

厚生労働行政推進調査事業費補助金

食品の安全確保推進研究事業

輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の

安全性評価の加速のための研究

令和2年度 総括研究報告書

研究代表者 窪崎 敦隆

令和4（2022）年 5月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	-----	1
輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の 安全性評価の加速のための研究 窪崎敦隆		
（資料1）米国FDAが公表している食品添加物及び毒性に関する 情報		
（資料2）Redbook 2000		
（資料3）FDA ガイダンスドキュメント		
（資料4）関連論文集		
（資料5）米国への食品添加物の使用許可申請の経験者からの 聞き取り調査結果概要		
（資料6）毒性病理学者を取り巻く現況		
（資料7）EHC240 第4章第5節 遺伝毒性（第2版）		
（資料8）米国における食品添加物使用許可申請支援コンサル ティング会社 調査レポート		
II. 総括研究年度（繰越）終了報告	-----	527
輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の 安全性評価の加速のための研究 窪崎敦隆		
（資料1）FDAのGRAS届出代行の実績のある企業の届出件数		
（資料2）FDAのGRAS届出代行の実績のある企業の規模		
（資料3）米国コンサルタント会社へのインタビュー調査		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	537

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究年度終了報告書

輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の安全性評価の加速のための研究

研究代表者 窪崎 敦隆 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」（令和元年法律第57号）が第200回臨時国会において成立し、令和元年11月27日に公布、令和2年4月1日に施行された。本法律は、日本で生産された農林水産物や加工食品の輸出の促進を図るため、輸出に取り組む事業者の支援等を行うことにより、農林水産業・食品産業の持続的な発展に寄与することを目指している。現在、日本の加工食品は、諸外国で人気が高く輸出量の拡大が見込まれる分野であるが、日本と輸出先国で食品添加物の規制が異なることから、日本で使用が認められている食品添加物を含む加工食品が、輸出国先で食品添加物の使用が認められていないことを理由に輸出できないという問題が生じている。海外に輸出する加工食品に用いられる食品添加物の安全性については、輸出先国としても関心が高く、相手国・地域における食品添加物にかかる評価への対応が輸出促進の課題の一つとなっている。そこで、本年度は、食品添加物、特に天然由来の添加物の規格基準や安全性に関して米国がどのような点に着目して評価しているか等について情報を収集し整理することで、輸出拡大のための規制等への対応に関する問題の解決につながる道筋を示すことを目的にした。

最初に、米国の食品添加物に関する担当政府機関である Food and Drug Administration (FDA) が発出している食品添加物の規格基準や使用許可申請等の情報、および米国の食品添加物の規格基準や規制に関する研究者が発表した論文を入手して記載内容を整理した。次に、日本からの米国への使用許可申請に携わったことがある食品添加物企業等の関係者から、これまでの経験や日本から米国への食品添加物の承認申請する際の注意点や問題点等に関する意見を収集して整理した。それらの指摘から、「毒性試験の国際調和」「環境保健クライテリア改訂情報」「米国コンサルタント業界」の3点について追加の調査研究を行った。

その結果、FDA 発出している食品添加物の新規承認手続に関連した連邦行政規則集を補足する FDA ガイダンスについて新規の関連文書が発出されても漏れなく収集できるような検索方法も含めて今後の利活用を念頭にした情報が整理できた。また、FDA ガイダンス「Redbook 2000」や関連論文に仮訳を付すことで、行政担当官が参考資料として活用できる資料を作成できた。さらに、米国への使用許可申請の経験がある日本の食品添加物企業等の関係者からの意見収集により、使用許可申請の際のコンサルタントの役割の重要性を含めて日本側から見た米国への食品添加物の新規承認手続で注意が必要な項目等について整理できた。また、毒性病理学分野での日米間での所見や評価および専門単語に関する相違点の存在や整理しておくべき資料に関する指摘が得られた。そこで、それらの情報を基に「毒性試験の国際調和」「環境保健クライテリア改訂情報」「米国コンサルタント業界」について追加の調査研究を行い、資料を作成した。

本研究は、食品添加物、特に天然由来の成分で混合物からなる添加物を中心に、諸外国における品質や安全性審査の着目点を明らかにすることにより、今後の輸出拡大のための相手国・地域の規制等への対応に関する問題点の解決につながる道筋を示すことを目指すものであり、本研究の成果を活用することにより、輸出先国のリスク管理上の懸念を生むことなく、我が国の加工食品の輸出の加速につながることを期待される。厚生労働省では農林水産省と共同で食品輸出拡大のため、相手国・地域の規制等への対応強化を進めている。食品添加物に関しては、輸出先国の許可申請等に関する技術支援を行うもので、本研究で得られた情報等を踏まえた申請支援や技術的指導を既に行っており、これらの施策に直接活用されている。また、今後、輸出先国の新規使用許可申請を希望する企業や団体が出てきた際に、本研究の成果を利活用することにより、技術水準の向上や迅速化に資すると考えられ、食品安全政策の適切な施行に貢献すると考えられる。

協力研究者
林新茂 東京農工大学客員教授

A. 研究目的

「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」（令和元年法律第 57 号）が第 200 回臨時国会において成立し、令和元年 11 月 27 日に公布、令和 2 年 4 月 1 日に施行された。本法律は、日本で生産された農林水産物や加工食品の輸出の促進を図るため、輸出に取り組む事業者の支援等を行うことにより、農林水産業・食品産業の持続的な発展に寄与することを目指している。現在、日本の加工食品は、諸外国で人気が高く輸出量の拡大が見込まれる分野であるが、日本と輸出先国で食品添加物の規制が異なることから、日本で使用が認められている食品添加物を含む加工食品が、輸出国先で食品添加物の使用が認められていないことを理由に輸出できないという問題が生じている。海外に輸出する加工食品に用いられる食品添加物の安全性については、輸出先国としても関心が高く、相手国・地域における食品添加物にかかる評価への対応が輸出促進の課題の一つとなっている。そこで、本研究では、食品添加物、特に天然由来の添加物の規格基準や安全性に関して輸出先国がどのような点に着目して評価しているか等について情報を収集し整理することで、輸出拡大のための相手国・地域の規制等への対応に関する問題の解決につながる道筋を示すことを目的にした。

本研究の研究期間 3 年で、収集できた情報に基づき、規格基準や安全性審査の着目点について取りまとめるとともに、期間内に天然由来の添加物の評価に資する事例集等の作成及び問題の解決策をまとめる計画である。令和 2 年度（1 年目）は、米国の規格基準や安全性審査について調査研究を行った。2 年目は欧州、3 年目は欧米以外で、今後、輸出拡大が見込まれる国や地域を選別して調査研究することにしており、加えて国際機関における天然由来成分の品質や評価に関する事例等の解析を行い、本研究期間内に厚生労働行政の課題の解決に資する資料を作成することを目標としている。

B. 研究方法

本研究は、食品の流通のグローバル化を踏まえ、国内で使用が許可されている食品添加物のうち、特に天然由来の添加物を含む加工食品の輸出推進する目的で、輸出先国における品質及び安全性に関する具体的な評価のポイントについて調査研究を実施することにしており、1 年目の令和 2 年度は、米国の規格基準や安全性審査について着目したが、具体的には、以下の項目について調査研究を行った。

B-1. 米国の食品添加物の規格基準等の情報収集

米国の食品添加物に関しては、Food and Drug Administration（米国食品医薬品局、以下 FDA）が担当政府機関

であることから、FDA が発出している食品添加物の規格基準や使用許可申請等の情報の収集を行うことにした。米国の食品添加物の新規承認手続に関しては、連邦行政規則集（the Code of Federal Regulations、以下 CFR という。）等で規定されている。CFR は、連邦政府により連邦官報の中で公布される規則・規定を集成した法典であり、第 21 編に記載された食品添加物の規定に関しては、FDA によって管理されている。一方、FDA は、CFR 以外にも CFR を補足する情報として、Guidance（以下、FDA ガイダンスという。）を発出しており、これらの資料について収集し整理した。特に、安全性試験に関する FDA ガイダンスである「Redbook」は欠くことの出来ない資料である。また、随時新しい FDA ガイダンスが発出され続けていることから、今後も、新規の関連書類を漏れなく収集できるような検索方法も含めて、今後の利活用も念頭おいた情報の整理を行った。また、今後、行政担当官の参考資料として活用できるように FDA ガイダンスである「Redbook 2000」と食品添加物や毒性試験に関連する「Guidance for Industry」を選択して仮訳を付した。

B-2. 米国の食品添加物の規制に関する論文等の整理

米国の食品添加物の規格基準や規制に関して、多元的に制度を捉える観点から研究者等が発表した論文として、最適な 4 報の論文を選んで仮訳を

付し、記載内容を整理した。

B-3. 米国への使用許可申請の経験者から聞き取り調査

日本の食品添加物企業等において、米国への使用許可申請に携わったことがある方々から、これまでの経験を踏まえて日本から食品添加物の米国への承認申請する際の問題点や疑問点等に関する意見を収集・整理することにした。新型コロナウイルス（Covid-19）感染症拡大の影響で、全てを対面での聞き取りで調査出来なかったが、3 組の経験者から意見を伺い、その概要をまとめた。

B-4. 聞き取り調査で指摘された事項の追跡調査

米国への使用許可申請の経験者からの聞き取り調査で指摘された事項のうち、令和 2 年度は、「毒性試験の国際調和」「環境保健クライテリア改訂情報」「米国コンサルタント業界」の 3 点について情報を整理することにした。毒性試験の国際調和については、協力研究者である林新茂東京農工大学客員教授が「毒性病理学者の取り巻く現況」について情報整理を担当した。環境保健クライテリア改訂情報については、具体的に指摘された第 4 章第 5 節「遺伝毒性」を入手して改正点等を確認した。米国での食品添加物使用許可申請におけるコンサルタントの役割について、基礎情報の整理の目的で「米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調

査」を行った。

C. 研究結果

C-1. 米国の食品添加物の規格基準等の情報収集

C-1-1. 米国 FDA が公表している食品添加物及び毒性に関する情報

米国政府が発出している食品添加物の新規承認手続に関連した「CFR」と CFR を補足する「FDA ガイダンス」について情報の収集を行い、資料を「資料 1」にまとめた。

図 1 に記載した通り、FDA が発出している文書には、大きく分けて「CFR」と「FDA ガイダンス」の 2 種類があるが、CFR は、全 50 章で構成される米国内の一般的かつ永続的な規則・規定を集成した法典であり、21 章 (21CFR) が FDA 申請に関連する事項がまとめられた章になっている。そのうち、食品添加物関連の事項は、Part 70~82、170~182 に記載されている。ただ、CFR については、行政機関の他の調査研究でも情報が整理されている。例えば、日本貿易復興機構 (ジェトロ) から「2019 年度米国の食品安全・輸入関連制度の解説 (第三版)」(農林水産・食品部、農林水産・食品課、シカゴ事務所、2020 年 3 月) や「食品添加物規制調査 米国」(農林水産・食品部、農林水産・食品課、ロサンゼルス事務所、2016 年 3 月) が公表されており、CFR に関する詳細については、それら公開資料等から十分な情報が得られると判断できたため、本研究の対象から外すこととした。

一方、FDA ガイダンスについては、業界向けの情報が多いこともあり、過去の他の行政による調査事業等では調査研究されてこなかったと思われるが、本研究の目的を達成するためには極めて重要な情報であると考えられた。FDA ガイダンスは、CFR を補足する文書という扱いになっているが、業界向け (Guidance for Industry) の情報が記載されており、FDA の推奨事項や申請に必要な書類の鋳型など実務に必要な情報が含まれている。2020 年 9 月 24 日までに 2604 報の FDA ガイダンスが出されている。

FDA は、これら FDA ガイダンスを容易に検索できるように、ホームページ上に全ガイダンスを検索できるページ「Search for FDA Guidance Documents」を提供している。そこで、まず、この「Search for FDA Guidance Documents」の機能等を確認することにした (図 2)。「Search」の Window へキーワードを入力して検索した結果を「Food」「Drug」「Cosmetic」に分類してみると、全 2604 ガイダンスは、それぞれ 946 報、1404 報、93 報ずつ含まれていること、「Food」「Drug」「Cosmetic」を横断する内容が多数存在することが明らかになった。さらに、「Food」「Drug」「Cosmetic」いずれにも属さないと考えられるガイダンスが 618 報存在していることが分かった。

実際に検索したガイダンスの例を図 3 に示した。「Search」にキーワードを記入して検索をするとキーワードを含むガイダンスが絞り込まれ画面

下に一覧で表示される(図3左図には「Food」で検索した際の結果を例示した)。一覧の「Summary」にガイダンスの表題が示されているので、興味があるガイダンスをクリックすることで全文を表示させることが出来る(図3右図上)。

検索結果に出た各ガイダンスには以下の項目が羅列されていた。

- Summary (ガイダンスの表題)
- Document (PDF ページへのリンク)
- Issue Date (発行日)
- FDA Organization (CFSAN 等のガイダンス発行元の FDA 機関)
- Topic (ガイダンスの内容に関連する項目やカテゴリー)
- Guidance Status (「Draft」または「Final」)
- Open for Comment (パブリックコメントの募集状況)

また、「Export Excel」をクリックすると絞り込んだガイドラインの上記の項目を含めた情報の一覧が Excel シートとしてダウンロードすることが出来た。

FDA ガイダンスは、適宜発出されている。実際、2020年9月24日以降、約半年で30以上のガイダンスが新たに発出されていた。そこで、検索ページから本研究の対象である食品添加物や毒性試験に関する必要な情報を今後も取りこぼすことなく収集する条件について検討することにした(図4)。最初に「Search」を用いてキーワード検索を行ったが、不足なく情報を収集できる適切なキーワードを見つ

けることが出来なかった。そこで、「Topic」に注目することにした。

「Topic」は、各ガイダンスの分類分けを容易にするために、記載内容に関連する項目やカテゴリーが付与されたもので、1つのガイダンスに複数付与されていることも多い。

作業として以下のことを行った。本研究の対象である食品添加物や毒性試験に関する主要なキーワードとして「Additive」と「Tox」で全ガイダンスに対して検索を行うと、ガイダンスがそれぞれ134報と99報に絞り込まれた。それぞれのガイダンスには「Topic」が紐づけされているが、重複を除くとそれぞれ40個と57個に集約することが出来た。さらに「Additive」と「Tox」の重複している「Topic」21個を除くと76個の「Topic」が食品添加物か毒性試験と関連の強い「Topic」と考えられた。さらに、76個の「Topic」とガイダンスの関連を丁寧に確認した結果、以下の6種類の「Topic」が特に関連が強いと考えられた。

- Food & Color Additives
- GRAS
- Advisory committees
- CGMP
- Ingredients
- Safety - Issues, Errors, and Problems

この考えが正しいことを確認するために、「Topic」の検索機能を用いて、この6種類の「Topic」を1つでも含むガイダンスを抽出したところ、233報であった(Table 1)。全2604ガイダ

ンスを丁寧に確認して食品添加物か毒性試験と関連のあるガイダンスが、233 個の中に全て含まれていると判断できた。今後、食品添加物や毒性試験に関する必要な情報を今後も取りこぼすことなく収集するには、上記の6種類の「Topic」で絞り込むと有効であると考えられた。

今回、抽出できた233報のガイダンスを「Redbook」「Guidance for Industry」「GMP」「CPG」「CVM」「Others (Drug, Medical device, et al)」の6種類に分類してみたところ、それぞれ28報、53報、4報、45報、11報、92報であることが分かった(図5)。そのうち、「Redbook」と「Guidance for Industry」については、今後の食品安全政策を考える上で重要な情報が多く含まれると考えられたことから、行政担当官の参考資料として活用できるように仮訳を付すことにした。

「Redbook」は、抽出された28報のうち「1993 Draft Redbook II」と「Guidance for Industry and Other Stakeholders: Redbook 2000 : Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients」を除く26報(以下、「Redbook 2000」という。)を対象とし、「Guidance for Industry」53報のうち、食品添加物や毒性試験と関連の深い13報を対象に仮訳を付した。対象とした計39報は、資料1のTable 1の「Pick up」に「○」を記入した。

C-1-2. Redbook 2000

Redbook 2000 として整理対象にした26ガイダンスの標題と公表年は以下であった。

- I. 序論 (2007年7月)
- III. 推奨される毒性試験 (2007年7月)
- IV. A. 毒性試験に関するガイドラインの概要 (2007年4月)
- IV. B. 1. 毒性試験の設計及び実施に関する一般的なガイドライン (2007年4月)
- IV. B. 2. 毒性試験結果の報告に関するガイドライン (2007年4月)
- IV. B. 3. 毒性試験における病理学的考察 (2007年4月)
- IV. B. 4. 毒性試験における統計学的考察 (2007年6月)
- IV. C. 1. 遺伝毒性の短期試験 (2007年7月)
 - IV. C. 1. a. 細菌を用いる復帰突然変異試験 (2018年7月)
 - IV. C. 1. b. in vitro 哺乳類染色体異常試験 (2003年11月)
 - IV. C. 1. c. マウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (2013年11月)
 - IV. C. 1. d. 哺乳類赤血球小核試験 (2000年7月)
- IV. C. 3. a. げっ歯類を用いた短期毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 3. b. 非げっ歯類を用いた短期毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 4. a. げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 4. b. 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験 (2003年11月)

- IV. C. 5. a. げっ歯類を用いた慢性毒性試験 (2007年7月)
- IV. C. 5. b. 非げっ歯類を用いた慢性毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 6. げっ歯類を用いたがん原性試験 (2006年1月)
- IV. C. 7. げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験 (2007年7月)
- IV. C. 8. げっ歯類を用いたがん原性試験または慢性毒性試験に追加する子宮内曝露段階 (2007年7月)
- IV. C. 9. a. 生殖試験に関するガイドライン (2007年7月)
- IV. C. 9. b. 発達毒性試験に関するガイドライン (2000年7月)
- IV. C. 10. 神経毒性試験 (2007年7月)
- VI. B. 疫学 (2001年10月)
- VII. 用語解説 頭字語と定義 (2007年4月)

全 26 ガイダンスについては、行政担当官の参考資料として活用できるように仮訳を付した(資料2)。公表された年からも分かるように、これまでに改定はなされているが最近は作業が行われていない。このことは、記載内容が必ずしも最新の手法を取り入れているわけではないことを示している。実際、Redbook 2000 の中で更新日が最も新しい「細菌を用いる復帰突然変異試験 (2018年7月)」であっても、古典的な手法の記載になっていた。来年度以降に行う欧州やその他の地域、国際機関で使用されているガイダンスの調査研究で得られた資料を整理する際にも、Redbook 2000 の情報は有効に活用できると考えられた。

C-1-3. FDA ガイダンスドキュメント

「Guidance for Industry」として抽出された 53 報のうち、食品添加物や毒性試験と関連の深い 13 報を選んだところ、「コンプライアンスポリシーに関する指針」が 2 報と「業界向け指針」が 11 報であった。整理対象にした 13 ガイダンスの標題は以下であった。

コンプライアンスポリシーに関する指針 (2 報)

- CPG Sec 500.200 食品添加物 - 「GRAS」

- CPG Sec 587.300 着色料

業界向け指針 (11 報)

- 食品添加物局 (OFAS) への規制上の申請、第 IV 部 - 食品添加物・着色料に関する申請
- 食品添加物局 (OFAS) への規制上の申請、第 VI 部 - GRAS 通知
- ヒトまたは動物用の食品に使用することが意図された物質の GRAS についてよくある質問
- 着色料に関する請願 - 食品、医薬品、化粧品、医療機器用の着色料についての化学・技術的データの提出に関する FDA の推奨
- 食品添加物に関する請願の迅速審査
- 食品添加物および着色料に関する請願前諮問
- 食品添加物または着色料の請願審査に関する質問と回答
- 直接食品添加物の請願に用いる化学・技術的データの提出に関する推奨

- ・酵素製剤としての食品添加物の請願
および GRAS 通知で提出する、化学・
技術的データについての推奨
 - ・食品で使用される添加物について推
奨される毒性学的試験の概要一覧
 - ・毒性学データ報告用ひな形
- 全 13 ガイダンスについては、行政
担当官の参考資料として活用できる
ように仮訳を付した（資料 3）。

C-2. 米国の食品添加物の規制に関する論文等の整理

C-2-1. 関連論文の収集・整理

米国の食品添加物の規格基準や規制に関連する論文として、Foods & Food Ingredients Journal of Japan 誌より以下の 4 報を選んで記載内容を整理した。また、行政担当官の参考資料として活用できるように仮訳を付した資料を作成した（資料 4）。

(1) 合成および天然着色料

“Synthetic and Natural Food Colorants”

日本、欧州、米国における天然と合成着色料の定義、規制の歴史と現在の規制、そしてその背景等について報告している。

・着色料の使用は、食品の第一印象をよくするため、消費者の期待を満たすことを目的としている。現代の消費者において、健康志向の高まりによる合成化学物質などが使用されていない「クリーンラベル」製品の需要が高まっており、食品への合成着色料の不使用、天然着色料の安全性を期待されて

いる。

・米国において、着色料は「食品、医薬品、化粧品、または人体に添加・塗布する場合に色を付与する染料、顔料、物質」と定義され、化学的に合成されている場合「認証着色料」、天然由来の場合「認証免除」と分類される。すべての着色料は市場に出る前に FDA による認証を必要とし、GRAS（一般的に安全と認められている食品）による免除は認められない。認証には FDA への color additive petitions（着色料請願書）の提出が必要であり、FDA は請願者に対して支援を提供する場合がある。

・EU の規制では、着色料において「天然」は定義されておらず、「天然」と「合成」の区別もされていない。また、表示義務には色素の名称は含まれておらず、食品添加物に付与される分類番号である E 番号が代わりに必要とされる。添加物の安全性に関するリスク評価は EFSA とその科学パネルによって提供されているが、その採用に関しては EU 加盟国独自とする柔軟性がある。

(2) 天然食品着色料：最新の知識と研究動向 “Natural Food Colorants: Current Knowledge and Research Trends”

近年需要の高まっているカロテノイド類、アントシアニン類、ベタニン、クロロフィル類の天然着色料の構造の特徴・安定性・加工工程や保管期間における退色に関する化学的側面について報告している。

・合成着色料の代替を求める消費者の声に加え、食品への天然着色料の使用で直面した技術的な課題が天然着色料の研究分野を進展させてきている。現在、市場に流通する天然着色料は主に、植物原料由来のカロテノイド類、アントシアニン類、ベタニン、クロロフィル類と微生物由来のカロテノイド類である。色素構造の特徴や安定性、食品の加工工程および保管期間中の退色についての詳細な試験により、安定性の乏しい天然着色料の取り扱い方法については多くの知見がもたらされてきた。アントシアニンとベタシアニンについては、新規で安価に生産可能な植物原料が求められており、カロテノイドについては工業規模で安価に供給可能な微細藻類による生産の最適化が求められている。収率のよい緑色の抽出法や安定化、多彩で高品質な着色料の製造およびヒトの健康への影響評価も重要な研究課題である。安定化技術としてはカプセル化、マイクロカプセル化、ナノカプセル化が広く評価されている。

(3) 食品着色料における安全性評価試験の要項 “Safety Assessment Testing Requirements for Food Color Additives”

日本、欧州および米国における着色料の安全性試験のうち、特に安全性試験ガイダンス、遺伝毒性試験、毒性試験、国際的な安全性評価ガイドラインについて報告している。

・日本、欧州および米国において、着

色料を市場に出すためには一通りの *in vivo* と *in vitro* の毒性試験を要求される場合がある、これは、多くの医薬品などと異なり着色料が生涯にわたり摂取される可能性が高いためである。

・着色料が直接的、もしくは間接的に生殖細胞や体細胞のDNA配列や構造を変えて、がんなどを引き起こす可能性を確認する目的で行われる。具体的な試験の実施にはICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)のガイドラインが着色料を含む食品添加物にも適用される。加えて、EFSAは、添加物に適用される遺伝子試験方針について科学的な見解を提供、米国FDAはFDA Redbookで試験ガイドラインを提供している。

・追加で要求される可能性のある *in vivo* の安全性評価試験に関して、米国では具体的な追加要求事項を記載したうえで、食品添加物の化学構造と、予想されるヒトへのばく露に基づいた懸念レベルを用いた分類システムが採用されている。欧州では安全性試験には段階的なアプローチを採用しており、毒物動態試験、亜急性毒性試験、生殖・発達毒性試験、生体内遺伝子毒性試験を含む最低限の試験を実施している。第二段階は、吸収性や毒性や遺伝毒性の証拠があった、というようにケースバイケースで次の段階が必要であると決定された場合に追加の試験が要求される。

(4) 米国における着色料規制の興味深

い一面：Interesting Aspects of Color Additive Regulation in the U.S.

共通点の多い各国の着色料の規制において、米国特有の規制である FDA による特定の添加物における市販前認証 (pre-market certification) のプロセスと義務について報告している。

- ・米国の着色料規制の特徴の一つは、合成着色料の販売前認証義務である。連邦規則法典 (CFR) が、米国の色素添加物規制の情報源となっていて、着色料に影響のある規定は、21CFR に記載されている。ここでは、販売のために市場に出す前に認証を受けなければならない着色料の基準と一緒に、認証された着色料のリストが含まれている。これらの規則は、21CFR パート 70-82 に記載されており、着色料は原材料に関係なく、使用される前に米国の規制の下で認証される必要がある。21CFR のパート 73、74、82 には、化学的規格、用途及び制約、表示義務、認証のための義務に沿って、認証された着色料を明らかにしている。また、認証免除になる着色料は植物または鉱物由来であるが、その例とその規制についてはパート 73 に記されている。

C-3. 米国への使用許可申請の経験者から聞き取り調査

C-3-1. 聞き取り調査結果

日本国内の食品添加物企業で米国への使用許可申請の経験がある方々からの情報収集により、日本側から見た米国への食品添加物の新規承認手

続で注意が必要な項目等の意見を整理した (資料 5)。最初に、米国申請への使用許可申請の経験について伺ったが、「Generally Recognized as Safe (GRAS)」や「着色料」について経験があるとのことだった。また、使用許可申請の際のコンサルタントの役割については、その重要性が再確認できる意見が出されるとともに、優秀なコンサルタントを探すことの難しさも明らかとなった。米国への使用許可申請の問題点や今後の課題、国に支援を求める点については、「毒性・病理学分野では、日本と米国で同じ所見に対する評価や用いる専門単語に異なる点が存在する」「Environmental health criteria 240 (EHC240) が 2020 年に改定されたので整理することが有用であり、その中でも特に遺伝毒性の部分は重要」「コンサルタントや安全性試験の費用が高額であるので、輸出促進には国の支援が必要」「日本国内で FDA Redbook に対応できる機関が少ないことから、国管轄で国内に開発業務委託機関の設置を希望」などの意見が出された。これら指摘のあった点で、問題を回避するために事前に対策を考えておく必要がある項目のうち、今年度は「毒性試験の国際調和」「環境保健クライテリア改訂情報」「米国コンサルタント業界」についての調査研究に着手することにした。

C-4. 聞き取り調査で指摘された事項の追跡調査

C-4-1. 毒性試験の国際調和

毒性試験の国際調和については、林新茂東京農工大学客員教授が、日本毒性病理学会国際委員長の経験を踏まえて「毒性病理学者の取り巻く現況」として情報を整理した(資料6)。米国への日本の食品添加物の使用許可申請の経験がある方々からの指摘にあったように、日本で行った毒性試験の結果が海外で使用することが難しい、または難しい可能性があると考えられると、使用許可申請のための毒性試験実施機関を大きく制限する可能性が出てくる。この問題点を解決するためには、国際毒性病理学専門家協会フェローのような国際的な舞台で毒性病理学分野の国際調和に向けた活動をされている研究者の助言が重要と考えられた。

C-4-2. EHC240 遺伝毒性

申請経験者への聞き取り調査の結果を受けて、提案のあった EHC240 で遺伝毒性について記載されている第4章第5節を入手した。EHC240 は、2009年に公開された FAO / WHO 合同専門家委員会 (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; JECFA) および FAO / WHO 合同会議 (the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues; JMPR) の作業のための「食品中の化学物質のリスク評価の原則と手法」に関する文書である。1960年代以降、コーデックス委員会、加盟国およびその他の利害関係者に対して、食品添加物に関しては JECFA、農薬残留物に関しては JMPR が科学諮問機関

としての役割を果たしてきた。JECFA と JMPR は、それぞれ手引書を作成して作業を進めていたが、食品中の化学物質の評価の手順と複雑さに対応するため合同で作成して公表した。しかし、2009年以降の化学分析、毒性学的評価及びリスク評価手順の大幅な進歩を反映するために、章ごとに改定の作業が進められ、2020年11月に「Genotoxicity Section 4.5」の改訂版として「Genotoxicity Section 4.5 (Second edition)」が、公表された。改訂された第2版は、これまでの初版と比較して、10ページから86ページへ、文字数にして約3,600 words から約26,400 words へ大幅な変更が加えられていることが分かった(資料7)。現時点では、第2版だけが有効ということにはまだなっていないが、今後の世界の遺伝毒性試験を考える上で、とても重要であることから、OECD テストガイドラインを含めた他の手引書との比較を来年度以降も続けることにした。

C-4-3. 米国コンサルタント基礎情報

米国での食品添加物使用許可申請におけるコンサルタントの役割について、今年度(2年度)中の基礎情報を整理する目的で「米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調査」を行った。まず、デスクトップ調査により、企業ウェブサイト、Euromonitor、LinkedIn の公開情報から米国における食品添加物許可申請を支援する企業として、食品

添加物または食全般に関する規制への解決手段の提示していること、また個人事業者を除くため、従業員数が2名以上の企業または企業名に Inc.、LLC、LLP が含まれている企業を選定することにした。その結果、選定基準を満たす該当企業が60社程度であることが分かった。次に、それらの企業のうち「企業名」「所在地」「電話番号」「住所」「設立年」「資本金」「従業員数」「URL」の情報を、また可能な限り「参考費用」「オフィス所在地（対応可能州）」「その他の特記事項」に関する情報が多い50社について整理した。その結果、選定した企業のうち、約半数が従業員数50人以下の小規模な企業であること（資料8）、資本金や相談費用を公開情報としては開示していない企業が多いため、見積入手には問い合わせが必要となること、FDAの規制に関して専門性の高い弁護士や有識者に業務を委託している場合もあること、特にカリフォルニア州は「Proposition 65」という独自の厳しい基準を設けており、その順守に特化したコンサルティングサービスを提供する企業も存在することが明らかとなった。今回、収集・整理した情報は、今後コンサルティング会社から詳細を聴取する際の重要な基礎情報になると考えられた。

D. 考察

本研究は、食品添加物、特に天然由来の成分で混合物からなる添加物を中心に、諸外国における品質や安全性

審査の着目点を明らかにすることにより、今後の輸出拡大のための相手国・地域の規制等への対応に関する問題点の解決につながる道筋を示すことを目指すものであり、本研究の成果を活用することにより、輸出先国のリスク管理上の懸念を生むことなく、我が国の加工食品の輸出の加速につながることを期待される。令和2年4月1日に農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律が施行されたことを受けて、厚生労働省では農林水産省と共同で食品輸出拡大のため、相手国・地域の規制等への対応強化を進めている。食品添加物に関しては、輸出先国の許可申請等に関する技術支援を行うもので、本研究で得られた情報等を踏まえた申請支援や技術的指導を既に行っており、これらの施策に直接活用されている。また、今後、輸出先国の新規使用許可申請を希望する企業や団体が出てきた際に、本研究の成果を利活用することにより、技術水準の向上や迅速化に資すると考えられ、食品安全政策の適切な施行に貢献すると考えられる。

日本では、天然由来の成分で混合物からなる食品添加物の多くは、平成8年に告示された「既存添加物名簿」に記載されているが、これらの添加物は、その当時の手法に則った毒性試験結果や使用実績に基づいて使用が認められている。そのため、米国への使用許可申請の際には、最新の国際的な試験条件に基づいた追加の試験結果を準備する必要がある。ただ、本研究で

の聞き取り調査の指摘にあるように、毒性病理学分野では、日本と米国で同じ所見に対する評価や用いる専門単語に異なる点が存在することが問題として挙がってきている。この問題から申請時に求められている GLP や OECD テストガイドラインに準じた毒性試験であっても、日本国内で準備した試験結果を用いると、米国への申請時に円滑に話が進まない要因になっている。専門単語の国際調和は、短期間で解決できる問題ではないが、本研究でも引き続き関心を持って調査研究を行うことにしている。一方、短期的な対応としては、関連分野の研究者の協力や助言を得ながら申請を進める方法が考えられる。米国への申請では、FDA 担当者との事前相談ができる仕組みがあり、その際に、必要な書類を準備するだけでなく、同席する FDA 側の科学者との論理立てた議論を行うことが重要である。毒性病理学分野での研究者の選択では、国際毒性病理学専門家協会フェローを活用することが有効である。

本研究を通じて、日本の食品添加物を海外で使用できるように許可の申請を行ったことがある方々からの情報が非常に有益であることが分かったことから、Covid-19 感染防止の観点から Web 会議システムも活用しつつ、引き続き来年度以降も行うこととする。

米国の食品添加物の新規承認手続に関しては、CFR や FDA ガイダンスで規定されている。例えば、着色料等の

申請について Guidance が出されているが、「Safety invitations (安全性評価)」については、「Not covered by these recommendations (推奨事項対象外)」と書かれており、安全性評価については当該分野に詳しいコンサルタントを仲介して作業を進めることが想定されている可能性が高く、米国におけるコンサルタントの役割や業界規模等に関して情報を整理する必要があると考えられた。申請時の計画では、「安全性評価におけるコンサルタントの役割に関する情報」を調査研究する予定にしていたが、Covid-19 感染拡大の影響から訪米が困難となり調査研究を延期しているが、往来が可能になり次第遂行することになっている。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

米国 F D A が公表している食品添加物及び毒性に関する情報の収集

CFR (連邦行政規則集)

- 全50章で構成される米国内の一般的かつ永続な規則・規定を集成した法典
- 21章(21CFR)がFDA申請に関連する章
- 食品添加物についてはPart70~82、170~182

Title	Volume	Chapter	Browse Parts	Regulatory Entity
Title 21		1	1-99	FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
Food and Drugs		2	100-169	
		3	170-199	
		4	200-299	
		5	300-499	
		6	500-599	
		7	600-799	
		8	800-1299	
		9	1300-1399	DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF JUSTICE
			1400-1499	OFFICE OF NATIONAL DRUG CONTROL POLICY

https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=991313e6976280119bdcb9256dc25963&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl

FDA ガイダンス

- FDAが業界向けに発行しているガイダンス (Guidance for Industry)
- CFRの下位に位置するがFDAの推奨事項や申請に必要な書類の鑄型などが記載されている
- FDAはHP上に全ガイダンスの検索ページ「[Search for FDA Guidance Documents](#)」を提供している

<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>

Search for FDA Guidance Documents

Search for FDA Guidance Documents

Subscribe to Email Updates

Share Tweet LinkedIn Email Print

The table below lists all official FDA Guidance Documents and other regulatory guidance. You can search for documents using key words, and you can narrow or filter your results by product, date issued, FDA organizational unit, type of document, subject, draft or final status, and comment period.

This feature is provided to give a convenient way to search for all FDA guidance documents from a single location.

If you cannot find the document you're looking for here, you can browse separate collections of guidance documents by topic.

[Go to Guidance Document Search](#)

- Browse Guidance Documents By Topic
- About FDA Guidance Documents
- Commenting on Guidance Documents
- Report on Good Guidance Practices

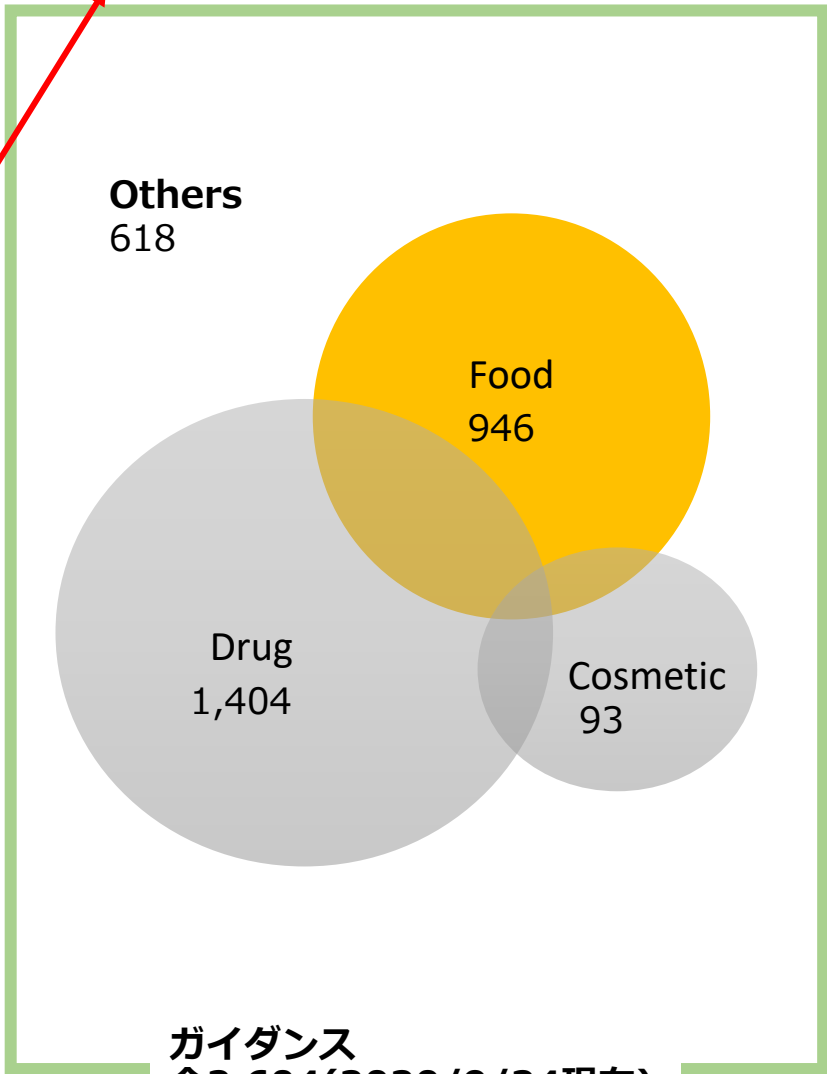
Guidance Document Search

Search

Showing 1 to 10 of 2,616 entries

キーワード入力欄

キーワード検索結果



ガイダンス
全2,604(2020/9/24現在)

実際に検索したガイダンスの例

Search

food

Showing 1 to 10 of 952 entries (filtered from 2,616 total entries)

Filters

Product:

FDA Organization:

Topic:

Issue Date:

Draft or Final:

Open for Comment:

Document Type:

Comment Closing Date on Draft*:

Clear Filters

Export Excel Show 10 entries

Summary	Document	Issue date	FDA Organization	Topic	Guidance Status	Open for Comment	Comment Closing Date on Draft	Docket Number
Guidance for Industry: The Declaration of Allulose and Calories from Allulose on Nutrition and Supplement Facts Labels	PDF (108.49 KB)	10/16/2020	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Labeling, Nutrition Label	Final	No		FDA-2019-D-0725
Guidance for Industry: U.S. Agent Voluntary Identification System (VIS) for	PDF (133.08 KB)	10/16/2020	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Registration,	Final	No		FDA-2013-S-0610

Guidance for Industry: The Declaration of Allulose and Calories from Allulose on Nutrition and Supplement Facts Labels

OCTOBER 2020

Download the Final Guidance Document

Read the Federal Register Notice

Final

Share Tweet LinkedIn Email Print

Docket Number: FDA-2019-D-0725

Issued by: Center for Food Safety and Applied Nutrition

October 2020

This guidance provides our current view on the declaration of allulose on Nutrition and Supplement Facts labels, as well as on the caloric content of allulose. This guidance also advises manufacturers of our intent to exercise enforcement discretion for the exclusion of allulose from the amount of "Total Sugars" and "Added Sugars" declared on the label and the use of a general factor of 0.4 calories per gram (kcal/g)² for allulose when determining "Calories" on the Nutrition and Supplement Facts labels pending review of the issues in a rulemaking.

In arriving at our decision to consider the exercise of enforcement discretion, we considered data and information provided in citizen petitions and in comments to the

検索結果に出た各ガイダンスには以下の項目が羅列されている

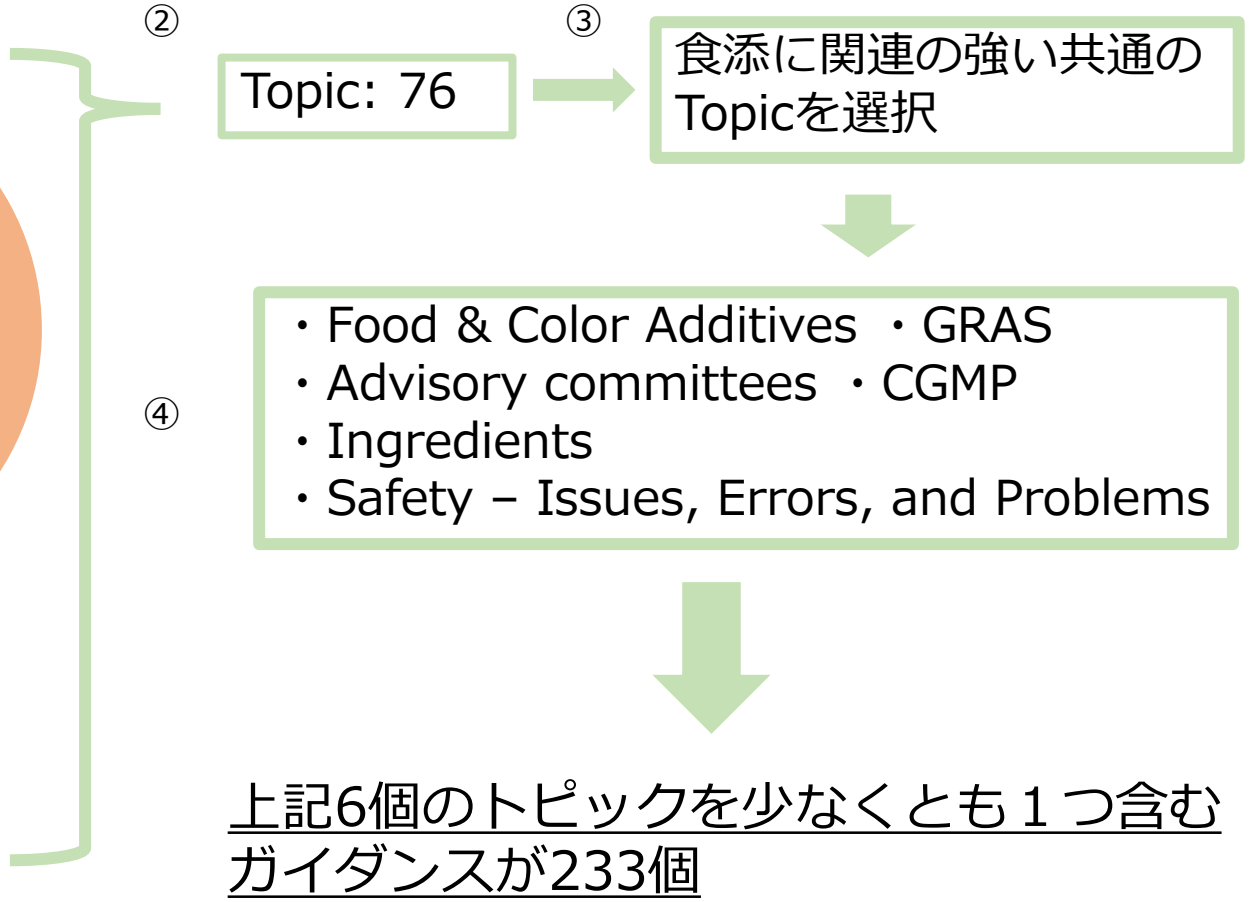
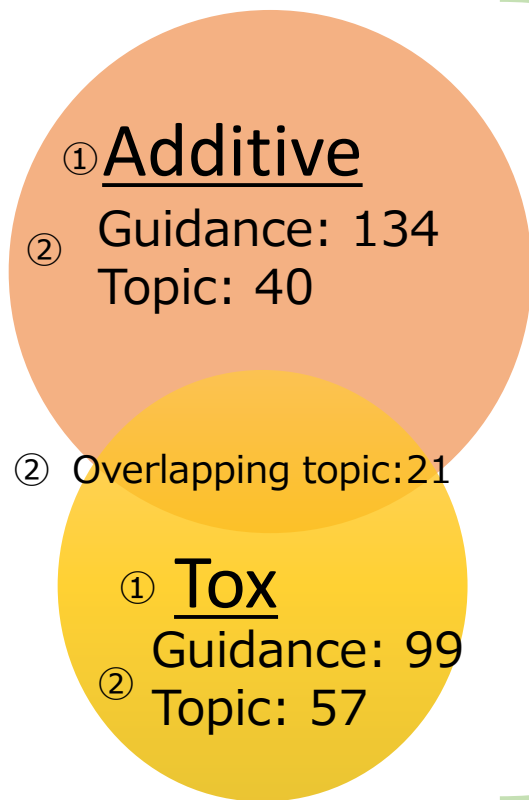
Summary	ガイダンスの表題
Document	PDFページへのリンク（ないものもある）
Issue Date	発行日
FDA Organization	CFSAN等のそれぞれのガイダンスを発行しているFDAの各センター
Topic	ガイダンスの内容に関連する項目、カテゴリーのこと（例：Food & Color Additive等）一つのガイダンスに複数つく場合もある
Guidance Status	案か最終版か
Open for Comment	パブリックコメントを募集しているかどうか

必要な情報を収集するための検討

Search for FDA Guidance Documentsにてキーワード検索した手順と結果

①サーチ機能を使い
"Additive"と"Tox"で検索
↓
キーワードだけの場合
欲しい情報が漏れてしまう
↓
Topicに着目

- ②結果"Additive"は134個のガイダンス、40個のTopic、
"Tox"は99個のガイダンス、57個のTopic
- ③重複を除き76個のTopicから関連の強い6個のTopicを選出
- ④6個のTopic一つ一つを検索にかけ、結果に出たガイダンスを
リストアップした結果233個のガイダンスが見つかった



233のガイダンスの主なトピック(計95個の内12個)

Administrative/Procedural
 Advisory Committees
 Chemistry, Manufacturing, and Controls(CMC)
 Current Good Manufacturing Practice(CGMP)
 Food & Beverage Safety
 Food & Color Additives
 Generally Recognized as Safe(GRAS)
 GRAS
 Import
 Ingredients
 Investigation & Enforcement
 Safety-Issues Errors and Problems

233のガイダンスの種類とその数

Redbook	28
Guidance for Industry	53
GMP	4
CPG	45
CVM	11
Others (Drug, Medical device, etc..)	92

Redbook2000がまとめられている
 PDF1ページ目 (全286ページ)

Redbook 2000

U.S. Department of Health & Human Services

FDA U.S. Food and Drug Administration

[Home](#) > [Food](#) > [Guidance, Compliance & Regulatory Information](#) > [Guidance Documents](#)

Redbook 2000
 July 2000; Revised July 2007

**Guidance for Industry and Other Stakeholders
 Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food
 Ingredients**
Redbook 2000

*Additional copies are available from:
 Office of Food Additive Safety, HFS-200
 Center for Food Safety and Applied Nutrition
 Food and Drug Administration
 5001 Campus Drive
 College Park, MD 20740
 (Tel)301-436-1200
<http://www.cfsan.fda.gov/guidance.html>*

U.S. Department of Health and Human Services
 Food and Drug Administration
 Center for Food Safety and Applied Nutrition
 July 2000; Updated July 2007

Note to reader: Individual chapters/sections of this internet version of "Redbook" are available as linked documents via the Table of Contents. The date of revision for each chapter and /or chapter section is provided in the Table of Contents and the individual documents. These revisions supersede previous versions of Redbook.

