児の発生に及ぼす悪影響を検索する（1.の(2)に掲げた段階 C-D の評価）。

評価対象となる悪影響

- 非妊娠動物と比較した毒性の増強
- 胚・胎児の死亡
- 成長の変化
- 形態学的変化

動物

通常2種。1種はげっ歯類、ラットが望ましい。他の1種は非げっ歯類、ウサギが望ましい（注5）。1種のみを使用する場合には、その妥当性について説明しなければならない。

動物数

1群あたりの動物数は、意味のあるデータ解釈が十分にできる数とする（注13）。

投与器官

投与期間は、着床から硬口蓋の閉鎖までとする（1.の(2)に掲げた段階Cの終了まで）。

試験方法

雌動物は分娩予定の約1日前にと殺、剖検する。すべての胎児について生死と異常の有無を検査する。他の観察結果との関連性を後日評価できるように、胎児は個体識別がなされなければならない。（注22）。

内臓及び骨格の検査のために別々の胎児を割り付ける場合には、各同腹児の約半数を骨格観察に割り当てる。内臓異常については、どのような検査法を用いても、約半数のラット胎児を検査する。内臓検索のために新鮮標本の顕微解剖法（ウサギで推奨される手技）を用いる場合には、すべての胎児について内臓と骨格双方の異常を検査しなければならない。

観察

- 症状及び生死：少なくとも1日1回
- 体重及び体重変化：少なくとも週2回（注16）
- 摂餌量：少なくとも週1回
- 全親動物の剖検（肉眼的検査）
- 肉眼的変化が認められた組織・器官は保存し、必要に応じて病理組織学的評価を行うこと。比較検討のため十分な数の対照群の同じ組織・器官を保存すること。
- 黄体数，死亡胚・胎児数，生存胎児数（注16）
- 胎児の個体別重量
- 胎児の異常（注22）
- 胎盤の肉眼的観察
- 他の毒性試験の結果より，観察する意義の認められる項目

(2) 単一試験計画法（げっ歯類）

の試験と の試験の投与期間を一つの試験として統合すれば，生殖発生過程の段階AからFまでの評価を含むことになる（1.の(2)を参照）。この試験で，胎児の検査を実施し，十分な高曝露量においても明らかな陰性所見が得られた場合に限り，げっ歯類を用いたさらなる生殖発生毒性試験は要求されない。胎児の形態的異常の検査として の試験を追加してする場合には，二試験計画法になる（注3及び11）。

第二種動物の の試験は必要である。（4.の(1)を参照）。

(3) 二試験計画法（げっ歯類）

最も単純な二試験計画法は， の試験と胎児の検査を含む の試験で構成できるであろう。しかし，この胎児の検査を含む の試験において，ヒトの曝露量を越えた十分な高用量においても出生前の影響が認められない場合には，追加的な の試験を行っても，ヒトの危険性を評価するうえで大きな変化はみられないであろう。

別法として， の試験における雌動物に対する投与を，硬口蓋の閉鎖まで継続し， の試験の方法に従って胎児を検査する方法もある。この試験と， の試験を統合すれば，「最も実際のな選択」に要求されている全検査が実施され，使用動物数はかなり少なくなる（注3及び11）。

第二種動物の の試験は必要である（4.の(1)を参照）。

5 統計

統計解析は試験成績を解釈するための手段である。統計解析で最も重要な点は，異なる変数間の相関性の検討とデータの分布を明らかにすることであり（記述統計），この検討によって群間の比較方法が決定される。生殖発生毒性試験で得られる各種指標（エンドポイント）は，通常正規分布には従わず，計量値とみなせるものから極端にカテゴリカル（分類値的）なものもある。

推測統計学（統計学的に有意差を決定する方法）を用いる場合は，個々の胎児や新生児ではなく，交尾した雌雄親動物または同腹児を比較の基本単位として用いる。用いた検定についてはその妥当性を説明しなければならない（注23）。