Table of Contents

I Introduction¹ (July 2007)

II. Agency Review of Toxicology Information Submitted in Support of the Safety Assessment of Food Ingredients (available in 1993 Draft "Redbook II"²)

III Recommended Toxicity Studies³ (July 2007)

IV. Guidelines for Toxicity Studies

A. **Introduction⁴** (November 2003)
 B. General Recommendations for Toxicity Studies

000001
 3/3/2010 Page 1 of 4

Table 1

Search for FDA Guidance Documents | FDA

Pick up	Summary	Document	Issue date	FDA Organization	Topic	Guidance Status	Open for Comment	Comment Closing Date on Draft	Docket Number
	1993 Draft Redbook II		08/01/1993	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Draft	No		
	2016 Medical Gas Container-Closure Rule Questions and Answers Guidance for Industry: Guidance for Industry	PDF (81.54 KB)PDF (81.54 KB) of 2016 Medical Gas Container-Closure Rule Questions and Answers Guidance for Industry: Guidance for Industry	01/17/2017	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Labeling	Final	No		
	Adverse Event Reporting for Outsourcing Facilities Under Section 503B of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	PDF (138.48 KB)PDF (138.48 KB) of Adverse Event Reporting for Outsourcing Facilities Under Section 503B of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	10/08/2015	Center for Drug Evaluation and Research	Compounding, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No	05/17/2015	FDA-2014-D-2138
	Applying Human Factors and Usability Engineering to Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (918.39 KB)PDF (918.39 KB) of Applying Human Factors and Usability Engineering to Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	02/03/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Premarket, 510(k), IVDs (In Vitro Diagnostic Devices), Labeling, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Anesthesiology , Laboratory Tests, Physical Medicine, Orthopedic, Ophthalmic, Obstetrical & Gynecological, Neurological, Molecular and Clinical Genetics, Immunology & Microbiology , Cardiovascular , Hematology & Pathology , General Hospital & Personal Use , General & Plastic Surgery , Gastroenterology-Urology , Ear, Nose & Throat , Digital Health, Dental , Clinical Chemistry & Clinical Toxicology , Radiology	Final	No	04/03/2016	FDA-2011-D-0469
	Assessment of Radiofrequency-Induced Heating in the Magnetic Resonance (MR) Environment for Multi-Configuration Passive Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (393.81 KB)PDF (393.81 KB) of Assessment of Radiofrequency-Induced Heating in the Magnetic Resonance (MR) Environment for Multi-Configuration Passive Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	03/22/2016	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, 510(k), Labeling, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Device Exception (IDE), Anesthesiology , Physical Medicine, Orthopedic, Ophthalmic, Obstetrical & Gynecological, Neurological, Cardiovascular , General Hospital & Personal Use , General & Plastic Surgery , Gastroenterology-Urology , Ear, Nose & Throat , Dental , Radiology	Final	No	08/28/2015	FDA-2015-D-2104
	Best Practices for Conducting and Reporting Pharmacoepidemiologic Safety Studies Using Electronic Healthcare Data Sets	PDF (501.28 KB)PDF (501.28 KB) of Best Practices for Conducting and Reporting Pharmacoepidemiologic Safety Studies Using Electronic Healthcare Data Sets	05/14/2013	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2011-D-0057
	Best Practices in Developing Proprietary Names for Drugs	PDF (279 KB)PDF (279 KB) of Best Practices in Developing Proprietary Names for Drugs	05/29/2014	Center for Drug Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No		FDA-2014-D-0622
	Clinical Considerations for Investigational Device Exemptions (IDEs) for Neurological Devices Targeting Disease Progression and Clinical Outcomes: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (176.87 KB)PDF (176.87 KB) of Clinical Considerations for Investigational Device Exemptions (IDEs) for Neurological Devices Targeting Disease Progression and Clinical Outcomes: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	11/07/2016	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, Advisory Committees, 510(k), Clinical - Medical, Good Clinical Practice (GCP), Labeling, Laser Notice, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, HUD/HDE, Neurological	Final	No	06/05/2016	FDA-2016-D-0539
	Complementary and Alternative Medicine Products and their Regulation by the Food and Drug Administration: Draft Guidance for Industry	PDF (123.98 KB)PDF (123.98 KB) of Complementary and Alternative Medicine Products and their Regulation by the Food and Drug Administration: Draft Guidance for Industry	02/27/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research	Premarket, Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Draft	No	03/01/2006	FDA-2006-D-0102

	Computerized Systems Used in Clinical Investigations: Guidance for Industry	PDF (52.72 KB)PDF (52.72 KB) of Computerized Systems Used in Clinical Investigations: Guidance for Industry	05/10/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Clinical Policy, Office of Good Clinical Practice Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Good Clinical Practice (GCP)	Final	No		FDA-2004-D-0039
	Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology: Guidance for Industry	PDF (111.45 KB)PDF (111.45 KB) of Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology: Guidance for Industry	06/23/2014	Office of the Commissioner, Office of Policy, Legislation, and International Affairs, Office of Policy	Premarket, Food & Color Additives, Records	Final	No		FDA-2010-D-0530
	Contents of a Complete Submission for the Evaluation of Proprietary Names	PDF (146.01 KB)PDF (146.01 KB) of Contents of a Complete Submission for the Evaluation of Proprietary Names	04/11/2016	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Labeling, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2008-D-0592
	Contract Manufacturing Arrangements for Drugs: Quality Agreements Guidance for Industry: Guidance for Industry	PDF (122.79 KB)PDF (122.79 KB) of Contract Manufacturing Arrangements for Drugs: Quality Agreements Guidance for Industry: Guidance for Industry	11/23/2016	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2013-D-0558
	Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry	PDF (239.62 KB)PDF (239.62 KB) of Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry	09/02/2020	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2020-D-1530
	CPG Sec 100.200 FDA Jurisdiction Over Products Composed of Interstate Ingredients		08/31/1989	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec 100.900 International Memoranda of Understanding		06/06/1995	Office of Regulatory Affairs Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine Center for Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Drug Evaluation and Research Center for Tobacco Products	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec 110.900 Imported Products - Lack of English Labeling		08/20/1996	Office of Regulatory Affairs Center for Food Safety and Applied Nutrition	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Labeling	Final	No		
	CPG Sec 120.500 Health Fraud - Factors in Considering Regulatory Action		03/01/1995	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Medical Food/Beverage	Final	No		FDA-2013-S-0610
	CPG Sec 500.100 Additives - Labeling with Adequate Directions for Many Uses		10/01/1980	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
○	CPG Sec 500.200 Food Additives - "GRAS"		11/29/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.250 Food Additives - Labeling Directions Necessary for Safe Use: CPG Sec 500.250 Food Additives		08/01/1996	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.300 "Approved by FDA" - Use of Phrase Objectionable in Marketing or Labeling of a Food Additive		08/01/1996	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.400 Use of Calcium Chloride as a Drying Agent in Such Products as Packaged Potato Chips and Peanuts		03/01/1995	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.425 Use of Color Additives in Paper and Paperboard Intended for Use with Food		11/29/2005	Office of Regulatory Affairs Center for Food Safety and Applied Nutrition	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.450 Volatile N-Nitrosamines in Rubber Baby Bottle Nipples		11/29/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 500.500 Guidance Levels for 3-MCPD (3-chloro-1,2-propanediol) in Acid-Hydrolyzed Protein and Asian-Style Sauces	PDF (25.9 KB)PDF (25.9 KB) of CPG Sec 500.500 Guidance Levels for 3-MCPD (3-chloro-1,2-propanediol) in Acid-Hydrolyzed Protein and Asian-Style Sauces	03/14/2008	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		
	CPG Sec 587.100 Label Declaration of Certification-Exempt Color Additives		11/29/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		

	CPG Sec 587.200 Uncertified or Delisted Colors in Foods for Export - (e.g., FD&C Red #2)		03/01/1995	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
○	CPG Sec 587.300 Color Additives	PDF (9.33 KB)PDF (9.33 KB) of CPG Sec 587.300 Color Additives	11/29/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 100.100 Responsibility for Reporting Possible or Potential Violations of Laws Administered by FDA, Regulations Issued by FDA, Other Possible or Potential Hazards to the Public Health		09/01/1987		Investigation & Enforcement, Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 100.300 *Non-FDA Regulated Products Involving Communicable Disease Hazards*		09/01/1987		Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		
	CPG Sec. 100.350 FDA Jurisdiction on Indian Reservations		08/31/1987		Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 100.500 - Common Carrier as a Relabeler, Repacker, Reprocessor, etc.		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 100.700 GWQAP Pre-Award Evaluation - Inadequate Information to Evaluate Prospective Supplier		04/24/2005	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 100.800 Guaranties Over Printed Signatures		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Records	Final	No		
	CPG Sec. 100.950 International Partnership Agreements for Compliance Activities		06/28/2000	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 110.100 Certification for Exports		04/13/2000	Office of Regulatory Affairs Center for Food Safety and Applied Nutrition	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 110.200 Export of FDA Regulated Products from U.S. Foreign Trade Zones		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 110.500 Food and Drug Guaranty - Imports		09/30/1980	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 110.600 FDA Authority Over Products of Foreign Origin Located in Foreign Trade Zones, Bonded Warehouses or on Bonded Carriers		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 110.700 Seizures by the U.S. Customs Service of Prohibited Articles of Foreign Origin Not Intended for Entry into the United States		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 120.100 Fraud, Untrue Statements of Material Facts, Bribery, and Illegal Gratuities		06/30/1991	Center for Drug Evaluation and Research, Office of Regulatory Policy Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 130.100 Inspectional Authority; Refusal to Permit Inspection.		09/30/1980		Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 130.200 Inspection of Firms when Legal Action is Pending		08/30/1989		Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 130.300 FDA Access to Results of Quality Assurance Program Audits and Inspections		06/01/2007	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 130.400 Use of Microfiche and/or Microfilm for Method of Records Retention		11/07/2004	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Records	Final	No		
	CPG Sec. 140.100 Seizure of Books that Constitute Misleading Labeling		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Labeling	Final	No		
	CPG Sec. 150.100 Requests for Portions of Intermediate or End Products Resulting from FDA Sample Analysis		03/22/1988	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 150.500 Analytical Methodology Used by FDA - Drugs		02/28/1995	Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Food Safety and Applied Nutrition	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Medical Food/Beverage	Final	No		
	CPG Sec. 160.100 Regulatory Actions and Small Business		11/28/2005	Office of Regulatory Affairs Center for Food Safety and Applied Nutrition	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 160.200 FDA Use of Income Tax Information from IRS in Compliance Activity		04/20/1988	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		

	CPG Sec. 160.300 Requests for Records Under Section 703		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 160.400 *Section 305 Meeting* Before Report of Criminal Violation		08/30/1989	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 160.500 Answering Inquiries on Status of Criminal Referrals		07/31/1996	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 160.600 Payment of Expert Witnesses		10/15/1987	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	CPG Sec. 325.100 Karaya Gum Powder and Related Devices for Use by Ostomates		09/24/1987	Center for Devices and Radiological Health Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2013-S-0610
	CPG Sec. 350.100 Packaging Technologies and Tamper-Resistant Packaging Requirements for Contact Lens Solutions and Tablets		11/21/1988	Center for Devices and Radiological Health Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
	CPG Sec.140.500 Metric Declarations of Quantity of Contents on Product Labels		02/28/1995	Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives, Labeling	Final	No		
	CPG Section 110.800 Post Detention Sampling Guidance for Industry	PDF (46.48 KB)PDF (46.48 KB) of CPG Section 110.800 Post Detention Sampling Guidance for Industry	03/24/2020	Office of Regulatory Affairs	Investigation & Enforcement, Food & Color Additives	Final	No		
	Current Good Manufacturing Practice for Medical Gases: Draft Guidance for Industry	PDF (218.85 KB)PDF (218.85 KB) of Current Good Manufacturing Practice for Medical Gases: Draft Guidance for Industry	06/29/2017	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Draft	No	09/28/2017	FDA-2003-D-0431
	Current Good Manufacturing Practice for Phase 1 Investigational Drugs: Guidance for Industry	PDF (91.58 KB)PDF (91.58 KB) of Current Good Manufacturing Practice for Phase 1 Investigational Drugs: Guidance for Industry	07/14/2008	Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Good Clinical Practice (GCP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2005-D-0157
	Current Good Manufacturing Practice Requirements for Combination Products: Guidance for Industry and FDA Staff	PDF (555.16 KB)PDF (555.16 KB) of Current Good Manufacturing Practice Requirements for Combination Products: Guidance for Industry and FDA Staff	01/11/2017	Office of Regulatory Affairs Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Combination Products Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Compounding, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No	03/30/2015	FDA-2015-D-0198
	Current Good Manufacturing Practice—Guidance for Human Drug Compounding Outsourcing Facilities Under Section 503B of the FD&C Act Guidance for Industry: Draft Guidance for Industry	PDF (484.69 KB)PDF (484.69 KB) of Current Good Manufacturing Practice—Guidance for Human Drug Compounding Outsourcing Facilities Under Section 503B of the FD&C Act Guidance for Industry: Draft Guidance for Industry	12/11/2018	Center for Drug Evaluation and Research	Compounding, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Draft	No	02/11/2019	FDA-2014-D-0779
	CVM GFI #171 - Demonstrating Bioequivalence for Soluble Powder Oral Dosage Form Products or Type A Medicated Articles Manufactured from Active Pharmaceutical Ingredients Considered to be Soluble in Aqueous Media	PDF (155.64 KB)PDF (155.64 KB) of CVM GFI #171 - Demonstrating Bioequivalence for Soluble Powder Oral Dosage Form Products or Type A Medicated Articles Manufactured from Active Pharmaceutical Ingredients Considered to be Soluble in Aqueous Media	09/30/2019	Center for Veterinary Medicine	Premarket, Aquaculture, New Animal Drug Application (NADA), Generic Animal Drugs, Investigational New Animal Drug (INAD)	Draft	No	11/29/2019	FDA-2019-D-3764
	CVM GFI #23 Medicated Free Choice Feeds-- Manufacturing Control		06/30/1985	Center for Veterinary Medicine	Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC), Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No		
	CVM GFI #235 Current Good Manufacturing Practice Requirements for Food for Animals	PDF (361.86 KB)PDF (361.86 KB) of CVM GFI #235 Current Good Manufacturing Practice Requirements for Food for Animals	10/20/2017	Center for Veterinary Medicine	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Animal Feed	Final	No	11/23/2016	FDA-2016-D-1229
	CVM GFI #239 Human Food By-Products For Use As Animal Food	PDF (145.58 KB)PDF (145.58 KB) of CVM GFI #239 Human Food By-Products For Use As Animal Food	08/25/2016	Center for Veterinary Medicine	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Animal Feed	Draft	No	11/23/2016	FDA-2016-D-1220
	CVM GFI #262 Pre-Submission Consultation Process for Animal Food Additive Petitions or Generally Recognized as Safe (GRAS) Notices	PDF (235.78 KB)PDF (235.78 KB) of CVM GFI #262 Pre-Submission Consultation Process for Animal Food Additive Petitions or Generally Recognized as Safe (GRAS) Notices	02/13/2020	Center for Veterinary Medicine	Animal Food Additives, Generally Recognized as Safe (GRAS)	Draft	No	04/13/2020	FDA-2020-D-0064

					Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC), Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Human Food Safety, Target Animal – Effectiveness, Target Animal – Safety, Investigational New Animal Drug (INAD), Animal Feed					
CVM GFI #264 Standardized Medicated Feed Assay Limits	PDF (85.07 KB)PDF (85.07 KB) of CVM GFI #264 Standardized Medicated Feed Assay Limits	02/27/2020	Center for Veterinary Medicine			Draft	No	06/26/2020	FDA-2019-D-5664	
CVM GFI #67 Small Entities Compliance Guide for Renderers	PDF (65.79 KB)PDF (65.79 KB) of CVM GFI #67 Small Entities Compliance Guide for Renderers	02/01/1998	Center for Veterinary Medicine		Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No			
CVM GFI #68 Small Entities Compliance Guide for Protein Blenders, Feed Manufacturers, and Distributors	PDF (65.92 KB)PDF (65.92 KB) of CVM GFI #68 Small Entities Compliance Guide for Protein Blenders, Feed Manufacturers, and Distributors	02/01/1998	Center for Veterinary Medicine		Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No			
CVM GFI #70 Small Entities Compliance Guide for Feeders of Ruminant Animals Without On-Farm Feed Mixing Operations	PDF (58.73 KB)PDF (58.73 KB) of CVM GFI #70 Small Entities Compliance Guide for Feeders of Ruminant Animals Without On-Farm Feed Mixing Operations	07/13/2009	Center for Veterinary Medicine		Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Animal Feed	Final	No			
CVM GFI #72 GMP'S For Medicated Feed Manufacturers Not Required to Register and be Licensed with FDA	PDF (56.67 KB)PDF (56.67 KB) of CVM GFI #72 GMP'S For Medicated Feed Manufacturers Not Required to Register and be Licensed with FDA	05/01/1998	Center for Veterinary Medicine		Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Animal Feed	Final	No			
CVM GFI #76 Questions and Answers BSE Feed Regulations	PDF (152.28 KB)PDF (152.28 KB) of CVM GFI #76 Questions and Answers BSE Feed Regulations	07/01/1998	Center for Veterinary Medicine		Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No			
Data Integrity and Compliance With Drug CGMP Questions and Answers Guidance for Industry: Guidance for Industry	PDF (127.11 KB)PDF (127.11 KB) of Data Integrity and Compliance With Drug CGMP Questions and Answers Guidance for Industry: Guidance for Industry	04/15/2016	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research, Office of Regulatory Policy Center for Biologics Evaluation and Research		Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2018-D-3984	
Development of a Shared System REMS Guidance for Industry	PDF (98.62 KB)PDF (98.62 KB) of Development of a Shared System REMS Guidance for Industry	06/01/2018	Center for Drug Evaluation and Research		Drug Competition Action Plan, Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No	07/31/2018	FDA-2018-D-1041	
Direct Final Rule Procedures: Guidance for FDA and Industry		11/20/1997	Office of the Commissioner, Office of Policy, Legislation, and International Affairs, Office of Policy		Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Final	No			
Disclosure of Materials Provided to Advisory Committees in Connection with Open Advisory Committee Meetings Convened by the Center for Drug Evaluation and Research Beginning on January 1, 2000	PDF (10.32 KB)PDF (10.32 KB) of Disclosure of Materials Provided to Advisory Committees in Connection with Open Advisory Committee Meetings Convened by the Center for Drug Evaluation and Research Beginning on January 1, 2000	12/22/1999	Center for Drug Evaluation and Research		Administrative / Procedural	Final	No			
Draft Guidance for Industry: Best Practices for Convening a GRAS Panel	PDF (188.86 KB)PDF (188.86 KB) of Draft Guidance for Industry: Best Practices for Convening a GRAS Panel	11/16/2017	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine		GRAS	Draft	No	05/15/2018	FDA-2017-D-0085	
Draft Guidance for Industry: Calorie Labeling of Articles of Food in Vending Machines	PDF (109.07 KB)PDF (109.07 KB) of Draft Guidance for Industry: Calorie Labeling of Articles of Food in Vending Machines	08/16/2016	Center for Food Safety and Applied Nutrition		Food & Color Additives, Labeling, Nutrition Label	Draft	No	09/30/2016	FDA-2011-F-0171	
Draft Guidance for Industry: Cosmetic Good Manufacturing Practices	PDF (77.92 KB)PDF (77.92 KB) of Draft Guidance for Industry: Cosmetic Good Manufacturing Practices	06/01/2013	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Cosmetics and Colors		Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Draft	No			
Draft Guidance for Industry: Measures to Address the Risk for Contamination by Salmonella Species in Food Containing a Pistachio-Derived Product as an Ingredient		06/29/2009	Center for Food Safety and Applied Nutrition		Nuts & Nut Products, Ingredients, Foodborne Illness, Food & Beverage Safety	Draft	No	08/28/2009	FDA-2009-D-0271	
Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part III Electronic Format		12/01/2013	Center for Food Safety and Applied Nutrition		Food & Color Additives	Draft	No			
Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part X Appendices		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition		Food & Color Additives	Draft	No			

	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part I Introduction	PDF (622.69 KB)PDF (622.69 KB) of Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part I Introduction	03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part II Common Elements		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
○	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part IV Food or Color Additive Submissions		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part IX FDA References		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part V Food Contact Substance Submissions		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
○	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part VI GRAS Notices		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part VII Biotechnology Final Consultations		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Part VIII New Protein Consultations		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Draft	No		
	Draft Guidance for Industry: Regulatory Submissions to OFAS, Quick Links		03/01/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Draft	No		
	Drug Safety Information - FDA's Communication to the Public	PDF (87.05 KB)PDF (87.05 KB) of Drug Safety Information - FDA's Communication to the Public	03/02/2007		Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		
	Drug Safety Information -- FDA's Communication to the Public	PDF (448.71 KB)PDF (448.71 KB) of Drug Safety Information -- FDA's Communication to the Public	03/08/2012		Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		
	Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation	PDF (205.82 KB)PDF (205.82 KB) of Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation	07/29/2009	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2008-D-0128
	Enforcement Policy on National Health Related Item Code and National Drug Code Numbers Assigned to Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (286.18 KB)PDF (286.18 KB) of Enforcement Policy on National Health Related Item Code and National Drug Code Numbers Assigned to Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	08/30/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Premarket, Recalls, Clinical - Medical, Combination Products, Safety - Issues, Errors, and Problems, Physical Medicine, Orthopedic, Ophthalmic, Obstetrical & Gynecological, Neurological, General Hospital & Personal Use , General & Plastic Surgery , Gastroenterology-Urology , Ear, Nose & Throat , Radiology	Final	No		FDA-2016-D-0199
	Expiration Dating and Stability Testing of Solid Oral Dosage Form Drugs Containing Iron: Guidance for Industry	PDF (88.67 KB)PDF (88.67 KB) of Expiration Dating and Stability Testing of Solid Oral Dosage Form Drugs Containing Iron: Guidance for Industry	07/09/1997	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-1997-D-0489
	Expiration Dating of Unit-Dose Repackaged Solid Oral Dosage Form Drug Products: Guidance for Industry	PDF (69.76 KB)PDF (69.76 KB) of Expiration Dating of Unit-Dose Repackaged Solid Oral Dosage Form Drug Products: Guidance for Industry	07/29/2020	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2017-D-0829
	Factors to Consider Regarding Benefit-Risk in Medical Device Product Availability, Compliance, and Enforcement Decisions: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (870.11 KB)PDF (870.11 KB) of Factors to Consider Regarding Benefit-Risk in Medical Device Product Availability, Compliance, and Enforcement Decisions: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	12/27/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Recalls, Adverse Event Reporting System (FAERS), 510(k), Adverse Event Reporting, Combination Products, Laser Notice, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Device Exception (IDE), HUD/HDE	Final	No	09/14/2016	FDA-2016-D-1495
	FDA's Application of Statutory Factors in Determining When a REMS Is Necessary	PDF (110.01 KB)PDF (110.01 KB) of FDA's Application of Statutory Factors in Determining When a REMS Is Necessary	04/04/2019	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2016-D-2730
	Field Alert Report Submission: Questions and Answers Guidance for Industry: Draft Guidance for Industry	PDF (123.2 KB)PDF (123.2 KB) of Field Alert Report Submission: Questions and Answers Guidance for Industry: Draft Guidance for Industry	07/18/2018	Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC), Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Draft	No	10/18/2018	2018-15389

	Formal Dispute Resolution: Scientific and Technical Issues Related to Pharmaceutical CGMP_PRA	PDF (249.28 KB)PDF (249.28 KB) of Formal Dispute Resolution: Scientific and Technical Issues Related to Pharmaceutical CGMP_PRA	01/11/2006	Center for Veterinary Medicine Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		
	Format and Content of a REMS Document Guidance for Industry	PDF (240.04 KB)PDF (240.04 KB) of Format and Content of a REMS Document Guidance for Industry	10/12/2017	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No	12/11/2017	FDA-2009-D-0461
	Good Laboratory Practice Regulations Management Briefings, Post Conference Report, Aug 1979: Guidance for Industry		08/31/1979	Office of Regulatory Affairs Center for Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Drug Evaluation and Research Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine	Clinical Trials, Compliance, Food & Color Additives, Investigational New Drug Application (INDA), Pharm/Tox	Final	No		FDA-1976-N-0476-0380
	Good Laboratory Practice Regulations Questions and Answers	PDF (2.19 MB)PDF (2.19 MB) of Good Laboratory Practice Regulations Questions and Answers	03/02/1998	Center for Drug Evaluation and Research	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No		
	Guidance for Hospitals, Nursing Homes, and Other Health Care Facilities - FDA Public Health Advisory: Guidance for Hospitals, Nursing Homes, and Other Health Care Facilities	PDF (18.7 KB)PDF (18.7 KB) of Guidance for Hospitals, Nursing Homes, and Other Health Care Facilities - FDA Public Health Advisory: Guidance for Hospitals, Nursing Homes, and Other Health Care Facilities	04/05/2001	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		
	Guidance for Industry and Other Stakeholders: Redbook 2000 : Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients		07/02/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		
○	Guidance for Industry: Frequently Asked Questions About GRAS for Substances Intended for Use in Human or Animal Food	PDF (117.29 KB)PDF (117.29 KB) of Guidance for Industry: Frequently Asked Questions About GRAS for Substances Intended for Use in Human or Animal Food	09/30/2016	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Preparation of Food Contact Notifications (Administrative)		05/01/2002	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Food & Color Additives, Ingredients, Food & Beverage Safety	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Antimicrobial Food Additives		06/30/1999	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Additives	PDF (201.31 KB)PDF (201.31 KB) of Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Additives	06/27/2014	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Food & Color Additives	Final	No		FDA-2011-D-0490
	Guidance for Industry: Channels of Trade Policy for Commodities With Residues of Pesticide Chemicals, for Which Tolerances Have Been Revoked, Suspended, or Modified by the Environmental Protection Agency Pursuant to Dietary Risk Considerations		05/18/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Contaminants, Environmental Safety, Food & Beverage Safety, Potential Metal or Chemical Contaminant, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Color Additive Petitions - FDA Recommendations for Submission of Chemical and Technological Data on Color Additives for Food, Drugs, Cosmetics, or Medical Devices		07/01/2009	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Colored Sea Salt	PDF (173.3 KB)PDF (173.3 KB) of Guidance for Industry: Colored Sea Salt	09/01/2015	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Considerations Regarding Substances Added to Foods, Including Beverages and Dietary Supplements	PDF (108.06 KB)PDF (108.06 KB) of Guidance for Industry: Considerations Regarding Substances Added to Foods, Including Beverages and Dietary Supplements	01/14/2014	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Ingredients, Food & Beverage Safety	Final	No		FDA-2009-D-0542
	Guidance for Industry: Estimating Dietary Intake of Substances in Food		08/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		

○	Guidance for Industry: Food Additive Petition Expedited Review		09/30/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables	PDF (98.28 KB)PDF (98.28 KB) of Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables	10/25/1998	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Fruit/Fruit Product , Produce, Safety - Issues, Errors, and Problems, Vegetable Products	Final	No		FDA-1997-N-0152
	Guidance for Industry: Guidelines for Determining Metric Equivalents of Household Measures		09/30/1993	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Labeling, Nutrition Label, Packaging, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Highly Concentrated Caffeine in Dietary Supplements	PDF (132.05 KB)PDF (132.05 KB) of Guidance for Industry: Highly Concentrated Caffeine in Dietary Supplements	04/16/2018	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Caffeine , Food & Beverage Safety, Ingredient Level, Nutrition, Food & Beverage Safety	Final	No		FDA-2018-D-1189
	Guidance for Industry: Measures to Address the Risk for Contamination by Salmonella Species in Food Containing a Peanut-Derived Product as an Ingredient		03/11/2009	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Nuts & Nut Products, Ingredients, Foodborne Illness	Final	No		FDA-2009-D-0060
	Guidance for Industry: Microbiological Considerations for Antimicrobial Food Additive Submissions	PDF (92.1 KB)PDF (92.1 KB) of Guidance for Industry: Microbiological Considerations for Antimicrobial Food Additive Submissions	05/31/2008	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2007-D-0207
	Guidance for Industry: Preparation of Food Contact Notifications for Food Contact Substances (Toxicology Recommendations)		04/01/2002	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Preparation of Food Contact Notifications for Food Contact Substances in Contact with Infant Formula and/or Human Milk	PDF (281.59 KB)PDF (281.59 KB) of Guidance for Industry: Preparation of Food Contact Notifications for Food Contact Substances in Contact with Infant Formula and/or Human Milk	05/08/2019	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Infant Formula & Foods, Milk/Milk Product	Final	No		FDA-2016-D-1814
	Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances (Chemistry Recommendations)		12/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Appendix A		05/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Appendix B		05/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Appendix C		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Appendix D		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Appendix E (40 CFR 1508.27)		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Attachment 1		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Preparing a Claim of Categorical Exclusion or an Environmental Assessment for Submission to CFSAN - Attachment 2		05/16/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		

	Guidance for Industry: Preparing a Color Additive Petition for Submission to the Center for Food Safety and Applied Nutrition for Color Additives Used in or on Contact Lenses		05/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
○	Guidance for Industry: Pre-Petition Consultations for Food Additives and Color Additives		04/01/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Questions and Answers About the Food Additive or Color Additive Petition Process		03/31/2011	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Beverage Safety, Food & Color Additives, Food & Beverage Safety	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Recommendations for Submission of Chemical and Technological Data for Direct Food Additive Petitions		03/22/2009	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Recommendations for Submission of Chemical and Technological Data for Food Additive Petitions and GRAS Notices for Enzyme Preparations	PDF (100.85 KB)PDF (100.85 KB) of Guidance for Industry: Recommendations for Submission of Chemical and Technological Data for Food Additive Petitions and GRAS Notices for Enzyme Preparations	06/30/2010	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		
	Guidance for Industry: Regulatory Framework for Substances Intended for Use in Human Food or Animal Food on the Basis of the Generally Recognized as Safe (GRAS) Provision of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	PDF (176.65 KB)PDF (176.65 KB) of Guidance for Industry: Regulatory Framework for Substances Intended for Use in Human Food or Animal Food on the Basis of the Generally Recognized as Safe (GRAS) Provision of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	11/01/2017	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine	GRAS	Final	No		FDA-2016-D-4484
	Guidance for Industry: Submitting Requests under 21 CFR 170.39 Threshold of Regulation for Substances Used in Food-Contact Articles		04/01/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Ingredients	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Summary Table of Recommended Toxicological Testing for Additives Used in Food		06/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
○	Guidance for Industry: Templates for Reporting Toxicology Data		05/11/2005	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		FDA-2013-S-0610
	Guidance for Industry: Temporary Policy for Preparation of Certain Alcohol-Based Hand Sanitizer Products During the Public Health Emergency (COVID-19)	PDF (266.49 KB)PDF (266.49 KB) of Guidance for Industry: Temporary Policy for Preparation of Certain Alcohol-Based Hand Sanitizer Products During the Public Health Emergency (COVID-19)	03/19/2020	Center for Drug Evaluation and Research	Public Awareness, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Over-the-Counter Drugs, Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2020-D-1106
	Guidance for Industry: Use of Recycled Plastics in Food Packaging (Chemistry Considerations)		08/07/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Contaminants, Food & Beverage Safety, Food & Color Additives, Ingredients, Potential Metal or Chemical Contaminant	Final	No		
	Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality: Guidance for Industry	PDF (60.37 KB)PDF (60.37 KB) of Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality: Guidance for Industry	06/25/2013	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2012-D-0083
	Immediately in Effect Guidance Document: Product Labeling for Laparoscopic Power Morcellators: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (2.18 MB)PDF (2.18 MB) of Immediately in Effect Guidance Document: Product Labeling for Laparoscopic Power Morcellators: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	11/25/2014	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Premarket, 510(k), Labeling, Safety - Issues, Errors, and Problems, Obstetrical & Gynecological, General & Plastic Surgery	Final	No	01/23/2015	FDA-2014-D-1804
	Implementation of Section 120 of the Food and Drug Administration Modernization Act of 1997-Advisory Committees	PDF (62.13 KB)PDF (62.13 KB) of Implementation of Section 120 of the Food and Drug Administration Modernization Act of 1997-Advisory Committees	10/01/1998	Center for Drug Evaluation and Research	Administrative / Procedural	Final	No		

	Information to Support a Claim of Electromagnetic Compatibility (EMC) of Electrically-Powered Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (295.55 KB)PDF (295.55 KB) of Information to Support a Claim of Electromagnetic Compatibility (EMC) of Electrically-Powered Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	07/11/2016	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, Biotechnology, 510(k), IVDS (In Vitro Diagnostic Devices), Radiological Health, Safety - Issues, Errors, and Problems, Device Exception (IDE), Anesthesiology , HUD/HDE, Laboratory Tests, Physical Medicine, Orthopedic, Ophthalmic, Neurological, Cardiovascular , Ear, Nose & Throat , Radiology	Final	No		FDA-2015-D-3787
	Investigating Out-of-Specification Test Results for Pharmaceutical Production: Guidance for Industry	PDF (85.62 KB)PDF (85.62 KB) of Investigating Out-of-Specification Test Results for Pharmaceutical Production: Guidance for Industry	10/12/2006	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-1998-D-0019
	List of Highest Priority Devices for Human Factors Review: Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (359.16 KB)PDF (359.16 KB) of List of Highest Priority Devices for Human Factors Review: Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	02/03/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Premarket, Labeling, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Device Exception (IDE)	Draft	No	04/03/2016	FDA-2015-D-4599
	Media Fills for Validation of Aseptic Preparations for Positron Emission Tomography	PDF (155.82 KB)PDF (155.82 KB) of Media Fills for Validation of Aseptic Preparations for Positron Emission Tomography	04/11/2012	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2011-D-0691
	Medication Guides — Adding a Toll-Free Number for Reporting Adverse Events	PDF (66.81 KB)PDF (66.81 KB) of Medication Guides — Adding a Toll-Free Number for Reporting Adverse Events	06/08/2009	Center for Drug Evaluation and Research	Administrative / Procedural, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2009-D-0217
	Medication Guides — Distribution Requirements and Inclusion in Risk Evaluation and Mitigation Strategies (REMS)	PDF (91.2 KB)PDF (91.2 KB) of Medication Guides — Distribution Requirements and Inclusion in Risk Evaluation and Mitigation Strategies (REMS)	11/18/2011	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		
	Mixing, Diluting, or Repackaging Biological Products Outside the Scope of an Approved Biologics License Application: Guidance for Industry	PDF (555.69 KB)PDF (555.69 KB) of Mixing, Diluting, or Repackaging Biological Products Outside the Scope of an Approved Biologics License Application: Guidance for Industry	01/18/2018	Center for Drug Evaluation and Research	Compounding, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No	03/13/2017	
	National Uniformity for Nonprescription Drugs - Ingredient Listing for OTC Drugs	PDF (73.83 KB)PDF (73.83 KB) of National Uniformity for Nonprescription Drugs - Ingredient Listing for OTC Drugs	04/09/1998	Center for Drug Evaluation and Research	Administrative / Procedural	Final	No		FDA-1998-D-1007
	Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination: Guidance for Industry	PDF (70.18 KB)PDF (70.18 KB) of Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination: Guidance for Industry	04/17/2013	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2011-D-0104
	Organ-Specific Warnings: Internal Analgesic, Antipyretic, and Antirheumatic Drug Products for Over-the-Counter Human Use —: Guidance for Industry	PDF (173.4 KB)PDF (173.4 KB) of Organ-Specific Warnings: Internal Analgesic, Antipyretic, and Antirheumatic Drug Products for Over-the-Counter Human Use —: Guidance for Industry	11/17/2015	Center for Drug Evaluation and Research	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Over-the-Counter Drugs, Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2012-D-0529
	Over-the-Counter Pediatric Oral Liquid Drug Products Containing Acetaminophen	PDF (81.71 KB)PDF (81.71 KB) of Over-the-Counter Pediatric Oral Liquid Drug Products Containing Acetaminophen	08/05/2015	Center for Drug Evaluation and Research	Administrative / Procedural, Combination Products, Over-the-Counter Drugs, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2014-D-1473
	Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures - Scope and Application: Guidance for Industry	PDF (43.9 KB)PDF (43.9 KB) of Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures - Scope and Application: Guidance for Industry	09/05/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Veterinary Medicine Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research	Postmarket, Compliance, Electronic Submissions, Investigation & Enforcement, Administrative / Procedural, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Food & Color Additives, Good Clinical Practice (GCP)	Final	No		FDA-2003-D-0143
	PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance: Guidance for Industry	PDF (210.76 KB)PDF (210.76 KB) of PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance: Guidance for Industry	10/04/2004	Center for Veterinary Medicine Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2003-D-0032
	Pediatric Expertise for Advisory Panels - Guidance for Industry and FDA Staff	PDF (39.46 KB)PDF (39.46 KB) of Pediatric Expertise for Advisory Panels - Guidance for Industry and FDA Staff	06/02/2003	Center for Devices and Radiological Health	Advisory Committees,	Final	No		FDA-2003-D-0147

PET Drug Products - Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	PDF (399.04 KB)PDF (399.04 KB) of PET Drug Products - Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	12/10/2009	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-1998-D-0025
PET Drugs--Current Good Manufacturing Practice (CGMP); Small Entity Compliance Guide	PDF (228.68 KB)PDF (228.68 KB) of PET Drugs--Current Good Manufacturing Practice (CGMP); Small Entity Compliance Guide	08/05/2011	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2011-D-0541
Pharmaceutical Components at Risk for Melamine Contamination: Guidance for Industry	PDF (136.64 KB)PDF (136.64 KB) of Pharmaceutical Components at Risk for Melamine Contamination: Guidance for Industry	08/06/2009	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2009-D-0354
Possible Dioxin/PCB Contamination of Drug and Biological Products	PDF (7.73 KB)PDF (7.73 KB) of Possible Dioxin/PCB Contamination of Drug and Biological Products	08/23/1999	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		
Postmarket Management of Cybersecurity in Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (1.23 MB)PDF (1.23 MB) of Postmarket Management of Cybersecurity in Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	12/28/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Premarket, 510(k), Labeling, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Digital Health	Final	No		FDA-2015-D-5105
Postmarketing Adverse Event Reporting for Medical Products and Dietary Supplements During a Pandemic	PDF (187.63 KB)PDF (187.63 KB) of Postmarketing Adverse Event Reporting for Medical Products and Dietary Supplements During a Pandemic	05/11/2020	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2008-D-0610
Postmarketing Safety Reporting for Human Drug and Biological Products Including Vaccines: Draft Guidance for Industry	PDF (380.54 KB)PDF (380.54 KB) of Postmarketing Safety Reporting for Human Drug and Biological Products Including Vaccines: Draft Guidance for Industry	03/12/2001	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems, Vaccines	Draft	No		FDA-2001-D-0506
Preparation and Public Availability of Information Given to Advisory Committee Members: Guidance for Industry	PDF (169.24 KB)PDF (169.24 KB) of Preparation and Public Availability of Information Given to Advisory Committee Members: Guidance for Industry	08/01/2008	Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Clinical Policy	Advisory Committees, Food & Color Additives	Final	No		
Preparation of Investigational New Drug Products (Human and Animal): Guidance for Industry	PDF (795.48 KB)PDF (795.48 KB) of Preparation of Investigational New Drug Products (Human and Animal): Guidance for Industry	11/01/1992	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		
Procedures for Evaluating Appearance Issues and Granting Authorizations for Participation in FDA Advisory Committees: Draft Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	PDF (946.76 KB)PDF (946.76 KB) of Procedures for Evaluating Appearance Issues and Granting Authorizations for Participation in FDA Advisory Committees: Draft Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	06/29/2016	Center for Food Safety and Applied Nutrition Center for Tobacco Products Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Clinical Policy Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research Office of the Commissioner, Office of the Chief Scientist, National Center for Toxicological Research	Advisory Committees,	Draft	No	06/29/2016	FDA-2016-D-1399
Procedures for Meetings of the Medical Devices Advisory Committee: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (443.17 KB)PDF (443.17 KB) of Procedures for Meetings of the Medical Devices Advisory Committee: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	09/01/2017	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, Advisory Committees, 510(k), Administrative / Procedural, IVDs (In Vitro Diagnostic Devices), Labeling, Laser Notice, Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Anesthesiology , HUD/HDE, Laboratory Tests, Physical Medicine, Orthopedic, Ophthalmic, Obstetrical & Gynecological, Neurological, Molecular and Clinical Genetics, Immunology & Microbiology , Cardiovascular , Hematology & Pathology , General Hospital & Personal Use , General & Plastic Surgery , Gastroenterology-Urology , Ear, Nose & Throat , Dental , Clinical Chemistry & Clinical Toxicology , Radiology	Final	No	05/29/2015	FDA-2015-D-0838

	Process Validation: General Principles and Practices: Guidance for Industry	PDF (371.9 KB)PDF (371.9 KB) of Process Validation: General Principles and Practices: Guidance for Industry	01/25/2011	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2008-D-0559
	Product Labeling for Certain Ultrasonic Surgical Aspirator Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (273 KB)PDF (273 KB) of Product Labeling for Certain Ultrasonic Surgical Aspirator Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	10/30/2017	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, 510(k), Labeling, Safety - Issues, Errors, and Problems, Obstetrical & Gynecological, General & Plastic Surgery	Final	No	01/09/2017	FDA-2016-D-3275
	Providing Postmarket Periodic Safety Reports in the ICH E2C(R2) Format (Periodic Benefit-Risk Evaluation Report)	PDF (115.79 KB)PDF (115.79 KB) of Providing Postmarket Periodic Safety Reports in the ICH E2C(R2) Format (Periodic Benefit-Risk Evaluation Report)	11/29/2016	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2013-D-0349
	Providing Submissions in Electronic Format — Postmarketing Safety Reports for Vaccines: Guidance for Industry	PDF (77.06 KB)PDF (77.06 KB) of Providing Submissions in Electronic Format — Postmarketing Safety Reports for Vaccines: Guidance for Industry	08/18/2015	Center for Biologics Evaluation and Research	Postmarket, Electronic Submissions, Safety - Issues, Errors, and Problems, Vaccines	Final	No		FDA-2014-D-0903
	Public Availability of Advisory Committee Members' Financial Interest Information and Waivers: Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	PDF (93.78 KB)PDF (93.78 KB) of Public Availability of Advisory Committee Members' Financial Interest Information and Waivers: Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	02/28/2014	Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Clinical Policy	Advisory Committees, Food & Color Additives	Final	No		
	Public Notification of Emerging Postmarket Medical Device Signals ("Emerging Signals"): Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (127.96 KB)PDF (127.96 KB) of Public Notification of Emerging Postmarket Medical Device Signals ("Emerging Signals"): Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	12/14/2016	Center for Devices and Radiological Health	Postmarket, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2015-D-4803
	Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers	PDF (173.71 KB)PDF (173.71 KB) of Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers	06/28/2012	Center for Veterinary Medicine Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		
	Quality Considerations for Continuous Manufacturing	PDF (197.29 KB)PDF (197.29 KB) of Quality Considerations for Continuous Manufacturing	02/27/2019	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Draft	No	05/28/2019	FDA-2019-D-0298
	Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practice Regulations	PDF (362.89 KB)PDF (362.89 KB) of Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practice Regulations	10/02/2006	Center for Veterinary Medicine Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2004-D-0300
	Questions and Answers on Current Good Manufacturing Practices for Drugs		03/30/2018	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2017-D-6821
	Recommended Warning for Over-the-Counter Acetaminophen-Containing Drug Products and Labeling Statements Regarding Serious Skin Reactions	PDF (89.49 KB)PDF (89.49 KB) of Recommended Warning for Over-the-Counter Acetaminophen-Containing Drug Products and Labeling Statements Regarding Serious Skin Reactions	01/11/2017	Center for Drug Evaluation and Research	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Over-the-Counter Drugs	Final	No		FDA-2014-D-1862
	Redbook 2000: I Introduction		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: III Recommended Toxicity Studies		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: IV. A. Introduction to Guidelines for Toxicity Studies		04/29/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: IV.B.1. General Guidelines for Designing and Conducting Toxicity Studies		04/29/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: IV.B.2 Guidelines for Reporting the Results of Toxicity Studies		04/29/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: IV.B.3. Pathology Considerations in Toxicity Studies		04/29/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
	Redbook 2000: IV.B.4. Statistical Considerations in Toxicity Studies		06/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No	07/01/2007	

Redbook 2000: IV.C.1. Short-Term Tests for Genetic Toxicity		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.1.a. Bacterial Reverse Mutation Test		07/01/2018	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.1.b. In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.1.c Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay		11/01/2013	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test		07/01/2000	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.10. Neurotoxicity Studies		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.3.a. Short-Term Toxicity Studies with Rodents		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.3.b. Short-Term Toxicity Studies with Non-Rodents		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.4.a. Subchronic Toxicity Studies with Rodents		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.4.b. Subchronic Toxicity Studies with Non-Rodents		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.5.a. Chronic Toxicity Studies with Rodents		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.5.b. One-Year Toxicity Studies with Non-Rodents		11/01/2003	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.6. Carcinogenicity Studies with Rodents		01/01/2006	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.7. Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies with Rodents		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.8. In-Utero Exposure Phase for Addition to Carcinogenicity Studies or Chronic Toxicity Studies with Rodents		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.9.a. Guidelines for Reproduction Studies		07/01/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: IV.C.9.b. Guidelines for Developmental Toxicity Studies		07/01/2000	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Redbook 2000: VI.B Epidemiology		10/01/2001	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
○ Redbook 2000: VII Glossary, Acronyms and Definitions		04/25/2007	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety	Food & Color Additives	Final	No		
Repackaging of Certain Human Drug Products by Pharmacies and Outsourcing Facilities: Guidance for Industry	PDF (645.92 KB)PDF (645.92 KB) of Repackaging of Certain Human Drug Products by Pharmacies and Outsourcing Facilities: Guidance for Industry	01/13/2017	Center for Drug Evaluation and Research	Compliance, Compounding, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2014-D-1524
Review of FDA's Implementation of the Drug Export Amendments of 1986	PDF (2 MB)PDF (2 MB) of Review of FDA's Implementation of the Drug Export Amendments of 1986	11/01/1989	Center for Veterinary Medicine Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Compliance, Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No		
Safety Assessment for IND Safety Reporting Guidance for Industry	PDF (410.54 KB)PDF (410.54 KB) of Safety Assessment for IND Safety Reporting Guidance for Industry	12/17/2015	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No		FDA-2015-D-4562
Safety Considerations for Container Labels and Carton Labeling Design to Minimize Medication Errors	PDF (608.23 KB)PDF (608.23 KB) of Safety Considerations for Container Labels and Carton Labeling Design to Minimize Medication Errors	04/24/2013	Center for Drug Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No		FDA-2013-D-0401
Safety Considerations for Product Design to Minimize Medication Errors Guidance for Industry	PDF (211.98 KB)PDF (211.98 KB) of Safety Considerations for Product Design to Minimize Medication Errors Guidance for Industry	04/12/2016	Center for Drug Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2012-D-1005

Safety Labeling Changes -- Implementation of Section 505(o)(4) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	PDF (117.89 KB)PDF (117.89 KB) of Safety Labeling Changes -- Implementation of Section 505(o)(4) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act	07/30/2013	Center for Biologics Evaluation and Research Center for Drug Evaluation and Research	Administrative / Procedural, Device & Drug Safety, Good Clinical Practice (GCP), Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2011-D-0164
Safety Reporting Requirements for INDs (Investigational New Drug Applications) and BA/BE (Bioavailability/Bioequivalence) Studies: Guidance for Industry and Investigators	PDF (227.49 KB)PDF (227.49 KB) of Safety Reporting Requirements for INDs (Investigational New Drug Applications) and BA/BE (Bioavailability/Bioequivalence) Studies: Guidance for Industry and Investigators	12/20/2012	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Generic Drugs, Good Clinical Practice (GCP), Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2010-D-0482
Safety Reporting Requirements for INDs and BA/BE Studies: Guidance for Industry and Investigators	PDF (35.12 KB)PDF (35.12 KB) of Safety Reporting Requirements for INDs and BA/BE Studies: Guidance for Industry and Investigators	12/20/2012	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Generic Drugs, Good Clinical Practice (GCP), Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2010-D-0482
Small Entity Compliance Guide: Declaration by Name on the Label of All Foods and Cosmetic Products That Contain Cochineal Extract and Carmine		04/30/2009	Center for Food Safety and Applied Nutrition	Food & Color Additives, Labeling	Final	No		FDA-2009-D-0198
Specifications for Preparing and Submitting Electronic ICSRs and ICSR Attachments	PDF (329.35 KB)PDF (329.35 KB) of Specifications for Preparing and Submitting Electronic ICSRs and ICSR Attachments	02/14/2020	Center for Drug Evaluation and Research	Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		None found
Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice: Guidance for Industry	PDF (734.22 KB)PDF (734.22 KB) of Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice: Guidance for Industry	10/04/2004	Office of Regulatory Affairs Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2003-D-0145
Street Drug Alternatives	PDF (10.51 KB)PDF (10.51 KB) of Street Drug Alternatives	04/03/2000	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP)	Final	No		FDA-2000-D-0783
Submission of Quality Metrics Data Guidance for Industry	PDF (339.64 KB)PDF (339.64 KB) of Submission of Quality Metrics Data Guidance for Industry	11/25/2016	Center for Drug Evaluation and Research Center for Biologics Evaluation and Research	Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC), Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Draft	No	01/23/2017	FDA-2015-D-2537
Temporary Policy for Manufacture of Alcohol for Incorporation Into Alcohol-Based Hand Sanitizer Products During the Public Health Emergency (COVID-19) Guidance for Industry	PDF (181.99 KB)PDF (181.99 KB) of Temporary Policy for Manufacture of Alcohol for Incorporation Into Alcohol-Based Hand Sanitizer Products During the Public Health Emergency (COVID-19) Guidance for Industry	03/24/2020	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Over-the-Counter Drugs, Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2020-D-1106
Testing of Glycerin for Diethylene Glycol: Guidance for Industry	PDF (36.13 KB)PDF (36.13 KB) of Testing of Glycerin for Diethylene Glycol: Guidance for Industry	05/02/2007	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2007-D-0374
The Meaning of "Spouse" and "Family" in FDA's Regulations after the Supreme Court's Ruling in United States v. Windsor: Questions and Answers: Guidance for Industry, Consumers, and FDA Staff	PDF (37.72 KB)PDF (37.72 KB) of The Meaning of "Spouse" and "Family" in FDA's Regulations after the Supreme Court's Ruling in United States v. Windsor: Questions and Answers: Guidance for Industry, Consumers, and FDA Staff	03/31/2014	Office of the Commissioner, Office of Policy, Legislation, and International Affairs, Office of Policy	Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Final	No		FDA-2014-D-0261
The Open Public Hearing at FDA Advisory Committee Meetings: Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	PDF (68.71 KB)PDF (68.71 KB) of The Open Public Hearing at FDA Advisory Committee Meetings: Guidance for the Public, FDA Advisory Committee Members, and FDA Staff	05/15/2013	Office of the Commissioner	Advisory Committees, Food & Color Additives	Final	No		
The Use of Mechanical Calibration of Dissolution Apparatus 1 and 2 – Current Good Manufacturing Practice (CGMP): Guidance for Industry	PDF (127.37 KB)PDF (127.37 KB) of The Use of Mechanical Calibration of Dissolution Apparatus 1 and 2 – Current Good Manufacturing Practice (CGMP): Guidance for Industry	01/27/2010	Center for Drug Evaluation and Research	Current Good Manufacturing Practice (CGMP), Pharmaceutical Quality	Final	No		FDA-2007-D-0420

Unique Device Identification: Policy Regarding Compliance Dates for Class I and Unclassified Devices and Certain Devices Requiring Direct Marking: Immediately in Effect Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (353.05 KB)PDF (353.05 KB) of Unique Device Identification: Policy Regarding Compliance Dates for Class I and Unclassified Devices and Certain Devices Requiring Direct Marking: Immediately in Effect Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	07/01/2020	Center for Devices and Radiological Health Center for Biologics Evaluation and Research	Investigation & Enforcement, Postmarket, Labeling, Safety - Issues, Errors, and Problems	Final	No		FDA-2017-D-6841
Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process" : Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	PDF (613.48 KB)PDF (613.48 KB) of Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process" : Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff	09/03/2020	Center for Devices and Radiological Health	Premarket, 510(k), Premarket Approval (PMA), Safety - Issues, Errors, and Problems, Device Exception (IDE), HUD/HDE	Final	No	09/14/2016	FDA-2013-D-0350
Using Electronic Means to Distribute Certain Product Information: Guidance for Industry		02/28/2006	Office of the Commissioner, Office of Policy, Legislation, and International Affairs, Office of Policy	Administrative / Procedural, Food & Color Additives	Final	No		
Voting Procedures for Advisory Committee Meetings: Guidance for FDA Advisory Committee Members and FDA Staff	PDF (36.7 KB)PDF (36.7 KB) of Voting Procedures for Advisory Committee Meetings: Guidance for FDA Advisory Committee Members and FDA Staff	08/01/2008	Office of the Commissioner, Office of Clinical Policy and Programs, Office of Clinical Policy	Advisory Committees, Food & Color Additives	Final	No		
Waivers of the Single, Shared System REMS Requirement; Draft Guidance for Industry	PDF (91.3 KB)PDF (91.3 KB) of Waivers of the Single, Shared System REMS Requirement; Draft Guidance for Industry	06/01/2018	Center for Biologics Evaluation and Research Center for Drug Evaluation and Research	Clinical - Antimicrobial, Drug Competition Action Plan, Safety - Issues, Errors, and Problems	Draft	No	07/31/2018	FDA-2018 - D-1043

レッドブック 2000 タイトル一覧

- I. 序論 (2007年7月)
- III. 推奨される毒性試験 (2007年7月)
- IV. A. 毒性試験に関するガイドラインの概要 (2007年4月)
- IV. B. 1. 毒性試験の設計及び実施に関する一般的なガイドライン (2007年4月)
- IV. B. 2. 毒性試験結果の報告に関するガイドライン (2007年4月)
- IV. B. 3. 毒性試験における病理学的考察 (2007年4月)
- IV. B. 4. 毒性試験における統計学的考察 (2007年6月)
- IV. C. 1. 遺伝毒性の短期試験 (2007年7月)
- IV. C. 1. a. 細菌を用いる復帰突然変異試験 (2018年7月)
- IV. C. 1. b. *in vitro* 哺乳類染色体異常試験 (2003年11月)
- IV. C. 1. c. マウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (2013年11月)
- IV. C. 1. d. 哺乳類赤血球小核試験 (2000年7月)
- IV. C. 3. a. げっ歯類を用いた短期毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 3. b. 非げっ歯類を用いた短期毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 4. a. げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 4. b. 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 5. a. げっ歯類を用いた慢性毒性試験 (2007年7月)
- IV. C. 5. b. 非げっ歯類を用いた慢性毒性試験 (2003年11月)
- IV. C. 6. げっ歯類を用いたがん原性試験 (2006年1月)
- IV. C. 7. げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験 (2007年7月)
- IV. C. 8. げっ歯類を用いたがん原性試験または慢性毒性試験に追加する子宮内曝露段階 (2007年7月)
- IV. C. 9. a. 生殖試験に関するガイドライン (2007年7月)
- IV. C. 9. b. 発達毒性試験に関するガイドライン (2000年7月)
- IV. C. 10. 神経毒性試験 (2007年7月)
- VI. B. 疫学 (2001年10月)
- VII. 用語解説 頭字語と定義 (2007年4月)