6 データの提示

優れた報告とするためには，試験に用いたすべての動物についての成績を説明できるように明確で簡潔な方法で個々の値を表示することが大切である。こうすることによって，試験開始から終了までのすべての動物個体の履歴を追跡することができるようにすべきであり，各個体値がどの群別総括値に寄与しているかを容易に推定できるようにする。群別総括値は生物学的に矛盾しない形式で（まちがった精度を避けるため），また変数の分布を反映した形式で表示する。付表すなわち体重，摂餌量，同腹児の値などの個体別数値表は簡潔に，

できる限り計算によって得た変数値ではなく絶対値で表示すべきであり、不必要な重複は避けなければならない。

臨床所見、剖検所見、異常など、出現頻度の低い観察項目の作表にあたっては、陽性所見のみられた（少数の）個体をまとめて記載することが推奨される。特に、形態的变化（胎児異常）のようなデータを表示する場合は、一次作表では異常胎児をもつ母動物と、その同腹児の中での異常胎児がはっきり識別でき、異常胎児で観察されたすべての変化が報告されなければならない。必要に応じて、上記作表に基づいて変化の型別の二次表を作成する。

7 用語

生殖発生毒性：

成熟動物の生殖能力に及ぼす影響のほか次に次のものを含む。

発生毒性

動物が成熟するまでに誘発される障害。すなわち、胚または胎児期に誘発または発現した障害及び出生後に誘発または発現した障害が含まれる。

胚毒性、胎児毒性、胚・胎児毒性

出生前の曝露の結果として受胎産物にみられる障害。障害には、形態異常、機能異常、及びこれらの影響が出生後に発現した場合が含まれる。「胚毒性」または「胎児毒性」という用語は、障害の検出される時期に関係なく、誘発された時点/時期に関連したものである。

一、二、三代試験：

被験物質が直接曝露される親動物の世代数によって定義される。例えば、一代試験では、F0世代への直接曝露とF1世代への間接曝露（母体を介する）であり、試験は通常F1世代の離乳時に終了する。農薬や工業用化学物質について用いられる二代試験では、F0世代への直接曝露、F1世代への間接及び直接曝露、F2世代への間接曝露が行われる。三代試験も同様な見方によって定義される。

身体負荷：

被験物質の投与により生じる個体の体内での全薬物曝露量であり、未変化体や代謝物の分布とか蓄積を考慮にいれたものが含まれる。

キネティクス：

ファーマコキネティクスまたはトキシコキネティクスのどちらかを指すか、あるいは両者を指すか、に関係なく、本ガイドラインでは「キネティクス」という用語を一貫して使用している。何故なら一言で表現できる用語がないからである。

8 注解

注1 科学的柔軟性

ガイドラインは、強制的な規則ではない。また最終的なものでもなく出発点である。

ガイドラインは、研究者が試験材料や最新の技術水準に関する利用可能な情報をもとに、試験の方策に工夫を加える基本的な拠りどころとなる。本ガイドラインでは代替試験計画を記載しているが、他の方法を探求したり、試験方法に工夫を加えなければならない。試験の方策を工夫する主たる目的は、生殖発生に対するあらゆる毒性徴候を見出し、明らかにすることである。

試験計画及び技術手順の詳細については、本文より省略した。技術というものは、ある研究室でふさわしくても、他の研究室では好ましくない場合もあるので、どのような方法を用いるかの決定は研究者の裁量とすることが正しい。研究者は、最善を尽くして職員や資源を利用し、またそうするにはどうすればよいかを部外者よりもよく理解しなければならない。試験従事者の心構え、能力及び一貫性が施設設備よりも重要である。

GLP規則に準拠することが求められている部分については、当該規則を参考にすること。

注2 時期に関する取り決め

本ガイドラインにおける妊娠日に関する取り決めについては、交尾が夜間に行われても膣垢内の精子及び膣栓またはその一方が観察された日を妊娠0日とする。特に記載がなければ、ラット、マウス及びウサギでは着床は妊娠6日 - 7日、硬口蓋の閉鎖は妊娠15日 - 18日に起こると仮定する。

この他の取り決めも同様に容認されるが、報告書に必ず明記しなければならない。また、その場合、投与期間に空白をきたさないように、その取り決めは異なった試験の間でも一致していなければならない。一連の試験で投与期間は最低1日の重複期間を設けることが望ましい。

交尾日は、胎児と出生時に関する数値に変動を与えるので、正確に特定しなければならない。

哺育児についても同様に、特に記載がなければ出生日を生後あるいは授乳0日とする。しかし、特に分娩遅延または分娩時間の延長がみられる場合は、交尾後の時間を参照することが有用なことがある。

注3 一次試験及び追加試験

すべての一次試験（ガイドラインに基づく試験）は、多少の程度の差はあるが、その性質上、集約された最終的な反応結果を示すものである。すなわち、ある一つの指標（エンドポイント）でみられた影響にはいくつかの異なる原因が考えられる。例えば、出生児の出生児数の減少には、排卵率（黄体数）の低下、着床前死胚の増加、着床後死胚の増加、出生直後の死亡などが考えられる。また、この死亡は、早期に誘発された奇形の結果かもしれない。そしてこの奇形はその後の二次的变化などのために観察できなくなったのかもしれない。特に対照群で自然に低頻度でみられる影響に関しては、投与によって惹起された事象と自然発生のものとの区別は、他に出現した影響との関連性を考慮することにより判断できよう。

毒性物質は通常、用量に相関して1種以上の影響を惹起する。例えば、奇形の誘発は、胎児の死亡の増加や軽度な形態的变化の発生頻度の増加とほぼ例外なく関連している。ある指標（エンドポイント）についてある影響がみられた場合、それに関連する項目についての追加試験を考えなければならない。すなわち、その化合物の毒性の本質、範囲、起源を明らかにしなければならない。さらに、この追加試験においてはヒトの危険性評価に用いるための用量反応関係の確認を行わなければならない。これは、一次試験において投与による変化と自然発生性の変化とを区別するために用量相関の有無を調べることは状況が異なる。

注4 予備試験

生殖発生毒性試験を計画し、開始するにあたっては、多くの場合単回投与毒性試験及び1か月以上の反復投与毒性試験の情報が活用できるであろう。これらの情報から生殖発生毒性試験における被検物質の投与量を設定することが十分可能であろう。

もし、適切な予備試験が行われたならば、その結果は本試験の用量設定の科学的根拠の一部となる。このような予備試験は、原則としてGLP規則に関係なく提出されなければならない。これにより不必要な動物の使用が避けられることもある。

注5 動物種と系統の選択

生殖発生毒性試験における動物種と系統の選択に際しては、適切なモデル動物の選択に留意しなければならない。他の毒性試験に使用されている動物と同じ種と系統を選択することで、予備試験は不要となることもある。もし、選択した動物種がヒトのモデルとして適切であることがキネティクス、薬理及び毒性のデータから示すことができれば、1種のみでの試験で十分であろう。また、第2の動物種を使用するとしても、その動物にヒトとの類似性が同様に示されなければ、その動物種を用いる意味はほとんどないであろう。被検物質、試験計画、成績の解釈との関係で、動物の種（系統）の利点と欠点を考慮しなければならない。

どの動物種にもそれぞれ利点はある。ラットは、一般的な目的にそつたよいモデルである。マウスも同様であるが、利点の範囲はラットより狭い。ウサギは、胚・胎児毒性試験を除く生殖発生毒性試験や反復投与毒性試験のための「非げっ歯類」としては無視されてきた傾向があるが、受胎能試験、特に雄の受胎能試験には価値あるモデル動物としての特性をもっている。ウサギとイヌ（反復投与毒性試験でしばしば第二の動物種として用いられる）は両者とも、苦痛を伴う方法（電気刺激的射精）を使用せずに、精液標本の採取が可能であり、同一個体でいろいろの日時での精液解析が可能である。その他のほとんどの動物種は、一般的な目的に合うよいモデル動物とはいえない。多分、非常に特殊な目的の試験にのみ有用であろう。

いずれの動物種でも次のような欠点がある。

ラット：性ホルモンに対する感受性の違い、プロラクチンが妊娠の成立と初期の妊娠維持のための主要なホルモンであることから、プロラクチン分泌に影響を示すドーパミン作用薬に対しては不適切である。妊娠後期における非ステロイド性抗炎症薬に対する感受性が高い。