レッドブック 2000 : I 序論

2007 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2007 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 I 章 序論

「食品成分の安全性評価のための毒性学的原則」（「レッドブック 2000」）は、食品に使用される直接食品添加物及び着色添加物の安全性評価のための毒性学的原則の新しい名称であり、1982 年に初版が発表され（「レッドブック I」）、1993 年に改訂案が発表された（「レッドブック II」）。この改訂されたガイダンスの主な変更点については本章の後半で述べる。本文書は、食品成分に関して米国食品安全応用栄養センター（CFSAN）食品添加物安全局（OFAS）に提出される毒性情報に関して、業界及びその他の利害関係者（学界、その他の規制団体など）のためのガイダンスを提供する。本文書は、以下のことに関して申請人及び届出人を支援することを目的とするガイダンスである。

- 毒性試験の必要性の判断
- 毒性試験の計画、実施、結果の報告
- データの統計解析の実施
- 組織学的データの審査
- 食品成分の安全性評価の一環としてのこの情報の FDA への提出。

本ガイダンスで使用する「食品成分」という用語には、食品に使用される食品添加物及び着色添加物、食品接触物質（以前は間接食品添加物として知られていた）に分類される物質、及び一般に安全と認められる（GRAS）物質に分類される物質が含まれ

る。本ガイダンス文書に記載する毒性試験は、成分残留物の安全性評価にも使用することができる。

申請人及び届出人は、申請書や届出書の提出を検討する際には、本ガイダンス文書に記載されている情報だけでなく、以下のインターネットリンクから入手できるその他の毒物学関連のガイダンス情報にも精通することが推奨される。

- 食品・着色添加物（申請）プログラム
- 食品接触物質プログラム
- GRAS 届出プログラム

さらに、試験依頼人は、検討中の毒性試験の範囲及び種類、並びに提出予定の申請書又は届出書の種類について、OFAS 内の適切な規制部門と協議することが推奨される。FDA は一貫して、各種の科学的に妥当な情報を用いることで、提案された成分を使用しても安全であるという判断を裏付けることができるという立場をとっている。申請人は、別の情報を使用し、食品成分の安全性の判定を裏付ける場合は、申請書又は届出書を提出する前に FDA と協議しなければならない。

背景

FDA と CFSAN の責務の 1 つは、米国で食料品に添加される食品成分の安全性を確保することである。これらの成分の「安全性」は、連邦規則集（CFR）タイトル 21、セクション 70.3 及び 170.3 において、物質が意図する使用条件下で有害ではないという合理的な確実性と規定されている。一般に安全性は、消費者における物質の潜在的な蓄積効果及び食物中の物質の推定消費量を考慮して判断される。潜在的な蓄積効果は、毒性試験の結果及び化合物とその構造に関する知識によって判断される。

FDA の食品局（CFSAN の以前の名称）は、食品添加物の申請書提出に関する試験依頼人向けガイダンスを提供するため、1982 年にガイダンス「食品に使用される直接食品添加物及び着色添加物の安全性評価のための毒性学的原則」（レッドブック I と呼ばれる）を発表した。本文書の改訂草案は 1993 年に発行され（1993 年 3 月 29 日付け連邦官報（FR）58 FR 16536 で公表された Notice of Availability を参照）、「レッドブック II」と呼ばれている。FDA は、規制当局及び科学団体やその他の利害関係者からこの草案に関連するコメントを受け取り、その審査を継続している。さらに、FDA は本ガイダンス文書の作成にあたって、毒物学、科学、食品業界における最近の進歩や増加する知識に関する出版物や情報、並びに毒性試験に関するその他の信頼できるガイダンスについて検討してきた。

通常食品添加物は、連邦食品・医薬品・化粧品法（本法）の 201(s)項及び 21 CFR 170.3(e)(1)に、その意図した用途により、直接的又は間接的に食品成分となる物質、そうでない場合は食品の特性に影響を及ぼす物質として定義されている。そのため、歴史的に食品添加物は、直接又は間接食品添加物と呼ばれてきた。一般に、直接食品添加物は技術的効果（すなわち、乳化作用、甘味）を得るために食品に直接添加される化合物であり、間接食品添加物は、食品の生産、製造、包装、加工、調製、処理、梱包、輸送、又は保持に使用される物質（すなわち、缶コーティング、紙及び板紙、消毒剤、及び接着剤）などであると理解されている。1997 年、米国食品医薬品局近代化法（FDAMA）で本法を改正し、食品接触物質のより効率的な届出プロセスを新設した。着色添加物は、通常、食品、医薬品、又は化粧品に添加又は塗布した場合に着色することができる染料、顔料又はその他の物質として、本法のセクション 201 (t) に定義されている。GRAS 物質とは、その安全性が適格な専門家によって評価され、さらに目的用途の条件下で安全であることを示すエビデンスと科学的手順に基づく安全性の判定によって評価される物質である。GRAS 分類の適格性については、21 CFR 170.30 で説明されている。また、1997 年に FDA は、物質の特定の使用が GRAS であるとの判断を FDA に届出するための自主的な届出手順を確立する規則案（62 FR 18937、1997 年 4 月 17 日、PDF - 272KB）を発行した。

改訂版ガイダンスの主な変更点

本項では、「レッドブック 2000」と「レッドブック II」間の主な変更点について要約する。概して、これらの変更点は以下の 3 つの主な情報源から得られた：1) 1993 年以降、科学的知識と技術的進歩の増加；2) 「レッドブック II」1993 年版草案に関して受け取ったコメント；及び 3) そのような活動が食品成分の安全性を確保する FDA の能力を損なわない場合、他の機関、国、及び国際機関が発行するガイダンスとの整合性及び調和を達成するという要望。

- 本ガイダンス文書の表題を「食品に使用される直接食品添加物及び着色添加物の安全性評価のための毒物学的原則」（「レッドブック II」）から「食品成分の安全性評価のための毒物学的原則」（「レッドブック 2000」）に変更し、本ガイダンスが適用される状況の範囲をより適切に説明した。「レッドブック 2000」の「2000」は、改訂されたレッドブックの最初の章がインターネット上で公開された年である。他の章を追加又は改訂した場合は、本ガイダンス文書の名称を変更するのではなく、「レッドブック 2000」という名称を残すこととした。
- 「レッドブック 2000」は、インターネット上で公開されている電子文書として設計されている。以前のバージョンと同様に、印刷、製本された文書として公開される予定はない。

- 本ガイダンス文書の全体的なフォーマットは、インターネット上での閲覧を容易にするために変更されている。各章は「独立型の」文書であり、個別にアクセスできる。このため、毒性試験に関連する一般的な情報は、各種の試験に関連する情報が完全になるように、個々の章で繰り返されている。
- 「レッドブック 2000」では、「レッドブック II」の第 III 章「懸念レベル及び推奨毒性試験」を削減、改訂し、「推奨される毒性試験」に名称変更した。推奨される毒性試験に関するより具体的なガイダンスについては申請及び届出のウェブサイトアクセスしていただきたい。
- 第 IV 章 C.1. 遺伝毒性の短期試験が拡大され、4 種類の遺伝子検査についてより完全な記述と説明が付けられた。
- 「神経毒性試験」のガイダンスは、現在、第 IV 章「毒性試験に関するガイドライン」に記載されている。「神経毒性試験」は、以前「レッドブック II」の第 V 章「追加推奨試験」に記載されていた。
- 「レッドブック II」の第 IV 章 C.7 げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験は、現在「レッドブック 2000」の次の二つの章で利用可能である。
 - IV.C.5a.げっ歯類を用いた慢性毒性試験
 - IV.C.7.げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験
- 第 VII 章新たに生じた問題は「レッドブック 2000」に含まれていない。「レッドブック II」に示された新たな問題に関連する情報については、検討の結果、「レッドブック 2000」の関連する章に組み入れた。読者は、OFAS のウェブページから入手可能な追加情報に精通すること、及び具体的な質問については OFAS に接触することが推奨される。

毒性試験に関するガイダンスの適応性

食品成分の毒性試験に関する FDA のガイダンスでは、妥当な科学的判断に代わるものはないことが引き続き強調されている。このガイダンスが提示するのは勧告であり、厳密なルールではない。試験責任者が、推奨される試験実施計画書を修正することにより有用な毒性学的情報を当局に提供できると考え、妥当な科学的論拠をもってその修正を裏付けることができると考える場合は、その試験責任者は、修正された試験実施計画書を OFAS 内の適切なプログラム部門に提案すべきである。今までと同様、申請人及び届出人は、毒性試験の試験実施計画書の設計前及び設計中もしくは試験開始前に FDA に相談すべきである。

本ガイダンスを含む FDA のガイダンス文書は、法的強制力のある責任を規定するものではない。それよりむしろ、ガイダンスはあるトピックに関する当局の現在の考え方を説明するものであり、具体的な規制要件や法的要件が引用されていない限り、単なる勧告とみなすべきである。当局のガイダンスにおいて「should（～しなければならない）」という語を使用することは、何かが提案又は推奨されることを意味するが必須ではない。

読者のために、また、レッドブック 2000 の各章及びセクションは独立した文書でありインターネット上で独立してアクセスすることができるため、FDA はレッドブックの各章及び節の冒頭にあるボックス内で免責事項を繰り返し述べている。

レッドブック 2000 : III 推奨される毒性試験

2007 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター

2007 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 III 章 推奨される毒性試験

本章では、FDA が食品成分（直接食品添加物、食品に使用される着色添加物、これまで間接食品添加物と呼ばれていた食品接触物質など）の安全性を評価するため、どの毒性試験を推奨するか FDA が判断する方法についての一般的な説明を提示する。製造業者及び流通業者が食品成分を米国内で販売することが可能となる前に、提案されている食品成分を使用しても害は生じないという合理的な確実性が要求される（連邦規則集タイトル 21 のセクション 70.3 及び 170.3 を参照）。害が生じないという合理的な確実性についての判断は、毒性試験の結果、曝露情報、並びに申請書及び届出書で提出されるその他の種類の情報に左右される。毒性学的情報の評価に関する詳細は、レッドブックの第 II 章に記載されている。一般に安全と認められる（GRAS）物質及びバイオ工学食品の評価のために提出される安全性データが、レッドブックに記載されていない特殊な試験に由来する場合もある。場合によっては、レッドブックに記載された古典的な毒性試験が推奨され、これらの物質の評価に有用であることもある。提出に関するさらに具体的なガイダンスについて以下で述べる。

食品・着色添加物プログラム

- 業界向けガイダンス：食品に使用する添加物の推奨毒性試験の要約表
- 直接食品添加物への曝露の推定

- 食品に使用する直接添加物及び着色添加物の懸念レベル及び推奨される毒性試験（レッドブック II 1993 年版「草案」）

食品接触物質届出プログラム

- 業界向けガイダンス：食品接触物質に関する食品接触届出書の作成：毒性に関する推奨事項
- 業界向けガイダンス：食品接触通知書及び食品接触物質用食品添加物申請書の作成：化学的推奨事項
- 業界向けガイダンス：食品接触届出書の作成：管理

GRAS 届出プログラムとバイオテクノロジー

- GRAS に関するよくある質問
- GRAS 届出書の提出方法
- バイオテクノロジー
- 生物工学食品に関する完結した相談のリスト

一般的に、食品成分の申請又は届出の一部として提出すべき毒性試験の種類は、当該化合物に関する情報及び提案されている用途を介した当該化合物への曝露に基づいて決定される。この化合物に関する情報には、この化合物を用いて実施された毒性試験から得ることができる様々な生体系に対する毒性学的影響（作用の性質、標的、単用量当たりの反応の程度など）が含まれる。類似化合物に関する毒性情報、又は類似の化学構造もしくは下部構造を有する化合物に関する知見は、対象の化合物に関する毒性情報が限られている場合に有用である。

本章では、具体的な毒性試験に関する詳細なガイダンスについては述べない。遺伝毒性試験、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期毒性試験、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた慢性毒性試験、げっ歯類を用いたがん原性試験、げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験又は慢性毒性試験、並びにげっ歯類を用いたがん原性試験又は慢性毒性試験に追加するための子宮内曝露段階、生殖及び発生毒性試験の実施に関するガイダンスについては、レッドブック 2000 の第 IV 章 C. で述べる。代謝及び薬物動態、並びに免疫毒性を評価するための戦略の策定において申請人及び届出人を支援するためのガイダンスは、レッドブック II 1993 年案「草案」の第 V 章に記載されている。

推奨される一連の毒性試験のデータが得られた場合、その結果を用いれば、化合物の潜在的な毒性学的影響を評価するその後の試験の種類、感度、及び厳密さを改善又は調整することができることに留意することが重要である。

レッドブック 2000 : IV.A. 毒性試験に関するガイドラインの概要

2007 年 4 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 A. 毒性試験に関するガイドラインの概要

当局は、1982 年に食品に使用される食品添加物及び着色添加物の毒性試験に関するガイドラインの最初のセットを発表し、その後 1993 年に 1 回目の改訂版を発表した。レッドブック 2000 の第 IV 章に提示されているガイドラインは、食品成分の安全性評価に使用される毒性試験の計画、実施、及び報告に関連する最新の科学的知識を反映している。

第 IV 章の B. に含まれる情報から、一般的にすべての種類の毒性試験に適用され、毒性試験を計画する際に考慮すべき推奨事項が得られる。第 IV 章 B. には、現在以下が含まれる：「毒性試験の計画及び実施に関する一般的ガイドライン」(IV.B.1.)、「毒性試験結果の報告に関するガイドライン」(IV.B.2.)、「毒性試験における病理学的考察」(IV.B.3.)、「毒性試験における統計学的考察」(IV.B.4.)。「毒性試験の計画及び実施に関する一般的ガイドライン」(IV.B.1.) に含まれる関連情報は、便宜上レッドブック 2000 の具体的な試験 (IV.C.3.-5.) にも組み込まれている。

レッドブック 2000 の第 IV 章の C. に記載されている情報には、以下の特定の種類の毒性試験に関する勧告が記載されている。

1. IV.C.1. 遺伝毒性の短期試験
2. IV.C.1.a. 細菌を用いる復帰突然変異試験

3. IV.C.1.b. *in vitro* 哺乳類染色体異常試験
4. IV.C.1.c. *in vitro* マウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験
5. IV.C.1.d. *in vitro* 哺乳類赤血球小核試験
6. IV.C.3.a. げっ歯類を用いた短期毒性試験
7. IV.C.3.b. 非げっ歯類を用いた短期毒性試験
8. IV.C.4.a. げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験
9. IV.C.4.b. 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験
10. IV.C.5. 非げっ歯類を用いた 1 年間毒性試験
11. IV.C.9.a. 生殖試験に関するガイドライン
12. IV.C.9.b. 発生毒性試験に関するガイドライン
13. IV.C.10. 神経毒性試験

レッドブック 2000 の目次に記載されているその他の具体的な毒性試験は、今後数ヵ月以内に追加される予定である。これらの毒性試験には、急性毒性試験もしくは代替試験（第 IV 章 C.2.）、げっ歯類を用いたがん原性試験（第 IV 章 C.6.）、慢性毒性・がん原性複合試験（第 IV 章 C.7.）、及びがん原性試験に追加する子宮内曝露段階（第 IV 章 C.8.）が含まれる。

レッドブック 2000 : IV.B.1. 毒性試験 の設計及び実施に関する一般的なガイ ドライン 2007 年 4 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 B.1. 毒性試験の設計及び実施に関する一 般的なガイドライン

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

毒性試験に関する一般的ガイドライン

このセクションでは、いくつかの毒性試験又はすべての毒性試験に共通するガイドラインについて述べる。以下の特定の推奨毒性試験に関するガイドラインについては第 IV 章 C. で述べる：遺伝毒性試験（第 IV 章 C.1.）、急性経口毒性試験（「レッドブッ

ク II」1993年版草案の第IV章C.2.)、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期毒性試験(それぞれ第IV章C.3.a.及びb.)、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験(それぞれ第IV章C.4.a.及びb.)、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験(第IV章C.5.)、げっ歯類を用いたがん原性試験(「レッドブックII」1993年版草案の第IV章C.6.)、げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験(1993年ドラフト「レッドブックII」の第IV章C.7.)、げっ歯類を用いた毒性試験の子宮内曝露段階(「レッドブックII」1993年版草案の第IV章C.8.)、生殖及び発生毒性試験(それぞれ第IV章C.9.a.及びb.)及び神経毒性試験(第IV章C.10.)。申請書・届出書の試験依頼人及び申請人は、毒性試験の結果報告に関するガイダンス(第IV章B.2)、毒性試験における病理学的考察(第IV章B.3)、及び毒性試験における統計学的考察(第IV章B.4)についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブックII」1993年版草案に対する科学的に妥当な変更は、他の権威あるガイドライン及び公表文献を参照して行われている¹⁻⁸。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル21パート58の下で発行された米国FDA優良試験所基準(GLP)規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局(ワシントンD.C., 20402、無料通話866-512-1800)の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH出版85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁹、及びDHEW出版no.78-23に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。

B. 動物種、系統及び性別の選択:

このガイドラインは、げっ歯類(通常はラット)及び非げっ歯類(通常はイヌ)を用いた試験を対象としており、他の動物種を使用する場合は、本ガイドラインの修正が必要となる場合がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いるげっ歯類の種、系統及び亜系を選択する際には、毒性化学物質に対する試験動物の一般的な感受性、及び試験動物の特定の臓器及び組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験におけるげっ歯類の近交系、非近交系、又はハイブリッド系統は、答えるべき科学的疑問に基づいて選択しなければならない。さらに、試験動物は、特性が十分に明らかにされており、かつ健康なコロニーに由来するものであることが重要である。最近の情報から、ラットの一部の系統には生存性の問題が存在することが示唆されるため、推奨試験期間生存する可能性が高い試験動物を選択すべきである。FDA は申請人及び届出人に、特定の種、系統又は亜系の適切性について疑問がある場合、毒性試験の開始前に当局の科学者に相談することを推奨している。

C. 年齢：

試験は、若い動物を用い、離乳後できるだけ早期に投与を開始し、5 日間以上の馴化期間後に実施しなければならない。げっ歯類への投与は、6～8 週齢までに開始しなければならない。イヌを使用する場合、4～6 月齢までに投与を開始する。

D. 数及び性別：

試験には、それぞれの種及び系統について同数の雄と雌を使用すべきである。一般的に、亜慢性毒性試験の場合、実験群及び対照群は、げっ歯類の場合 1 群当たり雌雄各 20 匹以上、イヌの場合 1 群当たり雌雄各 4 匹以上とすべきである。試験が事実上用量反応試験とみなされる場合、あるいはより長期の試験が予測される場合は、げっ歯類を用いる亜慢性試験に、10 匹／性／群のげっ歯類が容認されることがある。これらの勧告は、確実に試験終了時の生存動物数が毒性的影響の有意の評価を可能にするのに十分な数であるようにする上で役立つ。

中間剖検が予定されている場合は、1 群当たりの雌雄毎の動物数を、試験終了前に屠殺する予定の動物の数だけ増やさなければならない。げっ歯類の場合、中間剖検には 1 群当たり雌雄各 10 匹以上の動物が必要である。

E. 感染した動物：

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化すべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

動物は、交配及び授乳期間中並びに急性毒性試験を除いて、1 ケージ又は 1 回の実験操作当たり 1 匹収容（単独収容）しなければならない。この勧告は、以下の 3 つの検討事項を反映している：

- 1 ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

一般に、毒性試験に用いる動物には飼料及び水を不断的に与え、これらの試験に用いる食餌は、正常な成長及び生殖に関する種の栄養要求量¹⁰⁻¹³を満たす必要がある。それ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。そのため、一部の高用量群の動物は予想よりも高用量の被験物質を投与される場合がある。なぜなら、このような希釈された食餌を不断的に与えた動物は、高用量飼料のエネルギー及び栄養素含有量の差を補うために、他の投与群の動物よりも多量に摂取する可能性があるからである。このような状況から、観察された変化が被験物

質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、これらの動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要となる。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同性でほぼ同じ大きさの同腹仔の離乳ラットのペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察された実験結果への影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを確認するため、試験には不断給餌された第2の対照群の動物を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期及び亜慢性毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

関連する問題については、「レッドブック II」1993年版草案の第IV章B.5.「毒性試験のための食餌」のセクションで考察されている。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に組み入れなければならないが、試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、数日間かけて動物を試験に組み入れてもよい。後者の推奨に従っている場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できず、試験を繰り返す原因となり得る。例えば、通常の状況下では、短期及び中期（生涯ではない）毒性試験における対照群の死亡率が10%を超えてはならない。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超えると、再試験が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同じの物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が可能な限り類似したロットを用いる。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクト・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件：

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間：

動物は、指定された試験期間中週に7日被験物質に曝露すること。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂餌することができないようにすること。化合物を粉碎した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料 1 kg 当たりの被験物質の重量 (mg) で表す。
- **飲料水に溶解**、被験物質が液体の形態（例えば、清涼飲料、ビールなど）で摂取される場合や、その他の理由により混餌投与が不適当な場合。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水 1 mL 当たりの被験物質の重量 (mg) で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の 2 つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1 回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。げっ歯類の場合、通常、投与容量は体重 100 g 当たり 1 mL を超えてはならない。強制経口投与した賦形剤がオイルの場合（「レッドブック II」1993 年版草案の第 IV 章 B.5.b.を参照）、投与容量は体重 100 g 当たり 0.4 mL 以下とし、低脂肪食の使用を検討すべきである。被験物質の分割投与が必要な場合は、すべての投与を 6 時間以内に行わなければならない。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤 1 mL 中の被験物質の重量 (mg) で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験化合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

雌雄両方を用いる 3～5 用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用することが必要である。急性期（「レッドブック II」1993 年版草案の第 IV 章 C.2.）及び短期（第 IV 章 C.3.a.及び b.）毒性試験から得られた情報は、亜慢性毒性試験のための適切な用量の決定の助けになり得る。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。

毒性試験には、少なくとも3用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するのに十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報（対飼養に関する説明を含む）は、上記のセクション「II. 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記の「II. 試験動物、H. 食餌」の追加情報を参照）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準の原則に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。¹⁴

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも1日1～2回、通常のケージサイド観察を行わなければならない

い。観察間隔は通常 6 時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた 1 年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体的な情報は、第 IV 章 C.10. に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第 IV 章 C.10.）は、年齢に適したものであり、投与開始前に少なくとも 1 回、及び投与中は定期的に、全動物に対して実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）の変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な巡回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

推奨事項は、具体的な毒性試験の種類に関するガイドラインに記載されている（「レッドブック II」1993 年版草案もしくは「レッドブック 2000」の第 IV 章 C. を参照）。飼料の漏出量を記録し、関連する計算において調整を行い、適切な考察を試験報告書に記載すること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロファイル、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科検査：** この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検

査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。

2. **血液学的検査**： 血液学的検査に推奨される動物数及び時間間隔は、個々の毒性試験のガイドラインに記載されている（「レッドブック 2000」の第 IV 章 C.3.-5.及び「レッドブック II」1993 年版ドラフトの第 IV 章 C.2.及び第 6.-8.を参照）。理想的には、各採取時点で同じげっ歯類からサンプルを採取しなくてはならない。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならない。試験期間中に動物から複数日にサンプルを採取する場合、各サンプル採取日のほぼ同時刻に血液を採取する。

1. 以下の測定が推奨される。
 1. ヘマトクリット
 2. ヘモグロビン濃度
 3. 赤血球数
 4. 全白血球数及び白血球分画
 5. 平均赤血球ヘモグロビン量
 6. 平均赤血球容積
 7. 平均赤血球ヘモグロビン濃度
 8. 及び凝固能の測定値（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数など）。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査**： 臨床化学的検査に推奨される動物数及び時間間隔は、個々の毒性試験のガイドラインに記載されている（「レッドブック 2000」の第 IV 章 C.3.-5.及び「レッドブック II」1993 年版ドラフトの第 IV 章 C.2.及び第 6.-8.を参照）。理想的には、各採取時点で同じげっ歯類からサンプルを採取しなくてはならない。血液サンプルは絶食時間終了時かつ給餌前に採取する。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならない。試験期間中、動物から複数日にサンプルを採取する場合、各サンプル採取日のほぼ同時刻に血液を採取する。

すべての被験物質に適した臨床化学的検査には、電解質バランス、糖代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ (SGPT、ALT)
 2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (SGOT、ALT)
 3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ
 4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
 5. 総胆汁酸
2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アルカリホスファターゼ
 2. ビリルビン (総ビリルビン)
 3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GG トランスフェラーゼ)
 4. 5'ヌクレオチダーゼ
 5. 総胆汁酸
3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー
 1. アルブミン
 2. カルシウム
 3. 塩化物
 4. コレステロール (総コレステロール)
 5. コリンエステラーゼ
 6. クレアチニン
 7. グロブリン (計算値)
 8. グルコース (絶食下)
 9. リン
 10. カリウム
 11. タンパク質 (総タンパク質)
 12. ナトリウム
 13. トリグリセリド (絶食下)
 14. 尿素窒素
4. しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDAは、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ

2. アルカリホスファターゼ
3. 塩化物
4. クレアチニン
5. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GG トランスフェラーゼ)
6. グルコース (絶食下)
7. カリウム
8. タンパク質 (総タンパク質)
9. ナトリウム
10. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果に大きな変動が認められることは珍しいことではない¹⁵。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：定時尿量採取は、試験の最後の週に、特定の個々の毒性試験ガイドライン（「レッドブック 2000」の第 IV 章 C.3.~5 並びに「レッドブック II」1993 年版ドラフト の第 IV 章 C.2 及び 6.~8）に記載されているその他の時間間隔で実施しなければならない。採取した尿の量、比重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う¹⁶。
5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、げっ歯類（ラットが望ましい）及び非げっ歯類（イヌが望ましい）を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた 1 年間の試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において定期的実施しなければならない。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下の VI.C. 顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能バッテリー。この

機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、本章のセクション V.A. 試験動物の観察及び第 IV 章 C .10. でより詳細に説明する。神経毒性試験。

毒性試験報告書には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えられるかどうかについて明確に述べる必要がある。FDA は、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：短期、亜慢性及び発生毒性試験については、免疫毒性の主要な指標のリスト（「レッドブック II」1993 年版草案の第 V 章 C. を参照）に記載されている臨床検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価すべきである。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993 年版草案 の第 V 章 C. で考察されているが、まず当局に相談して実施すべきである。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を 10%緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色

して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。詳細については、試験依頼人は特定の試験を参照（第 IV 章 C.1.10）。

1. 副腎
2. 大動脈
3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる 3 以上のレベル）
6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. ハーダー腺（存在する場合）
15. 心臓
16. 回腸
17. 空腸
18. 腎臓
19. 肝臓
20. 肺（主気管支を伴う）
21. リンパ節（投与経路関連が 1 つ、遠隔部位由来が 1 つ）
22. 乳腺
23. 鼻甲介
24. 卵巣及び卵管
25. 膵臓
26. 下垂体
27. 前立腺
28. 直腸
29. 唾液腺
30. 坐骨神経
31. 精嚢（存在する場合）
32. 骨格筋
33. 皮膚

34. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
35. 脾臓
36. 胃
37. 精巣
38. 胸腺（又は胸腺領域）
39. 甲状腺・副甲状腺
40. 気管
41. 膀胱
42. 膣
43. ジンバル腺（存在する場合）
44. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、短期及び亜慢性毒性試験及び発生毒性試験の全動物について、免疫毒性試験の節（第V章C.参照）に記載された通りに実施しなければならない。

レッドブック 2000 : IV.B.2 毒性試験結果の報告に関するガイドライン

2007年4月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003年11月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

毒性試験の結果の報告に関するガイドラインを本節に記載する。病理及び統計に関するより完全な情報については、それぞれ第IV章B.3.及び第IV章B.4.を参照。試験報告書には、21 CFR 58.185 に従い、試験手順及び結果の完全かつ正確な説明及び評価を提示するのに必要なすべての情報を含めなければならない。以下の項目を含めること。

I. 試験の識別及び情報

- A. 試験の標題及び報告書番号
- B. 試験施設の名称及び所在地
- C. 試験期間
- D. 日付:
 - 1. 馴化
 - 2. 開始（投与開始）
 - 3. 安楽死・終了
 - 4. 試験報告書
- E. 以下に最終責任を負う担当者の識別情報及び署名（該当する場合）：
 - 1. 試験の実施（試験責任者、試験責任者）
 - 2. データの解析
 - 3. 病理組織検査
 - 4. 報告書の作成
 - 5. 報告書に記載されたその他の情報

II. 非臨床試験に関する優良試験所基準の陳述書

優良試験所基準（GLP）による規制は、非臨床安全性試験の実施及び報告に関する最低限の基準を確立するために策定されたものであり、FDAに提出する安全性データの品質及び完全性を保証することを目的としている。食品及び着色添加物の各申請書、一般に安全と認められる（GRAS）確認申請書、及び食品接触通知書（FCN）には、21 CFR 171.1(k)、21 CFR 71.1(g)、21 CFR 170.35(c)(1)(vi)又は21 CFR 170.101(c)に規定されているGLP順守陳述書を含めなければならない。

III. 品質保証陳述書

各試験報告書には、21 CFR セクション 58.35(b)(7)に準拠し、「最終試験報告書に含めるべき陳述書を作成し、これに署名する。この報告書には、査察実施日、並びに管理部門及び試験責任者に報告された所見を明記するものとする。」と述べている品質保証部門が署名した品質保証陳述書が含まれていなければならない。

IV. 試験実施計画書及び修正案

各非臨床試験の実施計画書は、21 CFR 58.120 に規定されるすべての GLP 要件を満たすように作成する必要がある。実施計画書には、試験を実施するための明確に記述された目的及び方法を記載すること。実施計画書の写しを試験報告書に添付すること。試験報告書には、実施計画書のすべての変更又は修正、変更理由、変更が試験の結果に及ぼしたあらゆる影響を記載した陳述書を含めなければならない。

V. 記録の保管・検索・保存

試験報告書のこのセクションには、21 CFR 58.190 及び 195 に従って、被験物質の元データ、標本及びサンプルの可用性及び位置に関する情報を記載しなくてはならない。

VI. まとめ及び結論

試験報告書のこのセクションには、以下の内容を簡潔に記載する。

- A. 方法
- B. 数値データの要約及び解析
- C. 記述データの要約及び解析（例えば、神経毒性の可能性を評価するための観察）
- D. 標的臓器及び無影響量（NOEL）などの解析から導かれた結論

要約では、被験物質の毒性作用の指標となる可能性がある対照群と比較して、被験物質投与群のデータ又は所見におけるすべての有意な変化を強調しなければならない。また、要約には、病変又は異常の発生率・重症度と用量との関係に関する説明も含めなければならない。

要約には、データ又は観察の品質又は完全性に影響を及ぼした可能性があるすべての状況についての説明を含めなければならない。

VII. 被験物質

- A. 同定
 - 1. 化学名
 - 2. 化学情報検索サービス（CAS）登録番号（又はコード番号）
 - 3. 分子構造及び分子量
 - 4. 化学組成の定性的及び定量的測定
- B. 製造情報
 - 1. ロット番号
 - 2. 純度。既知の汚染物質及び不純物の名称及び量、並びに識別不能な物質の割合を含む。
 - 3. 使用期限
 - 4. 安定性
 - 5. 保管方法
- C. 物理的性質
 - 1. 状態（例えば、粉末、液体）
 - 2. 色
 - 3. 水及び投与した賦形剤中での溶解性
 - 4. pH（該当する場合はpKa）
 - 5. 沸点及び融点
- D. 希釈剤、懸濁化剤、乳化剤、賦形剤、又は被験物質の投与に使用されるその他の材料の識別情報。
- E. 投与形態での被験物質のサンプリング
 - 1. サンプリング実施時刻
 - 2. 投与形態での被験化合物の安定性の確認：方法及び結果
 - 3. 投与形態での被験化合物の均質性の確認：方法及び結果
 - 4. 投与形態での被験化合物の濃度の確認：方法及び結果
- F. 保存条件：試験期間中及び試験終了後

VIII. 試験動物

- A. 使用した種及び系統（及び該当する場合は亜系）、特に試験に一般的な実験室系統以外の系統を使用する場合は、その系統を選択した根拠
- B. 動物の供給源又は供給業者
- C. 試験前のコンディショニングに関する説明（隔離手順など）
- D. 試験群及び対照群への動物の無作為化に用いた方法の説明
- E. 試験開始時及び終了時の被験物質投与群及び対照群の性別ごとの動物数、年齢及び状態
- F. 食餌

1. 飼料
 - a. 飼料：ロット番号、組成等
 - b. 可用性：すなわち不断給餌
2. 水
 - a. 可用性：すなわち不断給餌

G. ケージ条件

1. ケージ当たりの収容動物数
2. 寝床の材料
3. 周囲温度
4. 湿度
5. 照明条件

IX. 方法

試験報告書の方法の項には、以下の情報を含めなければならないが、これらに限定されない。

- A. これらのレッドブック 2000 ガイドラインからの逸脱
 1. 試験手順がこれらのレッドブック 2000 ガイドラインから逸脱しているすべての状況について説明する
 2. 逸脱の根拠を記載する。
- B. 実験計画及び手順（詳細）
 1. 試験期間（試験開始日及び終了日を含む）
 2. 用法・用量に関する資料には以下の事項を記載すること。
 - a. 単位時間（例:日）当たりの投与量（mg/kg 体重）
 - b. 投与経路
 - c. 投与方法、投与回数、投与時刻
 - d. 被験物質を強制経口投与した場合、各動物に投与された賦形剤と合わせた総投与量
 - e. 投与時間
 3. 被験動物の観察
 - a. 個体別観察期間
 - b. 頻度
 - c. 方法
 4. 標本の採取条件（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、その他）
 - a. 期間及び時刻

- b. 頻度
 - c. 方法
5. 統計解析：使用するすべての統計学的手法は、参照文献により十分に説明するか、特定すること。試験報告書のこのセクションに含めるべき情報の詳細な考察については、第 IV 章 B.4 を参照。

XI. 結果及び考察

- A. 個々の動物のデータ及び結果は、結果の独立した評価を可能にするため、表形式で十分詳細に提示する必要がある。データの生成、測定又は評価に使用するコンピュータ化されたシステムについて、システム（ソフトウェア）の名称及びバージョン、並びに指定された使用目的を含めて記載しなければならない。試験動物ごとに以下の情報を記載する。
- 1. 各異常徴候の初回観察時刻及びその後の経過。これらのデータは、必要に応じて同腹子ごとに整理すること。
 - 2. 試験中の死亡時刻。事前に予定された時点で屠殺されなかった動物についても、「最も可能性の高い」死因を特定し、報告すべきである。
 - 3. 摂餌量及び節水量のデータ（飼料の漏出量を含む）
 - 4. 体重及び体重の変化
 - 5. 飼料効率のデータ
 - 6. 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及びその他の臨床所見
 - 7. 必要に応じて、神経毒性試験及び免疫毒性試験の結果
 - 8. 以下を含む肉眼的剖検所見
 - a. 絶対的及び相対的臓器重量
 - b. 肉眼的病変の説明
 - c. 肉眼的病変の発生率及び重症度
 - 9. 以下を含む組織病理学的所見（第 IV 章 B.3 参照）：
 - a. 顕微鏡的病変の説明
 - b. 顕微鏡的病変の発生率及び重症度
- B. 個々の動物の要約されたデータを性別及び用量群ごとに整理し、表形式で提示しなければならない。必要に応じて同腹子ごとにデータを整理すること。数値的手段を提示する場合には、標準誤差等の適切なばらつきの尺度を併記すること。要約されたパラメータごとに以下の情報を記載すること。
- 1. 試験開始時の動物数
 - 2. 各パラメータについて評価した動物数
 - 3. 各パラメータについて動物を評価した試験日（第 60 日、終了時など）

- C. すべての数値結果は、適切な統計学的方法によって評価しなければならない。
毒性試験の統計学的考察に関する詳細なガイドラインについては、第 IV 章 B.4
を参照。
- D. 結果の評価には、少なくとも以下のことを含めなければならない。
1. 被験物質への曝露と、すべての一般的及び特異的有害作用（腫瘍性及び非腫瘍性病変、臓器重量への影響、死亡率への影響など）の発生率及び重症度との関係の性質に関する考察、並びに標的臓器の特定。
 2. 試験期間中に得られた臨床所見と剖検所見との関係に関する考察。
 3. 被験物質に起因する影響が認められなかった用量レベル（NOEL）に関する結論、及びその決定の周辺のあらゆる複雑な問題もしくは議論の余地がある問題についての考察。

レッドブック 2000 : IV.B.3. 毒性試験 における病理学的考察 2007 年 4 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2000 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 B.3. 毒性試験における病理学的考察

- a. 病理学的データの審査プロセスの説明
 - b. 病理学的データの審査中に遭遇する一般的な問題
 - i. 病変の形態学的説明の欠如
 - ii. 診断用語の適用における不整合
 - iii. 肉眼的病理検査結果の記載の不備
 - iv. データの不正確な要約
 - v. 病理学的検査の結果に関する十分な考察の不足
 - c. 病理学的データの報告に関する一般的推奨事項
 - i. 表形式のデータと形態学的観察の整理
 - ii. 要約表
 - iii. 相互参照表
 - iv. 動物の内訳表
 - v. 病理学者のコメント
 - d. 参考文献
-

病理学的データは、食品成分の安全な使用を裏付けるため FDA に提出される毒性情報の最も重要な部分を構成する。病理学的データ及びその他の安全性データの解釈が、製品の安全性に関する判断の基礎となる。

げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期毒性試験、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた 1 年間毒性試験、げっ歯類を用いたがん原性試験、げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験、生殖発生毒性試験に関する試験動物の剖検及び臓器・組織の顕微鏡検査についての具体的な推奨事項は第 IV 章 B.1.e. を参照されたい。一般に、本ガイドラインでは、試験に使用した全動物に完全な肉眼的剖検を実施し、この試験のすべての対照動物及び高用量動物から採取したすべての肉眼的病変及び実施計画書が要求するすべての組織並びに臓器（第 IV 章 B.1.e.iii を参照）を顕微鏡下で検査することが推奨されている。他のすべての投与群から得られたすべての肉眼的病変及び標的臓器も顕微鏡下で検査しなければならない。

この毒性試験における病理学的考察に関するセクションでは、病理学的データの審査のプロセスを説明し、そのようなデータの審査において審査官が遭遇する一般的な問題を特定し、病理学的データの報告に関する一般的なガイドラインを示す。本章では言及していないが、CFSAN の病理学者は提案された毒性試験の実施計画書についても審査し、申請人に助言を提供する。このような審査の要請は、当該申請に指定された CSO に指示される（第 II 章 A. を参照）。

a. 病理学的データの審査プロセスの説明

病理学的データの審査は、規制当局の審査担当科学者又は CAC からの病理学的評価に対する要請で開始されることがある。このような事態は、食品成分の安全性を裏付けるために提出された毒性情報の科学的審査中に、病理学的データの解釈に関する疑問が生じた場合に発生する。審査の要請は一般に、解釈に関する具体的な質問に限定されており、審査を行う病理学者の注意が特定の臓器又は組織の所見に向けられる。場合によっては、審査担当病理学者に、試験におけるすべての病理学的所見の検査を依頼することがある。

試験報告書の病理に関する部分には、通常、平均及び個体別の臓器重量パラメータ、臨床化学的検査値、血液学的検査値、認められた病理学的変化の概算発生率、並びに個体別の肉眼的及び顕微鏡的病理学的所見が含まれる。規制審査担当科学者からの評価メモが資料に添付される場合がある。このメモには、過去の毒性試験の結果及び関連する科学文献から得られる情報を含む毒性情報の要約が記載されている。

審査担当病理学者は通常、実験のデザインと方法を検討することから審査を開始する。審査担当病理学者は、試験動物の一般毒性指標（例えば、体重増加量、摂餌量、臨床又は血液学的所見、臓器重量の変化）を注意深く審査し、動物の生存及び終了時の生存動物数に特に注意を払う。これらの情報はすべて、審査を行う病理学者が観察された病理学的変化と投与との関係性を評価するのに役立つ。

病理学的審査へのアプローチは変動する場合があるが、すべての審査において以下に示す要素が考慮される。審査担当病理学者は、

- 概算発生率表で病変が認められた動物の割合を算出した方法を判断する。例えば、分母が試験の総動物数に基づいているのか、あるいは特定の組織又は臓器の顕微鏡検査を実施した動物数に基づいているのかを判断する；
- 肉眼的所見と顕微鏡的所見を比較して、すべての肉眼的所見が顕微鏡的所見又は他の適切な説明によって説明されることを確認する；
- 病変に適用される診断用語を調べて、それが最新のものか従来のものか判断する；
- 個々の動物データから、報告された肉眼的病変の位置、大きさ、及び分布に関する十分な情報が得られることを確認する；
- 実験動物の群間の投与関連の差を評価する際に、定性的特性、病変の重症度及び発生数を考慮する；
- 所見を解釈する前に対照データを慎重に評価する；
- 試験病理学者が作成した重要な病理学的所見の考察を評価する；及び
- 必要な場合、病理学的所見と試験期間中の試験動物に対する投与関連の影響に関する他の所見との相関関係を示す。

病理学的審査が完了すると、正式な報告書が共同の規制審査担当科学者に提出される。報告書では、提出された資料の審査に基づく病理所見及び病理所見と投与との関連について考察する。病理学的データに関する疑問が残る場合、報告書でさらに明確な資料の要求を推奨する場合がある。

追跡して行う病理学的審査には追加データが必要である。当局が最も頻繁に要求する追加情報は、使用した診断基準及び特定の病変に関する過去の対照データの明確化である。当局から元の顕微鏡スライドの審査を要請されることがある。場合によっては、申請人はFDAの審査のためにパラフィンブロック又は湿組織から新しいスライドを作成するよう求められることがある。毒性試験のスライドに関する当局の審査により、病変の独立した特性が明らかになり、病変の発生率を検証することが可能になる。

当局が顕微鏡スライド及びその他の資料を追跡審査のために必要とする場合、当局はそれらを提出するよう指示する。通常、臓器又は組織部位からの顕微鏡スライドは、治療群、性別によって、及び病理学的登録番号の順に配置しなければならない。当局の指示に従って顕微鏡スライドを提出すれば、追跡審査が迅速に行われる。

b. 病理学的データの審査中に見られる一般的な問題

情報の欠落、不正確さ又は不完全さによって病理学的データのタイムリーな審査が妨げられることがある。このような問題は、当局への提出時によく見られる。情報不足に起因する問題の一般的な考察を以下に示す。この話題に関する詳細な考察は公表されている。⁽¹⁾

i. 病変の形態学的説明の欠如

病理学的データの審査が遅れる原因として最も多い問題の1つは、病変の形態学的説明が欠けていることである。報告された病変の重要性は、その診断基準、分布、重症度に関する情報がなければ評価することは困難である。病変の用語に議論の余地がある場合、これは特に重要である。

ii. 診断用語の適用における不整合

1種類の病変を説明するために複数の診断用語を使用すると、審査を行う病理医にとって問題となる可能性がある。2つ以上の用語が同義的に使用されているのか、あるいは試験の結果が2名以上の病理学者によって評価され、それぞれが同じ形態学的変化に対して異なる用語を使用しているのかを示すには、さらに明確な説明が必要である。例えば、ある試験では、「肝細胞がん」と「肝細胞腫、悪性」という用語が同じ組の診断に使用されていた。別の報告では、ラットの甲状腺病変を記述するために、「C細胞」、「澄明細胞」、「明細胞」、「傍濾胞細胞」の4つの異なる用語が使用された。いずれの場合も、同じ診断に複数の用語を使用した理由は示されていない。

複数の病理学者がスライドを審査した際に診断用語の使用に相違が生じていた。例えば、提出された試験では、約1/3の動物から採取した組織を試験担当の病理学者が評価し、残りの組織を顧問の病理学者が評価していた。病理医間で診断用語が一致していないが、試験報告書の不一致を説明する試みは行われていなかった。データは投与

に関連した影響を示しているように思われたが、これらは後に様々なカテゴリーの病変のまとめ方に起因するものとみなされた。

iii. 肉眼的病理検査結果の記載の不備

肉眼所見の記述が不完全であるため、肉眼的病理所見と顕微鏡診断との相関関係を示すことは困難である。顕微鏡的所見が肉眼的所見と相関していない場合、審査官は重要な情報が欠落しているかどうかを判断するよう努めなければならない。報告書には、肉眼的所見と顕微鏡的診断との間の不一致を解消するために講じた措置を記載しなければならない（例えば、パラフィンブロックの再切断、又は湿組織から採取した追加サンプル）。

iv. データの不正確な要約

誤った集計又は計算の結果として生じた不正確な要約の数値によって、病理学的データの審査が困難になっている。病理学的データを要約する際には、すべての実験動物を考慮し、発生率の数値は実際に検査した動物数、臓器、組織に基づくべきである。

v. 病理学的検査の結果に関する十分な考察の不足

多くの場合、提出書類で病理学的評価の結果の重要性が十分に考察されていない。一部の報告では結論が要約されているが、結論が利用可能な病理学的データからどのように推論されたかは説明されていない。一部の報告では、データの統計解析の結果のみに基づいた結論が報告されており、試験から得られた関連するすべての生物学的情報を考慮することから読み取ることができる広範な結論が無視されている。

c. 病理学的データの報告に関する一般的推奨事項

毒性試験の報告書の病理学に関するセクションには、一般的に導入部、及び材料と方法、結果と考察、要約と結論に関するセクションを記載する。

毒性試験とは別に病理学的データを報告する場合には、毒性試験の実験計画及び方法に関する十分な情報を含めるべきである。この情報には、実験動物の種及び系統、被験化合物の投与に関する詳細、実験群及び対照群の数、各群の動物数、臨床化学的測定及び血液学的検査を含む生存時観察の種類及び頻度、並びに組織の肉眼的及び顕微

鏡的評価の範囲を含めなければならない。一般に、提供される情報は、審査官が病理学的データの質を評価するのに十分なものでなければならない。

当初の試験実施計画書からの逸脱については説明が必要である。例えば、低用量群及び中用量群から採取した組織について顕微鏡検査が予定されていなかったが検査が行われた場合は、実施計画書を適切に修正するか、もしくはこの逸脱の理由を示さなければならない。

i. 表形式のデータと形態学的観察の整理

審査を容易にするためには、表形式の情報を容易に理解できる書式で整理することが特に重要である。表の表題、行及び列の見出しは、簡潔であるが、情報を提供するものでなければならない。個々の動物の所見を示す表では、記述的診断カテゴリーは情報を提供するものでなければならない。病変カテゴリーとの重複は避けなければならない。形態学的診断は、現在受け入れられている基準を反映すべきである。複数のカテゴリーの病変が共通の「診断」にグループ化されている場合は、そのグループ化の理論的根拠を示すこと。複数の診断が共通の診断にグループ化されていない場合、形態学的な違いによってグループ化が不可能であると推測される。重症度並びに臓器又は組織内の病変の分布に関する情報を提供する必要がある。これらの観察結果は、病変の進行及び異なる用量の効果を試験している場合には特に重要である。副腎、性腺、及び腎臓などの対になった臓器では、特定の病変を、必要に応じて一側性又は両側性と示さなければならない。肉眼的病変はすべて、顕微鏡的所見又は説明書によって説明する必要がある。

ii. 要約表

報告書の結果のセクションの要約表には、実際に検査した動物、臓器、組織の数を明確に示すこと。各群の動物で検査した組織数が示されていない場合は、効果を示す発生数や平均値に疑問が生じる。要約表に二重カウントがあってはならない。発生率を決定する際、分母は各群に最初に割り当てられた動物数だけでなく、組織を検査した実際の動物数を反映すべきである。検査した組織の数についての図には、消失、自己融解又は欠損した組織を反映するあらゆる調整を明確に示すこと。例えば、副腎髄質に関わる病変の正確な発生率は、顕微鏡検査に十分な量の髄様組織が含まれていた両副腎からの副腎切片（動物の場合）の数に基づかなければならない。播種性病変、例えばリンパ網内系組織の腫瘍について要約する際には、個々の臓器における疾患の存在だけでなく、これらの病変が認められた動物数を発生率の数値に反映させること。

iii. 相互参照表

可能であれば、個々の病変を縦軸に、個々の動物番号を横軸に示した相互参照表を含めること。これは、動物内の病変のレビューと、グループ内の動物間又は異なるグループ間の病変の比較の両方に便利である。

iv. 動物の内訳表

報告書には、一般に、病理学的登録番号、性別、群の指定、試験日数及び動物の運命（例えば、中間屠殺、瀕死屠殺、死亡発見、又は最終屠殺）を記載した動物処分表を含めるべきである。これによって FDA の科学的審査官がすぐに参照することができ、個々の動物データからこのような情報を構築する必要がなくなる。

v. 病理学者のコメント

最後に、報告書には病理学的データについて具体的に考察する項を含めなければならない。この病理学的コメントでは、試験の病理学者の観点から病理学的所見の概要を示す必要がある。病変の定性的説明を含み、投与群と対照群間の差を強調する考察は、病理学的データの解釈及び評価の重要な部分である。病変の形態学的特徴の説明は、用語が論議的となるか誤解される可能性がある場合に特に重要である。可能性のある病因に関する所見は、科学文献の参照によって強化され、病理学者のコメントの重要な部分となり得る。試験実施の疾病の激増などの重大な事象及び試験結果に対するその事象の影響について考察しなければならない。重要な組織病理学的所見の発現率の群間差について考察すること。観察された差が投与に関連したものとみなされない場合は、この結論の根拠を示さなければならない。

レッドブック 2000 : IV.B.4. 毒性試験 における統計学的考察 2007 年 6 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2007 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 B.4. 毒性試験における統計学的考察

- a. 特定の統計学的問題
 - i. 試験実施計画書及びデザイン
 - ii. 収集データの提示
 - iii. 解析結果の提示及び解釈
 - iv. CFSAN の統計学審査官からの支援
- b. 統計学的考察の参考文献

販売承認を管理する規制は、申請書類に提出する毒性データの統計解析と解析に関する文書の両方を申請書類に含めなければならないことを意味している。このセクションの目的は、CFSAN の審査官がこれらの試験を効率的に評価できるよう、食品成分申請書に含まれる毒性試験の統計学的側面を文書化する際に申請人を指導することである。CFSAN の Office of Toxicological Sciences（毒性科学局）の数学部門が作成した標準操作手順書（SOP）の形の追加の助言は、申請に割り当てられた CSO からの要請に応じて入手することができる。

毒性試験を適切に実施し、そこで得られた食品成分の安全性評価の妥当性を保証するため、計画、デザイン、実行、解析及び結果の解釈では、常に統計学の専門知識を使

用すべきである。このガイドラインでは、毒性試験で得られたエビデンスの妥当性を評価する上で最も重要な因子を強調する。これらの因子は、1) 試験実施計画書及び試験デザイン、2) 収集データ（個体別動物データ）の提示、3) 解析結果（要約データ表を含む）の提示及び解釈、4) その他の検討事項である。