マウス：代謝速度が速い。ストレスに対する感受性が高い。奇形の群発（どの種でもみられるが）が特に著しい。胎児が小型である。

ウサギ：キネティクスや毒性試験のデータが十分でない。ある種の抗生物質や消化管の障害に対する感受性が高い。臨床症状の解釈が容易でない。

モルモット：キネティクスや毒性試験のデータが十分でないことが多い。ある種の抗生物質や消化管の障害に対する感受性が高い。胎児期が長い。背景データが十分でない。

ブタ/ミニブタ：背景データの変動が大きい。奇形の群発が多い。大量の被検物質が必要である。飼育設備に費用がかかる。背景データが十分でない。

フェレット：特殊な管理システムがないと季節性の繁殖をする。背景データが十分でない。

ハムスター：静脈内投与が不可能ではないとしても極めて困難である。投与薬物が頬袋に隠される可能性がある。性質が攻撃的である。消化管障害に対して感受性が高い。多くの化合物の催奇形性に対して過度な感受性を示す。胎児が小型である。

イヌ：季節性の繁殖をする。近親交配による弊害が現れやすい。背景データが十分でない。

ヒト以外の霊長類：他の動物と同様にキネティクスがヒトと異なる場合がある。背景データが十分でない。リ

スクの検出のために十分な動物数を使用することがしばしば困難である。障害を検出することを目的とする試験よりも生殖発生毒性が知られている物質の特性を検索する目的の試験に適している。

注6 丸ごとの動物以外の試験系の使用

予備的試験（プレスクリーニング又は優先度を決定するために実施する試験）または追加試験に、丸ごとの動物を用いる試験系以外の試験系が開発され、使用されている。

化学構造または薬効が類似する化合物の予備的試験として用いる場合には、それらの内の一つの化合物で丸ごとの動物での成績を知っておく必要がある（影響が推測できることがある）。このような方策によって、より高度な試験を進める化合物を選択することが可能となる。

追加試験として、またはさらに物質の特性を追求するために、丸ごとの動物以外の試験系を用いることによって詳細な発生過程に対する影響についての研究が可能になる。例えば、毒性の特殊な機序の研究、濃度 - 反応相関の確認、感受期の特定、代謝物の影響の検出などがある。

注7 投与量の決定

反復投与毒性試験と類似の用量を生殖発生毒性試験で用いると、全身性の一般毒性と関連させて、出現する受胎能への影響を説明することができよう。

高用量群では母動物に何らかのごく軽度の毒性が発現することが望ましい。

被験物質の種類により、反復投与毒性試験または生殖発生毒性の予備試験から高用量を決定する場合、その規定要因としては以下のものがあげられる。

- 体重増加抑制
- 体重増加の亢進。特にホメオスタシス機構の変化に関連する場合
- 特異的な標的器官毒性
- 血液学的検査，血液化学的検査
- 過度な薬理作用。これは著明な徴候（例えば、鎮静，痙攣）として発現することも、しないこともある。
- 投与経路にもよるが、被験物質あるいは処方物の物理化学的特性により、実際の投与可能量は限界がある。通常、1 g/kg/day が限界量として十分である。
- キネティクス。低毒性の被験物質の高用量を設定する場合に有用である。しかし、投与量を上げて血漿中あるいは組織内の薬物濃度が上昇しない場合は、投与量を増加する意味はほとんどない。
- 予備試験における胚・胎児死亡率の著明な上昇

注8 用量反応関係の決定

生殖発生毒性試験における値の変動の多くのものでは、偶然による変動が投与による影響かを識別することは容易でなく、用量相関性の有無が投与による影響の可能性を決定する重要な手がかりとなる。生殖発生毒性試験では用量反応勾配は急となることがあるので、用量段階の間隔を広くとることは好ましくないことに留意しなければならない。観察された影響に対する用量反応関係を一つの試験で検討する場合は、少なくとも三段階の用量を用い、適切な対照群を設けることが望ましい。用量反応関係が疑わしい場合には、用量間隔が広くなりすぎるのを避けるために第四の用量を追加しなければならない。このような方策によって生殖発生に対する「無毒性量」が得られるはずである。もし無毒性量が求められない場合は、より詳細な研究や追加試験が必要である。