FDA は、統計学者と具体的な毒性試験を実施した科学者との間のコミュニケーションが、使用される統計学が毒性試験の生物学に関連することを保証するのに役立つということを強調している。例えば、統計学的異常値は必ずしも生物学的な異常値であるとは限らず、「有意な」統計学的検定 ($p < 0.05$) は必ずしも生物学的有意性を示すものではない。FDA は、試験のデザイン及び実施、並びに試験データの解釈の際には、適宜、申請人が当局の統計学者に相談することを推奨している。

以下の勧告は、毒性試験の結果を整理し、文書化する際の申請人向けの一般的な指針を示している⁽¹⁾

- データは、FDA の審査官が分析を繰り返すか、あるいは必要に応じて代替りの分析を行うことによって、結果を容易に検証できるような形式で提出しなければならない。これを達成する最良の方法は、申請書でデータを表形式で提出するとともに、機械可読形式で提出することである（機械可読データの提出に関する追加情報については、第 II 章 B. を参照）。
- また、データの要約表も提出すること。
- 提出物は、当局の審査官がデータと要約表との間を容易に移動できるように、整理及び文書化すること。（例えば、ある用量群の 50 匹のラットを用いたバイオアッセイの報告に、ある腫瘍の発生率が 3/40 であることを示す要約表が含まれている場合、腫瘍を有していた 3 匹がどのラットか、検査したが腫瘍がなかった 37 匹がどのラットか、腫瘍を検査しなかった 10 匹がどのラットかを示す補助表がなければならない。）
- 統計学的理由から異常値を除外する場合は、異常値を除外する決定の根拠となった統計学的検定を明記すること。
- 統計学的推測の説明には、使用したモデルに関する説明、そのモデルに適した要約データ、投与の影響の推定値によるデータの解析、モデルの妥当性に関する合理的な統計学的チェックを含めるべきである。
- 仮説の統計学的検定を参照する要約データの表を提示する場合、説明において、帰無仮説と対立仮説、統計学的検定、帰無仮説の下での検定統計量の標本分布、検定統計量の値、検定統計量の自由度（適切な場合）、p 値、及び検定が片側か両側かを特定しなければならない。

- 統計解析は、添加剤の安全性に関する特定の疑問に直接関連付ける必要がある（すなわち、投与群の結果を対照群の結果と比較し、様々な動物特性（性別、種、年齢など）が実験結果に及ぼす影響を評価する）。
- すべての毒性試験の統計解析の結果（例えば、p 値、信頼区間）を表にまとめること。さらに、これらの結果が食品成分の安全性に関する疑問の解決にどのように寄与するかを説明する努力をするべきである。
- 提出書類は、FDA による試験の統計学的レビューを容易にする関連情報（例えば、データの表、検証した統計学的仮説、使用したモデルなど）の相互参照を行わなければならない。

a. 特定の統計学的問題

i. 試験実施計画書及びデザイン

提出する申請書には、実施計画書の原本及び試験期間中に行われた試験実施計画書の変更の完全な説明を記載しなければならない。実施計画書は、試験の実施と最終的な解析の両方を形作るバイオアッセイの評価における重要な文書である。実施計画書は、試験の目的を示し、これらの目的を検証される統計学的仮説と関連付ける。この文書には、試験の目的、実験デザイン（亜慢性、短期、多世代）、動物種の選択、評価すべきパラメータの選択、予定されているデータの間中解析、予定されている中間解析及び最終屠殺、試験の早期中止の要因となる事象、データモニタリング委員会又は品質保証委員会の役割と責任、提案されている統計的手法など、試験のデザイン及び実施の重要な特徴が記載されている。実施計画書では、事前に投与群及び統計解析の主要評価項目とする変数を指定することによって、試験で検証可能な仮説を適切に定義し、制限する。

適切に設計された試験実施計画書には、通常、最低限以下の項目が含まれる：

- **目的の説明**：主要目的に加えて、副次的目的を明確に記載する。試験が証明しようとしている、あるいは否定しようとしている正確な仮説も明確に記述しなければならない。
- **試験動物の入手先**：試験動物の種、系統、性別及び入手先、並びに試験動物を試験から排除する方法（すなわち、いわゆる「出来損ない」を排除する。その理由）に関する明確な説明。
- **実験計画**：実験計画には、初期のベースライン期間（存在する場合）、試験の構成（短期、生涯など）、投与レベル、対照群、各群の動物数（サンプルサイズ）及び試験の終了基準に関する情報を含めなければならない。

- **無作為化の手順**：動物を実験群に割り振るために用いる無作為化手順の説明。一般に、乱数表より乱数発生器を用いるコンピュータ駆動式の手順の方が優れている。
- **投与経路**：被験化合物の投与経路及び投与頻度に関する記述。
- **食餌**：試験で使用した食餌に関する詳細な説明。
- **交絡因子の制御**：関心のある交絡反応変数（すなわち、ケージング効果）の影響を最小化した方法に関する記述。これが不可能な場合は、その旨を記載し、試験に対するこれらの影響及び可能性のある影響を無視できない理由を併記する。
- **測定した実験パラメータ**：測定するパラメータの説明及び測定頻度に関する説明。
- **検定力分析**：使用する動物の数が、計画中の試験の種類に関してこの出版物に記載されているガイドラインの範囲内である場合、検出力分析は不要である。使用する動物数が少ない場合は、検出力分析又は試験が検出可能な比較群間の試験パラメータの差に関する記述を提出する必要がある。
- **品質管理**：正確で一貫した信頼性のあるデータを保証するために講じる手順の説明（例えば、標準操作手順書、取扱い説明書、データ検証など）。
- **データ解析**：モニタリング手順、解析する変数、使用する統計解析（各中間解析の有意水準の選択を含む）、及び解析の頻度などの予定されているデータの間接解析の説明。
- **統計学的方法**：データに適用する統計学的方法の説明。ここでは、試験の目的を裏付けるために統計解析で取り扱う具体的な質問を特定する。例えば、異常値を検出するために用いる方法の説明が重要である。分析の主要な評価項目を特定する必要がある。多重比較を行う場合は、事前に計画する必要がある。

ii. 収集されたデータの提示

試験に使用した全動物に関する情報を示すこと。試験に使用した動物に関するすべての情報を審査官が容易に見つけることができるようにデータを整理しなければならない。例えば、審査官が1匹の動物についてすべての試験パラメータを、すべての動物について単一のパラメータを閲覧できるようにデータを整理しなければならない。試験及び収集するデータの種類に応じて、個々の動物の記録を提示するか、あるいはデータを表にしてもよい。データ表を十分使用できることと機械可読データを提出することが強く推奨される（電子的提出については連絡先を参照のこと）。収集したデータの数値的正確性を保証するために講じた措置については、審査官がその正確性を判断できるように十分詳細に文書化する必要がある。

前述したように、試験の各動物について、識別番号、試験登録時の年齢、用量レベル、性別、初期体重及びケージの識別情報を示さなければならない。動物をそれぞれの投与群に無作為に割り振った方法を示す表も作成する必要がある。その他の情報には以下を含めること：

- 各動物について、試験期間、死亡日、死亡の種類（例えば、計画屠殺、瀕死屠殺、死亡動物の発見など）、試験からの早期離脱が生じた場合はその理由（例えば、ケージからの脱走）。
- 試験実施計画書に規定された各間隔での摂餌量、摂水量及び試験化合物の摂取量。
- 定義されたパラメータのすべての測定値及びこれらの測定が行われた回数。測定に際して標準操作手順書からの逸脱があった場合は、逸脱の性質、逸脱の理由及び試験への影響について考察すること。
- すべての顕微鏡的病変について：a) 病変の種類（腫瘍性又は非腫瘍性）は、形態学的診断から明確であること、b) 適切な場合、非腫瘍性病変の重症度（例えば、軽度、中等度、著明）を含めること、c) 適切な場合、腫瘍性病変には「転移性」、「浸潤性」、「全身性」などの修飾語を使用すること、さらにd) 個々の動物のデータには、病変が最初に観察された時点（生存中又は剖検時）を示す情報を含めること。

iii. 解析結果の提示及び解釈

統計解析結果の提示には、使用したすべての統計的手法についてその説明と理論的根拠を含めること。広く知られている方法（例えば分散分析）でない場合は、参考文献を提示すること。特定の解析の使用理由、仮定、解析の実施、結論の妥当性を含む統計解析の詳細な考察は、FDA がデータの再解析の必要性の有無を決定する際の指針となる。提出された関連変数の各解析について、以下の情報を提供しなければならない。

- **特定の変数及び分散分析**： 特定の変数を特定する記述。明らかでない場合は、試験の目的との関連性に関する考察を含めること。
- **統計学的モデル**： 解析の基礎となる統計モデル。必要に応じて参考文献を提示すること。
- **仮説**： 検定する仮説及び対立仮説の記述。
- **検定力の計算** 帰無仮説を棄却できなかった検定、特にサンプル数の妥当性を正当化するための検出力の算出。

- **信頼区間:** 効果の推定、信頼区間の構築などに用いた統計的手法。必要に応じて参考文献を提供すること。
- **異常値:** 外れているデータポイント（異常値）を検出するために用いた方法及び特定の方法を選択した理由。特定された異常値については、試験を行い、データセット内の他のデータから逸脱した理由を明らかにしなければならない。
- **統計的手法の基礎となる仮定:** 特に、推論の妥当性を確認するためにそのような仮定が必要な場合には、統計学的に合理的な範囲で、データが極めて重要な仮定を満たしていることを示す必要がある。例えば、パラメトリック法を使用するかノンパラメトリック法を使用するかを決定する際には、正規性の検定と分散の同等性の検定を実施することが望ましい。
- **生存率の解析** この解析は、投与群の動物が対照群よりも早期に死亡したかどうかという問題に対処するものであり、投与群の動物が投与に関連した腫瘍を検出できるほど長く生存していたかどうかを明らかにするのに役立つ。
- **腫瘍の解析:** 試験動物の各群についての腫瘍（良性及び悪性）及び他の病変の解析。腫瘍が死亡時の偶発的所見であるか、あるいは死因であるかによって、使用する解析方法が決定される。これらの解析間の主な理論上の違いは、各時間間隔においてリスクにさらされている動物の数を規定する方法である。標準的な Cox 生命表検査などの検査を実施する際には、この点を考慮に入れる必要がある。
- **トレンド検定:** 必要に応じたトレンド検定。これには、直線性の検定だけでなく、不適合度の検定も含まれる。
- **要約データのプロット又はグラフ:** 最も多くの情報を伝えるプロットを作成するよう注意すること：例えば、各用量群に多数の動物を用いた試験では、個々のデータをプロットするよりも、平均値と信頼限界又はプラスマイナス 1 (± 1) 標準偏差をプロットする方がよい場合がある。

収集したデータを提示する際には、以下の点も重要である。

- **データの変換:** 不要なデータ変換は避けなければならない。データの変換を行った場合は、その変換の理論的根拠及び変換データに基づく投与の影響の推定値の解釈を示すこと。
- **データのパラメトリック及びノンパラメトリック解析:** 異なる期間において同じパラメータのパラメトリック解析とノンパラメトリック解析を行うことは避けなければならない。例えば、経時的に測定したパラメータの等分散性を検定し、有意性が認められる試験と認められない試験がある場合、統計学者は合意に達しなければならない（すなわち、エビデンスの優越性が等分散性を示すか

否か)。これは、得られた p 値を標準正規偏差 (z スコア) に変換し、平均スコアの p 値に p 値の数値の平方根を乗じた値を得ることにより行うことを推奨する。

- **同腹仔及びケージ飼育の影響**：統計モデルを決定する際には、同腹仔及びケージ飼育の影響を考慮しなければならない。これが不可能な場合は、その旨を記載し、試験に対するこれらの影響及び可能性のある影響を説明できない理由を併記する。
- **反復測定**：経時的に測定されるパラメータについては、反復測定解析を考慮しなければならない。
- **従属実験パラメータ**：あるパラメータが生物学的に別のパラメータに依存する場合（すなわち、臓器重量は体重に依存する）、共分散分析と同様に、従属パラメータを調整する必要がある。
- **死亡時刻**：死亡時刻は、試験開始からの日数で報告する。例えば、試験を 1997 年 1 月 1 日に開始し、動物が 1999 年 1 月 1 日に死亡すれば、動物が死亡したのは 730 日目である。
- **生殖試験**：生殖発生毒性試験において、すべての仔が死亡した後に母動物が試験を継続している場合には、その同腹仔の数を 0 と数えること。
- **統計学的比較**：データの統計学的比較が事前に計画されていなかった場合、特定の解析を選択する際にバイアスを回避した方法を記載しなければならない。
- **統計**：統計値、帰無仮説の下での検定統計量の標本分布、検定統計量の値、有意水準（すなわち、p 値）、検定が片側か両側かの記述、中間の要約データは、審査者が解析結果を迅速かつ容易に検証できる書式で提示する。ほとんどの場合、コンピュータ出力のコピーによって必要な情報が得られる。例えば、2 標本 t 検定の記録には、2 つのサンプルサイズ、各サンプルの平均及び分散、プールした分散推定値、t 統計量の値、関連する自由度、及び p 値を含めなければならない。
- **コンピュータプログラム**：可能であれば、一般的に利用可能なコンピュータプログラムを使用しなければならない。適切なプログラムについては、FDA の統計学者に相談されたい。申請人自身が作成したプログラムを使用する必要がある場合は、以下を含むプログラムを完全に文書化すること：
 - ソースコード、
 - 「既知」の結果に照らしたテストラン、すなわち模範例、手作業で実施した例、あるいはパッケージプログラムで実行した例。これらのテストランは、申請書のデータに関連して生じる可能性のあるすべてのケースを対象とすること。テストケースは、提出されたデータにプログラムが使用される前と後の両方で実行する必要がある。

iv. CFSAN の統計学審査官からの支援

複雑な毒性試験又はがん原性バイオアッセイの場合、申請人は試験を実施する前か、関連する統計学的考察について議論するための申請書を提出する前に、CFSAN に相談することが推奨される。提案された毒性試験の実施計画書に関する統計審査官のコメントを、申請に割り当てられた CSO に要求することができる（第 II.A 章参照）。

試験実施中に通常とは異なる懸念が生じた場合、申請人は統計解析に関するデータ及び資料の予備的な表を CFSAN に提出し、助言及び指導を受けることができる。

レッドブック 2000 : IV.C.1. 遺伝毒性 の短期試験 2007 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2007 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.1 遺伝毒性の短期試験

ヒトの健康に有害な影響を及ぼす遺伝子変化には、遺伝子突然変異、染色体の再配列又は欠失、染色体全体（異数性）又は染色体セグメントの喪失又は増加がある。遺伝毒性試験は、遺伝子損傷を誘発する化合物を検出するようにデザインされた *in vitro* 及び *in vivo* 試験である。このような検査には以下のものがある。（1）重要な種類の遺伝子変化（遺伝子突然変異及び染色体効果）を直接評価する試験及び（2）これらの変化をもたらすとされる種類の DNA 損傷に対する間接的な遺伝毒性試験。後者の試験カテゴリーでは、DNA 損傷（例えば、DNA 付加体又は DNA 鎖切断）又は DNA 損傷に対する細胞応答（例えば、不定期 DNA 合成）のいずれかを評価することができる。

FDA は、累積推定食事摂取量が総食事量の 0.5 ppb に相当する 1.5µg/人/日を超える場合にはすべて、一連の短期遺伝毒性試験を使用することを推奨している。推奨される試験では、遺伝子突然変異もしくは染色体への影響が直接測定される。当局はそのようなデータを、長期動物給餌試験が実施されていない状況において、化学物質ががん原性の可能性がある物質であるか否かを判断するために使用する。そのようなデータは、化学物質が遺伝性の悪影響を及ぼすか否かを示している可能性もある。がん原性の評価に長期動物給餌試験が利用可能な場合、遺伝毒性データは前記の試験の結果の解釈に役立つ可能性がある。

遺伝毒性試験バッテリー

化学物質を遺伝子突然変異と染色体異常の両方を誘発する能力について評価することが不可欠であると考えられる。遺伝子突然変異に最も広く用いられている検査は、細菌を標的細胞として用いて行われる。遺伝子突然変異を誘発する化学物質の試験は、*in vitro* で成長させた哺乳類の細胞でも実施することができる。染色体異常の誘発を検出する試験は、*in vitro* 又は *in vivo* で化学物質に曝露した細胞を用いて実施する。推奨される一連の遺伝毒性試験は特異的な遺伝毒性試験から構成されるが、遺伝子突然変異、染色体への影響、DNA 損傷、又は DNA 損傷に対する細胞応答を測定する他のシステムからのデータは、化学物質の全体的な遺伝毒性評価に関連する可能性がある。したがって、すべての試験系において上記の評価項目に関して得られているすべてのデータを提出すべきである。

推奨される試験

食事（150µg/人/日）中の累積推定一日摂取量が 50ppb を超える食品成分について推奨される遺伝毒性試験バッテリーには、一般的に以下のものがある。

- a. 細菌の遺伝子突然変異試験

及び

- b. 哺乳類細胞を用いた染色体損傷の細胞遺伝学的評価を伴う *in vitro* 試験

又は

in vitro マウスリンパ腫チミジンキナーゼ^{+/−} 遺伝子突然変異試験

（マウスリンパ腫試験が望ましい）

及び

- c. 哺乳類の造血細胞を用いた染色体損傷の *in vivo* 試験。

当局は、項目「b」のマウスリンパ腫 tk^{+/−}試験を選択している。これは、この試験が、生細胞において複数の機序によって生じる遺伝性の遺伝的損傷を測定するものであり、発がんに関連する遺伝的事象を含む遺伝子突然変異又は遺伝性染色体事象のいずれかを誘発する化学物質を検出することができるからである。マウスリンパ腫 tk^{+/−}試験を実施する際は、ソフトアガー法又はマイクロウェル法のいずれかが好ましい。

食品成分の累積推定一日摂取量が 50ppb 以下であるが、0.5 ppb を超える場合、*in vivo* で染色体損傷について試験したときに固有の遺伝毒性を示す化学物質はほとんどないため、推奨される遺伝毒性試験バッテリーには、一般に上記のリストの項目「a」及び「b」が含まれる。

細菌を用いた遺伝子突然変異試験及び *in vivo* 小核試験（哺乳類の造血細胞を用いた染色体損傷の *in vivo* 試験として許容される）の実施に関するガイダンスを以下に示す。このガイダンスは、経済協力開発機構外部リンク免責事項（OECD）によって発表されたガイドライン又は米国環境保護庁（US EPA）によって発表されたガイドラインに直接基づいている。これらのガイドラインは実質的に同等である。医薬品規制調和国際会議外部リンクに関する免責事項（ICH）の報告書が、遺伝毒性試験に関する一般的な勧告の基礎として使用され、さらに特定の試験系に関するガイドラインの草案作成時にも参照された。ほかに、哺乳類の造血細胞を用いる *in vivo* の染色体損傷試験（小核試験）のガイダンスは、1998 年遺伝毒性試験国際ワークショップ（Hayashi ら、*Environmental and Molecular Mutagenesis*（環境と分子突然変異）、2000、印刷中）の報告書に基づいている。FDA は、これらの過去のガイドラインを適宜修正している。ここに記載されていない遺伝毒性試験の実施に関する具体的なガイダンスについては、上記の ICH、OECD、又は米国 EPA ガイドラインを参照。

遺伝子損傷の種類

標準的なバッテリーで規定された突然変異試験は、様々な遺伝的損傷のスペクトルを検出することができる。細菌を用いた遺伝子突然変異試験では、1 対又は少数の DNA 塩基対の置換、付加又は欠失を伴う点突然変異を検出する。点突然変異は、*in vitro* 哺乳類細胞突然変異試験でも検出される可能性がある。バッテリーで規定されているマウスリンパ腫 tk⁺試験は、点突然変異に加えて、大規模な欠失、転座、有糸分裂組換え・遺伝子変換及び異数性も検出するため、バッテリーにおいて検出可能な遺伝的損傷のスペクトルが最も広い試験になる。哺乳類細胞を用いた染色体損傷の細胞遺伝学的評価による *in vitro* 試験は、染色体構造異常を検出する。哺乳類の造血細胞を用いた *in vivo* 染色体損傷試験では、哺乳類の骨髄染色体異常試験の場合は染色体の構造異常を、哺乳類の赤血球小核試験の場合は染色体の構造的損傷あるいは有糸分裂装置の損傷を検出する。

また、マウスリンパ腫 tk⁺試験及び哺乳類細胞を用いて、染色体損傷を細胞遺伝学により評価する *in vitro* 試験ではいずれも染色体の構造的損傷が検出されるが、マウスリンパ腫 tk⁺試験で遺伝性であるが細胞に致死的ではない損傷が検出されると同時に、染色体損傷を細胞遺伝学により評価する *in vitro* 試験でさらに細胞に致死的な種類の損

傷が検出されることに留意されたい。さらに、マウスリンパ腫 tk^{+/+}試験は、バッテリーにおいて遺伝子変換・有糸分裂組換えを検出できる唯一の試験である。

そのため、バッテリーに含まれる試験は、検出された特定の遺伝子損傷の種類観点から互いに補完するために選択した。化学物質は、様々な試験において常に一様に陽性又は陰性の結果を示すとは考えられない。例えば、化学物質は細菌を用いる変異原性試験においてのみ陽性となる場合がある。それにもかかわらず、このような結果は、がん原性を含む潜在的なヒトの健康への影響と関連する可能性がある。逆に、一部の化学物質は細菌試験で陰性であるが、他の試験では陽性であることが示されている。これらの化学物質は、染色体突然変異を引き起こすメカニズム（大規模な欠失、転座、遺伝子変換・有糸分裂組換えもしくは異数性）によって作用する可能性が高いが、細菌試験では点突然変異及び他の非常に小規模な遺伝子突然変異のみが検出される。

マウスリンパ腫 tk^{+/+}試験に加え、チャイニーズハムスター細胞の CHO、AS52 及び V79 株並びに TK6 ヒトリンパ芽球様細胞を含む他の細胞株を用いる他の *in vitro* 哺乳類遺伝子突然変異試験が実施される場合がある。これらの細胞株において、最も一般的に使用される遺伝的評価項目は、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*hprt*)、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*xprt*) の導入遺伝子、又はチミジンキナーゼ (*tk*) のいずれかにおける突然変異を測定する。*tk*、*hprt*、及び *xprt* 突然変異試験は異なるスペクトルの遺伝的事象を検出する。遺伝子の配列の違いにより、検出可能な点突然変異のスペクトルが異なる。さらに、*tk* 及び *xprt* 遺伝子の常染色体部位によって、X 染色体の *hprt* 遺伝子座では検出されない遺伝的事象（例えば、染色体交換事象）の検出が可能になると考えられる。これは、X 染色体上の *hprt* 遺伝子座に隣接し、必須遺伝子に関与する遺伝子損傷が細胞にとって致命的である可能性が高く、一方、常染色体上の必須遺伝子の損傷は、相同染色体上の無傷の遺伝子（機能的な *tk* 又は *xprt* が欠如している）によって補償されるためである。また、*hprt* 遺伝子の場合に相同染色体がないことは、相同組換えによって生じる突然変異を排除する可能性がある。マウスリンパ腫細胞における *tk* 遺伝子座（マウスリンパ腫 tk^{+/+}試験）は、この遺伝子座及び試験を裏付ける豊富なデータが存在し、また、この遺伝子座では広範囲の障害が検出されるため、哺乳類細胞の遺伝毒性試験の標的として好ましい。

試験バッテリーの変更

a. 細菌試験の限定的な有効性

細菌を用いる復帰突然変異試験を実施しても、遺伝毒性を評価するのに十分な情報が得られない場合がある。このことは、細菌に対して強い毒性を示す化合物（例えば、一部の抗生物質）や、哺乳類細胞に特異的な系を阻害すると考えられる、又は阻害することが知られている化合物（例えば、トポイソメラーゼ阻害薬、核酸類似体、又はDNA代謝の特定の阻害薬）に該当する可能性がある。このような場合には、通常、哺乳類細胞を用いた2件の *in vitro* 試験を、2種類の異なる細胞型と2つの異なるエンドポイント、すなわち、遺伝子突然変異及び染色体損傷を用いて実施すべきである。哺乳類細胞の遺伝子突然変異を評価するために現在受け入れられている試験方法には、以下の位置の突然変異の試験がある：1) マウスリンパ腫 L5178Y 細胞又はヒトリンパ芽球様 TK6 細胞を用いた *tk* 遺伝子座；2) CHO 細胞、V79 細胞又は L5178Y 細胞を用いた *hprt* 遺伝子座；又は3) AS52 細胞を用いた *gpt* 遺伝子座。試験化合物が細菌に対して高レベルの毒性を示すため、このような追加試験を実施する場合でも、一部の抗菌薬は試験菌株に対して強い毒性を示すにもかかわらず、細菌を用いる復帰突然変異試験において極めて低い亜致死濃度で遺伝毒性を示すため（例えば、ニトロフラン系抗菌薬）、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することが重要である。

b. 遺伝毒性活性に対する警告部分構造を有する化合物

構造的に遺伝毒性が予想される化合物は通常、標準試験バッテリーで検出可能である。しかし、標準試験バッテリーで陰性の結果を示した警告部分構造を持つ化合物は、限定的な追加試験を必要とすることがある。追加試験又は試験実施計画書の変更の選択は、化学的性質、問題の構造的に遺伝毒性が予想される化合物に関する既知の反応性及び代謝データに依存する。特定の警告部分構造を持つ化合物クラスの中には、遺伝毒性の最適な検出のためにプロトコルの修正・追加試験が必要であることが規定されているものもある（例えば、アゾ還元生成物の試験を必要とするアゾ基含有分子、加水分解生成物の試験を必要とする配糖体、活性化のためにニトロ還元を必要とするニトロイミダゾールなどの化合物、代謝活性化のために別のげっ歯類 S9 を必要とするフェナセチンなどの化合物）。標準試験バッテリーが、特殊な試験条件が必要とされるクラス内の化学物質に陰性の結果を示した場合は、試験を適切に修正した追加試験を実施しなければならない。

c. 標準的な *in vivo* 試験の使用に関する制限

標準的な *in vivo* 試験で有用な追加情報が得られない化合物がある。これには、毒物動態又は薬物動態試験のデータから、全身には吸収されないため標準的な *in vivo* 遺伝毒性試験では標的組織に利用できないことが示唆される化合物が含まれる。十分な標的

組織の曝露が得られない場合には、*in vitro* 試験のみに基づいて評価することが適切な場合もある。

d. 腫瘍反応のエビデンス

適切なモデルにおける追加の遺伝毒性試験は、標準的な試験バッテリーでは陰性であったが、非遺伝毒性メカニズムの明確なエビデンスがないがん原性バイオアッセイで影響を示した食品成分について実施することができる。作用機序の理解を助けるため、追加試験には、*in vitro* 試験における代謝活性化のための変更された条件を含めるか、あるいは腫瘍誘発の標的臓器における遺伝子損傷を測定する *in vivo* 試験（例えば、肝 UDS 試験、³²P-ポストラベリング、導入遺伝子における突然変異誘発、又は腫瘍関連遺伝子における遺伝的変化の分子特性評価）を含めることができる。

e. 特異な構造を有する化学物質クラス

まれに、特異な構造を有する化学物質クラスの完全に新規な化合物が導入されることがある。げっ歯類を用いた慢性がん原性試験を実施しない場合には、より広範囲の遺伝毒性評価が必要であろう。

レッドブック 2000 : IV.C.1.a. 細菌を用いる復帰突然変異試験

2018 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.1.a 細菌を用いる復帰突然変異試験

I. 目的 :

- A. 細菌を用いる復帰突然変異試験では、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) 及び大腸菌 (*E. coli*) のアミノ酸要求株を用いて、1 対又は少数の DNA 塩基対の置換、付加又は欠失を伴う点突然変異を検出する。^{(3),(9),(16)}この細菌を用いる復帰突然変異試験の原理は、突然変異を誘発する化学物質が検出されるため、試験菌株に存在する突然変異が元に戻り、細菌が必須アミノ酸を合成する機能的な能力を回復させるということである。復帰突然変異体の細菌は、親試験菌株に要求されるアミノ酸の非存在下で増殖する能力によって検出される。
- B. 点突然変異は多くのヒト遺伝子疾患の原因であり、体細胞のがん遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の点突然変異がヒト及び実験動物における腫瘍形成に関与するという実質的なエビデンスがある。細菌を用いる復帰突然変異試験は迅速で安価であり、比較的容易に実施できる。多くの試験菌株には、復帰変異部位における反応性 DNA 配列、大型分子に対する細胞透過性の増加、DNA 修復システムの除去、あるいは誤りが生じやすい DNA 修復プロセスの強化など、突然変異の検出感度を高める特徴がいくつかある。試験菌株の特異性から、遺伝毒性物質によって誘発される突然変異の種類に関する有用な情報が得られる。細菌を用いる復帰突然変異試験には、多様な化学構造に関する結果の非常に大規模なデータベースが利用可能であり、揮発性化合物を含む物理化学的性質が異なる化学物質を試験するため十分に確立された手順が開発されている。

II. 定義

ネズミチフス菌又は *E. coli* を用いる **復帰突然変異試験**は、成長がアミノ酸の外部供給に依存しない菌株を産生するアミノ酸要求株（ヒスチジン又はトリプトファン）における変異を検出する。

点突然変異とは、DNA 配列における 1 対又は少数の塩基対の変化である。点突然変異は塩基対置換、あるいは小規模の挿入又は欠失から生じる可能性がある。

塩基対置換型変異原は、DNA の塩基変化を引き起こす物質である。復帰変異試験では、この変化は元の変異部位又は細菌ゲノムの 2 番目の部位で起こる可能性がある。

フレームシフト突然変異原は、DNA 中の 1 つ以上の塩基対の付加又は欠失を引き起こし、RNA 中の読み取り枠を変化させる物質である。

III. 初期検討

- A. 細菌を用いる復帰突然変異試験は、取り込み、代謝、染色体構造及び DNA 修復過程などの因子において哺乳類細胞とは異なる原核細胞を利用する。*in vitro* 試験では、一般に外因性の代謝活性化源を使用することが必要である。*in vitro* 代謝活性化系は、哺乳類の *in vivo* 条件を完全に再現することはできない。したがって、この試験は、哺乳類における物質の変異誘発能及び発がん作用に関する直接的な情報を提供するものではない。
- B. 細菌を用いる復帰突然変異試験は、一般に遺伝毒性活性、特に点突然変異誘発活性の初期スクリーニングとして用いられる。広範なデータベースから、この試験で陽性を示す多くの化学物質は、他の試験でも遺伝毒性を示すことが実証されている。この試験で検出されない変異原性物質の例がある。この欠点の理由として、検出された評価項目の特異的性質、代謝活性化の違い、又はバイオアベイラビリティの違いが考えられる。
- C. 細菌を用いる復帰突然変異試験を実施しても、遺伝毒性を評価するのに十分な情報が得られない環境がある。このことは、細菌に対して強い毒性を示す化合物（例えば、一部の抗生物質）や、哺乳類細胞の複製システムを阻害すると考えられる、又は阻害することが知られている化合物（例えば、トポイソメラーゼ阻害薬、核酸類似体、又は DNA 代謝の阻害薬）に該当する可能性がある。このような場合には、通常、哺乳類細胞を用いた 2 件の *in vitro* 試験を、2 つの異なる細胞型と 2 つの異なる評価項目、すなわち、遺伝子突然変異及び染色体損傷を用いて実施すべきである（第 IV 章 C.1.の「試験バッテリーの変更」

のセクション a.で考察している)。それにもかかわらず、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することは依然として重要である。

- D. この試験で陽性を示すほとんどの化合物は哺乳類の発がん物質であるが、相関関係は絶対的なものではなく、化学物質クラスによって異なる。他の非遺伝毒性機序又は細菌細胞に存在しない機序を介して作用すると推測されるため、あるいは代謝活性化が不十分で作用できないため、この試験では検出されない発がん物質がある。

IV. 試験法 :

A. 原理

1. 細菌を用いる変異原性試験は、一般に2つの基本的方法のいずれかを用いて実施される。いずれの方法においても、外因性代謝活性化系の存在下及び非存在下で細菌培養物を被験物質に曝露させる。プレート法^{(3),(9),(14),(16)}では、これらの成分を溶融重層寒天培地に混合し、直ちに最小寒天培地上に播種する。プレインキュベーション法^{(2),(8),(9),(16),(18),(34)}では、処理混合物をインキュベートし、重層寒天と混合して最小寒天培地上に播種する。いずれの方法でも、2~3日のインキュベーション後に復帰変異コロニー数を計数し、溶媒対照プレート上の自然復帰突然変異コロニー数と比較する。
2. プレート法及びプレインキュベーション法に加えて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施するいくつかの手順が記載されている。これらの追加手順には、変動法^{(10),(12)}及び停止法が含まれる。⁽³¹⁾ガス又は蒸気の試験手順に関する提案も記載されている。⁽⁴⁾
3. この文書に記載されている手順は、主にプレート法及びプレインキュベーション法に関連する。いずれの方法も代謝活性化の有無にかかわらず実験を実施することが可能であるが、プレインキュベーション法を用いるとより効率的に検出できる化合物もある。これらの化合物は、短鎖脂肪族ニトロソアミン、二価金属、アルデヒド、アゾ染料及びジアゾ化合物、ピロリジジンアルカロイド、アリル化合物、ニトロ化合物などの化学物質クラスに属する。⁽⁹⁾ 特定のクラスの変異原がプレート法やプレインキュベーション法などの標準的な方法では必ずしも検出されないことも認められている。これらは「特殊な事例」とみなすべきであり、検出には別の手順を使用することが強く推奨される。以下の「特殊な事例」が特定された（それらの検出に使用された手順の例を記載した引用文献とともに示す）。すなわち、アゾ染料及びジアゾ化合物、^{(9),(18),(26),(34)}ガス及び揮発性化学物質、^{(4),(13),(21),(28),(35)}並びに配糖体などである。^{(5),(20),(23),(30)}標準作業手順からの逸脱は、科学的に妥当であることが証明されることが必要であ

る。アゾ化合物（腸内で遊離芳香族アミンに還元される）及び配糖体（腸内で糖質及びアグリコンに加水分解される）の場合、利用可能であれば、上記の参考文献中の修正された方法を使用するのではなく標準的な方法で遊離芳香族アミン又はアグリコン代謝物を試験することが望ましい。

4. 植物又は動物組織由来の被験物質には、アミノ酸（ネズミチフス菌試験菌株ではヒスチジン、*E. coli* WP2 菌株ではトリプトファン）又はこれらのアミノ酸の起源となり得るペプチドが、これらの標準的な突然変異試験手順の実施を妨げる濃度で含まれている場合がある。^{(1),(27)}他にも試験サンプル中のアミノ酸の存在によって影響を受けない細菌を用いる変異原性試験方法があるが（例えば、参考文献^{(11),(22),(24),(29)}を参照）、そのような手順は標準化されておらず、広く使用されていない。さらに十分な検証もなされていない。細菌を用いる変異原性試験において、生体物質由来の被験物質で変異コロニー数の増加が認められた場合は、その増加が被験物質にヒスチジン又はトリプトファンが含まれていることのみ起因する可能性を評価しなければならない。そのような評価のために計画された実験には、例えば、被験物質のアミノ酸を含まない抽出物の試験などが含まれ、使用した手順により、被験物質に添加された変異原性物質が検出できることを示す適切な対照を用いる必要がある。

B. 説明

1. 調製

a. 細菌

- i. 新鮮な細菌培養物は、指数増殖期後期又は静止期早期まで増殖させる（細胞約 10^9 個/mL）。後期静止期の培養物は使用してはならない。終夜培養物の過度の通気は避けなければならない。フラスコ中での培養物の終夜振盪は 120rpm を超えないことが推奨されている。⁽¹⁶⁾ 実験に用いる培養物には高力価の生菌が含まれていなければならない。力価は、増殖曲線に関する過去の対照データ、又は各試験においてプレート培養試験による生存細胞数の測定のいずれかによって示すことができる。
- ii. 培養温度は 37°C とする。
- iii. 少なくとも 5 種類の細菌株を用いること。これらには、試験室間で信頼性があり、再現性のある反応を示すことが確認されているネズミチフス菌の 4 株（TA1535、TA1537 又は TA97a あるいは TA97、TA98、及び TA100 株）を含めなければならない。これらの 4 種類のネズミチフス菌株は、一次復帰変異部位に GC 塩基対を有しており、特定の酸

化性変異原、架橋剤及びヒドラジンを検出できないことが知られている。このような物質は、一次復帰変異部位に AT 塩基対を持つ *E. coli* WP2 株又はネズミチフス菌 TA102⁽³³⁾ により検出される。したがって、推奨される菌株の組み合わせは以下の通りである：

- ネズミチフス菌 TA1535
- ネズミチフス菌 TA1537 又は TA97 又は TA97a
- ネズミチフス菌 TA98
- ネズミチフス菌 TA100
- *E. coli* WP2 *uvrA*、又は *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101)、又はネズミチフス菌 TA102。

被験物質が架橋変異原であると考えられる理由がある場合、試験バッテリーには TA102 株を含めるか、*E. coli* の DNA 修復能を有する株（例えば、*E. coli* WP2 又は *E. coli* WP2 (pKM101)）を添加しなければならない。

- iv. ストック培養液の調製、マーカー検証及び保存については規定された手順を用いること。増殖に必要なアミノ酸は、それぞれの凍結保存培養液について明示しなければならない（ネズミチフス菌株についてはヒスチジン、*E. coli* 株についてはトリプトファン）。その他の表現型の特性、すなわち適切な場合は R 因子プラスミドの有無（すなわち、菌株 TA98、TA100、TA97a、TA97、WP2 *uvrA* (pKM101) 菌株におけるアンピシリン耐性、並びに菌株 TA102 におけるアンピシリン+テトラサイクリン耐性）；特徴的な突然変異の存在（すなわち、クリスタルバイオレット感受性によるネズミチフス菌での *rfa* 変異、及び紫外線感受性による *E. coli* での *uvrA* 変異又はネズミチフス菌での *uvrB* 変異）についても同様に確認しなければならない。^{(9),(16)} 菌株も、検査室の過去の対照データから予想される頻度の範囲内、望ましくは文献で報告されている範囲内で、自然発生的な復帰変異コロニー数を生じなければならない。

b. 培地

適切な最小寒天培地（例えば、Vogel-Bonner 最小培地 E 及びグルコースを含む）及び数回の細胞分裂を可能にするヒスチジン及びビオチン（ネズミチフス菌の場合）又はトリプトファン（大腸菌の場合）を含む重層寒天培地を使用すること。^{(3),(10),(16)}

c. 代謝活性化

被験物質は、適切な代謝活性化システムの存在下及び非存在下で細菌を曝露させなければならない。最も一般的に使用されるシステムは、Aroclor1254^{(3),(16)}などの酵素誘導剤を投与したげっ歯類（通常ラット）の肝臓から調製された補因子添加ポストミトコンドリア画分（S9）、あるいはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用である。^{(7),(19),(25),(30)} S9 混合液では、通常、10 から30% v/v の濃度範囲でポストミトコンドリア上清画分が使用される。代謝活性化システムの選択及び濃度は、試験する化学物質のクラスによって異なる。場合によっては、複数濃度のポストミトコンドリア画分を使用することが適切であることがある。アゾ染料及びジアゾ化合物の場合、還元代謝活性化システムを使用する方が適切と考えられる。^{(18),(26)}

肝臓の S9 は、その後のろ過滅菌を必要としないように、無菌法を用いて調製すること。S9 又は S9 混合液をろ過すると、酵素活性が失われる可能性がある。⁽¹⁶⁾ S9 の各ロットは、試験検査室で製造されたものか、又は市販品として入手されたものかにかかわらず、無菌性について試験し、汚染されている場合は廃棄すること。

d. 被験物質・調製物

固形の被験物質は、細菌の処理前に適切な溶剤及び賦形剤に溶解又は懸濁し、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は、処理前に試験系に直接添加する、もしくは希釈することができる。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、新鮮な調製物を使用すること。

2. 試験条件

a. 溶媒・賦形剤

溶媒・賦形剤は被験物質との化学反応の疑いがないものであり、使用する濃度は細菌の生存率及び S9 活性に適合するものでなければならない。⁽¹⁷⁾十分に確立された溶媒・賦形剤以外のものを使用する場合は、それを含めたことをそれらの適合性を示すデータによって裏付けることが必要である。適切な場合には、水性の溶媒・賦形剤を使用することが推奨される。水に不安定な物質を試験する場合は、使用する有機溶媒に水が含まれていてはならない。

b. 曝露濃度

- i. 被験物質の最大使用量を決定する際に考慮すべき基準には、細胞毒性和最終処理液中での溶解度がある。予備実験で毒性や難溶性を測定することが有用な場合もある。細胞毒性は、復帰変異コロニー数の減少又は背景細菌叢の消失又は減少により検出される。しかし、希釈培養液中の細胞生存率を測定する予備毒性試験では、誤った結果が得られる可能性がある。⁽³²⁾ 物質の細胞毒性は、代謝活性化システムの存在下で変化する可能性がある。

被験物質の用量が毒性によって制限される場合は、1用量以上の予備試験及び最終試験のすべてにおいて毒性が認められ、かつ代謝活性化の有無にかかわらず、各試験の各菌株において3用量以上で毒性が認められてはならない。不溶性は、実際の試験条件下で最終混合物中の沈殿物として評価し、チューブ内又はプレート上で、肉眼で確認できるものでなければならない。溶解性非細胞毒性物質の推奨される最大試験濃度は5mg/プレート又は5µL/プレートである。5mg/プレート又は5µL/プレートで溶解しない非細胞毒性物質については、試験した1つ以上の濃度が最終処理混合物に不溶性でなければならない。5mg/プレート又は5µL/プレート未満で細胞毒性を示す被験物質は、細胞毒性濃度に至るまで試験する。いずれかのプレート上に沈殿物が存在する場合、コロニーの自動計数を妨げることがある。このような状況では、その一連の用量及び対照のすべてのプレートを手作業で数えなければならない。

一部の例では、被験化学物質の毒性濃度によりほぼすべての細胞が死滅する可能性があるが、ヒスチジン要求性 (His⁻) からヒスチジン非依存性 (His⁺) への突然変異、又は *E. coli* の場合はトリプトファン要求性 (Trp⁻) からトリプトファン非依存性 (Trp⁺) への突然変異が生じていない場合でも、生存している細胞は培地中でヒスチジンを利用して目に見えるコロニーに成長することができる。この現象により、1つ以上の毒性用量でコロニー数が増加することがあるが、その化学物質は変異原性ではない可能性がある。このような場合には、プレートを注意深く観察すると、通常、透明又はほぼ透明な背景細菌叢、及び毒性から生じる異常に小さい「ピンポイント」コロニーが明らかになる。このようなコロニーの性質に問題がある場合は、対象のプレートから得られた代表的なコロニーを、最小寒天プレート (ヒスチジン又はトリプトファンではなくビオチンを添加 (サルモネラの場合)) に画線することができる。また溶媒対照プレートから得たコロニーも対照と

して画線する。疑わしいプレートから画線した細胞がコロニーに増殖せず、溶媒対照プレートから画線した細胞が増殖する場合、認められた疑わしいコロニーは His^r（又は Trp^r）細胞で形成されたものであり、コロニー数の増加は被験化学物質の変異原性を示すものではないと結論することができる。このことから、細胞が増殖した場合、それらは突然変異体であり、化学物質は変異原性であることが示される。

- ii. 最初の実験では、少なくとも 5 種類の分析可能な濃度の被験物質を使用し、試験時点の間隔をおおよそ half log（すなわち、 $\sqrt{10}$ ）としなければならない。濃度と反応の関係を検討する場合には、より短い間隔が適切と思われる。
- iii. 相当量の潜在変異原性不純物を含有する物質を評価する場合は、5mg/プレート又は 5 μ L/プレートの濃度を超える試験を検討してもよい。

c. 対照

- i. 代謝活性化システムの存在下及び非存在下の両方で、同時陰性対照（溶媒及び賦形剤）及び菌株特異的陽性対照を各試験に含めなければならない。各試験の実効性能を示す陽性対照化学物質及び濃度を選択しなければならない。
- ii. 代謝活性化システムを用いる試験では、使用する菌株の種類に応じて陽性対照標準物質を選択する必要がある。以下の化学物質は、代謝活性化を伴う試験に適した陽性対照の例である。

化学物質	CAS 番号
9,10-ジメチルアントラセン	781-43-1
7,12-ジメチルベンズアントラセン	57-97-6
コンゴレッド（還元代謝活性化法用）	573-58-0
ベンゾ（a）ピレン	50-32-8
2-アセトアミドフルオレン	53-96-3
シクロホスファミド（一水和物）	50-18-0 (6055-19-2)
2-アミノアントラセン*	613-13-8
*2-アミノアントラセンは S9 混合液の有効性の唯一の指標として使用してはならない。2-アミノアントラセンを使用する場合、S9 の各バッチは、ミクロソーム酵素、例えば、ベンゾ（a）ピレン、ジメチルベンズアントラセンによる代謝活性化を必要とする突然変異誘発物質を用いて特性解析を行わなければならない。	

- iii. 代謝活性化系の非存在下で実施する試験については、株特異的陽性対照の例を以下に示す。

化学物質	CAS 番号	菌株
アジ化ナトリウム	26628-22-8	TA1535 及び TA100
ニトロフラントイン	67-20-9	TA100
2-ニトロフルオレン又は 4-ニトロ-1,2 フェニレンジアミン	607-57-8 or 99-56-9	TA 98
9-アミノアクリジン又は ICR 191	90-45-9 or 17070-45-0	TA1537、TA97 及び TA97a
クメンヒドロペルオキシド	80-15-9	TA102
マイトマイシン C	50-07-7	WP2 $uvrA$ 及び TA102
N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 4-ニトロキノリン-1-オキシド	70-25-7 or 56-57-5	WP2、WP2 $uvrA$ 及び WP2 $uvrA$ (pKM101)
フリルフルアミド (AF-2)	3688-53-7	プラスミド含有株

- iv. 他の適切な陽性対照標準物質を使用してもよい。可能な場合、化学物質クラスに関連した陽性対照化学物質の使用について検討してもよい。
- v. 被験物質は含まず、溶媒又は賦形剤のいずれかを含み、さらにはその他の点では投与群と同じ方法で処理された陰性対照を含めなければならない。また、選択した溶媒により有害作用又は変異原性作用が誘発されないことを実証する過去の対照データがない限り、非投与対照も使用すべきである。

C. 手順

1. 被験物質による処理

- a. プレート法の場合、^{(3),(9),(14),(16)}代謝活性化システムの非存在下で、通常 0.05 mL 又は 0.1 mL の試験溶液と、0.1mL の新鮮な細菌培養液（約 10^8 個の生存細胞を含む）を、2.0 mL の重層寒天と混合する（0.5mL の滅菌緩衝液も含めることができる）。代謝活性化システム存在下の試験では、通常、適量のポストミトコンドリア画分（代謝活性化混合物中 10~30% v/v）を含む代謝活性化系混合物 0.5 mL を、細菌及び被験物質・被験溶液とともに重層寒天培地（2.0 mL）と混合する。各チューブの内容物を混合し、最少寒天プレート培地の表面に注ぐ。重層寒天を固まらせた後、インキュベーションを行う。

- b. プレインキュベーション法の場合、^{(9),(16),(18),(34)}被験物質・試験溶液（通常 0.05 mL 又は 0.1 mL）を、試験菌株（0.1 mL、約 10^8 個の生存細胞を含む）及び無菌緩衝液（0.5 mL）又は代謝活性化システム（0.5 mL）とともに、重曹寒天（2.0 mL）と混合する前に 30~37°C で通常 20 分又はそれより長時間プレインキュベートを行い、最小寒天プレートの表面に注ぐ。チューブは通常、プレインキュベーションする際に振盪器を用いて曝気する。
- c. 変動を適切に推定するため、各用量レベルで 3 回のプレーティングを使用する。科学的に正当な理由がある場合、同型プレート培養が許容される。偶発的にプレートが失われても、必ずしも試験が無効になるわけではない。
- d. ガス状又は揮発性の物質は、密封容器などの適切な方法で試験しなければならない。^{(4),(13),(28),(35)}

2. インキュベーション

所定の試験法ですべてのプレートを 37°C で 2 又は 3 日間インキュベーションする。インキュベーション終了後、1 プレート当たりの復帰変異コロニー数を計数する。

V. データ及び報告

A. 結果の処理

1. データはプレート当たりの復帰変異コロニーとして提示する。陰性対照（溶媒対照、及び使用した場合は非処理対照）及び陽性対照の両プレート上の復帰変異コロニー数も記載する。
2. 各用量の被験物質、陽性対照及び陰性対照（無処理もしくは溶媒）について、それぞれのプレート数、1 プレート当たりの復帰変異コロニー数の平均値及び標準偏差を示すこと。
3. 明確な陽性反応を確認する必要はない。わずかなもしくは弱い陽性の結果が得られた場合は、追加検査によって確認する必要がある。不確かな結果は、実験条件を変更して追加試験を行うことによって、何度でも明確にしようと試みるべきである。変更することができる試験パラメータとしては、濃度間隔、処理方法（プレート法又は液体プレインキュベーション法）、S9 の哺乳類由来種又は S9 混合液中の S9 濃度などの代謝活性化条件などがある。それにもかかわらず、修正されたプロトコルを用いた再検査後でも、結果が依然不確か、あるいは疑わしい場合があることが認められている。
4. 用量設定試験の結果からは、明らかな陰性結果が報告された場合、それが正しいことを保証するのに十分なデータが得られる可能性がある。すべての菌株に

ついて、代謝活性化の有無によらず、適切な陽性及び陰性対照を用い、かつ変異体を定量して行った予備的な用量設定試験は、その後の結果が明確に陰性である完全な試験の十分な複製とみなすことができる。別の方法として、陰性結果を完全な試験を追加し確認しなくてはならない場合、先に不確かな試験の繰り返しについて述べたように試験実施計画書を修正することが推奨される。

B. 結果の評価及び解釈

1. 陽性結果を判定するためのいくつかの基準がある。例えば、代謝活性化系の有無にかかわらず、少なくとも1種類の菌株において、プレート当たりの復帰変異コロニー数が試験範囲を超えて濃度依存的に増加した、もしくは1種類以上の濃度で再現性のある増加が認められた。まず、結果の生物学的関連性を検討する。統計学的手法を試験結果の評価の補助として用いることができる。⁽¹⁵⁾しかし、統計学的有意性が陽性反応の唯一の決定因子であってはならない。
2. 結果が上記の基準を満たさない被験物質は、この試験において非変異原性と判断される。
3. ほとんどの実験は明確に陽性又は陰性の結果を示すが、まれにデータセットから被験物質の活性について明確な判断ができないことがある。実験の反復回数にかかわらず、結果が依然曖昧あるいは疑わしい場合がある。
4. 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果が陽性の場合、被験物質がネズミチフス菌もしくは *E. coli* のゲノムにおいて塩基置換もしくはフレームシフトによる点突然変異を誘発することが示唆される。陰性の結果は、その試験条件下で被験物質は試験した菌種において変異原性を示さないことを示唆する。

C. 試験報告書

試験報告書には以下の内容を記載すること：

1. 被験物質

- 既知の場合、名称及び CAS 番号を含む識別データ。
- 物理的性質及び純度。
- 試験実施に関連する物理化学的性質。
- 既知の場合、被験物質の安定性。

2. 溶媒・賦形剤

- 溶媒・賦形剤の選択の根拠

- 溶媒・賦形剤に対する被験物質の溶解性及び安定性。
- 3. 投与液**
- 投与液を調製及び使用した時間（又は調製と使用の間隔）並びに保存条件。
 - 可能な場合、投与液の濃度を検証するデータ。
- 4. 菌株**
- 使用菌株。
 - 1培養当たりの細胞数。
 - 菌株の特性。
- 5. 試験条件**
- プレート当たりの被験物質の量（ $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、 $\text{mg}/\text{プレート}$ 又は $\mu/\text{プレート}$ ）、用量選択及び濃度当たりのプレート数の理論的根拠を併記。
 - 使用培地。
 - 代謝活性化システムのソース、種類及び組成、S9 混合液中の S9 の濃度及び判定基準を含む。
 - 処理手順。
- 6. 結果**
- 毒性の徴候。
 - 沈殿の徴候。
 - 個々のプレート数。
 - プレート当たりの復帰変異コロニー数の平均値及び標準偏差。
 - 可能な場合、濃度と反応の関係
 - もしあれば、統計解析。
 - 同時陰性対照（溶剤・賦形剤）及び陽性対照のデータ、範囲、平均値及び標準偏差を併記。
 - 既存陰性対照（溶剤・賦形剤）及び陽性対照のデータ、例えば、範囲、平均値及び標準偏差を併記。

レッドブック 2000 : IV.C.1.b. *in vitro* 哺乳類染色体異常試験 2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.1.b. *in vitro* 哺乳類染色体異常試験

[レッドブック 2000 の目次に戻る](#)

- I. はじめに
- II. 優良試験所基準
- III. 定義
- IV. 初期検討
- V. 試験方法の原理
- VI. 試験方法の説明
- VII. データ及び報告
- VIII. 引用文献

I. はじめに

in vitro 染色体異常試験の目的は、培養哺乳類細胞で染色体構造異常を引き起こす物質を同定することである^{1,2,3}。構造異常には 2 つの型、すなわち染色体型又は染色分体型がある。化学的突然変異原の大部分では、誘発された異常は染色分体型であるが、染色体型の異常も生じる。*in vitro* 染色体異常試験では、株化細胞、細胞株又は初代培養細胞の培養を用いることができる。染色体異常は多くのヒト遺伝性疾患の原因であり、体細胞のがん遺伝子及びがん抑制遺伝子の変化を引き起こす染色体損傷及び関連

事象が、ヒト及び実験動物におけるがんの誘発に関与するという実質的なエビデンスがある。

倍数性の増加は、化学物質に数的異常を誘発する可能性があることを示している可能性がある²⁵。しかし、このガイダンス文書に規定された試験実施計画書は、染色体お数的異常を引き起こす物質の検出に適切な方法を提供することを意図したものではない。したがって、倍数性がないことは、被験物質に異数性を含む数的異常を誘発する可能性がないことを示す十分なエビデンスとは考えられない。

このガイダンス文書は、経済協力開発機構（OECD）が発表したガイドラインもしくは米国環境保護庁（US EPA）が発表したガイドラインに基づいている。本章の発行日には、以下の文書が利用可能である：

<http://www.oecd.org>[External Link Disclaimer](#) and <http://www.epa.gov/>.

II. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。この文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

III. 定義

異数性： 染色体の異常数は単数体数の正確な倍数ではない。

セントロメア： 細胞分裂中に紡錘体線維が結合する染色体の領域で、娘染色体を娘細胞の極に秩序正しく移動させることができる。

染色分体型異常： 単一染色分体の切断又は染色分体間の切断及び再結合として表される染色体の構造的損傷。

染色体型異常： 同一の部位における両染色分体の切断、又は切断及び再結合として表される染色体の構造的損傷。

染色体切断物質： 染色体の構造異常の形成に不可欠な段階である染色体切断を誘発する物質。

核内倍加： DNA 複製の S 期後に核が有糸分裂しなくなり、別の S 期を開始するプロセス。結果は、4、8、16、・・・本の染色分体を有する染色分体となる。

ギャップ： 1 本の染色分体の幅よりも小さく、染色分体のずれが最小である非染色性病変。

分裂指数： 分裂中期の細胞数を細胞集団中に観察された総細胞数で除した比率であり、その集団の増殖の程度の指標である。

数的異常： 使用した細胞に特有の正常数からの染色体数の変化。

倍数性： 二倍体数より大きい単数体染色体数 (n) の倍数 (すなわち、3n、4n など)。

構造異常： 細胞分裂の分裂中期段階の顕微鏡検査により検出可能な染色体構造の変化で、内部交換、相互交換、又は欠失及び断片として観察されるもの。

IV. 初期検討

in vitro 試験では、一般に外因性の代謝活性化源を使用することが必要である。この代謝活性化システムは、哺乳類の *in vivo* 代謝及び薬物動態条件を完全に再現することはできない。固有の変異原性を反映しない陽性結果をもたらす pH 又は浸透圧の極端な条件を回避するよう注意しなければならない^{4,5}。

この試験は、可能性のある哺乳類突然変異原及び発がん物質のスクリーニングに使用される。この試験で陽性を示す多くの化合物は哺乳類の発がん物質であるが、相関関係は化学物質クラスに依存しており、直接的な DNA 損傷以外のメカニズムを介して作用すると考えられるため、この試験や他の遺伝毒性試験では検出されない発がん物質があるというエビデンスが増加している。

V. 試験方法の原理

細胞培養物は、代謝活性化の有無にかかわらず被験物質に曝露される。細胞培養物を被験物質に曝露後所定の間隔で、分裂中期停止物質 (コルセミド®又はコルヒチンなど) で処理し、収穫して染色し、さらに染色体異常の有無について分裂中期細胞を顕微鏡で分析する。

VI. 試験方法の説明

A. 調製

1. 細胞

ヒト細胞を含む多様な哺乳類細胞株、細胞系統又は初代細胞培養物を使用することができる（例えば、チャイニーズハムスター線維芽細胞、ヒト又はその他の哺乳類末梢血リンパ球）。試験に使用する細胞は、細胞型種、培養における増殖能力、核型の安定性、染色体数、染色体形態の多様性及び染色体異常の自然発生頻度に基づいて選択する。株化細胞株及び系統は、モード染色体数の安定性について定期的に検査すること。

2. 培地及び培養条件

インキュベーションの維持には、適切な培地及びインキュベーション条件（培養容器、CO₂濃度、温度及び湿度）を使用すること。培養物をマイコプラズマ汚染がないか定期的に検査し、汚染されている場合は使用してはならない。使用する細胞の正常な細胞周期時間及び培養条件を明らかにすること。

3. 培養物の調製

株化細胞株及び系統：細胞を保存培養物から増殖させ、収穫時期以前に培養物が集密度に達しないような密度で適切な培地に播種し、37°Cでインキュベーションする。

リンパ球：抗凝固剤（例えば、ヘパリン）で処理した全血又は分離したリンパ球を、マイトジェン（例えば、フィットヘマグルチニン）を含む適切な培地に添加し、37°Cでインキュベーションする。異なる個体のリンパ球は、培養条件や被験物質に対して異なる反応を示す可能性がある。したがって、少なくとも2名の健常ドナー由来のリンパ球を使用しなくてはならない。

4. 投与調製物

固形の被験物質は、細菌の処理前に適切な溶剤及び賦形剤に溶解又は懸濁し、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は、処理前に試験系に直接添加する、もしくは希釈することができる。被験物質と、溶媒又は賦形剤を合わせた量は、陰性対照及び賦形剤の対照群を含むすべての培養で同じとする。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、被験物質の新鮮な調製物を使用すること。

B. 試験条件

1. 溶媒・賦形剤

溶剤・賦形剤は、被験物質との化学的反応、S9による被験物質の代謝への影響、被験物質に対する細胞の反応変化、又は細胞変化の誘発など、いかなる方法でも試験の実施を妨げてはならない。これらの基準に従って、標準外の賦形剤・溶媒の適合性を実証しなければならない。可能な限り、まず水性の溶剤・賦形剤の使用を検討することが推奨される。水に不安定な物質を試験する場合は、使用する有機溶媒に水が含まれていてはならない。水分は、分子ふるいを加えることによって除去することができる。

2. 代謝活性化

細菌は、適切な代謝活性化システムの存在下及び非存在下の両方で被験物質に曝露させなければならない。最も一般的に使用されるシステムは、Aroclor1254^{6,7,8,9}などの酵素誘導剤、あるいはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボン^{10,11,12}の混合液を投与したラットの肝臓から調製された、補因子添加ポストミトコンドリア画分（S9）である。通常、ポストミトコンドリア画分は、最終試験培地中で1～10%v/vの範囲の濃度で使用される。代謝活性化システムの条件は、試験する化学物質のクラスによって異なる。場合によっては、複数濃度のポストミトコンドリア画分を使用することが適切であることがある。特定の活性化酵素を発現する遺伝子組換え細胞株の構築を含む多くの開発によって内因性活性化の可能性がもたらされる可能性がある。外因性代謝活性化の代わりに改変細胞株を慎重に使用することは、科学的に正当化されるべきである（例えば、被験物質の代謝にチトクロムP450アイソザイムが関連することによる）。

3. 対照

各実験には、代謝活性化有り及び無しの両方の同時陽性及び陰性（溶媒又は賦形剤）対照を含めるべきである。

陽性対照には、試験系の感度を示すバックグラウンドを超える再現性があり検出可能な増加をもたらすと予想される曝露レベルで、既知の染色体異常誘発物質を用いなければならない。陽性対照濃度は、影響が明確になるように選択するが、読み手に対しコード化された陽性対照スライドの識別情報を直ちに明らかにしてはならない。代謝活性化を使用する場合、陽性対照化学物質は染色体異常誘発反応を引き起こす活性化を必要とする化学物質でなければならない。陽性対照物質の例を以下に示す。

代謝活性化条件	化学名及び CAS 番号
外因性代謝活性化無し	メタンスルホン酸メチル [CAS 番号 : 66-27-3]
	メタンスルホン酸エチル [CAS 番号 : 62-50-0]
	エチルニトロソウレア [CAS 番号 : 759-73-9]
	マイトマイシン C [CAS 番号 : 56-57-7]
	4-ニトロキノリン-N-オキシド [CAS 番号 : 56-57-5]
外因性代謝活性化有り	ベンゾ (a) ピレン [CAS 番号 : 50-32-8]
	シクロホスファミド (一水和物) * [CAS 番号 : 50-18-0 (CAS 番号 : 6055-19-2)]

* 一部の試験ではシクロホスファミドが代謝活性化の非存在下 *in vitro* で染色体異常誘発性を示すが、他の試験では示さないことを示す文献報告（参考文献 26 でまとめられている）がある。陽性対照としてシクロホスファミドを使用する場合、S9 非存在下

でも試験を行い、当該試験室で使用する細胞株における S9 依存性を実証しなければならない。

4. 用量レベル

最高濃度を決定する際に考慮すべき基準には、細胞毒性、試験系における溶解性、pH 又は浸透圧の変化がある。

細胞毒性と溶解性は、最終的な染色体異常試験で使用するものと同じ処理レジメンと代謝活性化を用いる予備的な用量設定試験で測定することが有用であると考えられる。細胞毒性は、集密度、生細胞数、コロニー形成率又は分裂指数などの細胞の完全性及び増殖の適切な指標を用いて判定しなければならない。細胞毒性は、確定試験においても代謝活性化の存在下及び非存在下で測定すべきである。

分析可能な細胞は、最低 3 つの試験濃度から取得しなければならない。細胞毒性が認められる場合、これらの濃度は、毒性が最大からほとんどあるいは全く認められない濃度までの範囲を網羅すべきである。このことは通常、濃度を最大 $2\sim\sqrt{10}$ 倍に分割することを意味する。収穫時、最高濃度は、50%以上の集密度、細胞数又はコロニー形成率の低下を示さなければならない。培養物のような混合細胞培養物では、末梢血リンパ球が遺伝毒性標的細胞として用いられるため、細胞毒性の指標として有糸分裂指数を使用することが許容される。この種の培養物では、他の毒性推定量は不可能であるか、技術的に実行困難である。分裂指数の減少は、細胞毒性反応よりも細胞増殖抑制性を示す可能性があり、処理から採取までの時間の長さの影響を受ける可能性がある。したがって、分裂指数の減少は、細胞毒性の他の指標が可能な細胞株を用いた実験では、細胞毒性の指標として推奨されない。平均世代時間 (AGT) などの細胞周期動態に関する情報は、補足情報として使用することができる。しかし、AGT は、全体の平均であって、必ずしも遅延した部分集団の存在を明らかにするとは限らないため、平均世代時間の延長がわずかであっても、染色体異常の最適産生時間の大幅な遅延と関連する可能性がある。

比較的非細胞毒性の化合物の場合、最高濃度は 5 μ L/ml、5mg/ml、又は 0.01 M のうち最も低い濃度とする。

溶解濃度で毒性を示さない比較的不溶性の物質の場合、試験する最高用量は、処理期間終了時の培地中の溶解限度を超える濃度とすべきである。場合によっては（例えば、毒性が不溶性の濃度でのみ生じる場合）、沈殿が目視できる複数の濃度で試験を行うことが望ましいことが示唆されている。この推奨を検討する際は、結果の定量化

が複雑になるような条件を最小限に抑えるよう注意を払うべきである。細胞、S9、血清の存在により、試験系における曝露の過程で溶解性が変化する可能性があるため、処理の開始時及び終了時に溶解性を評価することが有用と考えられる。不溶解性は肉眼で検出可能である。沈殿物がスコア化に干渉してはならない。

場合によっては、化学物質が可溶性の条件下で試験を実施できるように化学物質の濃度を低くし、処理時間を長く（代謝活性化なしで）することが可能である。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、新鮮な化学物質調製物を使用しなければならない。

C. 処理

増殖細胞は、代謝活性化システムの存在下及び非存在下、被験物質で処理される。リンパ球の処理は、分裂刺激の約 48 時間後に開始する。

通常、各濃度で同型培養物を使用すべきであり、陰性・溶媒対照の培養物にはこの培養物が強く推奨される。同型培養間の最小の変動が過去のデータから明らかにされている^{13,14} 場合、各濃度で単一培養を使用することが許容される。

ガス状又は揮発性物質は、密閉培養容器中などの適切な方法で試験しなければならない^{15,16}。

D. 培養物の収穫

最初の試験では、代謝活性化有り及び無しの両方で細胞を被験物質に 3~6 時間曝露させ、処理の開始後正常な細胞周期の約 1.5 倍の長さに相当する時点でサンプリングする¹²。この実施計画書で、活性化有り及び無しの両方で陰性の結果が得られた場合は、活性化なしの追加の実験を行い、正常な細胞周期の約 1.5 倍に相当する時点でサンプリングするまで連続処理を行わなければならない。特定の化学物質は、周期の 1.5 倍より長い処理・サンプリング時間によって容易に検出される可能性がある¹²。代謝活性化有りでの陰性の結果は、追加試験によって確認する必要がある。この確認試験の場合、S9 供給源又は濃度の変動など、試験実施計画書の修正を考慮すべきである。

E. 染色体の調製

細胞培養物は通常、収穫前にコルセミド®又はコルヒチンで 1~3 時間処理する。各細胞培養物を収穫し、染色体調製のため別々に処理する。染色体調製には、細胞の低張処理、固定及び染色が含まれる²⁷。低張処理は、染色体の最適な分離が得られるが染

染色体の損失がないように調節すべきある。染色は、染色体構造を正確に識別できるものでなければならない²⁷。

F. 解析

陽性及び陰性対照のスライドを含むすべてのスライドは、顕微鏡分析前に独立にコード化する必要がある。固定法は、分裂中期細胞の一部が染色体の喪失を伴い分裂することが多いため、スコア化する細胞はすべての細胞型についてモード数 ± 2 に等しい数のセントロメアを含むべきである。少なくとも 200 の十分に広がった分裂中期像を濃度ごとにスコア化し、必要に応じて対照を複製物間で等分する。異常が多数認められた場合、この数を減らすことができる。この試験の目的は染色体の構造異常を検出することであるが、倍数性及び核内倍加を記録することが重要である。

VII. データ及び報告

A. 処理の結果

実験単位は細胞であるため、染色体構造異常を有する細胞の割合を評価しなければならない。実験培養物及び対照培養物について、異なる型の染色体構造異常をその数及び頻度とともに記載しなければならない。ギャップは個別に記録して報告するが、一般に総異常頻度には含めない。染色体異常を分類するため、程度の異なる詳細に関与する様々なスキームが使用されている。ほとんどの試験では、異常を染色体切断、染色体交換、染色分体切断、染色分体交換の 4 つの主要カテゴリーに分類することが適切である。さらに、倍数性、核内倍加、重度の損傷を受けた細胞（例えば、一つの細胞中に 10 を超える異常がある）、及び破碎及び粉碎された染色体を有する細胞などの他の事象も記録する必要がある。

主要な異常試験では、すべての処理培養物及び陰性対照培養物に対して、細胞毒性の同時測定値も記録しなければならない。

個々の培養データを示すこと。さらに、すべてのデータを表形式で要約すること。

明確な陽性反応の検証に関する要件はない。わずかなもしくは弱い陽性の結果が得られた場合は、追加検査によって確認する必要がある。曖昧な結果は、できれば実験条件を変更して追加の試験を行うことによって明らかにすることが望ましい。陰性結果を確認する必要性については、セクション V.D. 「培養物の収穫」で考察している。評価した条件の範囲を広げるための試験パラメータの修正は、追跡実験で検討すべきで

ある。変更することができる試験パラメータには、濃度間隔及び代謝活性化条件などがある。

B. 結果の評価及び解釈

陽性結果を判定するためのいくつかの基準がある。例えば、1つの試験濃度で染色体異常を有する細胞数が濃度依存的に増加する、又は再現性のある増加を示すなどである。試験結果^{3,13}を評価する補助として統計学的手法を用いるべきであるが、陽性反応の唯一の決定因子であってはならない。生物学的関連性を考慮しなければならない。

倍数体細胞数の増加は、被験物質が分裂過程を阻害し、数的染色体異常を誘発する可能性があることを示している可能性がある。核内倍加染色体を有する細胞数の増加は、被験物質が細胞周期進行を抑制する可能性があることを示している可能性がある^{17,18}。数的異常の誘発を確認しなければならない。

ほとんどの実験は明確に陽性又は陰性の結果を示すが、まれにデータセットから被験物質の活性について明確な判断ができないことがある。実験の反復回数にかかわらず、結果が依然曖昧あるいは疑わしい場合がある。

in vitro 染色体異常試験の陽性結果は、被験物質が培養哺乳類体細胞で染色体構造異常を誘発することを示している。陰性の結果は、試験条件下において、被験物質が培養哺乳類体細胞で染色体異常を誘発しないことを示している。

陽性データが被験物質の本質的な染色体異常誘発性ではなく、試験条件の結果である可能性がある条件がいくつかある。pH 又は浸透圧の変化は異常を誘発することが示されている^{5,19}。また、化学物質によっては、高レベルの細胞毒性でのみ構造異常の増加を誘発することを示すエビデンスもある^{20,21}。この場合、異常は、低用量では予測されない細胞プロセスの崩壊の結果である可能性がある。したがって、生理学的に妥当な濃度では染色体異常誘発リスクとは関連しない可能性がある。しかし、被験物質には染色体異常誘発の危険性がないと結論する前に、その物質が他のいかなる *in vitro* 試験においても遺伝毒性を示さないこと、DNA と直接相互作用しないこと、トポイソメラーゼ阻害剤ではないこと、既知の染色体異常誘発物質と構造的に関連がないこと、さらに *in vitro* で異常を誘発する濃度が *in vivo* で達成できないことを実証しなければならない。

また、チャイニーズハムスター細胞を用いた試験のデータを解釈する際には注意が必要である。ある種の化学物質は、X 染色体長腕の特定の部位、すなわち脆弱部位に高頻度の損傷を誘発するように思われる^{22,23,24}。大部分の異常がこの部位に存在し、他の

異常に有意な増加がないことを実証できる試験では、この現象とヒト細胞における効果との関連性は不明である。

C. 試験報告書

試験報告書には以下の内容を記載すること：

1. 被験物質

- 既知の場合、識別データ及び CAS 番号；
- 物理的性質及び純度；
- 試験実施に関連する物理化学的性質；
- 既知の場合、被験物質の安定性。

2. 溶媒・賦形剤

- 溶剤・賦形剤の選択の根拠。
- 既知の場合、溶剤・賦形剤中での被験物質の溶解性及び安定性。

3. 投与液

- 保存溶液と投与液の調製と使用の間の時間間隔、並びに保存条件。
- 可能な場合、投与液の濃度を検証するデータ。

4. 試験培養物

- 細胞型及び供給源；
- 使用した細胞型の核型の特徴と適合性；
- 該当する場合、マイコプラズマが存在しないこと；
- 細胞周期の長さに関する情報；
- 血液提供者、全血又は分離リンパ球、使用したマイトジェンの性別；
- 該当する場合、継代数；
- 該当する場合、細胞培養物の維持方法；
- 染色体のモード数；

5. 試験条件

- 分裂中期停止物質の同定、その濃度及び細胞曝露期間；

- 可能であれば、濃度及び培養数の選択の根拠、例えば細胞毒性データ及び溶解度の限界
- 該当する場合、培地の組成、CO₂濃度；
- 被験物質の濃度；
- 賦形剤及び添加した被験物質の堆積；
- インキュベーション温度；
- インキュベーション時間；
- 処理時間；
- 該当する場合、播種時の細胞密度
- 許容基準を含む代謝活性化システムの種類及び構成；
- 陽性及び陰性対照；
- スライドの作製方法；
- 異常のスコア化判定基準；
- 分析した分裂中期の数；
- 毒性の測定方法；
- 試験を陽性、陰性又は不確かとみなすための基準。

6. 結果

- 毒性の徴候、例えば、集密度、細胞周期データ、細胞数、有糸分裂指数；
- 沈殿の徴候；
- 測定した場合、処理培地の pH 及び浸透圧に関するデータ；
- ギャップを含む異常の定義；
- 処理培養と対照培養のそれぞれについて、染色体異常を有する細胞の数と染色体異常の種類を別々に示す。
- 認められた場合、倍数性の変化；
- 可能な場合、用量と反応の関係；
- もしあれば、統計解析；
- 同時陰性（溶媒・賦形剤）及び陽性対照のデータ；
- 既存陰性対照（溶剤・賦形剤）及び陽性対照のデータ、範囲、平均値及び標準偏差を併記。

レッドブック 2000 : IV.C .1.c マウス リンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子突然 変異試験 2013 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2001 年 10 月; 2006 年 4 月更新

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.1.c. マウスリンパ腫チミジンキナーゼ 遺伝子突然変異試験

I. はじめに

in vitro 哺乳類細胞遺伝子突然変異試験を使用して、化学物質により誘発される遺伝子変化を検出することができる。使用可能な細胞株は多数あるが、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子を用いた L5178Y TK^{+/+}-3.7.2 C マウスリンパ腫細胞株が、最適な細胞株及び試験である。多くの種類の遺伝子異常が検出されることを示す研究が多数あることから、マウスリンパ腫試験 (MLA) を選択した。この試験では、がん及びその他のヒトの遺伝子疾患の病因において重要であることが知られている突然変異が検出される。この試験では、遺伝子突然変異 (点突然変異) 及び染色体イベント (欠失、転座、体細胞組換え・遺伝子変換及び異数性) が検出されるというエビデンスがある (Applegate ら, 1990 年; Hozier ら, 1981 年; Moore ら, 1985 年; Sawyer ら, 1989 年; Sawyer ら, 1985 年)。これらすべての突然変異事象の検出効率は現在も調査中である。

チャイニーズハムスター細胞株（CHO、AS52 及び V79）又はヒトリンパ芽球様細胞（TK6）のいずれかを用いる試験を含む *in vitro* 哺乳類遺伝子突然変異試験も存在する。これらの細胞株で最も一般的に使用される遺伝的評価項目は、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）、キサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ（XPRT）の導入遺伝子、又は TK のいずれかにおける突然変異を測定する。TK、HPRT 及び XPRT 突然変異試験は、スペクトルの異なる遺伝的事象を検出する。TK の常染色体部位は、X 染色体の HPRT 遺伝子座では検出されない遺伝的事象の検出を可能にする（Moore ら, 1989 年）。

種々の突然変異試験は、スペクトルの異なる遺伝的損傷を検出することができる。したがって、化学物質が様々な試験において一様に陽性又は陰性の結果を示すとは考えられない。特に、サルモネラ菌試験では点突然変異と他の非常に小規模な遺伝子突然変異のみ検出される。さらに、HPRT 遺伝子座を用いる *in vitro* 哺乳類試験では、点突然変異を誘発しないが染色体異常を誘発する化学物質を検出することはできない（Moore ら, 1989 年）。これらの化学物質は、染色体突然変異を引き起こすメカニズム（欠失、転座、遺伝子変換・有糸分裂組換えもしくは異数性）によって作用する可能性が高い。

追加情報は第 IV 章 C.1 に記載されている。

II. 定義

正突然変異： 野生型アレルを突然変異アレルに変換する突然変異。

塩基対置換型変異原： DNA 中の 1 対又は少数の塩基対の置換を引き起こす物質。

フレームシフト変異原： 1 対又は複数のヌクレオチドペアの挿入又は欠失を引き起こし、3 反復の並進運動の読み取り枠を破壊する物質。

表現型発現時間： 処理後、遺伝子変異がゲノム内で固定され、既存の遺伝子産物が表現型形質が変化する点まで枯渇する時間。

突然変異誘発率： 観察された変異細胞数を生存細胞数で除した値。

相対生存率（RS）： 細胞処理直後にプレート培養した試験培養物の相対的なクローニング効率で、陰性対照のクローニング効率と比較される（Cole ら, 1986 年）

相対浮遊細胞増殖率 (RSG) : 溶媒対照の 2 日間総浮遊細胞増殖率と比較した試験培養物の相対的な 2 日間総浮遊細胞増殖率。(Clive 及び Spector, 1975 年)。

相対総増殖率 (RTG) : RTG は、MLA における処理関連細胞毒性の指標として使用される。RTG は、試験の 2 日間の発現期及び変異体選択クローニング期の両方における試験培養の相対的な(賦形剤の対照群に対する)増殖の指標である。各試験培養物の RSG に突然変異体選択時の試験培養物のクローニング効率を乗じ、賦形剤の対照群のクローニング効率と比較して表す。

III. 初期検討

試験には、株化細胞株 L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C マウスリンパ腫を使用する。この試験は、外因性の代謝活性化源を使用する必要がある。この試験には、軟寒天クローニングを用いて突然変異体を計数する方法(Clive ら, 1979 年及び Turner ら, 1984 年)と液体培地及びマイクロウェルプレートを用いる方法(Cole ら, 1986 年)の 2 つのバージョンがある。いずれのバージョンの試験も等しく許容可能である(Moore ら, 2000 年)。

IV. 試験方法の原理

TK^{+/+}から TK^{-/-}への突然変異によりチミジンキナーゼ(TK)が欠損している細胞は、ピリミジン類似体トリフルオロチミジン(TFT)の細胞増殖抑制作用に抵抗性を示す。TK 正常細胞は、細胞代謝を阻害してさらなる細胞分裂を停止させる TFT に対して感受性が高い。したがって、変異細胞は TFT の存在下で増殖することができるのに対し、TK 酵素を含む正常細胞は増殖できない。

マウスリンパ腫細胞を増殖させ、懸濁培養物中において被験物質で処理する。処理は外因性の代謝活性化系の存在下及び非存在下で行う。処理後、細胞を培養して変異体を選択前に表現型の発現を可能とする。細胞毒性を測定し、被験化学物質の適切な用量範囲を決定するために用いる。突然変異誘発率は、突然変異体細胞を検出するため選択剤を含む培地中に、またクローニング効率(生存率)を測定するため選択剤を含まない培地中に既知数の細胞を播種することによって決定する。適切なインキュベーション時間の後、コロニー数を計数する。突然変異誘発率は、選択培地中の突然変異体コロニー数及び生存率から得られる。

V. 試験方法の説明

A. 調製

1. 細胞

この試験は、L5178Y 細胞の TK[±]-3.7.2C 亜系統を用いて開発及び特性評価されたため、TK[±]-3.7.2C 細胞を用いて試験を実施することが重要である (Mitchell ら, 1997 年)。すべての試験室が細胞を核型化するか、あるいは染色体 11 をペイントして 2 つの正常に見える染色体 11 があることを保証し、他のあらゆる異常を特定することが望ましい。TK[±]-3.7.2C 細胞の核型は発表されている (Sawyer ら, 1985 年, 1989 年, 2006 年)。L5178Y/TK[±]-3.7.2C 細胞株の染色体モード数は 40 である。1 本の染色体として数えるべき 1 本のメタセントリック染色体 (t12;13) がある。マスターストックを設定する際は、核型分析もしくは染色体 11 のペイントを実施する必要がある。細胞培養物は、倍加時間についてモニタリングする必要がある。正常な倍加時間は通常 8~10 時間である。マスターストックを設定する際は、集団の倍加時間を確認すること。細胞培養物は常に、確実に対数増殖期で増殖する条件下で維持しなければならない。一般的なガイダンスとして、試験室が細胞を継続的に増殖させている場合は、培養物を最大 3 ヶ月間維持すべきである。

2. 培地及び培養条件

適切な培地及びインキュベーション条件 (インキュベーション容器、温度、CO₂ 濃度及び湿度) を使用すること。突然変異細胞及び非突然変異細胞の両方の発現期間中に、最適な細胞増殖及びコロニー形成能を確保する培養条件を選択することが特に重要である。MLA については、培養条件によって小型コロニー TK 突然変異体の最適な増殖を確実にすることも重要である。マウス白血病細胞用 Fischer's Medium 及び RPMI 1640 培地はいずれも MLA とともに問題なく使用されている。

培地の浸透圧及び pH が生理的範囲 (300 ± 20 mOsm, pH 7.0 ± 0.4) であることを確認する。ウマ血清の各ロットについて、懸濁培養における最適な細胞増殖 (低密度及び高密度)、高いコロニー形成率及び小型コロニー変異体回収率を支持する能力を試験しなければならない (Turner ら, 1984 年)。

3. 培養物の調製

細胞を保存培養物から増殖させ、培地に播種し、37°C でインキュベートする。使用前に、培養液から既存の変異細胞を除去することが必要である。これは、TK 欠損細胞に対して選択するメトトレキサートを用いて達成される。TK コンピテントセルの最適な増殖を確保するため、チミジン、ヒポキサンチン及びグアニンを培養液に添加する (Turner ら, 1984 年)。

4. 代謝活性化

細菌は、適切な代謝活性化システムの存在下及び非存在下の両方で被験物質に曝露させなければならない。最も一般的に使用されるシステムは、Aroclor 1254 などの酵素誘導剤、あるいはフェノバルビタールと β -ナフトフラボンの併用で処理したげっ歯類の肝臓から調製された補因子ポストミトコンドリア画分 (S9) である (Mitchell ら, 1997 年)。通常、ポストミトコンドリア画分は、最終試験培地中で 1~10%v/v の範囲の濃度で使用される。代謝活性化系の選択及び条件は、試験する化学物質のクラスによって異なる可能性がある。場合によっては、複数濃度のポストミトコンドリア画分を使用することが適切であることがある。初代培養肝細胞 (Brock ら, 1987 年及び Oglesby ら, 1989 年) 等の別の代謝活性化システムを使用することの妥当性の根拠を示さなければならない。

5. 被験物質・調製物

液体の被験物質は、処理前に試験系に直接添加しても希釈してもよい。固形の被験物質は、細菌の処理前に適切な溶剤及び賦形剤に溶解又は懸濁し、必要に応じて希釈する。特に懸濁培養では、培養物に添加する前又は処理中に被験物質が沈殿した場合に問題が生じる可能性があることに注意されたい。一般に、化学物質が処理中に不溶性又は不溶性となる条件を用いて化学物質を試験することは避けることが最も望ましい。場合によっては、化学物質が可溶性の条件下で試験を実施できるように化学物質の濃度を低くし、処理時間を長く (代謝活性化なしで) することが可能である。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、新鮮な化学物質調製物を使用しなければならない。

MLA で塩基類似体や選択剤に関連する化合物を試験する場合は、被験物質の特性を慎重に検討しなければならない。例えば、変異細胞及び非変異細胞に対する被験物質による選択的毒性が疑われる場合には、それについて検討しなければならない。突然変異体及び非変異細胞が被験薬に対して異なる感受性を示す場合、処理中に既存の自然突然変異の誘発率が選択的に増加する可能性がある。結果として生じる突然変異誘発率の増加は、新たな突然変異の誘発ではなく、その既存の自然発生突然変異体の選択によるものと考えられる。この可能性については、被験化学物質が TFT と構造的に関連する場合に検討及び調査する必要がある。

B. 試験条件

1. 溶剤・賦形剤

溶剤・賦形剤は、被験物質の溶解性を最大化するように選択すべきである。しかし、溶剤・溶媒は、被験物質との化学反応が疑われるものであってはならない。また、細胞の生存及びS9活性に適合するものでなければならない。よく知られている溶剤／賦形剤以外のものを使用する場合は、適合性を示すデータによってそれらを含めることを裏付けることが必要である。可能な限り、まず水性の溶剤・賦形剤の使用を検討することが推奨される。水に不安定な物質を試験する場合は、使用する有機溶媒に水が含まれていてはならない。水分は、分子ふるいを用いて除去することができる。MLAで使用されている有機溶媒には、DMSO、アセトン、エチルアルコールがある。

2. 曝露条件

最高試験濃度を決定する際に考慮すべき基準には、細胞毒性、試験系における溶解性、pH又は浸透圧の変化がある。比較的非細胞毒性化合物の場合、最高濃度は5 mg/ml、5 L/mL又は0.01 Mのうち最も低い濃度とする。

比較的不溶性の物質は、培養条件下で溶解限度以下又はそれを超える濃度で試験すべきであるが、結果の定量化を複雑にする条件を最小限に抑えるよう注意しなければならない。細胞が曝露される最終処理培地では、非溶解性のエビデンスについて判定する必要がある。細胞、S9、血清の存在により、試験系における曝露の過程で溶解性が変化する可能性があるため、処理の開始時及び終了時に溶解性を評価することが有用である可能性がある。非溶解性は肉眼で評価することができる。

細胞を懸濁液中で増殖させる MLA では、沈降範囲の化合物を試験することは曝露期間の定義に関して問題がある。規定の曝露期間後、通常、細胞を遠心分離によりペレット化し、被験物質を含まない新鮮な培地に再懸濁する。沈殿物が存在する場合、化合物はアッセイの後期まで運ばれるため、曝露の制御は不可能である。したがって、MLAについては、最低沈殿濃度を試験した最高濃度又はデータ評価で用いる最高濃度として使用することが妥当である。このことは、結果の定量化を複雑にする可能性のある条件を最小限に抑えるのに役立つ。

3. 細胞毒性

細胞毒性は、個々の試験培養物及び対照培養物のそれぞれについて測定しなければならない。軟寒天バージョンの MLA では、これは通常、最初に Clive 及び Spector (1975 年) により定義され相対総増殖率 (RTG) を用いて行われている。この尺度には、発現時間中の懸濁液中での相対的増殖率及び変異体選択時の相対クローニング効率などがある。細胞毒性の指標として相対生存率 (RS) を用いて、マイクロウェルバ

ージョンの試験が開発された。RS は、曝露期間直後にプレート培養した場合の各培養物の相対コロニー形成率によって決定される。RTG と RS は異なる細胞毒性測定法であり、一方の測定法が他方より優れているという実際の根拠はないが、両バージョンの試験で同じ細胞毒性測定法を使用することが重要である。RS は通常、軟寒天バージョンの試験では測定されず、RTG は両方のバージョンで測定されるため、細胞毒性の標準的な指標として RTG を使用することが推奨される。この細胞毒性値は、許容可能な試験に必要な濃度範囲を決定するため、並びに陽性及び陰性反応の定義に使用される最高濃度を確立するために用いられる (Moore ら, 2000 年)。

MLA を実施するための 2 つの方法の間には、RTG の計算における付加的な検討事項がある。寒天法では、細胞を被験物質に曝露させ、遠心分離により化学物質を除去し、新鮮な培地に再懸濁する。最初の細胞数の計測は、化学物質への曝露開始の約 24 時間後に行う。処理後 1 日目に、各培養物の細胞密度を、通常培地 1 mL 当たり細胞 0.2 又は 0.3×10^6 個に再調整する。細胞密度が培地 1 mL 当たり細胞 0.2 又は 0.3×10^6 個未満の処理済み培養物は、一般に密度が調整されておらず、通常非常に強い細胞毒性を維持しているため、突然変異体計数のための完全な実験を行うことができない。それぞれの処理培養物について、相対細胞増殖率 (対照と比較した) を算出する。処理後 2 日目に、培養物を再度計数し、密度について調整し、変異体計数のためクローンを調製する。各培養物の合計 2 日間の浮遊細胞増殖率を算出し、各処理済み培養物を対照と比較する。この値を相対浮遊細胞増殖率 (RSG) という。選択培地の存在下及び非存在下で培養物をクローニングして変異体を計数し、突然変異誘発率 (クローン化可能細胞 10^6 個当たりの変異体数) を算出する。各培養物の相対コロニー形成率を求め (陰性対照との比較)、RSG を乗じて相対総増殖率 (RTG) を求める。

マイクロウェル法では、ほとんどの試験室が被験物質への曝露直後に培養細胞を計数し、培養物の密度を調整する。処理が終了し、細胞密度を調整した後、細胞培養物は寒天法の培養物と同様に取り扱う。2 日間の発現期間後、TFT 選択有り及び無しで培養物を 96 ウェルプレートに播種する。

上述のように、処理後の細胞培養物の取り扱いは 2 つの方法で大きく異なる。この違いが RSG と RTG の計算に影響する。寒天法における RSG 及び RTG は、細胞増殖中に化学処理培養物と対照培養物間に生じる可能性のあるあらゆる差を含むように算出される。しかし、マイクロウェル法では、培養物は一般に処理後の密度、及び処理後に生じるコロニー形成率と細胞増殖率を用いて算出された RS、RSG、RTG で調整される。言い換えれば、この試験の処理期間中に陰性対照と処理培養物との間で生じるいかなる増殖差も計算に組み込まれない。

2つのバージョンで得られた細胞毒性測定値を同等にするためには、マイクロウェル法のユーザーがRS、RSG、RTG値を調整して、処理中に生じる可能性のある増殖差を含める必要がある。この調整は、処理直後に各処理培養物の細胞密度を陰性対照の細胞密度と比較して行う。各処理培養物の増殖率を対照と比較することにより、RS、RSG及びRTGの調整に使用できる処理因子中の相対増殖率を計算することができる。例えば、処置期間後に、陰性対照の細胞密度が 0.6×10^6 個/mL、処理済み培養物の密度が 0.3×10^6 個/mLであった場合、処理済み培養物の処理中の相対増殖率は0.5（すなわち50%）となる。培養物のRSが0.4と測定された場合、調整RSは、 $RS \times$ 処理中の相対増殖率、すなわち $0.4 \times 0.5 = 0.20$ （すなわち20%）として算出する。RSGも同様の方法で調整する。調整RTGは、調整RSGに変異体選択時の相対コロニー形成率を乗じることによって得られる。

4. 用量設定

投与量の選択及び間隔は、MLAを適切に実施する上で重要な要素である。陽性又は陰性の反応を確認するには、使用することができるデータポイントが複数あることが望ましい。試験には、用量ポイント当たり単一の培養物、又は用量ポイント当たり複数の培養物のいずれかを使用することができる。用量の数、用量の選択及び間隔を決定するための計画は、評価する被験物質の毒性範囲及び化学物質が突然変異誘発率を増加させるか否かに基づいて変えることができる。化学物質が明らかに陽性である場合、規定された数の分析可能な培養を行う必要はない。化学物質に変異原性がないか、わずかに変異原性がある場合、一般に、同型培養を使用する場合には少なくとも4つの分析可能な用量が必要であり、単一培養を使用する場合には8つの分析可能な用量が必要である。

毒性を有する被験物質については、最高用量でRTGが80%低下しなければならない。RTGの低下が90%を超える用量は通常評価から除外される。ただし、以下に示すように、10%未満のRTGが得られるデータポイントが最終評価に有用となる場合がある。

RTGが100~10%の範囲全体をカバーするデータポイントを得ることが一般的に望ましいが、試験の妥当性は必ずしもそのような完全な用量反応の達成に依存するわけではない。被験物質が突然変異誘発率の大幅な増加を誘発する場合、一般にRTGが100~10%の範囲内のどこであっても十分データポイントが得られる。変異原性を示さない被験物質又は弱い変異原性反応のみを誘発する被験物質については、より高い毒性を示すと予想される用量の選択に重点を置くことが望ましい。これにより、明確な評

価を行うために使用できるデータポイント、すなわち RTG が約 10~20%の範囲にあるデータポイントが得られる確率が高くなる。

したがって、試験室は RTG 値が 10~20%の最大用量を達成するよう試みるのが推奨される。ただし、既に示されているように、化学物質が陽性反応の基準を明確に満たしている場合、10~20%の RTG をもたらず試験濃度がない場合でも、結果は有効である。

突然変異誘発率が 1 つ以上の用量でバックグラウンドの誘発率を越える（まだ陽性と判定されるレベルに達していない）場合、試験の解釈、したがってその妥当性は、RTG が 10~20%の範囲内となる 1 つ以上の用量に依存する。これは、RTG が 10~20%の範囲内でデータポイントを得る確率を増加させるために用量範囲を変更する反復実験を行うことによってのみ達成可能である。

10~20%RTG の RTG 値を示す培養物がない場合に、化学物質に変異原性がないと判断し得る状況がいくつかある。これらの状況の概要を以下に示す。(1) 100%~20% RTG の範囲内の一連のデータポイントにおいて変異原性のエビデンスがなく（例えば、用量反応性がない、同時陰性対照で観察された突然変異誘発率又は過去のバックグラウンド範囲を超える突然変異誘発率がない）、20~25% RTG の間に少なくとも一つのデータポイントがある。(2) 100%~25%までの一連のデータポイントにおいて変異原性のエビデンスは認められず（例えば、用量反応性が認められない、同時陰性対照又は過去のバックグラウンドで観察された誘発率を超える突然変異誘発率が認められない）、また 10%~1% RTG に陰性のデータポイントも認められる。

突然変異誘発率の有意な増加は RTG<10%の場合にのみ認められるが、「RTG>10%で変異原性のエビデンス無し」は、陽性の結果とはならない。

5. 対照

各実験には、代謝活性化有り及び無しの方の同時陽性及び陰性（溶媒又は賦形剤）対照を含めるべきである。代謝活性化システムを使用する場合、陽性対照化学物質は、変異原性反応を得るために活性化を必要とする化学物質としなければならない。

陽性対照は、大部分が小型コロニーTK 突然変異体を誘発するものでなければならない。S9 代謝活性化の非存在下における適切な陽性対照の 1 つはメタンサルホン酸メチルである。S9 活性化とともに使用する適切な陽性対照には、シクロホスファミド（一

水和物)、ベンゾ(a)ピレン及び3-メチルコラントレンが含まれる。S9の存在下及び非存在下での陽性対照反応は、品質管理措置のため、及び小型コロニー突然変異体の十分な検出を実証するために用いること。各試験室は、その陽性及び陰性対照に関する独自の履歴データベースを確立しなければならない。

処理培地に溶媒又は賦形剤のみを含む陰性対照は、処理群と同様に処理したものを含めなければならない。さらに、選択した溶媒により有害作用又は変異原性作用が誘発されないことを実証する過去の対照データがない限り、非処理対照も使用すべきである。

C. 手順

1. 被験物質による処理

対数増殖期にある細胞は、代謝活性化の有無にかかわらず被験物質に曝露させなければならない。曝露は適切な時間行わなければならない(通常は3~4時間が使用される)。しかし、(特に不溶解性を示す化学物質の場合)処理時間を(代謝活性化なしで)24時間に延長することが推奨されることもある。医薬品規制調和国際会議の外部リンクの免責事項では、標準的な3~4時間の処理後に陰性であったすべての化学物質を24時間の処理により評価すること(代謝活性化なし)を推奨している。

試験した各濃度で、同型又は単一の処理培養物を使用することができる。いずれの場合も、使用する濃度数は評価の信頼性を得るのに十分な数でなければならない。特に、化学物質が陰性又は弱陽性の場合には、単回処理培養物を使用し、単一の実験で評価する異なる濃度の数を増やすことが望ましい。陰性対照の重要性から、同型陰性(溶媒)対照培養物を使用することが推奨される。

ガス状又は揮発性物質は、密閉培養容器などの適切な方法で試験しなければならない。

2. 発現時間と突然変異誘発率の測定

曝露期間の終了時に、細胞を洗浄して培養し、変異表現型の発現を可能とする。

各遺伝子座では、新たに誘発された変異体のほぼ最適な表現型の発現を可能とするために必要な最短時間が規定されている。TK遺伝子座については、その時間は2日である(Moore及びClive, 1982年)。発現期間後、選択剤存在下及び非存在下で、それぞれ突然変異体数及びコロニー形成率(突然変異誘発率の算出に使用)を測定するため

細胞を増殖させる。この突然変異体の選択は、TFT 選択 (Moore-Brown ら, 1981 年) 及びソフトアガー法又はマイクロウェルクローニング法 (Moore ら, 2000 年) のいずれかを用いて行うことができる。

ソフトアガー法では、TFT 耐性コロニー数を計測し、コロニー形成率 (PE) で選択するために培養した細胞数を補正することにより、突然変異誘発率 (MF) を決定する。すなわち、 $MF = (\text{変異体数} \cdot \text{播種細胞数}) \times PE$ とする。マイクロウェル法では、ポアソン分布を用いてコロニー形成率 (PE) 及び突然変異誘発率 (MF) を算出する。突然変異体選択プレートと生存率プレートの両方におけるコロニー形成率 (PE) は、以下のように算出する。ポアソン分布のゼロ項から、推定クローン数/ウェル (P) は $-\ln(EW/TW)$ に等しい。ここで、EW = 空のウェル数、TW = 全ウェル数。PE = P/ウェル当たりの播種細胞数。次に、突然変異誘発率を計算する。 $MF = (PE(\text{変異}) / PE(\text{生存})) \times 10^6$ 。

3. 変異体コロニーのサイズ測定

MLA で被験物質が陽性の場合、少なくとも 1 つの試験培養物 (一般に最大許容陽性濃度)、及び陰性対照並びに陽性対照について変異コロニーサイズ測定を実施しなければならない。コロニーサイズ測定は、被験化学物質の点突然変異もしくは染色体事象を引き起こす能力に関する一般的な情報を得るために用いることができる。被験物質が陰性の場合、陰性対照及び陽性対照で変異コロニーのサイズ測定を実施しなくてはならない。大型コロニーが適切に増殖していることを実証するためには、陰性対照のコロニーサイズの測定が必要である。陽性対照が適切なレベルの小型変異コロニーの誘発及び検出を示さなくても、被験物質は陰性と判定できない。

VI. データ及び報告

A. 結果の処理

データには、処理培養物及び対照培養物の細胞毒性及びコロニー形成率の測定、コロニー数及び突然変異誘発率を含める。陽性反応の場合、被験物質の少なくとも 1 濃度 (陽性最高濃度)、陰性対照及び陽性対照で、小型コロニーと大型コロニーの基準を用いて突然変異体コロニーをスコア化する。

大型及び小型両方のコロニー突然変異体の分子及び細胞遺伝学的性質を詳細に調査した (Applegate ら, 1990 年、Hozier ら, 1981 年, 1985 年及び Moore ら, 1985 年)。小型コロニー変異体と大型コロニー変異体は増殖速度によって区別され、そのため大きさの異なるコロニーを形成する。最も広範な遺伝子損傷を受けた変異細胞は、長期の

倍加時間を有するため、小型コロニーを形成する。小型コロニー突然変異体の誘発は、染色体異常を誘発する化学物質と関連している。それほど深刻な影響を受けていない変異細胞は、親細胞と同様の速度で増殖し、大型コロニーを形成する。

RS（測定した場合）、RTG、RSG を提示する。突然変異誘発率は、生存細胞数当たりの変異細胞数で表す。

個々の培養物のデータは、要約データと相互参照できる表形式で示す。さらに、すべてのデータを表形式で要約する。

明確な陽性反応の検証についての要件はないが、確認実験が有用であることが多い。化学物質が陽性であるか陰性であるかを判断するのに十分な情報が得られない実験については、望ましくは試験濃度を変更して追加の試験を行うことにより明らかにすべきである。短時間（3～4 時間）の処理で陰性の結果が得られた場合は、代謝活性化系の非存在下での 24 時間処理を用いる再試験によって確認しなければならない。不確かな結果又は陰性の結果についての追跡試験では、評価した条件の範囲を拡大するための試験パラメータの修正について考慮しなければならない。変更することができる試験パラメータには、濃度間隔及び代謝活性化条件などがある。

B. 結果の評価及び解釈

陽性結果の判定には、濃度と相関する又は再現性がある突然変異誘発率の増加などいくつかの基準がある。米国 EPA MLA 遺伝子毒性作業部会は、公表文献を評価するための基準を作成した。陽性及び陰性（及びその他の反応）に関するこれらの基準は、データを解釈する際のガイダンスとして使用することができる（Mitchell ら, 1997 年）。試験結果の評価の補助として統計学的手法を用いることができる。統計学的有意性は陽性反応の唯一の決定因子であってはならない。結果の生物学的関連性も考慮しなければならない。遺伝毒性試験に関する国際ワークショップの MLA 作業部会は、MLA の判定基準を推奨しており、MLA データの解釈には、全体的な評価係数を統計解析と組み合わせて使用することを推奨している（Moore ら, 2006 年）。

ほとんどの試験は明確に陽性又は陰性の結果を示すが、まれにデータセットから被験物質の活性について明確な判断ができないことがある。このような状況では、化学物質は 2 つ以上の非常に適切に実施された試験で曖昧な結果をもたらす。このような状況では、通常さらなる試験を実施することは有用ではない。このような化学物質は陰性ではなく、境界域の反応とみなすべきである。

MLA 陽性の結果は、使用した培養哺乳類細胞では、被験物質がチミジンキナーゼ遺伝子の発現に影響を与える突然変異を誘発することを示す。再現性がある正の濃度依存性の反応が最も意味がある。陰性の結果は、試験条件下では、被験物質がマウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ遺伝子に影響を与える突然変異を誘発しないことを示している。

なお、*in vivo* の状況には関連しないと考えられる陽性結果が、*in vitro* では pH、浸透圧又は高レベルの細胞毒性の変化から生じる可能性があることに留意されたい (Bruusick, 1986 年、Mitchell ら, 1997 年及び Scott ら, 1991 年)。

VII. 試験報告書

試験報告書には以下の内容を記載すること：

A. 被験物質：

- 既知の場合、識別データ及び CAS 番号；
- 物理的性質及び純度；
- 試験実施に関連する物理化学的性質；
- 「未希釈」サンプル及び溶剤・賦形剤・培地中のサンプルの両方を含む被験物質の安定性。これは処理期間前と処理期間終了時の両方で行う。