注9 異なる経路による曝露

ある投与経路がより大きな身体負荷、例えば血中薬物濃度曲線下面積(AUC)、を与えることが示されるならば、それより小さい身体負荷を与える経路や技術的に非常に困難な経路（例えば吸入）を用いて検討する理由はほとんどないであろう。新たな投与経路を用いた試験を計画する前に、キネティクスに関する既存データを利用してその試験を行う必要性について検討しなければならない。

注10 妊娠動物におけるキネティクス

妊娠期及び授乳期の動物を用いたキネティクスの研究は、急激な生理的变化のために問題を生じることがある。こうした問題解決のためには二相ないし三相からなる研究を考慮することが最善である。試験を計画する際、キネティクスのデータ（しばしば、非妊娠動物からのデータ）はその動物種の一般的な適合性に関する全般的情報を提供し、試験計画の決定及び用量選択の参考となりうる。試験中にキネティクスの研究を行うと、薬物投与量の適正さの確認あるいは、予測した動態パターンからの著しい逸脱の立証に役立つ場合もある。

注11 他の代替案の選択例

2 g/kg の用量で死亡例がなく、1 g/kg の用量で何ら反復投与毒性がみられない化合物に関しては、対照群及び二用量群（0.5及び1.0 g/kg）での二世世代試験のみで十分と思われる。しかしながら、動物種の選択が適正であったかあるいは被験物質が有効医薬品であるかという問題が起こるであろう。

一生に1回、単回で使用されるような化合物（例えば、診断薬、手術用薬品）については、投与期間に関係なく、ヒト治療量の二倍以上を反復投与することは困難なことがある。こうした場合には、投与期間を短縮してより高用量を投与するのが適切であろう。雌に関しては、ヒトでの曝露を考慮すると器官形成期を過ぎた時期の投与はほとんど不必要であろう。

ドーパミン作用薬あるいは血中プロラクチン値を低下させる医薬品に関しては、雌ラットの使用は不適切であり、ウサギがおそらくすべての生殖発生毒性試験に適した動物種と思われる。しかしながら、ウサギは催奇形性試験以外ではあまり用いられていない。このことは、ウサギがラットよりもはるかに代謝パターンがヒトに近いような化合物についてもいえる。

反復投与により血漿中薬物動態に変化がみられる医薬品に関しては、胚・胎児発生に及ぼす影響は の試験では十分に評価できないと思われる。そのような場合には1の試験で雌への投与を妊娠17日まで延長することが望ましい。妊娠末期に剖検することで受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響をとともに評価できるであろう。

注12 交配前投与について

受胎能に関する試験の計画における雄の交配前投与期間の短縮は、精子形成過程に関する基礎的研究データの蓄積と再評価に基づくものである。すなわち、雄動物の生殖に限定して選択的に影響を誘発する化合物は稀であること、精子形成に影響を与える化合物はほとんどが常に減数分裂以降の相に影響した精巣重量に影響を示すこと、雌動物との交配は精子形成に及ぼす影響の検出としては感度の低い手段であること、精巣の病理組織学的検査は精子形成に及ぼす影響を検出するための最も感度の高い方法であること、が明らかになってきた。雄動物の生殖器官の適切な病理学及び病理組織学的検査（例えば、ブアン固定、パラフィン包埋、精巣の2 - 4ミクロンの横断切片、精巣上体の縦断切片、PAS及びヘマトキシリン染色）は、精子形成に及ぼす影響を検出するための直接的な検査手段である。精子検査（精子数、精子運動性、精子形態）は、他の方法による知見の確認や影響をさらに特徴づけるために、利用可能な検査である。精子検査には精管もしくは精巣上体尾部由来のサンプルを使用することがより適切である。精子形成（及び雌の生殖器官）に及ぼす影響に関する情報は、反復投与と毒性試験あるいは生殖発生毒性試験から得ることができる。雄の生殖器官の病理組織学的検査及び精子検査によっては検出できない雄の生殖に及ぼす影響を見出すためには、交配前4週間投与したのち雌と交配させる方法が、さらに長期間投与したのち雌と交配させる方法と比べて、少なくとも同程度に有効であることが示されている。バリデーションにより2週間試験が4週間試験と同じように有効であると確認されたので、交配前2週間の投与も許容される。受胎能試験の検索範囲を広げて実施しなければならないことを示唆するデータが認められる場合には、より詳しく当該影響の特徴を明確にするために適切な試験が計画されなければならない。

注13 動物数について

過去及び既存のガイドラインにおいても、また、本ガイドラインにおいても、試験群の動物数を特定することの基礎となる科学的根拠はほとんどない。そこに示されている動物数は、経験的に定められたものであり、試験管理全般にわたり支障をきたすことなく取り扱える最大の試験規模により左右される。このことは、動物の入手・飼育に費用がかかればかかるほど、試験群の規模は小さくなるという事実で示されている。理想的には、すべての動物種に対して少なくとも同程度の規模が要求されるべきであり、霊長類のように使用頻度が低い動物種については動物数をより多くする場合がある。また、必要とされる動物数は影響が発現することが予想されているか否かで決まることも明らかである。高頻度に影響が検出されるものでは少数の動物しか必要でない。影響がないことを推定するために必要な動物数は、検討される変数(エンドポイント)、対照群におけるその発現率(稀なあるいはカテゴリカルな事象)または中央周辺に分散する傾向(計量値の変数あるいは半計量値の変数)に応じて変動する。注23も参照すること。

極めて稀な事象(奇形、流産、同腹児全死亡等)を除きすべての事象で、げっ歯類及びウサギについては、母動物数が16 - 20匹の評価で、ある程度の整合性が試験間で得られている。母動物数が16匹を下まわると試験間の結果は一貫性を欠き、また、20 - 24匹より多くても整合性及び精度が大きく向上することはない。これらの匹数は評価に関係する。もし異なった評価別に投与群をさらに分割する場合には、試験開始時の動物数を二倍にしなければならない。同様に二世世代試験においては、母動物数として16 - 20匹がF1世代動物の最終評価に必要なとされよう。自然減を考慮すると試験開始時におけるF0世代の動物数はより大きくしなければならない。

注14 交配について

交配比率: 雌雄両動物とも投与されるか、または同じ目的ではあるが雌雄別に試験を実施する場合、望ましい交配比は1対1である。高い妊娠率の確保並びに結果の分析と解釈の誤りを避ける観点から、1対1の交配比率は最も安全な選択肢である。

交配期間及び方法: ほとんどの研究機関は2 - 3週間の交配期間を採用している。研究機関により、膣垢中の精子または膣栓が観察され次第雌動物を分離したり、あるいはまた、交配対をそのまま同居しておく機関もある。多くのラットは、同居開始5日以内(すなわち、同居後最初の発情時)に交尾するが、雌動物が偽妊娠を起こす場合もある。偽妊娠動物を約20日間雄動物と同居させておけば、その雌動物の発情周期が再開し妊娠が可能にな

る。

注15 親動物のと殺について

雌動物

雌動物への投与を着床時で終了する場合には、一般的に妊娠13日 - 15日に剖検することが、受胎能あるいは生殖機能に及ぼす影響の評価、例えば、着床部位と胚吸収部位の識別に適切である。

一般に、受胎能試験においては、後期胚死亡、胎児死亡及び形態異常に関する情報を得る目的で妊娠20 / 21日に雌動物をと殺することは、有害作用を検出するために必要とは考えられていない。

雄動物

交配結果が判明するまで雄動物の剖検を延期することが望ましい。剖検の延期により、交配結果が曖昧な場合には、受胎能あるいは不妊を確認するために雄動物を無処置の雌動物と交配させることができる。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の一部分として被検物質が投与された雄動物は、投与が交配期間以降も継続され、と殺が延期された場合には、雄の生殖系に対する毒性評価にも用いることができる。

注16 観察について

投与期間中の妊娠雌動物の体重を毎日測定することにより有益な情報が得られることもある。化合物によっては、妊娠期間以外の時期（交配前、交配中、授乳期間中）にも週2回以上、体重を測定することが望ましい。不妊が疑われるラットまたはマウスについての着床後早期死亡胚の確認は、硫化アンモニウムによる子宮の染色が有効であろう。