B. 溶剤・賦形剤：

- 溶剤・賦形剤の選択の正当性。
- 既知の場合、溶剤・賦形剤中での被験物質の溶解性及び安定性。

C. 細胞：

- 細胞型及び供給源
- 細胞の核型；
- 細胞培養物の数；
- 細胞培養物の維持方法；
- マイコプラズマが存在しない。

D. 試験条件：

- 例えば細胞毒性など、細胞培養物の濃度及び数の選択の理論的根拠
- 利用可能であれば、データ及び溶解度の限界；

- 培地の組成、CO₂濃度；
- 被験物質の濃度；
- 賦形剤及び添加した被験物質の堆積；
- インキュベーション温度；
- インキュベーション時間；
- 処理中の細胞密度；
- 許容基準を含む代謝活性化システムの種類及び組成；
- 陽性及び陰性対照；
- 発現期間の長さ（播種した細胞数、必要に応じて継代培養及び給餌スケジュールを含む）
- 選択物質；
- 検査結果を陽性、陰性又は不確かとみなすための基準
- 生細胞数及び変異細胞数の計数に使用した方法。
- 大きさ及び種類が考えられるコロニーの定義（必要に応じて「小型」及び「大型」コロニーの基準を含む）。

E. 結果：

- 毒性の徴候；
- 沈殿の徴候；
- 測定した場合、被験物質への曝露中の pH 及び浸透圧についてのデータ；
- コロニーサイズ測定（陽性の被験物質の場合）及び陰性対照及び陽性対照の場合
- 可能な場合、用量と反応の関係；
- もしあれば、統計解析；
- 同時陰性（溶媒・賦形剤）及び陽性対照のデータ；
- 既存陰性対照（溶剤・賦形剤）及び陽性対照のデータ、範囲、平均値及び標準偏差；既存対照の根拠となる試験数を併記；
- 突然変異誘発率；
- 細胞培養数及びコロニー数を含む生データ

レッドブック 2000 : IV.C.1.d. 哺乳類 赤血球小核試験 2000 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2000 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.1.d. 哺乳類赤血球小核試験

[レッドブック 2000 の目次に戻る](#)

I. はじめに

小核は、無動原体染色体断片又は染色体が分裂後期に遅延して、細胞分裂時に娘細胞の核内に取り込まれるようになれなかった場合に形成される細胞質のクロマチン含有体である。染色体切断、染色体構造異常、又は紡錘体異常をもたらす遺伝子の損傷は小核形成を引き起こすため、小核の発生率はこれらの種類の損傷の指標となる。基本的に二本鎖染色体切断を引き起こすすべての物質（染色体切断物質）が小核を誘発することが立証されている。小核の計数は染色体異常のスコア化よりはるかに速く技術的な要求が少ないこと、及び小核は 2 種の重要な遺伝子損傷（染色体異常誘発及び紡錘体破壊）から生じることから、小核試験はこれらの種類の損傷を引き起こす化学物質のスクリーニングに広く使用されている。

このガイダンスは、最も広く使用されている *in vivo* 小核試験である哺乳類赤血球小核試験に対応している。この *in vivo* 小核試験は、動物（通常げっ歯類）の骨髄もしくは末梢血細胞から採取した赤血球を分析することにより、赤芽球の染色体又は分裂装置に被験物質によって誘発された損傷を検出するために使用される。

小核試験の目的は、遅延染色体断片又は全染色体を含む小核の形成をもたらす細胞遺伝学的損傷を引き起こす物質を特定することである。

骨髓赤芽球が多染性赤血球に成長すると、主核が押し出され、形成された小核は、他の徐核細胞質内に残存する可能性がある。これらの細胞では、主核がないため、特異的な染色法を用いて小核の視覚化が促進される。投与動物における小核多染性赤血球の頻度の増加は、誘発された染色体損傷の指標である。

II. 定義

セントロメア (動原体) は、細胞分裂中に紡錘体線維が結合する染色体の領域で、娘細胞の極への娘染色体の秩序正しい移動を可能にする。

小核は、細胞の主核とは別の、又はそれに追加される小さな核であり、有糸分裂（減数分裂）の終期に、遅延染色体断片又は全染色体により産生される。

正染性赤血球は、リボソームを持たない成熟赤血球であり、リボソームに選択的な染色を行うことによって、未成熟多染性赤血球と区別することができる。

多染性赤血球は、未成熟赤血球であり、発育の中間段階ではリボソームを含むため、リボソームに選択的に染色することによって、成熟した正染性赤血球と区別することができる。

III. 初期検討事項

この試験では、多染性赤血球が産生されるためげっ歯類の骨髓をルーチンに使用する。末梢血中の小核未成熟（多染性）赤血球の測定は、小核赤血球を脾臓が除去できないことが実証された全動物種、又は構造的もしくは数的染色体異常を引き起こす物質を検出するのに十分な感度を示した全動物種に等しく受け入れられる。小核は、いくつかの基準によって区別することができる。これらには、小核における動原体又はセントロメア DNA の有無の確認などがある。小核未成熟（多染性）赤血球の出現頻度は主要評価項目である。所定数の成熟赤血球中に小核を含む末梢血中の成熟（正染性）赤血球の数も、当該動物種・系統では小核赤血球に対する有意な脾臓による選択は生じないという条件で、検討対象の動物種における赤血球の寿命を超える期間（例えば、マウスでは4週間）連続して動物に投与する場合、試験の評価項目として使用することができる。脾臓による選択が生じた場合は、その結果に十分に対処しなければならない。

この哺乳類の *in vivo* 小核試験は、動物種間、組織間及び遺伝的評価項目間でばらつきがあるものの、*in vivo* 代謝、薬物動態及び DNA 修復過程の要因の考察を可能にするという点で、変異原性の危険性の評価に特に関連している。*in vivo* 試験は、*in vitro* 試験系で検出された変異原性作用の追加検討にも有用である。

被験物質又は反応性代謝物が標的組織に到達しないことを示すエビデンスがある場合、本試験を用いることは適切ではない。

IV. 試験方法の原理

動物は適切な経路で被験物質に曝露させる。骨髄を使用する場合は、投与後適切な時点で動物を屠殺し、骨髄を抽出し、標本を作製して染色する。^{(16),(17),(18),(26),(32),(41)} 末梢血を用いる場合は、投与後適切な時期に採血し、塗抹標本を作製し染色する。

^{(4),(5),(14),(16),(27),(28),(29),(32)} 小核の有無について標本を分析する。

V. 試験方法の説明

A. 調製

1. 動物種を選択

これまでに、この試験にはマウス又はラットが日常的に使用されている。骨髄が採取された組織である場合、あらゆる適切な哺乳類種を使用することができる（上記のセクション III を参照）。他の毒性試験と同様に、適切な動物種を選択の妥当性の根拠を示さなければならない。末梢血を用いる場合はマウスが推奨される。ただし、脾臓が小核赤血球を除去しない種である場合、あるいは構造もしくは数的染色体異常を引き起こす物質を検出するのに十分な感度を有する種である場合は、あらゆる適切な哺乳類種を使用することができる。通常使用されている人工飼育種の若く健康な動物を使用しなければならない。試験開始時、動物の体重変動は最小限であり、各性別の平均体重の±20%を超えてはならない。

2. 飼育及び給餌条件

実験動物の飼育室の温度は、使用する動物種に適した温度とし、マウス及びラットの場合は 22°C (±3°C) とすること。相対湿度は、飼育室の清掃時を除き 30%以上、かつ望ましくは 70%とすることが必要であるが、目標値は 50~60%とする。照明は人工照明とし、12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。給餌には通常の実験食を使用し、飲料水の供給は制限なしとする。食餌の選択は、この経路で投与する場合に被験

物質の適切な混合物を確保する必要性によって影響を受ける場合がある。動物は個別に収容してもよいし、同じ性別の小グループで収容してもよい。

3. 動物の準備

健康で若い成体動物を無作為に対照群と投与群に割り振る。動物は一意的に識別すること。動物は5日間以上実験室条件に馴化させる。ケージは、ケージの設置によって生じる可能性のある影響が最小限になるように配置すること。

4. 投与調製物

固形の被験物質は、細菌の処理前に適切な溶剤又は溶媒に溶解又は懸濁し、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は直接投与するか、投与前に希釈してもよい。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、被験物質の新鮮な調製物を使用すること。

B. 試験条件

1. 溶媒・賦形剤

溶剤・賦形剤は、使用する用量レベルで毒性作用を生じてはならず、被験物質との化学反応が疑われるものであってはならない。一般的に使用されている溶剤・賦形剤以外を使用する場合は、その使用を被験物質及び動物との適合性を示す参考データを用いて裏付けなければならない。適切な場合には、まず水性の溶剤・賦形剤の使用を検討することが推奨される。

2. 対照

げっ歯類を用いて実施される各試験では、通常同時陽性及び陰性（溶剤・賦形剤）対照を雌雄それぞれに含めるべきである。しかし、小核試験がGLPガイドラインに従った一般毒性試験の一部として実施される場合には、化学分析によって適切な用量であることを検証する。このような場合には、陽性対照物質を用いた動物の同時投与は不要であり、現在の実験に含まれていない動物から以前に採取した適切な基準サンプルを組み入れることによって、染色及びスコア化の手順の管理を行うことができる。霊長類やイヌのような高等な動物種を用いた試験では、使用した動物種の陽性対照物質に対する許容できる反応が、試験機関によって既の実証されている場合は、陽性対照を除外してもよい。すべての場合において、同時陰性対照は必須の試験要素である。

被験物質投与群を除き、対照群の動物は投与群の動物と同様に取り扱わなければならない。

陽性対照は *in vivo* において、バックグラウンドを超える検出可能で統計学的に有意な増加をもたらすと予想される曝露レベルで小核を産生する。陽性対照の用量は、作用が明確であるように選択することが必要であるが、コード化されたスライドの識別情報がすぐには読み手に分からないようにしなければならない。陽性対照は被験物質とは異なる投与経路で投与し、1回だけのサンプリングでよい。また可能な場合には、化学物質クラスに関連する陽性対照化学物質の使用も検討してもよい。陽性対照物質の例を以下に示す。

溶媒又は賦形剤のみを投与し、その他の点では投与群と同じ方法で投与した陰性対照動物は、適切な状況下で投与前と投与後の試料を比較することで動物を自身の対照として用いることができる場合を除き、すべての試料採取時点に組み込まなければならない。陰性対照に単回サンプリングを適用する場合、選択したサンプリング時間の妥当性の根拠を示すべきである。また、(a) 試験施設から入手可能なデータ、又は (b) 選択した溶剤・賦形剤により有害作用又は変異原性作用が誘発されないことを示す過去の対照データ又は公表された対照データがない場合は、未投与の対照も使用すべきである。

末梢血を使用する場合、投与前サンプルも同時陰性対照として許容されるが、得られるデータが既存対照に予想される範囲内であり、溶媒効果がないことが実証されている場合は、短期末梢血試験（例えば、1～3回投与）においてのみ許容される。

VI. ラット及びマウスの場合の手順

以下のセクションでは、この試験で最も一般的に使用される動物種であるマウス及びラットの手順に関するガイダンスを示す。

A. 動物の数及び性別

投与群及び対照群には、少なくとも雌雄各5匹の分析可能な動物を含めなければならない。⁽¹²⁾試験実施時に、同じ動物種を用い、同じ曝露経路を用いた試験から、毒性に実質的な性差がないことを示すデータが得られる場合は、片性の試験で十分である。

B. 投与スケジュール

複数の異なる投与スケジュール（すなわち、24 時間間隔で 1、2 回又はそれ以上の投与）が推奨される。延長した投与レジメンから採取したサンプルは、この試験で有効性が実証されている限り、あるいはネガティブスタディの場合は、毒性が実証されているか、限界量（以下の セクション「D」を参照）が使用され、検体採取時点まで投与が継続されている限り、許容される。これは、マウス及びラットに最大亜慢性期間反復曝露すると、従来の急性試験で得られた効果と同程度の効果が得られることを示した試験に基づいている。(1),(2),(8),(11),(19),(21),(22),(23),(25),(29),(37),(38),(44),(48),(50) しかしながら、真の MTD が得られないため、長期投与試験では感受性が低下する懸念があること、あるいは適応性が生じる可能性があることから、現時点ではより長期間の投与を行った場合には、投与期間を試験の感受性が確認されるまで 4 週間に制限すべきであると考えられる。(12)

被験物質は、大量の物質の投与を容易にするため、又は被験物質の血中濃度の変動を最小限にするため、分割投与、すなわち、数時間以下の間隔をあけて同日に 2 回以上投与することもできる。

試験を実施する 2 つの方法は以下の通りである。

- 24 時間以下の間隔をあけて一回又は二回、被験物質を動物に投与する。最終投与後 24 時間から 48 時間以内に、適切なサンプリング間隔で骨髄サンプルを最低 2 回採取する。投与後 24 時間より早い時間でサンプリングする場合は、それが妥当である根拠を示さなければならない。最終投与後 36 時間から 72 時間以内に適切なサンプリング間隔で末梢血検体を少なくとも 2 回採取する。1 回のサンプリング時点で陽性反応が認められた場合、追加のサンプリングは不要である。
- 3 日以上連日投与を行う（例えば、24 時間間隔で 3 日以上投与を行う）場合、骨髄については最終投与後 24 時間以内に、末梢血については最終投与後 40 時間以内にサンプルを採取することができる。(12),(20)

関連性があり科学的に妥当であれば、追加のサンプリング時間を使用してもよい。

C. 用量レベル

利用できる適切なデータがないため用量設定試験を実施する場合は、同じ試験室で、主試験で使用するものと同じ動物種、系統、性別及び投与レジメンを用いて実施しなければならない。(7)毒性が認められる場合は、最初のサンプリング時に 3 つの用量レベルを使用する。これらの用量レベルは、明らかな毒性から毒性がほとんど又は全く

ないまでの範囲を網羅しなければならない。後のサンプリング時には、最高用量のみを使用する必要がある。最高用量は、同じ投与レジメンに基づくと、より高い用量レベルでは致死性が生じると予想されるような毒性徴候をもたらす用量と定義する。低い非毒性用量で特定の生物学的活性を有する物質（ホルモン、ミトジェン等）は、用量設定基準の例外となる場合があり、ケースバイケースで評価しなければならない。最高用量は、骨髄毒性（例えば、骨髄又は末梢血中の全赤血球中の未成熟赤血球の割合の減少）の何らかの徴候を生じる用量と定義されることもある。

D. 限度試験

2000 mg/kg 体重以上の用量レベルの単回投与又は同日に 2 回の投与で観察可能な毒性作用が認められない場合、さらには遺伝毒性が構造的に関連する物質からのデータに基づいて予測されない場合は、3 用量レベルを用いる完全な試験は必要ないと考えられる。より長期の試験の場合、限度用量は、14 日間までは 2000 mg/kg 体重/日、14 日間より長期間では 1000 mg/kg 体重/日とする。予測されるヒトでの曝露は、さらに高い用量レベルを限度試験で使用する必要性を示す可能性がある。

E. 投与

被験物質は通常、胃管又は適切な挿管カニューレを用いて強制経口投与するか、腹腔内投与する。正当な理由があれば、他の曝露経路も許容される。1 回の強制経口投与又は注射によって投与できる液体の最大量は、試験動物の大きさに依存する。容量は体重 100g 当たり 2 mL を超えてはならない。これらより多い量を使用する場合は、それが妥当である根拠を示さなければならない。通常、高濃度になると悪化した影響が明らかになる刺激性又は腐食性物質を除き、すべての用量レベルで一定の体積が得られるように濃度を調節して試験体積の変動を最小限に抑えるべきである。

F. 骨髄・血液の標本

骨髄細胞は通常、屠殺直後に大腿骨又は脛骨から採取する。通常、細胞を大腿骨又は脛骨から取り出し、規定された方法で調製及び染色する。末梢血は尾静脈又はその他の適切な血管から採取する。血液細胞を直ちに超生体染色する^{(4),(5),(14)}、塗抹標本作製して染色する。DNA 特異的染色法（例えば、アクリジンオレンジ⁽¹⁵⁾又はヘキスト 33258+ピロニン Y⁽³⁰⁾）を用いると、非 DNA 特異的染色法に関連する人工物を除去することができる。この利点によって、従来の染色剤（例えば、ギムザ）の使用は除外されない。また、試験室で小核標本に適切に作用することが示されている場合は、追

加の試験系（例えば、有核細胞を除去するセルロースカラム⁽³⁶⁾）も使用することができる。

G. 解析

骨髄では合計 200 個以上の赤血球を、末梢血では合計 1000 個の赤血球を計数することにより、各動物の全（未成熟+成熟）赤血球中の未成熟赤血球の割合を求める。⁽⁹⁾顕微鏡分析前に、陽性及び陰性対照のスライドを含むすべてのスライドを個別にコード化する。小核未成熟赤血球の発現について、動物当たり少なくとも 2000 個の未成熟赤血球をスコア化する。小核について成熟赤血球をスコア化することにより、追加情報を得ることができる。スライドを解析する場合、全赤血球に対する未成熟赤血球の割合が対照値の 20%以上でなければならない。動物に 4 週間以上連続して投与する場合、小核の発現について各動物に少なくとも 2000 個の成熟赤血球もスコア化することができる。自動分析システム（細胞懸濁液の画像分析又はフローサイトメトリ分析）は、古典的な顕微鏡による採点に関連して適切に正当化され、妥当性が確認されている場合には、手動評価の代替として許容される。⁽¹²⁾

VII. ラット及びマウス以外の動物種に関する手順

マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌ、非ヒト霊長類及びヒトを対象とした試験^{(3),(6),(18),(28),(31),(32),(39),(40),(45)}に基づいて公表された情報によると、小核赤血球の自然発現頻度と誘発頻度はほとんどの哺乳類で類似しており、これまでに試験した動物種における染色体損傷又は紡錘体損傷の評価には、骨髄中の小核未成熟赤血球の発現率の測定が適切であることが示唆される。骨髄における小核赤血球の出現及び消失は、各動物種の赤血球産生動態及び赤血球寿命の関数であるため、各動物種の赤血球動態の適切なパラメータに従って投与方法及びサンプリングレジメンを修正しなければならない。適切な場合、マウス又はラット以外の動物種を使用してもよいが、以下の情報を含めなければならない。

- 選択した動物種の妥当性、並びに使用した動物種における赤血球産生動態及び赤血球寿命に関連して使用した投与及びサンプリングスケジュール；
- 自然発生小核頻度が、公表されている情報と一致していること、もしくは試験を実施する試験室内で一致していることを示すエビデンス；
- 既知の遺伝毒性物質が使用された動物種において小核頻度の増加を生じることを示すエビデンス、及び誘発された反応の程度の基準値；
- 末梢血からの小核細胞の脾臓による選択的除去の影響（末梢血が監視対象組織となる場合）。

VIII. データ及び報告

A. 処理の結果

個々の動物データを表形式で示すこと。実験単位は動物である。スコア化した未成熟赤血球の数、小核未成熟赤血球の数及び全赤血球中の未成熟赤血球の数を分析した動物ごとに個別に記載しなければならない。4週間以上連続して投与する場合、成熟赤血球のデータを収集するならば併せて記載すること。全赤血球中の未成熟赤血球の割合、及び該当すると考える場合小核成熟赤血球の割合を動物ごとに示すこと。反応に性差があるというエビデンスがない場合は、統計解析に雌雄両方のデータを融合してもよい。

B. 結果の評価及び解釈

陽性結果の判定には、小核細胞数の用量依存的増加、又は1回のサンプリング時点での単回投与群の小核細胞数の明らかな増加など、いくつかの基準がある。試験結果の評価には統計学的手法を用いる。^{(24),(35)}陽性、陰性又は不確かな結果の統計学基準は、試験実施計画書に明確に記載しなければならない。生物学的因子によって解釈が変わる可能性があるため、統計学的有意性が結論を出す唯一の決定因子であってはならない。不確かな結果は、必要に応じて実験条件を修正し、追加試験により明らかにする必要がある。

ほとんどの実験は明確に陽性又は陰性の結果を示すが、まれにデータセットから被験物質の活性について明確な判断ができないことがある。実験の反復回数にかかわらず、結果が依然曖昧あるいは疑わしい場合がある。

小核試験で陽性の結果から、被験物質が、被験動物種の赤芽球における染色体損傷又は有糸分裂装置の損傷の結果である小核を誘発することが示唆される。陰性の結果は、試験条件下で被験物質が、試験動物種の未成熟赤血球に小核形成をもたらす染色体や紡錘体の損傷を引き起こさないことを示している。

被験物質又はその代謝物が全身循環血中に到達する可能性、特に標的組織に到達する可能性（例えば、全身毒性）について考察しなければならない。陰性の小核試験における標的組織への適切な曝露を実証することは、他の1つ以上の試験系で遺伝毒性の陽性エビデンスがある場合に特に重要な考慮事項である。

C. 試験報告書

試験報告書には以下の内容も記載すること：

1. 被験物質

- 既知の場合、識別データ及び CAS 番号
- 物理的性質及び純度
- 試験実施に関連する物理化学的性質
- 既知の場合、被験物質の安定性

2. 溶媒・賦形剤

- 賦形剤の選択の正当性
- 既知の場合、溶剤・賦形剤中での被験物質の溶解性及び安定性

3. 投与液

- 投与液を調製して使用した時間（又は調製から使用までの時間）及び保存条件
- 入手可能な場合、投与液の濃度を検証するデータ。

4. 試験動物

- 使用する動物種・系統、理論的根拠を含む
- 動物の数、年齢、性別
- 供給元、飼育条件、食餌など
- 試験開始時の動物の個体別体重、各群の体重範囲、平均値及び標準偏差を含む
- 該当する場合、脾臓による選択が末梢血中の小核細胞の発現率に及ぼす潜在的影響に関する情報

5. 試験条件

- 陽性及び陰性（賦形剤・溶媒）対照データ
- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 用量レベル選択の理論的根拠
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路及び投与方法の理論的根拠
- 該当する場合、被験物質が全身循環もしくは標的組織に到達したことを確認する方法

- 該当する場合、飼料・飲料水の被験物質濃度（ppm）から実投与量（mg/kg 体重/日）への換算
- 飼料及び水の質の詳細
- 投与及びサンプリングスケジュールの詳細な説明
- スライドの作製方法
- 毒性の測定方法
- 小核未成熟赤血球スコア化基準（適宜該当する場合には、成熟赤血球スコア化基準）
- 動物 1 匹当たりの分析細胞数
- 試験を陽性、陰性又は不確かと考えるための基準。

6. 結果

- 毒性の徴候
- 全赤血球に対する未成熟赤血球の割合
- 全幼未成熟赤血球のうち小核を有する未成熟赤血球の数、動物ごとに個別に示す
- 適宜該当する場合、全未成熟赤血球のうち小核未成熟赤血球の数、動物ごとに個別に示す
- 小核未成熟赤血球、及び該当する場合、各群の成熟赤血球数の平均値 ± 標準偏差
- 可能な場合、用量反応関係
- 統計解析及び適用した方法の根拠、適切な文献引用を含む
- 同時及び既存陰性対照データ
- 同時及び既存陽性対照データ

7. 結果の考察

8. 結論

XI. 補遺:無動原体断片由来の小核の特定と セントロメア染色体由来の小核の特定

小核は、有糸分裂中の無動原体断片又は全染色体によって形成される。後者の小核は、Cバンド法⁽⁴⁷⁾又はDNA含量の測定により、最初に大きなサイズ⁽⁴⁹⁾で認められた。⁽⁴⁶⁾しかし、これらの方法は信頼性がさほど高くなかった。したがって、小核におけるセントロメアの存在を確認し、それによって染色体異常誘発性と異数性誘発性の

小核を区別するため、2つの分子細胞遺伝学的方法、すなわち 1) 免疫蛍光 CREST 染色法及び 2) 汎セントロメア DNA プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法が開発された。⁽¹²⁾小核における動原体又はセントロメアの有無を明らかにすることが機序的に重要な場合は、これらの方法を適用することができる。

骨髓小核試験に適用される CREST 法は、Miller 及び Adler によって詳細に説明されている。⁽³³⁾スライド上の細胞 (通常の骨髓塗抹標本) を固定、脱水し、SDS 及び Triton-X とともに二段階でインキュベートした後、抗体で染色する。DNA はヘキスト 33258 で対比染色される。

FISH では、セントロメア領域が存在する場合、セントロメア⁽⁴³⁾に近接してハイブリダイズするマイナーサテライト DNA-プローブを使用してセントロメア領域を特定する。セントロメア DNA プローブを用いた FISH 法は、Pinkel ら⁽³⁴⁾により報告されている。この方法は、流動選別小核含有赤血球⁽¹⁰⁾、又は末梢血検体から得た単離小核に適用することができる。⁽¹³⁾

対照スライドでは、セントロメア領域を含む標識化された小核の割合は約 50%である。⁽⁴³⁾ 既知の異数性誘発物質 (コルヒチン及びビンブラスチン) により誘発される小核の約 70%は標識されているが⁽³³⁾、染色体異常誘発物質 (ヒドロキノン及びマイトマイシン C) により誘発される小核は 5~15%しか標識されていない。⁽³³⁾ 化学物質の染色体異常誘発性と異数性誘発活性の相対的特性を明らかにするために、セントロメア領域を含む多染性赤血球 1000 個当たりの小核多染性赤血球の数を指標として用いることが有用である。⁽⁴²⁾

これまでに報告されている FISH 法の主な欠点は、正染性赤血球と多染性赤血球を区別しないことである。⁽¹²⁾したがって、存在する小核の大部分が被験物質によって誘発される標本のみが分析に適している。例えば、標的細胞集団 (未成熟赤血球) はサンプル中の赤血球の 3~5%にすぎないため、成熟動物で急性曝露させた実験で採取した末梢血サンプルは、本質的に分析に適さない。

結論として、確実に適切なサンプルを分析に使用することに注意を払えば、CREST 又は FISH 標識化は、*in vivo* 小核試験において化学物質の異数性誘発特性を検出する信頼できる方法と考えられる。⁽¹²⁾ しかし、現行の方法は複雑であるため、化学物質が紡錘体障害を引き起こすことが疑われる場合 (例えば、大きな小核の存在、倍数性の誘発など)、又はこの機序的情報を得るため他に明確な理由がある場合には、それらの使用が制限される。

レッドブック 2000 : IV.C.3.a. げっ歯類を用いた短期毒性試験

2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.3.a げっ歯類を用いた短期毒性試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

げっ歯類を用いた短期毒性試験は、一般的に 14 又は 28 日間（1 ヶ月間）実施される。これらの試験の結果は、（1）将来の亜慢性又は慢性毒性試験における被験物質の適切な用量の予測に役立つ可能性があり、（2）一部の毒性評価項目の NOEL の決定に利用でき、（3）将来のげっ歯類を用いる試験を、特定された標的臓器に特に重点を置いてデザインすることを可能にする。非げっ歯類を用いた短期毒性試験についてのガイドラインについては IV.C.3b. で考察する。申請及び届出の試験依頼人及び提出人は、毒性試験の結果報告に関するガイダンス（第 IV 章 B.2.）、毒性試験における病理

学的考察（第 IV 章 B.3.）、及び毒性試験における統計学的考察（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブック II」1993 年版草案に対する科学的に妥当な変更は、他の権威あるガイドライン及び公表文献を参考に行われている¹⁻⁸。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH 出版物 85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁸、及び DHEW 出版物 no.78-23 に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。

B. げっ歯類の種、系統及び性別の選択:

これらのガイドラインは、げっ歯類（通常はラット）を用いる試験に関するものであり、他の動物種を使用する場合は、これらのガイドラインの修正が必要となる場合がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いるげっ歯類の種、系統及び亜系を選択する際には、毒性化学物質に対する試験動物の一般的な感受性、及び試験動物の特定の臓器及び組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験におけるげっ歯類の近交系、非近交系、又はハイブリッド系統は、答えるべき科学的疑問に基づいて選択しなければならない。さらに、試験動物は、特性が十分に明らかにされており、かつ健康なコロニーに由来するものであることが重要である。FDA は申請人及び届出人に、特定の種、系統又は亜系の適切性について疑問がある場合、毒性試験の開始前に当局の科学者に相談することを推奨している。

C. 年齢:

試験は、若い動物を用いて、離乳後はできるだけ早く投与を開始するが、6～8週齢までとし、5日間以上の馴化期間後に実施しなければならない。

D. 数及び性別：

試験には、それぞれの種及び系統について同数の雄と雌を使用しなければならない。30日間以下の短期毒性試験では、実験群及び対照群のげっ歯類は1群当たり雌雄各10匹以上とする。試験終了まで生存する動物数は、毒性作用の意味のある評価を可能にするのに十分な数でなければならない。

E. 感染した動物：

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化するべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

1ケージに1匹ずつ収容すること（単独飼育）。この勧告は、以下の3つの主要な懸案事項を反映している：

- 1ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

一般に、毒性試験では、げっ歯類に飼料及び水を定期的に摂取させ、これらの試験の食餌は、正常な成長及び生殖に関する動物種の栄養要求量^{4,7}を満たす必要がある。そ

れ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。そのため、一部の高用量群の動物は予想よりも高用量の被験物質を投与される場合がある。なぜなら、このような希釈された食餌を不断的に与えた動物は、高用量飼料のエネルギー及び栄養素含有量の差を補うために、他の投与群の動物よりも多量に摂取する可能性があるからである。このような状況から、観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、これらの動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要となる。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同性でほぼ同じ大きさの同腹仔の離乳ラットのペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察された実験結果への影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを確認するため、試験には不断給餌された第2の対照群の動物を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期及び亜慢性毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

関連する問題については、「レッドブック II」1993年版草案の第IV章B.5.の「毒性試験のための食餌の項」で考察する。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に組み入れなければならないが、試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、数日間かけて動物を試験に組み入れてもよい。後者の推奨に従っている場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できないし、試験を繰り返す原因となり得る。例えば、通常の下では、対照群の死亡率は10%を超えてはならない。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超えると、再試験が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同じの物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が類似したロットを用いること。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件：

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間：

動物は、試験期間中週に7日被験物質に曝露する（2～4週連続）。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂餌することができないようにすること。化合物を粉碎した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料1kg当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **飲料水に溶解**、被験物質が液体の形態（例えば、清涼飲料、ビールなど）で摂取される場合や、その他の理由により混餌投与が不適当な場合。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水1mL当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の2つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。げっ歯類の場合、通常、投与容量は体重100g当たり1mLを超えてはならない。強制経口投与した賦形剤がオイルの場合（「レッドブックII」1993年版草案の第IV章B.5.b.を参照）、投与容量は体重100g当たり0.4mL以下とし、低脂肪食の使用を検討すべきである。被験物質の分割投与が必要な場合は、すべての投与を6時間以内に行わなければならない。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤1mL中の被験物質の重量（mg）で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験化

合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

性別ごとに最低でも 3 用量レベルの被験物質を使用すべきであるが、被験物質は 4 又は 5 用量レベルが望ましい。同時対照群を設定すること。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。

毒性試験には、少なくとも 3 用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び 3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するのに十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報は、対飼養に関する説明を含むが、上記のセクション「II 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記のセクション「II 試験動物、H.食餌」の追加情報を参照。）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準の原則に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。⁹

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理学的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも1日1~2回、通常のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常6時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理学的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体的な情報は、第IV章C.10.に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第IV章C.10.）は、年齢に適したものであり、投与開始前に少なくとも1回、及び投与中は定期的に、全動物に対して実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）の変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な旋回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理学的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

試験動物の体重は少なくとも週1回測定すること。短期毒性試験では1週間ごとに摂餌量（又は被験物質を飲水投与する場合は飲水量）を測定しなければならない。ま

た、申請人及び届出人は、試験動物による飼料の漏出量を定量化するように努め、試験飼料の漏出量が対照飼料より多いかどうかを判断しなければならない。飼料漏出に関する適切な考察を試験報告書に含めること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロファイル、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科検査**： この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。
2. **血液学的検査**： げっ歯類では、1群当たり雌雄各10匹の動物を用いて血液学的検査を実施する。試験動物のサンプリングは、試験の最初の2週間（投与期間中）及び試験終了時に行う。最初のサンプリング時点は、臓器系に対する最初の毒性学的影響が予想される時点に基づいて決定する。理想的には、試験中及び終了時に同一の動物からサンプルを採取すべきである。各採血日のほぼ同時刻に血液を採取し、血液サンプルは個々に分析し、プールしてはならない。
 1. 以下の測定が推奨される。
 1. ヘマトクリット
 2. ヘモグロビン濃度
 3. 赤血球数
 4. 全白血球数及び白血球分画
 5. 平均赤血球ヘモグロビン量
 6. 平均赤血球容積
 7. 平均赤血球ヘモグロビン濃度
 8. 及び凝固能の測定値（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数など）。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査**：理想的には、各採取時点で同じ動物からサンプリングしなくてはならない。げっ歯類では、1群当たり雌雄各10匹の動物を用いて臨床化学的検査を実施する。試験動物のサンプリングは、試験の最初の2週間（投与期間中）及び試験終了時に行う。最初のサンプリング時点は、臓器系に対する最初の毒性学的影響が予想される時点に基づいて決定する。血液サンプルは絶食時間終了時かつ給餌前に採取する。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。各採血日のほぼ同時刻に血液を採取し、血液サンプルは個々に分析し、プールしてはならない。

すべての被験物質に適した臨床化学的検査には、電解質バランス、糖代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）
 2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（SGOT、ALT）
 3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ
 4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
 5. 総胆汁酸
2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アルカリホスファターゼ
 2. ビリルビン（総ビリルビン）
 3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
 4. 5'ヌクレオチダーゼ
 5. 総胆汁酸
3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー
 1. アルブミン
 2. カルシウム
 3. 塩化物
 4. コレステロール（総コレステロール）
 5. コリンエステラーゼ
 6. クレアチニン
 7. グロブリン（計算値）
 8. グルコース（絶食下）
 9. リン
 10. カリウム
 11. タンパク質（総タンパク質）

12. ナトリウム
 13. トリグリセリド（絶食下）
 14. 尿素窒素
4. しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDA は、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。

1. アラニンアミノトランスフェラーゼ
2. アルカリホスファターゼ
3. 塩化物
4. クレアチニン
5. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
6. グルコース（絶食下）
7. カリウム
8. タンパク質（総タンパク質）
9. ナトリウム
10. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果にかなりの変動が認められることは珍しくない¹⁰。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：試験の最後の週に、定時尿量採取を行う。げっ歯類では、1群当たり雌雄各10匹の動物を用いてこれらの検査を実施する。採取した尿の量、比

重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う¹¹。

5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、げっ歯類（ラットが望ましい）を用いたすべての短期毒性試験において定期的実施しなければならない。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下の VI.C.顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）、及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能的バッテリー。この機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、セクション V 章 A. でより詳細に説明する。本章及び第 IV 章 C .10.の試験動物の観察。神経毒性試験。

短期毒性試験報告書には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めるべきである。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えられるかどうかについて明確に述べる必要がある。FDA は、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：免疫毒性の主要な指標のリスト（「レッドブック II」1993 年版草稿の第 V 章 C.を参照）に記載されている検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価しなければならない。短期毒性試験の報告には、被験物質が免疫系に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、必要に応じて、免疫毒性スクリーニングに含まれる主要な指標のリストのデータ及び試験のその他の毒性データを評価しなければならない。この評価に基づき、申請人及び届出人は、被験物質がさらなる免疫毒性試験を必要とする潜在的な免疫毒性の危険性を示すか否かについて明確に記述しなければならない。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993 年版草案 の第 V 章 C.で考察されているが、まず当局に相談して実施しなければならない。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を 10%緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

1. 副腎
2. 大動脈
3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる 3 以上のレベル）
6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. ハーダー腺
15. 心臓
16. 回腸
17. 空腸
18. 腎臓
19. 肝臓

20. 肺（主気管支を伴う）
21. リンパ節（投与経路関連が1つ、遠隔部位由来が1つ）
22. 乳腺
23. 鼻甲介
24. 卵巣及び卵管
25. 膵臓
26. 下垂体
27. 前立腺
28. 直腸
29. 唾液腺
30. 坐骨神経
31. 精囊
32. 骨格筋
33. 皮膚
34. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
35. 脾臓
36. 胃
37. 精巢
38. 胸腺（又は胸腺領域）
39. 甲状腺・副甲状腺
40. 気管
41. 膀胱
42. 膣
43. ジンバル腺
44. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（第 V 章 C.参照）に記載されているように、全動物に実施しなければならない。

レッドブック 2000 : IV.C.3.b. 非げっ 歯類を用いた短期毒性試験 2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.3.b. 非げっ歯類を用いた短期毒性試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

非げっ歯類（通常、イヌ）を用いた短期毒性試験は、一般的に 14 又は 28 日間（1 カ月間）実施される。これらの試験の結果は、（1）将来の亜慢性又は慢性毒性試験における被験物質の適切な用量の予測に役立つ可能性があり、（2）一部の毒性評価項目の NOEL の決定に利用でき、（3）特定された標的臓器に特に重点を置き、将来のげっ歯類及び非げっ歯類を用いた試験をデザインすることを可能にする。げっ歯類を用いた短期毒性試験についてのガイドラインについては IV.C.3a で考察する。申請書・届出

書の試験依頼人及び提出人は、毒性試験の結果報告に関するガイダンス（第 IV 章 B.2.）、毒性試験における病理学的考察（第 IV 章 B.3.）、及び毒性試験における統計学的考察（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブック II」1993 年版草案に対する科学的に妥当な変更は、以下のように他の権威あるガイドライン及び公表文献を参考に行われている¹⁻⁷。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH 出版物 85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁷、及び DHEW 出版物 no.78-23 に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。

B. 動物種、系統及び性別の選択:

これらのガイドラインは非げっ歯類（通常はイヌ）を用いた試験に関するものであり、他の動物種を使用する場合は、本ガイドラインの修正が必要となる場合がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いる動物種及び系統を選択する際には、試験動物の一般的感受性、並びに試験動物の特定の臓器及び組織の毒性化学物質に対する反応性を考慮することが重要である。試験動物は、推奨される試験期間に生存する可能性が高い動物を選択すべきである。試験動物は、特性が十分に明らかにされた健康なコロニー由来であることが重要である。FDA は、申請人及び届出人に、特定の種又は系統の適切性について疑問がある場合、毒性試験の開始前に当局の科学者に相談することを推奨している。

C. 年齢:

試験は、若い動物を用いて、離乳後のできるだけ早期に投与を開始し、5日間以上の馴化期間後に実施しなければならない。イヌが月齢4~6ヵ月以下の時に検査を開始する。

D. 数及び性別:

試験には、それぞれの種及び系統について同数の雄と雌を使用しなければならない。30日間以下の短期毒性試験では、実験群及び対照群のイヌは各群雌雄4匹以上とする。試験をイヌの長期試験の適切な用量を決定するために使用するが、被験物質のNOELを決定するために使用しない場合には、実験群及び対照群は1群当たり雌雄各2匹とする。試験終了まで生存する動物数は、毒性作用の意味のある評価を可能にするのに十分な数でなければならない。

E. 感染した動物:

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化すべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

動物は1ケージに1匹ずつ収容すること（単独飼育）。この勧告は、以下の3つの主要な懸案事項を反映している：

- 1ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

短期試験用の食餌は、正常な成長及び生殖に対する動物種の栄養要求量³⁻⁶を満たす必要がある。一般に、水は不断摂取とする。それ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要である。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同じ性別、年齢でほぼ同じ大きさの動物のペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察された実験結果に対する影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを保証するために、試験には、通常の食餌量を給餌した第2の対照群の動物群を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には、飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

FDA は、非げっ歯類（例えば、ウサギ）に不断的に給餌する場合、IV.C.3.a.の食餌のセクションを見直すことを推奨している。関連する問題については、「レッドブック II」1993年版草案の第IV章B.5.の「毒性試験のための食餌の項」で考察する。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に供さなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できないし、試験を繰り返す原因となり得る。

K. 自己融解：

自己融解によって組織もしくは臓器が試験に支障をきたさないよう、適切な動物の飼育管理を行うこと。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同じの物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が類似したロットを用いること。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件：

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間：

動物は、試験期間中週に7日被験物質に曝露する（2～4週連続）。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂餌することができないようにすること。化合物を粉砕した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料1kg当たりの被験物の重量（mg）で表す。
- **飲料水に溶解**、被験物質が液体の形態（例えば、清涼飲料、ビールなど）で摂取される場合や、その他の理由により混餌投与が不適当な場合。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水1mL当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の2つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤1mL中の被験物質の重量（mg）で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験化合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。（「レッドブックII」1993年版草案の第IV章B.5.「追加情報」を参照）

C. 用量群：

性別ごとに最低でも 3 用量レベルの被験物質を使用すべきであるが、被験物質は 4 又は 5 用量レベルが望ましい。同時対照群を設定すること。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。

毒性試験には、少なくとも 3 用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び 3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するのに十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報は、対飼養に関する説明を含むが、上記のセクション「II 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記のセクション「II 試験動物、H.食餌」の追加情報を参照。）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。⁸

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも1日1~2回、通常のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常6時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体的な情報は、第IV章C.10.に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第IV章C.10）は、年齢に適しており、投与開始前に少なくとも1回、及び投与中は定期的に、全動物に実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）のエビデンスの変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な旋回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

試験動物の体重は少なくとも週1回測定すること。短期毒性試験では1週間ごとに摂餌量（又は被験物質を飲水投与する場合は飲水量）を測定しなければならない。また、申請人及び届出人は、試験動物による飼料の漏出量を定量化するように努め、試験飼料の漏出量が対照飼料より多いかどうかを判断しなければならない。飼料漏出に関する適切な考察を試験報告書に含めること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロフィール、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科検査**： この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。
2. **血液学的検査**： 非げっ歯類（イヌ、ミニブタなど）については、群ごとに各性別のすべての動物に血液学的検査を実施しなければならない。試験動物のサンプリングは、投与開始前、試験の最初の2週間（投与期間中）及び試験終了時に行う。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。血液は各採血日のほぼ同時刻に採取し、血液サンプルは個々に分析し、プールしてはならない。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査**： 非げっ歯類（イヌ、ミニブタなど）については、群ごとに各性別のすべての動物に血液学的検査を実施しなければならない。試験動物のサンプリングは、投与開始前、試験の最初の2週間（投与期間中）及び試験終了時に行う。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。血液サンプルは絶食時間終了時かつ給餌前に採取する。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。各採血日のほぼ同時刻に血液を採取し、血液サンプルは個々に分析し、プールしてはならない。

すべての被験物質に適した臨床化学的検査には、電解質バランス、糖代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）
 2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（SGOT、ALT）
 3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ

4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
 5. 総胆汁酸
2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アルカリホスファターゼ
 2. ビリルビン（総ビリルビン）
 3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
 4. 5'ヌクレオチダーゼ
 5. 総胆汁酸
 3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー
 1. アルブミン
 2. カルシウム
 3. 塩化物
 4. コレステロール（総コレステロール）
 5. コリンエステラーゼ
 6. クレアチニン
 7. グロブリン（計算値）
 8. グルコース（絶食下）
 9. リン
 10. カリウム
 11. タンパク質（総タンパク質）
 12. ナトリウム
 13. トリグリセリド（絶食下）
 14. 尿素窒素
 4. しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDAは、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ
 2. アルカリホスファターゼ
 3. 塩化物
 4. クレアチニン
 5. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
 6. グルコース（絶食下）
 7. カリウム

8. タンパク質（総タンパク質）
9. ナトリウム
10. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果に大きな変動が認められることは珍しいことではない⁹。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：試験の最後の週に、定時尿量採取を行う。非げっ歯類については、試験の全動物について試験を実施しなければならない。採取した尿の量、比重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う。¹⁰
5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、非げっ歯類（イヌ又はミニブタが望ましい）を用いたすべての短期毒性試験において定期的に行う必要がある。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下のVI.C.顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）、及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能的バッテリー。この機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、この章及び第IV章C.10.のセクションV.A.試験動物の観察でより詳細に説明する。神経毒性試験。

短期毒性試験報告書には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めるべきである。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えられるかどうかについて明確に述べる必要がある。FDAは、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：免疫毒性の主要な指標のリスト（「レッドブック II」1993年版草稿の第V章C.を参照）に記載されている検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価しなければならない。短期毒性試験の報告には、被験物質が免疫系に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、必要に応じて、免疫毒性スクリーニングに含まれる主要な指標のリストのデータ及び試験のその他の毒性データを評価しなければならない。この評価に基づき、申請人届出人は、被験物質がさらなる免疫毒性試験を必要とする潜在的な免疫毒性の危険性を示すか否かについて明確に記述しなければならない。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993年版草案の第V章C.で考察されているが、まず当局に相談して実施すべきである。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を10%緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

1. 副腎
2. 大動脈
3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる3以上のレベル）

6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. ハーダー腺
15. 心臓
16. 回腸
17. 空腸
18. 腎臓
19. 肝臓
20. 肺（主気管支を伴う）
21. リンパ節（投与経路関連が1つ、遠隔部位由来が1つ）
22. 乳腺
23. 鼻甲介
24. 卵巣及び卵管
25. 膵臓
26. 下垂体
27. 前立腺
28. 直腸
29. 唾液腺
30. 坐骨神経
31. 精嚢（存在する場合）
32. 骨格筋
33. 皮膚
34. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
35. 脾臓
36. 胃
37. 精巣
38. 胸腺（又は胸腺領域）
39. 甲状腺・副甲状腺
40. 気管
41. 膀胱

42. 膣

43. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（「レッドブック II」1993年版草案の第 V 章 C.参照）に記載されているように、全動物に実施しなければならない。

レッドブック 2000 : IV.C.4.a. げっ歯 類を用いた亜慢性毒性試験 2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.4.a. げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

げっ歯類を用いる亜慢性毒性試験は、一般的に 90 日間（3 ヶ月間）で実施されるが、最長 12 ヶ月実施される場合もある。これらの試験の結果は、（1）将来の慢性毒性試験における被験物質の適切な用量の予測に役立つ可能性があり、（2）一部の毒性評価項目の NOEL の決定に利用でき、（3）特定された標的臓器に特に重点を置き、将来のげっ歯類及び非げっ歯類を用いた試験をデザインすることを可能にする。通常、亜慢性毒性試験では、被験物質のがん原性を判定することはできない。非げっ歯類を用

いる亜慢性毒性試験に固有のガイダンスを第 IV 章 C.4.b.に示す。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は、毒性試験の結果報告に関するガイダンス（第 IV 章 B.2.）、毒性試験における病理学的考察（第 IV 章 B.3.）、及び毒性試験における統計学的考察（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブック II」1993 年版草案に対する科学的に妥当な変更は、以下のように他の権威あるガイドライン及び公表文献を参考に行われている¹⁻⁸。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH 出版物 85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁸、及び DHEW 出版物 no.78-23 に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。

B. 動物種、系統及び性別の選択:

これらのガイドラインは、げっ歯類（通常はラット）を用いる試験に関するものであり、他の動物種を使用する場合は、これらのガイドラインの修正が必要となる場合がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いるげっ歯類の種、系統及び亜系を選択する際には、毒性化学物質に対する試験動物の一般的な感受性、及び試験動物の特定の臓器及び組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験におけるげっ歯類の近交系、非近交系、又はハイブリッド系統の選択は、答えを出さなければならない科学的疑問に基づかなければならない。さらに、試験動物は、特性が十分に明らかにされており、かつ健康なコロニーに由来するものであることが重要である。最近の情報から、ラットの一部の系統には生存性の問題が存在することが示唆されるため、推奨試験期間生存する可能性が高い試験動物を選択すべきである。FDA は申請人及び届出人に、特定の種、系統又は亜系

の適切性について疑問がある場合、毒性試験の開始前に当局の科学者に相談することを推奨している。

C. 年齢:

試験は、若い動物を用いて、離乳後はできるだけ早く投与を開始するが、5日間以上の馴化期間後とし、さらにげっ歯類の場合は6~8週齢までに実施しなければならない。

D. 数及び性別:

試験には、それぞれの種及び系統について同数の雄と雌を使用すべきである。一般的に、亜慢性毒性試験の場合、実験群及び対照群は、げっ歯類の場合1群当たり雌雄各20匹以上とすべきである。試験が事実上用量反応試験とみなされる場合、あるいはより長期の試験が予測される場合は、げっ歯類を用いる亜慢性試験に、10匹/性/群のげっ歯類が容認されることがある。これらの勧告は、確実に試験終了時の生存動物数が毒性学的影響の有意の評価を可能にするのに十分な数であるようにする上で役立つ。

中間剖検が予定されている場合は、1群当たりの雌雄毎の動物数を、試験終了前に屠殺する予定の動物の数だけ増やさなければならない。げっ歯類の場合、中間剖検には1群当たり雌雄各10匹以上の動物が必要である。

E. 感染した動物:

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化すべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

1ケージに1匹ずつ収容すること（単独飼育）。この勧告は、以下の3つの主要な懸案事項を反映している：

- 1 ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

一般に、毒性試験に用いる動物には飼料及び水を不断的に与え、これらの試験に用いる食餌は、正常な成長及び生殖に関する種の栄養要求量⁴⁷を満たす必要がある。それ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。そのため、一部の高用量群の動物は予想よりも高用量の被験物質を投与される場合がある。なぜなら、このような希釈された食餌を不断的に与えた動物は、高用量飼料のエネルギー及び栄養素含有量の差を補うために、他の投与群の動物よりも多量に摂取する可能性があるからである。このような状況から、観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、これらの動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要となる。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同性でほぼ同じ大きさの同腹仔の離乳ラットのペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察された実験結果への影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを確認するため、試験には不断給餌された第2の対照群の動物を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期及び亜慢性毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

関連する問題については、「レッドブック II」1993年版草案の第IV章B.5の「毒性試験のための食餌の項」で考察する。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り:

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に組み入れなければならないが、試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、数日間かけて動物を試験に組み入れてもよい。後者の推奨に従っている場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できないし、試験を繰り返す原因となり得る。例えば、通常の下況下では、対照群の死亡率は10%を超えてはならない。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超えると、再試験が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同じの物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が類似したロットを用いること。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件:

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限:

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間:

動物は、被験物質に90日間（3ヵ月間）以上連続で週に7日曝露する。その他のレジメンについては、妥当である理論的根拠を示さなければならない。

B. 投与経路:

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂取することができないようにすること。化合物を粉碎した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料1kg当たりの被験物の重量（mg）で表す。

- **飲料水に溶解**、被験物質が液体の形態（例えば、清涼飲料、ビールなど）で摂取される場合や、その他の理由により混餌投与が不適当な場合。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水 1 mL 当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の 2 つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1 回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。げっ歯類の場合、通常、投与容量は体重 100 g 当たり 1 mL を超えてはならない。強制経口投与した賦形剤がオイルの場合（「レッドブック II」1993 年版草案の第 IV 章 B.5.b.を参照）、投与容量は体重 100 g 当たり 0.4 mL 以下とし、低脂肪食の使用を検討すべきである。被験物質の分割投与が必要な場合は、すべての投与を 6 時間以内に行わなければならない。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤 1 mL 中の被験物質の重量（mg）で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験化合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

少なくとも 3 用量レベルの被験物を性別ごとに使用しなければならない（1 群当たり 1 用量レベル）。理想的には 4～5 用量レベルの被験物質を使用する。同時対照群を設定すること。急性毒性試験（「レッドブック II」1993 年版草案の第 IV 章 C.2.）及び短期毒性試験（第 IV 章 C.3.）から得られた情報は、亜慢性試験における適切な用量の決定に役立つ可能性がある。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。

毒性試験には、少なくとも 3 用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び 3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するの

に十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報は、対飼養に関する説明を含むが、上記のセクション「II 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記のセクション「II 試験動物、H.食餌」の追加情報を参照。）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。⁹

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも1日1～2回、通常のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常6時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体

的な情報は、第 IV 章 C.10. に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第 IV 章 C.10）は、年齢に適しており、投与開始前に少なくとも 1 回、及び投与中は定期的に、全動物に実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）のエビデンスの変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な旋回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理学的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

試験動物の体重は少なくとも週 1 回測定すること。亜慢性毒性試験中は、摂餌量（被験物質を飲料水に混ぜて投与する場合は飲水量）を毎週測定しなければならない。また、申請人は、試験動物による飼料の漏出量を定量化するように努め、試験飼料の漏出量が対照飼料より多いかどうかを判断しなければならない。飼料漏出に関する適切な考察を試験報告書に含めること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロフィール、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科的検査：**この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。
2. **血液学的検査：**試験中少なくとも 3 回、各群雌雄各 10 匹以上のげっ歯類から血液サンプルを採取する。試験動物のサンプリングは、試験（投与）の最初の 2 週間、月ごと又は投与の途中（45 日目）、及び終了時に行う。最初のサンプリング時点は、臓器系に対する最初の毒性学的影響が予想される時点に基づいて決定する。理想的には、試験中及び終了時に同一のげっ歯類からサンプリングしなければならない。血液サンプルの採取は、各サンプリング日のほぼ同時刻に実施する必要がある。動物がサンプリング前に絶食している場合、絶食終

了時及び給餌前に採血を行う。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。血液学的検査は個々のサンプルについて実施し、プールしてはならない。

1. 以下の測定が推奨される。
 1. ヘマトクリット
 2. ヘモグロビン濃度
 3. 赤血球数
 4. 全白血球数及び白血球分画
 5. 平均赤血球ヘモグロビン量
 6. 平均赤血球容積
 7. 平均赤血球ヘモグロビン濃度
 8. 及び凝固能の測定値（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数など）。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査：** 試験中少なくとも3回、各群雌雄各10匹以上のげっ歯類から血液サンプルを採取する。試験動物のサンプリングは、試験（投与）の最初の2週間、月ごと又は投与の途中（45日目）、及び終了時に行う。最初のサンプリング時点は、臓器系に対する最初の毒性学的影響が予想される時点に基づいて決定する。理想的には、試験中及び終了時に同一のげっ歯類からサンプリングしなければならない。血液サンプルの採取は、各サンプリング日のほぼ同時刻に実施する必要がある。動物がサンプリング前に絶食している場合、絶食終了時及び給餌前に採血を行う。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。臨床化学的検査は個々のサンプルについて実施し、プールしてはならない。

すべての被験物質に適した臨床化学的検査には、電解質バランス、糖代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）

2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (SGOT、ALT)
 3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ
 4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
 5. 総胆汁酸
2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
1. アルカリホスファターゼ
 2. ビリルビン (総ビリルビン)
 3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GG トランスフェラーゼ)
 4. 5'ヌクレオチダーゼ
 5. 総胆汁酸
3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー
1. アルブミン
 2. カルシウム
 3. 塩化物
 4. コレステロール (総コレステロール)
 5. コリンエステラーゼ
 6. クレアチニン
 7. グロブリン (計算値)
 8. グルコース (絶食下)
 9. リン
 10. カリウム
 11. タンパク質 (総タンパク質)
 12. ナトリウム
 13. トリグリセリド (絶食下)
 14. 尿素窒素

しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDA は、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。

4. アラニンアミノトランスフェラーゼ
5. アルカリホスファターゼ
6. 塩化物
7. クレアチニン
8. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GG トランスフェラーゼ)

9. グルコース（絶食下）
10. カリウム
11. タンパク質（総タンパク質）
12. ナトリウム
13. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果にかなりの変動が認められることは珍しくない¹⁰。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：試験の最終週に、各群雌雄各10匹以上を用いて定時尿量採取を行う。採取した尿の量、比重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う¹¹。
5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、げっ歯類（ラットが望ましい）を用いるすべての亜慢性毒性試験において定期的に行なわれなければならない。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下のVI.C.顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能バッテリー。この機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、この章のセクションV.A.試験動物の観察及び第IV章C.10.神経毒性試験でより詳細に説明する。

亜慢性毒性試験報告書には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えら

れるかどうかについて明確に述べる必要がある。FDA は、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：免疫毒性の主要な指標のリスト（「レッドブック II」1993 年版草稿の第 V 章 C. を参照）に記載されている検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価しなければならない。亜慢性毒性試験の報告には、被験物質が免疫系に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、必要に応じて、免疫毒性スクリーニングに含まれる主要な指標のリストのデータ及び試験のその他の毒性データを評価しなければならない。この評価に基づき、申請人及び届出人は、被験物質がさらなる免疫毒性試験を必要とする潜在的な免疫毒性の危険性を示すか否かについて明確に記述しなければならない。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993 年版草案の第 V 章 C. で考察されているが、まず当局に相談して実施しなければならない。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を 10% 緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

1. 副腎
2. 大動脈

3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる3以上のレベル）
6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. ハーダー腺（存在する場合）
15. 心臓
16. 回腸
17. 空腸
18. 腎臓
19. 肝臓
20. 肺（主気管支を伴う）
21. リンパ節（投与経路関連が1つ、遠隔部位由来が1つ）
22. 乳腺
23. 鼻甲介
24. 卵巣及び卵管
25. 膵臓
26. 下垂体
27. 前立腺
28. 直腸
29. 唾液腺
30. 坐骨神経
31. 精嚢（存在する場合）
32. 骨格筋
33. 皮膚
34. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
35. 脾臓
36. 胃
37. 精巣
38. 胸腺（又は胸腺領域）

39. 甲状腺・副甲状腺
40. 気管
41. 膀胱
42. 膣
43. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（「レッドブックII」1993年版草案の第V章C.参照）に記載されているように、全動物に実施しなければならない。

レッドブック 2000 : IV.C.4.b. 非げっ 歯類を用いた亜慢性毒性試験 2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.4.b. 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性 試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

非げっ歯類（通常イヌ）を用いる亜慢性毒性試験は、一般的に 90 日間（3 ヶ月間）で実施されるが、最長 12 ヶ月実施される場合もある。これらの試験の結果は、（1）将来の慢性毒性試験における被験物質の適切な用量の予測に役立つ可能性があり、（2）一部の毒性評価項目の NOEL の決定に利用でき、（3）特定された標的臓器に特に重点を置き、将来のげっ歯類及び非げっ歯類を用いた試験をデザインすることを可能にする。通常、亜慢性毒性試験では、被験物質のがん原性を判定することはできない。

げっ歯類を用いる亜慢性毒性試験固有のガイダンスを第 IV 章 C.4.b.に示す。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は、毒性試験の結果報告に関するガイダンス（第 IV 章 B.2.）、毒性試験における病理学的考察（第 IV 章 B.3.）、及び毒性試験における統計学的考察（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブック II」1993 年版草案に対する科学的に妥当な変更は、以下のように他の権威あるガイドライン及び公表文献を参考に行われている¹⁻⁸。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH 出版物 85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁸、及び DHEW 出版物 no.78-23 に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。

B. 動物種、系統及び性別の選択:

これらのガイドラインは非げっ歯類（通常はイヌ）を用いた試験に関するものであり、他の動物種を使用する場合は、本ガイドラインの修正が必要となる場合がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いる動物種及び系統を選択する際には、試験動物の一般的感受性、並びに試験動物の特定の臓器及び組織の毒性化学物質に対する反応性を考慮することが重要である。試験動物は、推奨される試験期間に生存する可能性が高い動物を選択すべきである。試験動物は、特性が十分に明らかにされた健康なコロニー由来であることが重要である。FDA は、申請人及び届出人に、特定の種又は系統の適切性について疑問がある場合、毒性試験の開始前に当局の科学者に相談することを推奨している。

C. 年齢:

試験は、若い動物を用いて、離乳後のできるだけ早期に投与を開始し、5日間以上の馴化期間後に実施しなければならない。イヌが月齢4~6ヵ月以下の時に検査を開始する。

D. 数及び性別:

試験には、それぞれの種及び系統について同数の雄と雌を使用すべきである。一般的に亜慢性毒性試験では、実験群及び対照群がイヌの場合、1群当たり雌雄各4匹以上とすべきである。これらの勧告は、確実に試験終了時の生存動物数が毒性学的影響の有意の評価を可能にするのに十分な数であるようにする上で役立つ。

中間剖検が予定されている場合は、各群の雌雄毎の動物数を試験終了前に予定されている屠殺動物の数だけ増やさなければならない。

E. 感染した動物:

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統、性別、年齢、及び体重を参照として特性化すべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

動物は1ケージに1匹ずつ収容すること（単独飼育）。この勧告は、以下の3つの主要な懸案事項を反映している：

- 1ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。

- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

亜慢性試験用の食餌は、正常な成長及び生殖に対する動物種の栄養要求量⁴⁷を満たす必要がある。一般に、水は不断摂取とする。それ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要である。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同じ性別、年齢でほぼ同じ大きさの動物のペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察さ

れた実験結果に対する影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを保証するために、試験には、通常の食餌量を給餌した第2の対照群の動物群を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期及び亜慢性毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

FDAは、非げっ歯類（例えば、ウサギ）に不断的に給餌する場合、IV.C.4.a.の食餌のセクションを見直すことを推奨している。関連する問題については、「レッドブックII」1993年版草案の第IV章B.5.「毒性試験のための食餌」のセクションで考察されている。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に組み入れなければならないが、試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、数日間かけて動物を試験に組み入れてもよい。後者の推奨に従っている場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できないし、試験を繰り返す原因となり得る。例えば、通常の下況下では、対照群の死亡率は 10%を超えてはならない。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は 10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超えると、再試験が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同一の物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が類似したロットを用いること。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件：

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間：

動物は、被験物質に90日間（3ヵ月間）以上連続で週に7日曝露する。その他のレジメンについては、妥当である理論的根拠を示さなければならない。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂取することができないようにすること。化合物を粉砕した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料1kg当たりの被験物の重量（mg）で表す。
- **飲料水に溶解**、被験物質が液体の形態（例えば、清涼飲料、ビールなど）で摂取される場合や、その他の理由により混餌投与が不適当な場合。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水1mL当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の2つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤1mL中の被験物質の重量（mg）で表す。最後に、申請

人及び届出人は、被験化合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

少なくとも3用量レベルの被験物を性別ごとに使用しなければならない（1群当たり1用量レベル）。理想的には4～5用量レベルの被験物質を使用する。同時対照群を設定すること。急性毒性試験（「レッドブックII」1993年版草案の第IV章C.2.）及び短期毒性試験（第IV章C.3.）から得られた情報は、亜慢性試験における適切な用量の決定に役立つ可能性がある。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。

毒性試験には、少なくとも3用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するのに十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報は、対飼養に関する説明を含むが、上記のセクション「II 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきであ

る。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記のセクション「II 試験動物、H.食餌」の追加情報を参照。）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。⁹

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも1日1~2回、通常のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常6時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体的な情報は、第IV章C.10.に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第IV章C.10）は、年齢に適しており、投与開始前に少なくとも1回、及び投与中は定期的に、全動物に実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）のエビデンスの変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な巡回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

試験動物の体重は少なくとも週1回測定すること。亜慢性毒性試験中は、摂餌量（被験物質を飲料水に混ぜて投与する場合は飲水量）を毎週測定しなければならない。また、申請人は、試験動物による飼料の漏出量を定量化するように努め、試験飼料の漏出量が対照飼料より多いかどうかを判断しなければならない。飼料漏出に関する適切な考察を試験報告書に含めること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロファイル、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科検査：** この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。
2. **血液学的検査：** 血液サンプルは、すべての群のすべての動物から、投与開始前、最初の2週間（投与期間中）、毎月又は投与期間の途中（45日目）、及び投与終了時に採取する。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。血液サンプルの採取は、各サンプリング日のほぼ同時刻に実施する必要がある。動物がサンプリング前に絶食している場合、絶食終了時及び給餌前に採血を行う。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。血液学的検査はすべてのサンプルについて個別に実施し、プールしてはならない。
 1. 以下の測定が推奨される。
 1. ヘマトクリット
 2. ヘモグロビン濃度
 3. 赤血球数
 4. 全白血球数及び白血球分画
 5. 平均赤血球ヘモグロビン量
 6. 平均赤血球容積
 7. 平均赤血球ヘモグロビン濃度
 8. 及び凝固能の測定値（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数など）。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風

乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査**： 血液サンプルは、すべての群のすべての動物から、投与開始前、最初の2週間（投与期間中）、毎月又は投与期間の途中（45日目）、及び投与終了時に採取する。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。血液サンプルの採取は、各サンプリング日のほぼ同時刻に実施する必要がある。動物がサンプリング前に絶食している場合、絶食終了時及び給餌前に採血を行う。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。臨床化学的検査はすべてのサンプルについて個別に実施し、プールしてはならない。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する

1. アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）
2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（SGOT、ALT）
3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ
4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
5. 総胆汁酸

2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する

1. アルカリホスファターゼ
2. ビリルビン（総ビリルビン）
3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGトランスフェラーゼ）
4. 5'ヌクレオチダーゼ
5. 総胆汁酸

3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー

1. アルブミン
2. カルシウム
3. 塩化物
4. コレステロール（総コレステロール）
5. コリンエステラーゼ
6. クレアチニン
7. グロブリン（計算値）
8. グルコース（絶食下）
9. リン
10. カリウム

11. タンパク質（総タンパク質）
 12. ナトリウム
 13. トリグリセリド（絶食下）
 14. 尿素窒素
4. しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDA は、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。
1. アラニンアミノトランスフェラーゼ
 2. アルカリホスファターゼ
 3. 塩化物
 4. クレアチニン
 5. γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
 6. グルコース（絶食下）
 7. カリウム
 8. タンパク質（総タンパク質）
 9. ナトリウム
 10. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果にかなりの変動が認められることは珍しくない¹⁰。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：試験前、30 及び 60 日目、並びに試験最終週に、試験の全動物に対して定時尿量採取を行う。採取した尿の量、比重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う¹¹。
5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、非げっ歯類（イヌ又はミニブタが望ましい）を用いるすべての亜慢性毒性試験において

定期的に実施しなければならない。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下の VI.C.顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能バッテリー。この機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、セクション V 章 A. でより詳細に説明する。この章及び第 IV 章 C.10. の試験動物の観察。神経毒性試験。

亜慢性毒性試験報告書には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えられるかどうかについて明確に述べることが必要である。FDA は、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：免疫毒性の主要な指標のリスト（1993 年草稿「レッドブック II」の第 V 章 C. を参照）に記載されている検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価しなければならない。亜慢性毒性試験の報告には、被験物質が免疫系に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、必要に応じて、免疫毒性スクリーニングに含まれる主要な指標のリストのデータ及び試験のその他の毒性データを評価しなければならない。この評価に基づき、申請及び届出人は、被験物質がさらなる免疫毒性試験を必要とする潜在的な免疫毒性の危険性を示すか否かについて明確に記述しなければならない。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993 年版草案 の第 V 章 C. で考察されているが、まず当局に相談して実施しなければならない。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を 10%緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

1. 副腎
2. 大動脈
3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる 3 以上のレベル）
6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. ハーダー腺（存在する場合）
15. 心臓
16. 回腸
17. 空腸
18. 腎臓
19. 肝臓
20. 肺（主気管支を伴う）
21. リンパ節（投与経路関連が 1 つ、遠隔部位由来が 1 つ）
22. 乳腺
23. 鼻甲介
24. 卵巣及び卵管

25. 膵臓
26. 下垂体
27. 前立腺
28. 直腸
29. 唾液腺
30. 坐骨神経
31. 精嚢（存在する場合）
32. 骨格筋
33. 皮膚
34. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
35. 脾臓
36. 胃
37. 精巣
38. 胸腺（又は胸腺領域）
39. 甲状腺・副甲状腺
40. 気管
41. 膀胱
42. 膣
43. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（「レッドブック II」1993年版草案の第V章C.参照）に記載されているように、実施しなければならない。

レッドブック 2000 : IV.C.5.a. げっ歯 類を用いた慢性毒性試験 2007 年 7 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2007 年 7 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.5.a. げっ歯類を用いた慢性毒性試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

FDA は、レッドブック 1993 年版「草案」第 IV 章 C.7.げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験に科学的に妥当な変更を加え、他の権威あるガイドライン^{[6] [7] [12]}及び公表文献^[1]（以下の関連する項も参照のこと）を参照して、第 IV 章 C.5.a.げっ歯類を用いた慢性毒性試験を作成した。 レッドブック 2000 のこの項は、レッドブック 1993 年版「草案」の第 IV 章 C.7 に優先する。

FDA は、両試験について適切な用量レベルを同時に設定して投与することが困難であるため、複合試験を実施することが複雑で困難であることを認識している。 さらに、

これら 2 種類の試験の全般的な目的は異なる。しかし、予備慢性試験により、毒性の合理的な推定値が得られ、単一のバイオアッセイで使用する情報（投与用量など）を予測できる場合には、慢性毒性試験をがん原性試験と統合して、がん原性物質となる可能性のある成分及び有害作用を起こさない最大用量に関する情報を明らかにすることができる。ケースバイケースで、慢性疾患の転帰（もしくはがん）の発生率を増加させる可能性がある早期発生作用を明らかにするために、慢性毒性試験（又は慢性毒性・がん原性複合試験）に子宮内曝露段階を追加することもできる。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は、複合試験デザインの策定中に、げっ歯類を用いるがん原性試験（第 IV 章 C.6.）及びげっ歯類を用いるがん原性試験又は慢性毒性試験に追加するための子宮内曝露段階（第 IV 章 C.8.）に精通することが推奨される。申請人及び届出人も複合試験を実施する前に FDA に相談すること。

げっ歯類を用いる慢性毒性試験は、少なくとも 12 ヶ月間（1 年間）実施すべきである。これらの試験の結果は、1) 長期及び反復曝露後の食品成分の毒性の特徴を明らかにするため、及び 2) 毒性学的用量反応関係を明らかにし、有害作用を生じない最大用量（すなわち、NOEL 又は NOAEL）を設定するために用いることができる。以下のガイダンスは、主にラット又はマウスについて記載しており、他の非げっ歯類を使用する場合は、ガイダンスの修正が必要となる場合がある。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は、「毒性試験の結果報告に関するガイダンス」（第 IV 章 B.2.）、「毒性試験における病理学的考察」（第 IV 章 B.3.）及び「毒性試験における統計学的考察」（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

I. 優良試験所基準

この章で説明する非臨床試験は、米国連邦規則集タイトル 21 パート 58 に基づいて発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）の規則に従って実施しなければならない。この文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800 又は DC 地区 202-512-1800）の文書管理官から入手することができる。他の国際・国内的ガイドラインに基づいて実施された試験は、米国 FDA の GLP 規則に基づいて実施された試験と同等とみなすことができる。FDA の GLP 規制に準拠していない特定の領域について考察し、妥当性を示すこと。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

全米研究評議会の 実験動物の管理と使用に関する指針^[13]に記載されている動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告には、この章の特定の勧告と矛盾しない限り従わなくてはならない。

B. 動物種及び系統の選択:

この章に記載されたガイダンスはマウス及びラットを用いた試験に関するものであり、他のげっ歯類を使用する場合には修正が必要な場合がある。健康かつ過去に実験手順の対象となっていない雌雄両方の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に用いるげっ歯類の種、系統及び亜系を選択する際には、毒性化学物質に対する試験動物の一般的な感受性、及び試験動物の特定の臓器及び組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験に用いる近交系、非近交系、又はハイブリッドげっ歯類系統の選択は、答えるべき科学的疑問に基づかなければならない。さらに、試験動物は、特性が十分に明らかにされており、かつ健康なコロニーに由来するものであることが重要である。申請人及び届出人は、特定の種、系統又は亜系統の適切性について疑問がある場合、毒性試験を開始する前に当局の科学者に相談しなければならない。

C. 年齢（投与開始時）:

げっ歯類への投与は、離乳後かつ5日間以上の適切な馴化期間を経た後、さらに約6～8週齢となる前に開始すること。

D. 数及び性別:

実験群及び対照群のいずれも各群雌雄各20匹以上とする。中間剖検が予定されている場合は、各群の雌雄毎の動物数を試験終了前に予定されている屠殺数だけ増やさなければならない。各中間剖検時に各群雌雄各10匹以上のげっ歯類が使用可能でなければならない。

E. 感染した動物:

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる治療薬と被験物質が相互作用する可能性が生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が著しく混乱したり複雑になったりする可能性がある。ただし、感染症の問題が生じた場合には、試験依頼人は試験を進める上で最善の判断を行い、その旨を当局に報告しなければならない。さらに、FDAは、試験継続の根拠及び感染症の考えられる影響、

並びに該当する場合は感染症の治療に対する根拠及び考えられる影響の詳細な説明を提供することを要求している。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化するべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（例えば、耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨）。

G. 飼育

動物は1ケージに1匹ずつ収容すること。この勧告は、以下の3つの検討事項を反映している：

- 1ケージに複数の動物が収容されている場合には、試験に用いた各動物の摂餌量を十分な精度で測定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 体重増加量の減少が嗜好性の低下によるものか被験物質を介した毒性によるものかを判断する際に解析の交絡の可能性を最小限にする。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌：

一般に、食餌及び水は不断的に与え、食餌は正常な成長及び寿命に関する動物種の栄養要件^[14]を満たす必要がある。他に正当化される特別な状況が適用される場合を除き、動物の被験物質投与群の食餌には、対照群の食餌と同レベルのカロリー及び栄養素（例：食物繊維、微量栄養素）が含まれていることを確認するよう注意を払わなければならない。不適切に管理された食餌の変動は、栄養の不均衡又はカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果の解釈を混乱させ（例えば、寿命、腫瘍発生の背景率）、試験の結果及び再現性を変化させる可能性がある。しかし当局は、カロリー制限食^{[4][5]}又は低タンパク質食を摂取していた特定の動物種の生存可能性に対する有益な効果も認識している。^{[2][9]}試験依頼人が過去の食事に関する対照データを十分に提供し、かつ試験が適切に実施されている場合には、当該試験成績を受け入れることができる。

毒性試験において動物用の食餌を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である：

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。そのため、一部の高用量群の動物は予想よりも高用量の被験物質を投与される場合がある。なぜなら、このような希釈された食餌を不断的に与えた動物は、高用量飼料のエネルギー及び栄養素含有量の差を補うために、他の投与群の動物よりも多量に摂取する可能性があるからである。このような状況から、観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、これらの動物の摂取量を可能な限り正確かつ厳密に監視することが特に重要となる。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

不快な味や食感から被験物質の投与が摂取量に影響を及ぼすことが予想される場合には、他の給餌方法や実験計画が必要となることがある。代替案を検討する場合は、FDAと相談することが推奨される。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

その他の関連する問題（例えば、精製飼料と比較した天然成分の使用の長所及び短所）については、実験動物の栄養所要量に関する全米研究評議会の発表で考察されている。^[14]

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層化無作為法で対照群と被験物質投与群に割り振らなければならない。これにより、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群間で関連する変数の相互比較性を保証する。一般に、無作為化の基準として平均体重もしくは体重範囲を使用す

る。他の特性を無作為化の根拠として用いる場合は、その特性を記述し、その妥当性を示すこと。

すべての群の動物を同じ日に試験に供さなければならない。試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、動物を数日間にわたって試験に供してもよい。後者の推奨に従う場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

不十分な動物管理による過度の死亡は容認されず、再試験が必要となる場合がある。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超える場合は、試験の再実施が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検を直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐのに十分低い温度（すなわち4°C ~8°C）であるが、細胞を損傷させるほどは低くない温度で冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

慢性毒性試験に使用する被験物質は、申請人及び届出人が市販しようとする物質と同一の物質を使用すべきであり、適切な場合には、被験物質が構成化学物質又は不純物である可能性がある。試験期間を通じて1ロットの被験物質を使用しなければならない。これが不可能な場合は、純度及び組成が可能な限り類似したロットを用いる。被験物質の純度、並びに存在する可能性のある不純物の同定及び濃度を動物試験施設に通知することは、申請人及び届出人の責任である。

A. 同一性：

被験物質の同一性（例えば、単一成分又は成分の混合物のいずれか）が明らかであること。申請人及び届出人は、被験物質の測定方法について当局に相談することが推奨されており、関連するすべてのケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供しなければならない。

B. 組成・純度:

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件:

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性及び純度が維持される条件下で保存すること。

D. 使用期限:

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験デザイン

A. 試験期間:

試験動物は、被験物質に 12 ヶ月（1 年）以上週に 7 日曝露する。

B. 投与経路:

被験物質の投与経路は、ヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。可能であれば経口を用いる。他の経路を用いる場合には、その妥当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂餌することができないようにすること。被験物質を粉碎した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊さ

れる可能性がある)。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料 1 kg 当たりの被験物質の重量 (mg) で表す。

- 被験物質が液状のままヒトに摂取される可能性が高い場合 (例:清涼飲料、ビール)、又はげっ歯類の混餌投与が不適切な場合は、**飲料水に溶解する**。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水 1 mL 当たりの被験物質の重量 (mg) で表す。
- 前記の 2 つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回大量投与の摂取によってもたらされると予測される場合は、**カプセル化又は経口挿管 (強制経口投与) による**。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1 回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。げっ歯類の場合、通常、投与容量は体重 100 g 当たり 1 mL を超えてはならない。強制経口投与した賦形剤がオイルの場合、その量は体重 100 g 当たり 0.4 mL 以下とし、低脂肪食の使用を検討すべきである。動物の体重反応に基づいて 1~3 日ごとに量を調整することが最も望ましい。被験物質の分割投与が必要な場合は、すべての投与を 6 時間以内に行わなければならない。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤 1 mL 中の被験物質の重量 (mg) で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験物質のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要な点で同等であると当局が結論できる情報を提供しなければならない。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

慢性毒性試験の用量選択は、亜慢性試験の結果及びその他の関連情報に基づかなければならない。適切な用量選択により、NOEL 又は NOAEL とも呼ばれる、有害作用を生じない最大用量を予測できる。用量設定の理論的根拠を示すこと。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。(セクション II.1：対照群及び化合物投与群の動物の割り当てを参照)。

1. 対照：

基礎飼料を与えた試験動物の同時対照群が必要である。対照群の動物には、投与動物群に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、確実にそれらの使用が試験の結果を損なわないように、十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた担体又は賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形

剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（セクション II.H：食餌も参照。）

2. 投与量の選択：

慢性毒性試験では、少なくとも3用量レベルの被験物質を使用することを推奨する。以下は投与量レベルを選択する際の一般的な検討事項である。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分な高用量でなければならないが、死亡を引き起こして試験データの有意な評価を妨げるほどの高用量であってはならない。2) 低用量は、試験動物に生物学的に有意な毒性反応を誘発してはならない。さらに3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を引き起こすのに十分な高用量でなければならない。

申請人及び届出人が慢性毒性試験の用量設定の根拠として、被験物質の毒性とは関連がない情報を使用することは推奨しない。例えば、慢性毒性試験の最高用量は、その用量での試験結果が陰性であると仮定して、予想されるヒトの被験物質への最大曝露量に対して事前に決定された安全マージンが得られるように選択すべきではない。

高用量：

慢性毒性試験の高用量は、被験物質の毒性プロファイルが得られるように毒性を生じるものでなければならない。しかし、他の試験で毒性が観察されない場合、高用量には、他の栄養素との栄養バランスを損なうことなく給餌される食餌中の被験物質の最高比率のようなあらかじめ設定された限度が課せられる（例えば、約5%、他の重要な食餌の問題については「セクション II.H：食餌」も参照）。

一般に、試験する高用量は、適切な亜慢性毒性試験のデータを慎重に分析して推定する。毒性試験に関する科学界の経験が蓄積されるにつれて、高用量を選択する際に広範な生物学的情報を考慮する必要性がますます明らかになってきている。例えば、体重及び臓器重量変化のほか、神経学的検査、血液学的検査、尿検査及び臨床化学的検査の測定値の臨床的に重要な変化に関する亜慢性（90日間）試験のデータを、より決定的な曝露関連毒性、肉眼的又は病理組織学的評価項目を組み合わせれば、慢性毒性試験の高用量を推定することができる。

慢性毒性試験の高用量は、試験動物で毒性反応が得られるように選択すべきであり、試験データの意味のある評価を妨げるほど高い死亡率が生じてはならないが、当局は、この目標が常に達成されるとは限らないと認識している。このような状況で

は、被験物質のどの用量が高用量か不明な場合には、申請人及び届出人は当局と協議し、慢性毒性試験に適切な高用量を決定しなくてはならない。

低用量:

低用量レベルは、試験動物の正常な成長、発達及び寿命を妨げてはならず、また、他のいかなる生物学的に有意な毒性の徴候（例えば、NOEL 又は NOAEL）も生じてはならない。

中間用量:

中間用量では、最小限の毒性の徴候を生じるものとしなければならない。中間用量として選択される正確な用量は、被験物質の薬物動態特性に依存する。

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化システムは、優良試験所基準の原則の意図に沿った方法で開発、検証、運用、及び維持しなければならない。

[11] FDA は、動物試験データの電子的伝送に非臨床試験データモデル（SEND）の書式を使用することを承認している。この電子媒体を使った実施計画書の詳細については、当局に問い合わせることを推奨する。

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、ケージ内の全動物の通常活動からの逸脱、病的状態及び死亡の徴候について1日1~2回、所定のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常6時間以上あけること。各動物について個々の記録を保管し、可能な限り、作用の発現時期、特徴及び進行を、望ましくはスコア化システムを用いて記録しなければならない。肉眼で視認可能又は触知可能な腫瘍が発現した場合、以下のパラメータ、すなわち発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。

通常の活動からの逸脱、病的状態及び死亡の一般的な徴候だけでなく、神経障害、行動の変化、自律神経機能異常及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるように、ケージ内及びケージ外の動物に対して実施される臨床評価の拡張セットを実施すべきである。系統的な臨床検査・観察に関する具体的な情報は、第IV章C.10.に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セットは、年齢に適してお

り、投与開始前に少なくとも1回、及び投与中は定期的に、全動物に対して実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）のエビデンスの変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な巡回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理学的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

個々の体重、摂餌量及び摂水量の正確な測定値は、これらの変数の変化が毒性の最初の徴候であることが多いことから、被験物質が実験動物に及ぼす影響の客観的評価において重要である。これらのパラメータの完全な記録は、腫瘍形成を含む毒性誘発性変化の時間関連の発現を評価する上で不可欠である。摂餌量及び体重増加・減少に影響するいくつかの変数についての考察は、セクションII.H：食餌に記載されている。投与経路。

全試験動物の体重は、最初の13週間は毎週、その後試験期間中は毎月記録する。摂餌量（又は被験物質を飲水投与する場合は飲水量）の測定は体重と同間隔で行うこと。また、申請人及び届出人は、試験動物による飼料の漏出量の定量化も試みなければならない。被験物質の投与が、次のいずれかの条件、すなわち1) 飼料の嗜好性の問題、2) 体重の著しい変化、又は3) 動物の死亡数の増加によって影響されることが疑われる場合は、申請人及び届出人は、最初の13週間の期間後により高頻度で（例えば、2週間ごとに）体重及び摂餌（水）量を測定しなければならない。また、申請人及び届出人はこの蓄積された情報を用いて被験物質摂取量をmg/kg体重/日で算出する。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロファイル、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. 眼科的検査

この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被

験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。

2. 血液学的検査：

試験の最初の2週間、試験期間中の3、6及び12ヵ月目に、全動物に血液学的検査を実施する。最初のサンプリングの時間は、短期試験の試験結果に基づくことができる。12ヵ月時点の測定で懸念されるデータの傾向又は重要なパラメータの変化（生物学的又は統計学的）が認められ、試験が1年を超えて継続される場合は、試験終了時に追加の血液学的検査を実施すること。

理想的には、各採取時点で同じげっ歯類からサンプルを採取しなくてはならない。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならない。動物数が多いため、各採血時点で1日以上連続して採血する必要がある場合は、毎日ほぼ同時刻に採血することが必要である。

以下の測定、すなわちヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数及び白血球分画、平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、並びに凝固能の指標（例えば、凝固時間、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）が推奨される。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。細胞学的評価用の骨髓スライドを各動物から作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. 臨床化学的検査：

試験の最初の2週間、及び試験期間中の3、6、12ヵ月目に、全動物に臨床化学的検査を実施する。最初のサンプリングの時間は、短期試験の試験結果に基づくことができる。12ヵ月時点の測定で懸念されるデータの傾向又は重要なパラメータの変化（生物学的又は統計学的）が認められ、試験が1年を超えて継続される場合は、試験終了時に追加の臨床化学的検査を実施すること。

理想的には、各採取時点で同じげっ歯類からサンプルを採取しなくてはならない。血液サンプルは絶食時間終了時かつ給餌前に採取する。絶食時間は動物種及び実施する分析試験に適したものとする。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならな

い。試験期間中、動物から複数日にサンプルを採取する場合、各サンプル採取日のほぼ同時刻に血液を採取する。

すべての被験物質に適した生化学検査には、電解質バランス、栄養代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

肝細胞評価（以下の5つのうち3つ以上）

- アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）
- アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（SGOT、AST）
- ソルビトールデヒドロゲナーゼ
- グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
- 総胆汁酸

肝胆道の評価（以下の5つのうち3つ以上）

- アルカリホスファターゼ
- ビリルビン（総ビリルビン）
- γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
- 5'ヌクレオチダーゼ
- 総胆汁酸

細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー

- アルブミン
- カルシウム
- 塩化物
- コレステロール（総コレステロール）
- コリンエステラーゼ
- クレアチニン
- グロブリン（計算値）
- グルコース
- リン
- カリウム

- タンパク質（総タンパク質）
- ナトリウム
- トリグリセリド
- 尿素窒素
- 当局は、被験物質の特定の性質が代替試験を検討する正当な理由となる可能性があることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果に大きな変動が認められることは珍しくない。¹³⁾理想的には、すべての投与群の臨床化学的分析を1日中に完了しなければならない。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. 尿検査：

投与前及び試験中の3、6、12ヵ月後に、採尿量、尿比重、pH、グルコース及びタンパク質の測定、並びに尿沈渣並びに血液もしくは血球の有無の確認のための顕微鏡検査が推奨される¹⁴⁾。12ヵ月時点の測定で懸念されるデータの傾向又は重要なパラメータの変化（生物学的又は統計学的）が認められ、試験が1年を超えて継続される場合は、試験終了時に追加の尿検査を実施する。これらの検査は全動物に実施しなければならない。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである。

B. 臓器重量

最低でも重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、存在する場合、卵巣及び子宮などである。重量を測定する前に、臓器を慎重に切除し、トリミングして脂肪や他の隣接組織を除去する必

要がある。乾燥による臓器重量への影響を最小限にするため、切除直後に臓器重量を測定すること。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織については、10%緩衝ホルマリン液（又は一般的に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

- 副腎
- 大動脈
- 骨（大腿骨）
- 骨髄（胸骨）
- 脳（3つ以上の異なるレベル）
- 盲腸
- 結腸
- 子宮体部及び子宮頸部
- 十二指腸
- 精巣上体
- 食道
- 目
- 胆嚢（存在する場合）
- ハーダー腺
- 心臓
- 回腸
- 空腸
- 腎臓
- 肝臓
- 肺（主気管支付き）
- リンパ節（投与経路関連が1つ、遠隔部位由来が1つ）
- 乳腺

- 鼻甲介
- 卵巣及び卵管
- 膵臓
- 下垂体
- 前立腺
- 直腸
- 唾液腺
- 坐骨神経
- 精嚢（存在する場合）
- 骨格筋
- 皮膚
- 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
- 脾臓
- 胃
- 精巣
- 胸腺（存在する場合）
- 甲状腺・副甲状腺
- 気管
- 膀胱
- 膣
- ジンバル腺
- 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織で投与に関連した影響が認められた場合は、試験した一段階低い用量で特定の組織を検査すること。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査する。病理学的病変及び統計学的結果のレビュー及び解釈に関連す

る疑問がある場合は、レッドブック 2000 の第 IV 章 B.3.及び第 IV 章 B.4.で追加の説明を参照することができる。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（レッドブック II1993 年版草案の第 V 章 D.を参照）に記載されている通りに実施すべきである。この問題については、最近発表された論文でさらに考察している。^[10]

レッドブック 2000 : IV.C.5.b. 非げっ 歯類を用いる 1 年間毒性試験 2003 年 11 月

発行元:

米国食品安全・応用栄養センター食品添加物安全局

2003 年 11 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.5.b. 非げっ歯類を用いる 1 年間毒性 試験

- I. 優良試験所基準
- II. 試験動物
- III. 被験物質
- IV. 実験計画
- V. 観察及び臨床試験
- VI. 剖検及び顕微鏡検査
- VII. 参考文献

非げっ歯類（通常、イヌ）を用いた長期、1 年間の毒性試験を最低 12 ヶ月（1 年間）実施しなければならない。これらの試験の結果を用いて、（1）非げっ歯類における被験物質の毒性の特徴を明らかにし、（2）いくつかの毒性学的評価項目について無毒性量（NOEL 又は NOAEL）を求めることができる。がん原性の評価を目的とした 1 年間の毒性試験は実施していないが、これらのデータから被験物質のがん原性に関する情報が得られる場合がある。以下のガイドラインは、イヌについて書かれたものであり、他の非げっ歯類を使用する場合は、ガイダンスの修正が必要となる可能性がある

る。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は、毒性試験の結果報告に関するガイドランス（第 IV 章 B.2.）、毒性試験における病理学的考察（第 IV 章 B.3.）、及び毒性試験における統計学的考察（第 IV 章 B.4.）についても、試験計画の策定中に熟知することが推奨される。

このセクションの「レッドブック II」1993 年版草案に対する科学的に妥当な変更は、以下のように他の権威あるガイドライン及び公表文献を参考に行われている¹⁻⁷。

I. 優良試験所基準

非臨床試験は、連邦規則集タイトル 21 パート 58 の下で発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施しなければならない。本文書は、米国政府印刷局（ワシントン D.C., 20402、無料通話 866-512-1800）の文書管理官から入手することができる。

II. 試験動物

A. 管理、維持、飼育環境:

NIH 出版物 85-23、「実験動物の管理と使用に関する指針」⁷、及び DHEW 出版物 no.78-23 に記載された動物の管理、維持、飼育環境に関する勧告に従うべきである。ただし、本ガイドラインの特定の勧告と食い違う場合はこの限りではない。さらに、イヌは試験開始前に適切なワクチン接種を受けなければならない。

B. 動物種、系統及び性別の選択:

これらのガイドラインはイヌを用いる試験に関するものである。他の非げっ歯類を使用する場合、これらのガイドラインの修正が必要となる可能性がある。健康で過去に実験手順の対象になっていない雌雄の試験動物を使用しなければならない。

毒性試験に非げっ歯類、すなわちイヌを選択する際には、毒性化学物質に対する試験動物の一般的な感受性、及び試験動物の特定の臓器並びに組織の反応性を考慮することが重要である。さらに、試験動物は特性が明らかで健康なコロニーから得られる動物であり、推奨される試験期間を達成できるように選択することが重要である。

C. 年齢:

イヌは、適切な馴化期間後に動物が 4~6 月齢に達しない時点で投与を開始できるように入手する。

D. 数及び性別:

1年間の毒性試験では同数の雌雄のイヌを使用すべきである。試験群及び対照群は、試験開始時に各群雌雄各4匹以上としなければならない。中間剖検が予定されている場合は、各群の雌雄毎のイヌの数を試験終了前に予定されている屠殺数だけ増やさなければならない。これらの勧告は、確実に試験終了時の生存動物数が毒性学的影響の有意の評価を可能にするのに十分な数であるようにする上で役立つ。

E. 感染した動物:

一般的に、試験期間中に動物の感染症の治療を行うと、必ず治療に用いられる化合物と被験物質が相互作用するリスクが生じる。この相互作用によって試験結果の解釈が混乱したり複雑になったりする可能性がある。

F. 動物の識別

試験動物は、種、系統（及び亜系）、性別、年齢、及び体重を参照として特性化すべきである。各動物は、固有の識別番号を付けなければならない（耳タグ、植え込み型識別チップ、入れ墨など）。

G. 飼育

動物は1ケージに1匹ずつ収容すること（単独飼育）。この勧告は、以下の3つの主要な懸案事項を反映している:

- 1ケージに複数の動物が飼育されている場合は、試験に使用した動物の摂餌量を決定することはできない。この情報は飼料効率の測定に必要である（飼料消費量と体重増加量の関係）。
- 解析の交絡を最小化し、体重増加の減少が嗜好性の低下によるものか物質が介在する毒性によるものかを判断する。
- 単独収容されている瀕死動物及び死亡動物の臓器及び組織であれば共食いにより失われることはない。

H. 食餌:

一般に、毒性試験に用いる動物には飼料及び水を定期的に与え、これらの試験に用いる食餌は、正常な成長及び生殖に関する種の栄養要求量³⁻⁶を満たす必要がある。それ以外の場合は妥当な特別な状況が適用される場合を除き、動物の化合物投与群の食餌

が対照群の食餌と等カロリー（カロリー密度で同等）であり、同レベルの栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）を含有しているように注意を払わなければならない。認識されていない、あるいは十分に管理されていない食餌の変動は、栄養の不均衡やカロリー不足を引き起こし、毒性試験結果（寿命、バックグラウンドの腫瘍発生率など）の解釈を混乱させ、試験の結果や再現性を変える可能性がある。

毒性試験の動物用飼料を設定する際には、以下の問題点を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌の相当量を構成する場合（例えば、5%超）、高用量の食餌のカロリー及び栄養密度はいずれも他の群の食餌と比較すると希釈されている。観察された変化が被験物質の明らかな毒性によるものか、あるいは食餌の不均衡によるものかを判断するため、動物の摂餌量を可能な限り厳密かつ正確に監視することが特に重要である。この評価をさらに支援するため、2つの対照群を使用することができる。すなわち、一方の群には未希釈の対照食を、もう一方の群には食餌中の被験物質の最高の割合に等しい割合で不活性充填材（メチルセルロースなど）が補充された対照食を給餌する。

被験物質の賦形剤がカロリーもしくは栄養価が対照の食餌より大きいと予想される場合、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要となることがある。

被験物質の味や食感の不快さから、被験物質の投与が摂餌量に影響を及ぼすことが予想される場合は、対照群と化合物投与群との間の摂餌量の差を解消するため、対飼養を用いることができる。対飼養の試験計画を使用する場合は、同じ性別、年齢でほぼ同じ大きさの動物のペアを選択して対照又は実験食を給餌する。動物は摂餌量が毎日測定できるように単独収容する必要があり、その後対照動物に、その対である実験動物が前日に接種した食餌と同量の食餌を与える。被験物質が非栄養性であり、食餌のかなりの割合を構成する場合、対飼養の対照動物には、その対である実験動物と栄養学的に同等量の食餌を摂取するような量の飼料を与えるべきである。さらに、観察された実験結果に対する影響がエネルギー又は栄養摂取量の差によるものであることを保証するために、試験には、通常の食餌量を給餌した第2の対照群の動物群を含めなければならない。

被験物質が栄養素の吸収を妨げ、栄養不足又は栄養比の変化がもたらされる場合、検討中の毒性評価項目の評価が混乱する可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱油又は脂肪代替物で優先的に分配される可能性があり、これらのビタミンの潜在的欠乏が生じる可能性がある。この可能性は、被験物質投与群の飼

料に栄養強化を追加することによって排除されると考えられる。適切な栄養強化レベルは実験的に決定しなければならない。

一般的に使用される実験動物用の食餌の中には飼料の組成（例えば、食物繊維、ミネラル、ビタミン、イソフラボン）がバッチ間で変動するものがあるため、短期及び亜慢性毒性試験には、既知量の特性が明らかな成分で調製された半精製の食餌を使用することが望ましい場合がある。しかし、これらの半精製の食餌を使用することは、その動物の生存及び毒性評価項目に対する影響に関連する適切な過去のデータがないため、長期試験及び生殖試験では推奨されない。例えば、半精製の食餌中の必要であるが未特定の微量栄養素の欠損により、正常な生殖が妨げられることがある。

関連する問題については、「レッドブック II」1993年版草案の第IV章B.5.の「毒性試験のための食餌の項」で考察する。

I. 対照群及び化合物投与群の割り振り：

動物は層別ランダム化方式で対照群と化合物投与群に割り振らなければならない。これは、バイアスを最小限に抑え、化合物投与群と対照群にわたって関連する変数（例えば、平均体重、体重範囲）の同等性を保証するのに役立つ。他の特性が無作為化の根拠として用いられる場合には、その特性を記述し、その妥当性を示さなければならない。

すべての群の動物を同じ日に試験に組み入れなければならないが、試験動物数が多いためこれが不可能な場合は、数日間かけて動物を試験に組み入れてもよい。後者の推奨に従っている場合、同時性を維持するため事前に選択した対照動物及び実験動物の一部を毎日試験に供しなければならない。

J. 死亡率：

動物の管理不良による過剰な死亡は容認できないし、試験を繰り返す原因となり得る。例えば、通常の下況下では、対照群の死亡率は10%を超えてはならない。

K. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解によって試験で失われる動物、組織または臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。自己融解がこの基準を超えると、再試験が必要となる場合がある。

L. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするため、動物が屠殺された直後又は死亡しているのが分かった直後に実施しなければならない。剖検が直ちに実施できない場合は、自己融解を防ぐには十分低いが、細胞損傷を引き起こすほどは低くない温度で動物を冷蔵しなければならない。病理組織学的検査を実施する場合、剖検時に組織標本を動物から採取して適切な固定液に入れなければならない。

III. 被験物質

毒性試験に用いる被験物質は、申請人及び届出人が販売予定のものと同じの物質を使用しなければならない。可能な場合は、試験期間を通して単一ロットの被験物質を使用する。あるいは、純度及び組成が類似したロットを用いること。

A. 同一性：

被験物質又は被験物質の混合物の同一性が明らかでなければならない。食品添加物安全局としては、申請人及び届出人が、被験化合物の決定について当局に相談し、単一又は複数のケミカル・アブストラクツ・サービス（CAS）登録番号を提供することを推奨する。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称及び量、既知の汚染物質及び不純物、並びに識別不能な物質の割合などが分かっているなければならない。

C. 保管条件：

試験サンプルは、試験が完了するまで安定性、品質及び純度が維持される条件下で保存しなければならない。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限が判明しており、容易に知ることができなければならない。使用期限を過ぎたものは使用してはならない。

IV. 実験計画

A. 試験期間：

動物は、被験物質に週 7 日、52 週間（1 年間）以上曝露する。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、可能であればヒトの通常の曝露経路に近いものとしなければならない。食品成分（食品添加物や着色添加物など）については、経口投与が望ましい。他の経路を用いる場合には、その正当性を示すこと。試験期間を通じて、すべての試験動物に同じ投与方法を使用しなければならない。

被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌中**、ヒトの被験物質への曝露が固形食品の摂取又は固形食品と液状食品の組み合わせによるものである可能性が高い場合。被験物質を食餌に添加する場合は、色、匂い、粒子の大きさによって基礎食餌又は被験物質のいずれかを選択的に摂餌することができないようにすること。化合物を粉碎した飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化工程において被験物質が影響されてはならない（例えば、水蒸気処理によるペレット製造中に熱に弱い物質が破壊されることがある）。被験物質を混餌投与する場合、食餌中の濃度は飼料 1 kg 当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- 被験物質が液状（清涼飲料、ビール等）の場合、その他の理由により混餌投与が不適当な場合には、**水に溶解する**。飲料水に混ぜて投与する被験物質の量は、水 1 mL 当たりの被験物質の重量（mg）で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）**、前記の 2 つの方法が不十分な場合、又はヒトへの曝露が低用量の連続摂取ではなく、毎日の単回高用量摂取によってもたらされると予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同時刻に投与すること。1 回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、試験動物の大きさに依存する。強制経口投与する被験物質の用量は、強制経口投与した賦形剤 1 mL 中の被験物質の重量（mg）で表す。最後に、申請人及び届出人は、被験化合物のカプセル化又は強制経口投与が食餌又は飲料水による投与と、毒性学的に重要なすべての点において同等であると審査官が結論することができる情報を提供すべきである。あるいは、データを適切に解釈できるように、両投与方法に関する代謝情報を提供しなければならない。

C. 用量群：

性別ごとに最低 3 用量レベル（1 群につき 1 用量レベル）の被験物質を使用しなければならない。試験では同時対照群を設定すること。

1. 投与量の選択：

毒性試験の用量は、被験物質の毒性に関する情報に基づいて選択しなければならない。非げっ歯類を用いた90日間毒性試験から得られた情報は、非げっ歯類を用いた1年間毒性試験の適切な用量の決定に役立つ可能性がある（IV.C.4.b.章参照）。

毒性試験には、少なくとも3用量レベルの被験物質群及び同時対照群を使用しなくてはならない。毒性試験を計画し実施する際には、以下を考慮すること。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分高い用量でなければならない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない。及び3) 中間用量は、試験動物において最小毒性作用（酵素レベルの変化又は体重増加量のわずかな減少など）を誘発するのに十分高い用量でなければならない。意味のあるデータの評価を妨げる死亡を引き起こす用量であってはならない。被験物質の全用量群への投与は同時に行わなければならない。

2. 対照：

被験動物の同時対照群が必要である。食餌試験の対照群には基礎食餌を与える。これの例外及びその他の関連情報は、対飼養に関する説明を含むが、上記のセクション「II 試験動物、H. 食餌」に記載した。

対照群の動物には、投与したいずれかの投与群の動物に投与された担体又は賦形剤の最大量に等しい量で被験物質用の担体又は賦形剤を投与しなければならない。担体又は賦形剤については、それらの使用が試験の結果を損なわないように十分な毒性情報が利用可能でなければならない。被験物質の投与に用いた賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体又は賦形剤に曝露されない追加の対照群を組み込むべきである。その他の点では、対照群の動物には、投与群の動物と同じものを投与しなければならない。（上記のセクション「II 試験動物、H.食餌」の追加情報を参照。）

D. コンピュータ化されたシステム

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピュータ化されたシステムは、優良試験所基準に準拠した方法で開発、検証、運用、及び維持されなければならない。⁸

V. 観察及び臨床試験

A. 試験動物の観察：

試験期間中、全動物について、薬理的及び毒性学的影響の一般徴候、罹患率及び死亡率に関して少なくとも 1 日 1~2 回、通常のケージサイド観察を行わなければならない。観察間隔は通常 6 時間以上あけること。望ましくはスコア化システムを用いて、各動物の個々の記録を保管し、効果の発現時期、特徴及び進行を記録しなければならない。