注17 出生児への投与について

本ガイドラインは、医薬品の既存のガイドラインに由来しているので、離乳時から性成熟期にわたる薬物曝露については全面的に網羅しておらず、また、生殖寿命の短縮の可能性も取り扱っていない。乳幼児用医薬品の有害作用を検出するためには、特定日齢の出生児に直接投与する特殊試験（事例毎に試験計画をたてること）が考慮されなければならない。

注18 の試験の分割について

の試験を二つの試験、すなわち、胚発生期間に曝露する試験と胎児期間、出産及び授乳期間に曝露する試験とに分割する場合には、両試験とも出生時の出産後評価を行う必要がある。

注19 F1動物

本ガイドラインでは、生殖能の評価に用いるF1個体と同一の動物で行動とその他の機能試験を実施できるという事実に基づいて、1腹当たり雌雄各1匹のF1動物を離乳後の観察に用いるよう推奨している。この場合には、個々の動物について異なる試験間の関連性を互いに参照できるという利点がある。しかしながら、施設によっては行動試験と生殖能の試験に別々の動物を用いているところもあろう。各施設にとってどの方法が最も適切かは、実施する試験の組合せと利用できる設備等により異なる。

注20 同腹新生児数の調整

生殖発生毒性試験において同腹新生児の調整を行うことの可否については、現在なお議論中である。同腹児新生児数の調整については、調整するか否かにかかわらず実験者が説明を加えなければならない。

注21 身体発達、感覚機能、反射及び行動

出生時の身体発達に関する最も確かな指標は体重である。耳介展開、毛生、切歯萌出等の離乳前の発達指標は出生児の体重と高い相関がある。少なくとも妊娠期間が有意に異なる場合には、体重は出生後の時間よりも交尾後の時間経過に関連する。面正向反射、聴覚性驚愕反射、空中落下正向反射、対光反射等の諸反射も同様に身体発達に関連する。推奨される離乳後の発達指標は、雌では膻開口で、雄では陰茎亀頭と包皮との分離である。後者はテストステロンの上昇に関連しているが、精巣下降は関係がない。これらの指標は性成熟の開始を示すものであり、対照群との差が特異的なものかあるいは一般的な成長と関連しているものかを明らかにするために、達成時期の体重を測定することが推奨される。

機能試験：現在まで機能試験はほとんど行動についてのみ行われてきた。これについて多大の努力がなされてきたが、推奨できる特定の試験方法は認められない。研究者は感覚機能、運動機能、学習及び記憶に及ぼす影響を評価する方法を見出す努力をすることが望ましい。

注22 胎児の個体識別と評価

異常の型を明らかにするため、同一個体の標本について種々の検査（すなわち、体重、外表検査、内臓 / 骨格検査）で得られた全所見を関連付けることが可能でなければならない。対照群と高用量群との間で有意な変化が

認められない場合には、中間量及び低用量群の内臓／骨格検査は不要であろう。しかしながら、後日検査できるように固定標本を保管しておくことが望ましい。新鮮標本での解剖法が通常行われている場合には、固定胎児標本とのちに比較することは困難であろう。

注23 推測統計

“有意差”検定（推測統計）は結果の解釈に際し、補助手段としてのみ用いるもので、解釈それ自体は生物学的妥当性に基づいたものでなければならない。単に推測統計学的に有意差がないからといって、対照群との差を生物学的に意義がないものとするのはよくないし、また、“統計的に有意な差”があるから生物学的に意義があるとも考えるのも賢明さに欠ける。特に、片側にのみ裾をひく分布に従う低頻度の事象、たとえば、胚死亡、奇形の場合には、試験の統計的検出力は低いことに留意しなければならない。用いられる指標の信頼区間は影響の大きさがどの範囲にありそうかを示すものである。統計手法を用いる場合、比較する標本単位を考慮しなければならない。すなわち、個々の受胎産物ではなく母体を、雌雄動物に投与する場合には交配対を、二世世代試験の場合には親世代の交配対を標本単位とすることが考えられる。