一般的な薬理的及び毒性学的作用だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経機能異常、及びその他の神経系毒性の徴候も検出できるようにするため、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた短期及び亜慢性毒性試験、非げっ歯類を用いた 1 年間毒性試験、並びにげっ歯類を用いた生殖毒性試験において、ケージ内及びケージ外で実施される臨床評価の拡張セットを行わなければならない。系統的な臨床検査・所見に関する具体的な情報は、第 IV 章 C.10. に記載されている。ケージの内外で実施されるこの臨床検査の拡張セット（第 IV 章 C.10）は、年齢に適しており、投与開始前に少なくとも 1 回、及び投与中は定期的に、全動物に実施しなければならない。注意する徴候には、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の発生、並びに自律神経活動（例えば、流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸パターン）のエビデンスの変化などがあるが、これらに限定されない。さらに、歩行の変化、姿勢及びハンドリングに対する反応、並びに間代性又は強直性発作、常同行動（例えば、過度の身繕い、反復的な巡回行動）又は奇異行動（例えば、自傷、後退）の有無を記録すること。特に長期投与試験では、腫瘍の発生を追跡し、肉眼で確認できる腫瘍又は触知可能な腫瘍のそれぞれの発現時期、部位、大きさ、外観及び進行を記録すること。試験期間中に毒性及び薬理的徴候が認められた場合は、追加の臨床検査又は拡張された剖検の必要性が示唆される場合がある。

B. 体重及び摂餌量データ：

試験動物の体重は少なくとも週 1 回測定すること。1 年間の毒性試験中、1 週間ごとに摂餌量（被験物質を飲水投与する場合は飲水量）を測定する。申請人はこの情報を用いて試験の各週における被験物質の摂取量を算出する。また、申請人は、試験動物による飼料の漏出量を定量化するように努め、試験飼料の漏出量が対照飼料より多いかどうかを判断しなければならない。飼料漏出に関する適切な考察を試験報告書に含めること。

C. 臨床試験

眼科学的検査、血液学的プロファイル、臨床化学的検査及び尿検査を以下の節に記載された通りに実施しなければならない。

1. **眼科検査：** この検査は、試験開始前には全動物について、また試験終了時には対照群及び高用量群の動物について適格な担当者が実施すること。終了時検査の結果から眼の変化が被験物質投与に関連する可能性があることが示唆される場合は、試験の全動物について眼科検査を実施しなければならない。
2. **血液学的検査：** 血液サンプルは、すべての群の全動物から以下の時点、すなわち投与開始前、試験（投与）の最初の2週間、試験期間中は3ヵ月間隔、及び投与終了時に採取する。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならない。採血は各採血日のほぼ同時刻に行う。

1. 以下の測定が推奨される。

1. ヘマトクリット
2. ヘモグロビン濃度
3. 赤血球数
4. 全白血球数及び白血球分画
5. 平均赤血球ヘモグロビン量
6. 平均赤血球容積
7. 平均赤血球ヘモグロビン濃度
8. 及び凝固能の測定値（凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数など）。

被験化合物は造血系に影響を及ぼす可能性があるため、必要な場合には、網状赤血球数の評価及び骨髓細胞診の評価を実施できるよう適切な測定値を用いる。網状赤血球数は、各動物について自動網状赤血球計数能を用いて、又は風乾した血液塗抹標本から測定する。骨髓細胞診の評価のため、各動物から骨髓スライドを作製する。これらのスライドは、造血系への影響が認められた場合にのみ顕微鏡検査が必要となる。

3. **臨床化学的検査：** 血液サンプルは、すべての群の全動物から以下の時点、すなわち投与開始前、試験（投与）の最初の2週間、試験期間中は3ヵ月間隔、及び投与終了時に採取する。2回目のサンプリング時点は、臓器系に対する初期の毒性学的影響が予想される時間に基づいて決定しなければならない。イヌは一晩絶食させ、給餌前に臨床化学的試験用に採血する。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはならない。採血は各採血日のほぼ同時刻に行う。

すべての被験物質に適した臨床化学的検査には、電解質バランス、糖代謝、肝機能及び腎機能の測定などがある。具体的な測定には以下のものがある。

1. 肝細胞評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ (SGPT、ALT)
 2. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (SGOT、ALT)
 3. ソルビトールデヒドロゲナーゼ
 4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
 5. 総胆汁酸
2. 肝胆道評価：以下の5つのうち少なくとも3つを選択する
 1. アルカリホスファターゼ
 2. ビリルビン (総ビリルビン)
 3. γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GG トランスフェラーゼ)
 4. 5'ヌクレオチダーゼ
 5. 総胆汁酸
3. 細胞変化又は細胞機能のその他のマーカー
 1. アルブミン
 2. カルシウム
 3. 塩化物
 4. コレステロール (総コレステロール)
 5. コリンエステラーゼ
 6. クレアチニン
 7. グロブリン (計算値)
 8. グルコース (絶食下)
 9. リン
 10. カリウム
 11. タンパク質 (総タンパク質)
 12. ナトリウム
 13. トリグリセリド (絶食下)
 14. 尿素窒素
4. しかし、試験動物から十分な血液量が得られない場合には、通常次の測定を優先する。FDAは、被験化合物の特定の性質が代替試験を検討することの正当な理由となり得ることを理解している。代替試験については適切な根拠を試験報告書に記載すること。
 1. アラニンアミノトランスフェラーゼ
 2. アルカリホスファターゼ
 3. 塩化物
 4. クレアチニン

5. γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
6. グルコース（絶食下）
7. カリウム
8. タンパク質（総タンパク質）
9. ナトリウム
10. 尿素窒素

被験物質に起因する毒性作用の探索を拡大するため、追加の臨床化学的検査が推奨される場合がある。特定の試験の選択は、被験物質の作用機序に関する所見に影響される。臨床化学的測定法のうち、被験物質の毒性学的評価が適切であることを保証するために推奨されるものは、酸塩基平衡、ホルモン、脂質、メトヘモグロビン及びタンパク質の分析などがある。

標準操作手順書及び機器の校正にもかかわらず、日々の臨床化学的分析の結果に大きな変動が認められることは珍しいことではない⁹。理想的には、すべての投与群の臨床化学的検査は1日で完了すること。これが不可能な場合は、潜在的な変動を最小限にするような方法で分析を実施すべきである。

4. **尿検査**：試験の全動物に、投与前、3ヵ月間隔及び試験終了時に定時尿量採取を行う。採取した尿の量、比重、pH、グルコース及びタンパク質を測定するとともに、沈渣及び血液・血球細胞の有無について尿の顕微鏡検査を行う¹⁰。
5. **神経毒性スクリーニング・検査**：神経毒性作用のスクリーニングは、イヌ及び他の非げっ歯類（ミニブタが望ましい）を用いて定期的実施しなければならない。神経毒性スクリーニングは年齢に応じたものとし、通常は以下のものが含まれる：（1）脳、脊髄及び末梢神経系の主要領域を代表する組織サンプルの特異的病理組織学的検査（以下のVI.C.顕微鏡検査のための組織の調製に基づいて以下に記載された臓器及び組織を参照）及び（2）神経学的、行動的及び生理的機能障害の徴候を検出するために選択した定量可能な観察及び操作試験の機能バッテリー。この機能バッテリーは、臨床評価の拡張セットとも呼ばれ、セクションV章A.でより詳細に説明する。この章及び第IV章C.10.の試験動物の観察。神経毒性試験。

1年間毒性試験の報告には、被験物質が神経系の構造的又は機能的完全性に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、神経毒性スクリーニングから得られたデータ及び試験から得られたその他の毒性データを適宜評価する必要がある。この評価に基づいて、申請人は、被験物質が神経

毒性の危険性を示すかどうか、及び追加の神経毒性試験が適切であると考えられるかどうかについて明確に述べる必要がある。FDAは、まず当局に相談して、追加の神経毒性試験を行うよう推奨している。

6. **免疫毒性**：免疫毒性の主要な指標のリスト（「レッドブック II」1993年版草稿の第V章C.を参照）に記載されている検査の結果も、免疫毒性スクリーニングの一環として評価しなければならない。1年間毒性試験の報告には、被験物質が免疫系に悪影響を及ぼす可能性の評価を含めなければならない。この評価では、必要に応じて、免疫毒性スクリーニングに含まれる主要な指標のリストのデータ及び試験のその他の毒性データを評価しなければならない。この評価に基づき、申請人及び届出人は、被験物質がさらなる免疫毒性試験を必要とする潜在的な免疫毒性の危険性を示すか否かについて明確に記述しなければならない。追加の免疫毒性試験については、「レッドブック II」1993年版草案の第V章C.で考察されているが、まず当局に相談して実施しなければならない。

VI. 剖検及び顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

すべての被験動物について、外面、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔、死体、並びにすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を実施する病理学者によって、又はその直接の指示の下で実施すべきである（下記参照）。

B. 臓器重量

重量を測定すべき臓器は、副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮などである。臓器は慎重に切除し、トリミングして脂肪やその他の隣接組織を除去した後、臓器重量への影響を最小限に抑えるため速やかに直ちに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査用の組織の調製

通常、以下の組織を10%緩衝ホルマリン液（又は一般に知られている他の固定液）で固定し、切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン（又は他の適切な染色液）で染色して鏡検用標本とする。肺は固定液に浸漬する前に固定液で膨張させる。

1. 副腎

2. 大動脈
3. 骨（大腿骨）
4. 骨髄（胸骨）
5. 脳（異なる3以上のレベル）
6. 盲腸
7. 結腸
8. 子宮体部及び子宮頸部
9. 十二指腸
10. 精巣上体
11. 食道
12. 目
13. 胆嚢（存在する場合）
14. 心臓
15. 回腸
16. 空腸
17. 腎臓
18. 肝臓
19. 肺（主気管支を伴う）
20. リンパ節（投与経路関連が1つ、遠隔部位由来が1つ）
21. 乳腺
22. 鼻甲介
23. 卵巣及び卵管
24. 膵臓
25. 下垂体
26. 前立腺
27. 直腸
28. 唾液腺
29. 坐骨神経
30. 精嚢（存在する場合）
31. 骨格筋
32. 皮膚
33. 脊髄（頸部、胸中部、腰部の3か所）
34. 脾臓
35. 胃
36. 精巣
37. 胸腺（又は胸腺領域）

38. 甲状腺・副甲状腺
39. 気管
40. 膀胱
41. 膣
42. 異常が認められたすべての組織

D. 顕微鏡評価

肉眼的病変はすべて顕微鏡下で検査しなければならない。対照群及び高用量群の動物から採取したすべての組織を検査することが必要である。特定の組織に投与に関連した影響が認められた場合は、その特定の組織の次に低い用量レベルについて検査する。影響が認められなくなるまで、その次に低い用量レベルの逐次的検査を継続する。さらに、早期に死亡した動物又は試験中に屠殺した動物から採取したすべての組織を顕微鏡で検査し、あらゆる潜在的な毒性作用を評価する。

E. リンパ器官の病理組織学的検査

リンパ器官の病理組織学的評価は、免疫毒性試験のセクション（「レッドブック II」1993年版草案の第 V 章 C.参照）に記載されているように、全動物に実施しなければならない。

レッドブック 2000: IV C.6.げっ歯類を用いたがん原性試験

2006 年 1 月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN):
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

2006 年 1 月

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.6 げっ歯類を用いたがん原性試験

- I. [優良試験所基準](#)
- II. [試験動物](#)
- III. [被験物質](#)
- IV. [試験設計](#)
- V. [観察と臨床試験](#)
- VI. [剖検と顕微鏡検査](#)
- VII. [参考](#)

本ガイダンスは、このトピックに関する食品医薬品局（FDA）の現在の考え方を表している。このセクションの 1993 年の「草案」版 Redbook への変更は、他の権威あるガイドラインや出版物を参考に、科学的に正当化されたものである。

最も懸念レベルの高い食品成分（例えば、懸念レベルⅢの直接食品添加物、累積曝露量が 1ppm 以上の間接食品添加物）については、2 匹のげっ歯類（通常はラット及びマウス）を用いたがん原性試験（バイオアッセイ）が推奨される。がん原性試験（できればラットを対象とした）は、慢性毒性試験（第 IV.C.7 章参照）と組み合わせても

よい。食品成分への曝露は生命の全段階で起こるという事実から、がん原性試験に胎内曝露を含めることを当局は推奨する（詳細は第 IV.C.8 章に含まれる）。これらの研究は、げっ歯類に定期的に反復経口投与した場合、食品成分ががん原性活性を有するかどうかを、試験動物の「生涯」にわたって判定することを目的としている。

I. 優良試験所基準

本章で説明する非臨床試験は、連邦規則集第 58 部タイトル 21 の下に発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施されるべきである。この文書は、米国政府印刷局文書管理局（Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 20402）（フリーダイヤル 866-512-1800）から入手することができる。他の国際的・国内的なガイドラインの下で実施された試験は、米国 FDA の GLP 規制の下で実施された試験と同等とみなされる場合がある。FDA GLP 規制への不適合の特定の領域については、議論し、正当化する必要がある。

II. 試験動物

A. 手入れ、メンテナンス、飼育：

米国学術研究会議「Guide for Care and Use of Laboratory Animals」記載されている動物の世話、維持、および収容に関する推奨事項について、本章の特定の推奨事項と矛盾しない限り、これに従うべきである。

B. 種と系統と性別の選択：

本章に記載されているガイドラインは、マウスとラットを用いた研究を対象としているが、他のげっ歯類を使用する場合には、変更が必要な場合がある。健康で、それ以前の実験操作を受けていない雄と雌の両方の試験動物を使用する必要がある。

毒性試験に使用するげっ歯類の種、系統、および亜系統を選択する際には、被験動物の一般的な感受性、および有毒化学物質に対する被験動物の特定の器官や組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験のための近交系、非近交交系、または交雑したのげっ歯類の系統の選択は、答えるべき科学的な疑問に基づいて行うべきである。さらに、試験動物は、十分に特徴づけられた健康な集団（コロニー）から来たものであることが重要である。最近の情報によると、ラットのいくつかの系統には生存率の問題があることが示唆されているため、試験動物は、推奨される試験期間中に生存する可能性が高いものを選択すべきである（第 II.D.項「数と性別」及び第 IV 章 A 「試験期間」の議論を参照のこと）。特定の種、系統、または亜系統の適切性について

て疑問がある場合には、毒性試験を開始する前に当局の科学者に相談することを推奨する。

当局内の別のセンター（FDA 医薬品評価センター）では、パイロットプログラムの一環として、遺伝子組み換えマウス（トランスジェニックマウス）を用いた6ヶ月間の試験の安全性データを、げっ歯類がん原性試験の1つの代替として受け入れている⁵。食品添加物安全性局は、この種の情報を補足的なデータとしてのみ考慮するが、このような研究を2年間のげっ歯類がん原性バイオアッセイの代用とは考えていない。トランスジェニックげっ歯類がん原性または突然変異誘発性試験からのデータは、作用機序または組織分布に関連する化合物特有の疑問を評価するのに有用である可能性がある。特定の種類の食品成分（すなわち、成分もしくは汚染物質）の発がんリスクを決定するためには、トランスジェニックマウスモデルは、定量的な用量反応データを提供しないという点で不適切である。また、現時点では、ほとんどの国内及び国際的な検証機関（例えば、代替方法の検証に関する省庁間調整委員会の代替毒理学的方法¹²に関する科学諮問委員会）や試験所で完全には検証されておらず、受け入れられていない。現時点では、ベースラインパラメータを確立するための過去の管理データの大規模な保存場所は存在しない。食品成分の消費パターン（すなわち慢性的な生涯曝露）の性質を考えると、食品成分の安全性評価には、完全に検証された試験システムから得られた定量データのみを使用することを要求することに加えて、ヒトの生涯曝露を代表するような食品成分の慢性的な安全性試験を要求する必要がある。

C. 年齢（投与開始）：

げっ歯類への投与は、離乳後、少なくとも5日間の適切な順応期間を経て、約6~8週齢になる前に開始する必要がある。

D. 数および性別：

実験群及び対照群は、試験開始時に十分な数の動物を用意し、各群の性につき少なくとも25匹のげっ歯類が試験終了時まで生存するようにしなければならない。十分な数の動物を試験の最後まで生存させることにより、被験物質に関連した腫瘍の発生を客観的に評価することができる。生存率は、過剰な体重増加（例えば、肥満に関連した下垂体の変化）の結果として、あるいは他のストレス要因（例えば、寄生虫感染）の後遺症として発生する可能性のある、非化合物に関連した動物の病理を減少させることによって改善させることができる。

一部の系統は他の系統よりも生存率に深刻な問題があるため、当局は申請人もしくは届出人ががん原性バイオアッセイ用のラット系統の選択を慎重に検討することを推奨する。がん原性試験は、各群の性別ごとに少なくとも 50 頭の動物から開始することが推奨される。申請人もしくは届出人は、試験に使用したラット株で生存率が問題となると予想される場合には、1 群の性につき 50 頭以上の動物を用いてバイオアッセイを開始することが推奨される。試験終了時（24 ヶ月、項 [IV.A: 試験期間](#) を参照）までに生存する動物が各群の性につき 25 匹未満であると予想される場合には、申請人もしくは届出人は、ケージサイドでの観察を注意深く頻繁に行うことで動物の死亡を早期に発見し、記録に残すよう特に注意を払うべきであり、その結果、自己分解による組織の損失を最小限に抑えることができる。さらに、がん原性試験における生存率の問題が明らかになったら、すぐに当局に相談すべきである。

中間的な剖検が計画されている場合は、試験終了前に犠牲になる予定の数だけ、各群の各性のげっ歯類の総数を増やすべきである。中間剖検を行う場合は、各群の性ごとに最低 10 匹のげっ歯類を用意すべきである。

E. 感染動物：

一般的に、治療に使用される化合物と被験物質との相互作用の可能性がない限り、試験中に感染症のために動物を治療することはできない。この相互作用は、試験結果の解釈を著しく混乱させたり、複雑にしたりする可能性がある。しかしながら、感染症の問題が発生した場合には、試験依頼者は最善の判断で試験を進めるべきであり、その決定を当局に通知すべきである。加えて、感染の正当性と考えられる意味合い及び該当する場合には感染の治療の正当性と考えられる意味合いについて、完全かつ詳細な説明を提供することを当局は要請する。

F. 動物の識別：

試験動物は、その種、系統（および亜系統）、性別、年齢、体重を参照して特徴付けを行う必要がある。各動物には、固有の識別番号（例えば、耳タグ、埋め込み型識別チップ、入れ墨）を割り当てる必要がある。

G. 飼育

動物はケージごとに 1 匹ずつ収容すること。この推奨は、以下の 3 つの考慮点を反映している。

- 1つのケージに2頭以上の動物を収容した場合、試験の各動物が消費した飼料の量を算出することができない。この情報は飼料効率（消費飼料と体重増加の関係）を判定するために必要な情報である。
- 体重増加の減少が口当たりの低下によるものか、被験物質が媒介する毒性によるものかを判断する際の交絡分析の可能性を最小化する。
- 死にかけた動物や死んだ動物の臓器や組織は、単一ケージに入れておけば共食いによって失われることはない。

H. 食餌

一般的に、飼料と水は断続的に与えられるべきであり、飼料はその種¹³の正常な成長と長寿のための栄養要求を満たすべきである。他に正当化する特別な状況が適用されない限り、被験物質投与群の動物の飼料には、対照群の飼料と同レベルのカロリーと栄養素（例えば、食物繊維、微量栄養素）が含まれていることを確認するように注意を払うべきである。飼料変数の管理が不十分な場合、栄養の不均衡又はカロリー欠乏が生じ、毒性試験結果の解釈を混乱させ（例えば、寿命、バックグラウンドでの腫瘍発生率）、試験の結果及び再現性を変化させる可能性がある。しかしながら、カロリー制限食^{14,24}や低タンパク食^{15,16}を与えた特定の動物種の生存率に有益な効果があることも認識している。依頼者が食事に関する十分な過去の対照データを提供し、研究が十分に実施されている場合には、このような研究結果を認めることができる。

がん原性試験で動物用の食餌を設定する際には、以下の問題を考慮することが重要である。

被験物質がカロリー値を持たず、飼料のかなりの量（例えば、5%以上）を構成している場合、高用量飼料のカロリー値及び栄養密度の両方が他の群の飼料と比較して希釈されるであろう。その結果、一部の高用量動物は、このように希釈された飼料を断続的に与えられた動物が、高用量飼料のエネルギーおよび栄養素含有量の違いを補うために、他の投与群の動物よりも多くの量を食べる可能性があるため、予想よりも高い被験物質の投与量を受ける可能性がある。このような状況では、観察された変化が被験物質のあからさまな毒性によるものなのか、あるいは食餌の不均衡によるものなのかを判断するために、これらの動物の飼料消費量を可能な限り正確かつ綿密にモニターすることが特に重要である。この評価をさらに支援するために、以下の2つの対照群を使用することができる。1つは希釈されていない対照飼料を与えられた群、もう1つは飼料中の被験物質の最も高い割合に等しい割合で不活性充填剤（例えばメチルセルロース）を補充した対照飼料を与えられた群である。

被験物質の賦形剤が、対照飼料よりも大きいカロリーもしくは栄養価を有することが予想される場合には、カロリーもしくは栄養成分の調整が必要になる可能性もある。

被験物質の投与により、不快な味や食感により飼料摂取量に影響を及ぼすことが予想される場合には、他の給餌レジメンや 実験計画が必要となる場合がある。代替案を検討する場合には、当局との協議が推奨される。

被験物質が栄養素の吸収を阻害し、栄養不足や栄養比の変化を引き起こす場合、検討中の毒物学的エンドポイントの評価を混乱させる可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、大部分が吸収されない鉱物油や脂肪代替物と優先的に分離し、その結果、これらのビタミンの潜在的な欠乏が生じる可能性がある。このような潜在的な欠乏は、被験物質を投与された群の飼料の栄養強化を追加することで解消される可能性がある。

適切な栄養強化のレベルは、実験的に決定されるべきである。

その他の関連する問題（例えば、天然成分と精製飼料の使用の利点と欠点）については、実験動物の栄養所要量に関する米国国立研究会議（National Research Council）の出版物で議論されている¹³。

I. コントロール動物と化合物投与動物の割り当て

動物は、層化されたランダムな方法で対象群と化合物投与群に割り当てられるべきである。これは、バイアスを最小化し、化合物投与群と対照群の間での関連変数の比較可能性を保証するのに役立つ。一般に、平均体重もしくは体重範囲がランダム化の基礎としなる。他の特性をランダム化の基礎として使用する場合は、それらを説明し、正当化する必要がある。

すべてのグループの動物は、同じ日に実験に使われるべきである。研究中の動物の数が多いためにこれが不可能な場合は、動物を数日に渡って実験に使うことができる。後者の推奨に従う場合には、対照動物と実験動物の事前に選択された部分を毎日研究に、一致を維持する必要がある。

J. 死亡率

動物の管理が悪いことによる過剰な死亡率は受け入れられず、実験の繰り返しを招くことになるだろう。

K. 自己融解

適切な動物飼育の実践により、自己融解による動物、組織や臓器の損失は 10%を大幅に下回らなければならない。この基準を超えた自己融解は、試験を繰り返す原因となる。

L. 剖検

剖検は、動物が犠牲になった後、または死体が発見された後すぐに行うべきであり、そうすれば自己融解による組織の損失を最小限に抑えることができる。剖検をすぐに実行できない場合は動物を、自己融解を防ぐのに十分低い温度（すなわち、4°Cから 8°Cの間）で冷蔵する必要があるが、細胞損傷を引き起こすほど低くはない。組織病理学的検査を行う場合は、剖検を行う際に動物から組織標本を採取し、適切な固定剤に入れておく。

III. 被験物質

がん原性試験に使用される被験物質は、申立人もしくは届出人が販売する予定の物質と同じものでなければならないが、適切な場合、被験物質は構成化学物質または不純物であってもよい。試験中は、単一ロットの被験物質を使用すべきである。それが不可能な場合は、純度及び組成が可能な限り類似しているロットを使用しなければならない。被験物質の純度、存在する可能性のある不純物の正体と濃度を動物試験施設に通知することは、申請人もしくは届出人の責任である。

A. 同一性：

被験物質又は試験対象物質の混合物の同一性を知る必要がある。我々は、申立人もしくは届出人に対し、試験化合物の決定について当局と協議し、関連するすべての CAS (Chemical Abstract Service) 登録番号を提供することを強く求める。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称と量、既知の汚染物質と不純物、特定できない物質の割合を含めて既知でなければならない。

C. 保存条件：

試験サンプルは、試験が完了するまでの間、安定性と純度を維持できる条件で保管する必要がある。

D. 使用期限：

試験材料の使用期限を把握し、容易に入手できるようにしなければならない。被験物質は、その使用期限を過ぎて使用してはならない。

IV. 実験設計

A. 実験期間：

試験動物は、週7日間、104週連続（2年）、または動物の寿命まで被験物質に曝露されるべきである。一般に、生存率の低下を理由にがん原性試験を早期に終了することは推奨しない（II.D.項 [section II.D: 数と性別](#)を参照）。がん原性バイオアッセイは、試験動物の寿命の大部分において実施されるべきである。試験の最後まで最適な数の動物を生存させることが望ましいが、本ガイドラインで推奨されているがん原性バイオアッセイを可能な限り長期間、あるいは24ヶ月間実施することにより、感度の向上とともに、より多くの利益が得られると当局は考えている。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は通常のヒトへの曝露に近いものとし、可能であれば経口投与とする。他の経路を使用する場合には正当な理由を示すべきである。投与方法は、試験期間中、すべての被験動物に同一の方法を用いること。被験物質は以下のいずれかの方法で投与する。

- **食餌中**：固形食品又は固形食品と液体食品の組み合わせで被験物質に曝露する可能性が高い場合。被験物質を飼料に添加する場合、動物が色、におい、粒子径に基づいて、基底飼料または飼料中の被験物質のいずれかを選択的に摂取できないようにすべきではない。化合物を粉碎飼料と混合してペレット化する場合、ペレット化の過程で被験物質に影響を与えるものはないはずである（例えば、ペレット化の際に蒸気工程で熱に弱い物質が破壊される可能性がある）。被験物質を飼料中に投与する場合、飼料レベルは飼料 kg 当たりの被験物質の mg で表されるべきである。
- **飲料水に溶解させる**：被験物質が液状でヒトに摂取される可能性がある場合（清涼飲料水やビールなど）、またはげっ歯類の食餌中への投与が不適切な場合。被験物質の飲料水への投与量は、水 1ml 当たりの被験物質 mg で表す。
- **カプセル化又は経口挿管（強制経口投与）による投与**：前記2つの方法では満足できない場合、又はヒトへの曝露が、少量を継続的に摂取するのではなく、1日に1回の多量のボラスを摂取することによるものであると予想される場

合。被験物質を経管投与する場合は、毎日ほぼ同じ時間に投与する。一回の投与で経腹投与できる溶液の最大量は、被験動物の大きさに依存するが、げっ歯類の場合、通常、1ml/100gの体重を超えてはならない。経口投与する賦形剤が油である場合、その量は0.4ml/100g体重を超えてはならず、低脂肪食の使用を考慮すべきである。被験物質を分割投与する場合は、すべての投与量を6時間以内に投与する。投与される被験物質の投与量は、投与用賦形剤1 mLあたりの被験物質のmgで表されるべきである。最後に、申立人及び届出人は、カプセル化又は経管投与による被験物質の投与が、毒性学的に重要な点では、食餌又は飲料水での投与と同等であると当局が結論づけることができる情報を提供しなければならない。あるいは、データの適切な解釈ができるように、両方の投与方法に関する代謝情報を提供すべきである。

C. 投与群：

1. 投与容量の選択

長期毒性試験の用量選択は、亜慢性試験の結果及びその他の関連する被験物質情報に基づいて行うべきである。

がん原性バイオアッセイでは、3～5種類の用量レベルの被験物質と並行対照群を用いるべきである。がん原性バイオアッセイを計画し実施する際には、次のことを考慮すべきである。1)高用量（最大許容用量）は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分な高用量であり、試験データの意味ある評価を妨げるほどの高致死率を引き起こしてはならない、2)低用量は、試験動物に毒性反応を誘発してはならない、3)中間用量は、試験動物に最小限の毒性影響（酵素レベルの変化や体重増加のわずかな減少等）を誘発するのに十分な高用量である。すべての用量群への被験物質の投与は同時に行うべきである（第 II.I.項：[対照動物と化合物投与動物の割り振り](#)を参照）。

高用量： 高用量は最大許容用量（MTD）とする。

被験物質の毒性とは無関係な情報に基づいてがん原性バイオアッセイの用量を選択することは認められない。例えば、がん原性試験の最高用量は、その用量での試験結果が陰性であると仮定して、被験物質に対するヒトの予想最大曝露量よりもあらかじめ決められた安全性の余裕を提供するように選択すべきではない。

本ガイドラインでは、がん原性バイオアッセイにおける最高用量を MTD とすべきであると推奨している。食品中の物質のがん原性バイオアッセイの結果を評価する際、当局の科学者は、バイオアッセイの結果の解釈に影響を与えるいくつかの要因の一つ

として、その物質が MTD で試験されたかどうかという疑問を考慮する。バイオアッセイには、試験のために MTD を選択するために使用したプロセスの説明を含めるべきである。

米国国家毒性プログラム（NTP）による MTD の定義は、「最高用量として慢性試験の期間中に投与した場合、新生物の誘発以外のいかなる毒性作用によっても処理された動物の寿命を短縮しない用量」である¹⁷。科学技術政策局は次のようなアドバイスをしている。「最高用量は、必要に応じて十分な慢性前試験を行い、その他の関連情報を評価した後に選択すべきであり、がんの誘発の可能性に対する結果を除いて、予測される最小標的臓器毒性および通常の寿命と一致する最高用量を決定すべきである。¹⁸」また、NTP は、MTD が試験結果の解釈に支障をきたすような重篤な毒性の形態学的証拠を引き起こすべきではないと注意を促している。¹⁷

一般的に、MTD は以下の適切な亜急性毒性試験のデータを慎重に分析した上で推定される。毒性試験に関する科学界の経験が蓄積されるにつれ、MTD を選択する際には幅広い生物学的情報を考慮する必要性がますます明らかになってきている。例えば、体重や臓器の変化、血液学的、尿学的、臨床化学的測定における臨床的に有意な変化に関するデータは、より明確な毒性、総体的または病理組織学的エンドポイントと組み合わせ、MTD を推定するために使用することができる。

がん原性試験では、MTD を達成するために高用量を選択すべきであるが、この目標が常に達成されるとは限らないことを認識している。短期試験の結果から長期バイオアッセイの MTD を予測することには不確実性がある。MTD の実用的な定義には科学的な判断が必要であるため、同じデータを見ている有能な研究者でも、MTD の推定値が大きく異なる場合がある。このような意見の相違は、代謝研究の結果の解釈の違いや、臓器の変化が適応的なものか毒物学的なものかについての結論の違いに基づいている可能性がある。このような状況では、被験物質のどの用量が MTD であるかが不明な場合、申請人及び届出人は、がん原性バイオアッセイの適切な高用量（MTD）を決定するために当局に相談すべきである。

がん原性バイオアッセイにおける MTD の使用にはいくつかの利点があることを認識している。

- 試験に使用されたげっ歯類の数が比較的少ないことなど、バイオアッセイの固有の感度の低さを補う。

- 毒性学で使用される他のモデルとの整合性（例えば、推定毒性の証拠を引き出すために十分な量の高用量を使用すべきであるとか、稀な腫瘍を検出して弱いがん原性物質を特定する確率を高めるために）。
- データが異なる研究から収集された場合でも、MTD で試験された物質のがん原性力の比較を許可する [19](#)。

MTD でがん原性試験を実施するように勧告した結果、動物またはヒトにおける低用量での被験物質の毒性を表現できないほど高用量を使用することになる可能性があることを認識している。例えば、被験物質の過剰な高用量は、被験物質の解毒に参与する酵素系を飽和させる可能性がある。以上のことから、十分な内部評価を行い、他の権威ある機関との合意を得た上で [9.10](#)、MTD ががん原性試験のための高用量を選択するための最良の選択であると結論付けている。これは、医薬品安全性試験のための高用量を選択する際に MTD を使用することを推奨している国際調和会議の結論とも一致していることに留意すべきである [7.8](#)。

低用量

低用量レベルは、試験動物の正常な成長、発育、寿命を阻害してはならず、また、毒性の兆候を生じさせてはならない。

中間用量

中間投与量は、毒性の兆候を最小限に抑えるべきである。中間用量として選択される正確な用量は、被験物質の薬物動態学的特性に依存する。

任意の第 4 投与レベル

高用量及び低用量で投与した被験物質の薬物動態又は代謝プロファイルに有意な差が存在する場合、任意の（第 4 の）用量レベルを試験に含めることができる。この用量レベルは、低用量で得られたプロファイルに類似した薬物動態又は代謝プロファイルをもたらす最高用量でなければならない。任意群の試験動物の数は、高用量群が提供するのと同様同じ感度で被験物質のがん原性効果の検出を提供するように選択されるべきである。

2. 対照群：

基礎食を与えた同時対照群の試験動物が必要とされる。被験物質の担体また賦形剤は、対照群の動物に投与される担体または賦形剤の最大量に等しい量で投与されるべ

きである。担体又は賦形剤の使用が試験結果を損なうことがないように、担体又は賦形剤に関する十分な毒物学的情報が入手可能でなければならない。被験物質の投与に使用した賦形剤の毒性特性に関する情報が不十分な場合は、担体または賦形剤に曝露されていない追加の対照群を含めるべきである。他のすべての点において、対照群の動物は、投与群の動物と同じように扱われるべきである。(II.H : [飼料](#)も参照のこと。)

D. システムのコンピューター化

データの生成、測定、又は評価に使用されるコンピューター化されたシステムは、優良試験所基準 (GLP) の意図に合致した方法で開発、検証、運用、及び維持されるべきである²⁰。FDA は、動物試験データの電子的送信に SEND (Standard for Exchange of Nonclinical Data) フォーマットを使用することを認めている。この電子プロトコルの詳細については、FDA に問い合わせること。

V. 観察と臨床試験

A. 観察と試験動物 :

通常の行動からの逸脱の兆候、罹患率や死亡率を調べるために、研究期間中、1日に1、2回、ケージ内のすべての動物をケージ内で定期的に観察する必要がある。複数の観察期間中の通常の間隔は少なくとも6時間とする。各動物について個別の記録を維持し、可能な限りスコアリングシステムを使用して、影響の発現と進行を記録する必要がある。目に見える腫瘍が発生した場合は、以下のパラメーターを記録する必要がある。

発症時刻、位置、大きさ、外観および進行。

B. 体重と飼料摂取データ :

これらの変数の変化が毒性の最初の兆候であることが多いため、試験動物に対する化合物の効果を客観的に評価するには、正確な個体の体重、飼料、および水の消費量の測定が重要である。これらのパラメーターの完全な記録は、毒性による変化の経時的な発生を評価する上で不可欠である。これらのデータが注意深く記録されていないと、被験物質の全体的ながん誘発性ポテンシャルの評価が損なわれる可能性がある。飼料消費及び体重増加もしくは損失に影響を与える変数のいくつかについては、II.H : [飼料](#)及び IV.B : [投与経路](#)の項に記載されている。

すべての試験動物の体重は、最初の 13 週間は毎週記録し、その後、試験期間中は毎月記録する。飼料消費量（被験物質が飲料水に投与されている場合は水消費量）は体重と同じ間隔で測定すべきであり、申立人及び届出人は、被験動物による飼料の流出量の定量化も試みるべきである。1)飼料の口当たりの問題、2)体重の著しい変化、または 3)動物の死亡数の増加のいずれかによって試験化合物の投与が影響を受ける可能性があると思われる場合、申立人/届出人は、最初の 13 週間の期間の後、体重および飼料（水）消費量をより頻繁に測定すべきである（例えば、2 週間ごと）。また、申立人及び届出人は、この蓄積された情報を用いて被験物質の摂取量を計算すべきである。

C. 臨床試験：

眼科検査、血液学的プロファイル、臨床化学検査、尿検査は、以下の項目に記載されているように行うこと。

1. 眼科検査：

この検査は、試験開始前にはすべての動物に対して、試験終了時には対照動物及び高用量動物に対して、資格を有する者が実施すべきである。試験終了時の検査の結果、被験物質の投与に関連して目の変化がある可能性があることが示された場合には、試験に参加しているすべての動物に対して眼科検査を行うべきである。

2. 血液学的検査：

血液学的検査は、各群の性につき少なくとも 10 匹の動物について、試験の最初の 2 週間の間、および試験中の 3、6 および 12 ヶ月の間に行うことが望ましい。最初のサンプリングの時期は、短期試験の試験結果に基づいてもよい。12 ヶ月間の測定で懸念されるデータの傾向又は有意なパラメーターの変化（生物学的又は統計学的）が観察された場合には、18 ヶ月間の測定を含めるべきである。他の臨床試験との整合性を図るために、18 ヶ月時点でデータの傾向または有意なパラメーターの変化が観察された場合には、試験終了時に追加の血液学的検査を実施すべきである。

理想的には、各採取時期に同じげっ歯類をサンプリングすべきである。血液サンプルは個別に分析すべきであり、プールしてはならない。動物の数が多いため、各採血ポイントで連続した 1 日以上血液サンプルを採取する必要がある場合は、毎日ほぼ同じ時間に採血する必要がある。

ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および差動白血球数、平均皮質ヘモグロビン、平均皮質体積、平均皮質ヘモグロビン濃度、血小板数、および凝固電位の測定値（例えば、凝固時間、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）を測定することが推奨される。

被験物質は造血系に影響を及ぼす可能性があり、したがって、必要に応じて網小球数および骨髓細胞診の評価を実施できるように、適切な測定法を採用すべきである。網赤血球数は、自動化された網赤血球数測定機能を使用して、各動物について、または空気乾燥血液塗抹から取得する必要がある。細胞学的評価のための骨髓スライドを各動物から調製する必要がある。これらのスライドは、造血系への影響が指摘されている場合にのみ、顕微鏡で検査する必要がある。

3. 臨床化学：

臨床化学試験は、試験の最初の2週間の間、及び試験中の3、6及び12ヶ月の間に、各群の性別ごとに少なくとも10匹の動物に対して実施されるべきである。最初のサンプリングの時期は、短期試験の試験結果に基づいてもよい。12ヶ月間の測定で懸念されるデータの傾向又は有意なパラメーターの変化（生物学的又は統計学的）が観察された場合は、18ヶ月間の測定を含めるべきである。18ヶ月の測定でデータの傾向または有意なパラメーターの変化が観察された場合は、試験の終了時に追加の臨床化学試験を実施すべきである。

理想的には、各採取時期に同じげっ歯類をサンプリングすることが望ましい。血液サンプルは絶食時間の終了時と給餌前に採取する。絶食期間は、種および実施する分析試験に適したものでなければならない。血液サンプルは個別に分析し、プールしてはいけない。研究中に複数の日に動物を採血する場合は、採血日ごとにほぼ同じ時間に採血する必要がある。

すべての被験物質に適切な臨床化学検査には、電解質バランス、栄養素代謝、肝機能および腎機能の測定が含まれる。具体的な測定には以下のものが含まれるべきである。

肝細胞の評価（以下の5つのうち少なくとも3つ）

- アラニンアミノトランスフェラーゼ（SGPT、ALT）
- アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（SGOT、AST）
- ソルビトールデヒドロゲナーゼ
- グルタミン酸脱水素酵素

- 総胆汁酸

肝機能評価（以下の5つのうち3つ以上）

- アルカリホスファターゼ
- ビリルビン（総量）
- γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GG トランスフェラーゼ）
- 5'ヌクレオチダーゼ
- 総胆汁酸

細胞の変化や細胞機能の他のマーカー

- アルブミン
- カルシウム
- 塩化物
- コレステロール（総量）
- コリンエステラーゼ
- クレアチニン
- グロブリン（計算される）
- ブドウ糖（絶食動物の場合）
- リン
- カリウム
- タンパク質(総量)
- ナトリウム
- トリグリセリド（空腹時）
- 尿素窒素
- 被験物質の特定の性質により、代替試験の検討が正当化される可能性があることを理解している。代替試験のための適切な正当性は、試験報告書に記すべきである。

標準的な操作手順と機器の校正にもかかわらず、臨床化学分析の結果には日によってかなりのばらつきが見られることは珍しくない。²¹ 理想的には、すべての投与群の臨床化学分析は1日の間に完了するべきである。それが不可能な場合は、ばらつきの可能性を最小限に抑えるような方法で分析を行うべきである。

4. 尿検査：

採取した尿量、尿比重、pH、グルコース、蛋白質の測定、および沈殿物や血液もしくは血球の存在を調べるための尿の顕微鏡分析を、投与前、試験期間中の3、6及び12ヶ月間に行うことが推奨される。²² 12ヶ月目の測定時に懸念されるデータの傾向又は有意なパラメーターの変化（生物学的又は統計学的）が観察された場合には、18ヶ月目の測定を含めるべきである。18ヶ月の測定でデータの傾向または有意なパラメーターの変化が観察された場合は、試験終了時に追加の尿検査を実施すべきである。これらの試験は、各群の性につき少なくとも10匹の動物に対して実施するべきである。

VI. 剖検と顕微鏡検査

A. 総解剖

すべての試験動物は、外面、開口部、頭蓋、胸腔、腹腔、枝肉、およびすべての臓器の検査を含む、完全な総解剖を受けるべきである。剖検は、有資格の病理医、好ましくは後に顕微鏡検査を行う病理医によって、またはその直接の監督の下で行われるべきである。

B. 臓器の重量

計量すべき臓器には、副腎、脳、副睾丸、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、甲状腺・副甲状腺、胸腺がある場合は胸腺、卵巣、子宮が含まれる。体重を量る前に、臓器を慎重に解剖し、脂肪やその他の連続した組織を取り除くためにトリミングする必要がある。臓器の重量に対する乾燥の影響を最小限に抑えるために、臓器は解剖後すぐに計量する必要がある。

C. 顕微鏡検査のための組織の調整

一般的に、以下の組織は、顕微鏡検査の準備のために、10%緩衝ホルマリン（または別の一般的に認識されている固定剤）と調製され、ヘマトキシリンおよびエオジン（または別の適切な染色）で染色された切片で固定されるべきである。肺は、前に固定剤に浸漬する前に固定剤で膨らませる必要がある。

- 副腎
- 大動脈
- 骨（大腿骨）
- 骨髄（胸骨）
- 脳（最低でも3段階のレベル）
- 盲腸

- 大腸
- 子宮体と子宮頸部
- 十二指腸
- 精巣上体
- 食道
- 眼
- 胆のう（存在する場合）
- ハードリアン腺
- 心臓
- 回腸
- 空腸
- 腎臓
- 肝臓
- 肺（主幹気管支を含む）
- リンパ節（投与経路に関連するものが一つ、遠いところにあるものが一つ）
- 乳腺
- 鼻甲介
- 卵巣・卵管
- 膵臓
- 下垂体
- 前立腺
- 直腸
- 唾液腺
- 坐骨神経
- 精嚢（存在する場合）
- 骨格筋
- 皮膚
- 脊髄（頸椎、中胸椎、腰椎の3箇所）
- 脾臓
- 精巣
- 胸腺（あれば）
- 甲状腺・副甲状腺
- 胃
- 機関
- 膀胱
- 膣

- ジンバル腺
- 異常を示す全組織

D. 顕微鏡評価

すべての病変は顕微鏡で検査されなければいけない。対照群および高用量群の動物のすべての組織を検査すべきである。特定の組織で治療に関連した影響が指摘された場合は、次の低用量レベルで検査された特定の組織を検査すべきである。次の低用量レベルの連続的な検査は、効果が認められなくなるまで継続する。さらに、試験中に早死にした動物または犠牲になった動物のすべての組織を顕微鏡で検査すべきである。病理的病変及び統計的結果のレビュー及び解釈に関連する質問がある場合は、レッドブック 2000 の第 IV.B.3 章及び第 IV.B.4 章を参照のこと。

E. リンパ器官の病理組織試験

リンパ系臓器の病理組織学的評価は、免疫毒性試験の項に記載されているように行うべきである（1993 年版赤本草案 II の第 V.C.章を参照）。最近の出版物には、このテーマに関する更なる議論が掲載されている。

レッドブック 2000: IV.C.7 げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験

2007年7月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN:
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

July 2007

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV.C.7 章 げっ歯類を用いた慢性毒性・がん原性複合試験

レッドブック 2000 のこのセクションは、1993 年の Redbook 第 IV.C.7 章の「草案」に取って代わるものである。FDA は、慢性毒性とがん原性を併せ持つげっ歯類を用いた試験を、特に胎内曝露段階で実施することが複雑で困難であることを認識している。これは多くの場合、両方のタイプの試験を同時に実施するための適切な用量レベルを設定し、投与することの難しさに起因している。さらに、これら 2 種類の試験の一般的な目的は異なる。それにもかかわらず、単一のバイオアッセイで使用する情報（すなわち、投与用量）を予測するために、慢性毒性試験が妥当な毒性の推定値を提供する場合、慢性毒性試験はがん原性試験と組み合わせて、ある成分のがん原性の可能性や、有害な影響をもたらさない最大用量についての情報を明らかにすることができる。

FDA は、申請人及び届出人が複合試験を実施する前に FDA に相談することを推奨する。申請書・届出書の試験依頼人及び提出人は試験デザインの作成時、げっ歯類を用いた慢性毒性試験（[第 IV.C.5.a.章](#)）、げっ歯類を用いたがん原性試験（[第 IV.C.6 章](#)）、がん原性試験またはげっ歯類を用いた慢性毒性試験に追加する子宮内曝露段階

([第 IV.C.8 章](#))、および毒性試験結果の報告 ([第 IV.B.2 章](#))、毒性試験における病理学的考察 ([第 IV.B.3 章](#))、毒性試験における統計学的考察 ([第 IV.B.4 章](#)) のガイダンスを熟知することも推奨される。

レッドブック 2000: IV.C.8 げっ歯類を用いたがん原性試験または慢性毒性試験に追加する子宮内曝露段階

2007 年 7 月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN:
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

July 2007

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.8 げっ歯類を用いたがん原性試験または慢性毒性試験に追加する子宮内曝露段階

- I. [優良試験所実施基準](#)
- II. [試験動物](#)
- III. [被験物質](#)
- IV. [実験設計](#)
- V. [観察試験と臨床試験](#)
- VI. [剖検と顕微鏡検査](#)
- VII. [参照](#)

このセクションの 1993 年の「草案」版 Redbook に対する科学的に正当化された変更は、他の権威あるガイドライン^{[3] [4] [5] [10] [11] [12] [19] [20] [22] [23]}や出版物との協議の後に行われたものである（以下の関連セクションを参照）。

FDA は、最も懸念レベルの高い潜在的な食品成分（例えば、懸念レベル III の[直接食品添加物](#)、累積曝露量が 1ppm 以上の[食品接触物質](#)）の安全性評価のために、げっ歯類を用いて実施したがん原性試験または慢性毒性試験に胎内曝露段階を含めることを推奨している。本章で推奨する動物毒性試験は、試験動物に試験期間中、定期的に反復経口投与した場合に、試験食品成分ががんもしくは慢性疾患（例えば、耐糖能の変化、糖尿病、心血管障害）の発生率を増加させる可能性のある早期発育期の影響を有するかどうかを判断することを目的としている。

胎内曝露段階は、2つの推奨されるげっ歯類がん原性試験（又はバイオアッセイ；[第 IV.C.6 章](#)を参照）のうちの 1つに追加すべきである。ラットは生殖試験に推奨される種であり（[第 IV.C.9.a 章](#)参照）、FDA はマウスよりもラットの胎内曝露によるがん原性バイオアッセイのデータベースが大きいいため、一般的には、ラットを用いたバイオアッセイ試験に胎内曝露段階を追加すべきである。慢性毒性試験が食品成分の安全性を裏付ける唯一の長期試験である場合、FDA はケースバイケースで、少なくとも 1つの試験に胎内曝露段階を追加することを推奨している。

本章の目的は、食品成分のバイオアッセイ試験や慢性毒性試験に胎内曝露段階を追加する場合の設計と実施のための具体的な指針を提供することである。しかし、これらの一般的な手順は、慢性毒性・がん原性複合試験や、変更を加えた短期毒性試験（例えば、期間、用量など）にも適用することができる。FDA は、これらの研究に胎内曝露段階を追加することの適切性について疑問がある場合、毒性試験を開始する前に適切な FDA の科学者に相談することを申請人もしくは届出人に推奨する。申請人及び届出人は、試験デザインの開発中に、毒性試験の結果報告のためのガイドライン（[第 IV.B.2 章](#)）、毒性試験における病理学的考察（[第 IV.B.3 章](#)）、毒性試験における統計的考察（[第 IV.B.4 章](#)）を熟知しておくことが推奨される。

I. 優良試験所基準

本章で説明する非臨床試験は、連邦規則集[タイトル 21 の第 58 部](#)の下に発行された米国 FDA 優良試験所基準（GLP）規則に従って実施されるべきである。この文書は、米国政府印刷局、ワシントン D.C.、20402（フリーダイヤル 866-512-1800 または DC エリア 202-512-1800）の文書管理責任者から入手することができる。他の国際的・国内的なガイドラインの下で実施された試験は、米国 FDA の GLP 規制の下で実施された試験と同等とみなされる場合がある。FDA GLP 規制への不適合の特定の領域については、議論し、正当化する必要がある。

II. 試験動物

A. ケアとメンテナンスと飼育：

National Research Council（米国研究評議会）の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals（実験動物の管理と使用のためのガイド）」^[24]に記載されている動物のケア、メンテナンス、およびハウジングに関する推奨事項は、本章の特定の推奨事項と矛盾しない限り、遵守する必要がある。

B. 種と系統の選択：

この章に記載されているガイダンスは、マウスおよびラットを用いた研究のためのものであり、他のげっ歯類を使用する場合は、修正が必要となることがある。健康で、それ以前の実験操作を受けていない雄と雌の両方の実験動物を使用する必要がある。

毒性試験に使用するげっ歯類の種、系統、および亜系統を選択する際には、被験動物の一般的な感受性、および有毒化学物質に対する被験動物の特定の器官や組織の反応性を考慮することが重要である。毒性試験のための近交系、外交系、または雑種のげっ歯類の系統の選択は、答えるべき科学的な疑問に基づいて行うべきである。選択した系統は、繁殖力が低く、催奇形剤や胚毒に敏感なものでなければならない。さらに、試験動物は、十分に特徴づけられた健康な集団（コロニー）から来たものであることが重要である。最近の情報によると、ラットのいくつかの系統には生存率の問題があることが示唆されているため、試験動物は、推奨される試験期間中に生存する可能性が高いものを選択すべきである（第 II.D.項「数と性別」及び第 IV.A.項「試験期間」の議論を参照のこと）。FDA は、特定の種、系統、または亜種の適切性について疑問がある場合は、毒性試験を開始する前に、申請者及び届出人が適切な FDA 科学者に相談することを奨励している。

FDA の別のセンター（医薬品評価研究センター）では、パイロットプログラムの一環として、遺伝子組み換えマウス（トランスジェニックマウス）を用いた 6 ヶ月間の試験による安全性データを、げっ歯類がん原性試験の 1 つの代替として受け入れている。^[20] Office of Food Additive Safety（食品添加物安全性局）は、この種の情報を補足的なデータとしてのみ考慮し、このような研究を 2 年間のげっ歯類がん原性バイオアッセイの代替とは考えない。トランスジェニックなげっ歯類の発がんまたは突然変異誘発アッセイのデータは、作用機序や組織分布に関する化合物固有の問題を評価するのに有用である。ある種の被験物質（食品成分に含まれる成分や汚染物質）の発がんリスクを判定するためには、トランスジェニックマウスモデルでは定量的な用量反応データが得られないという点で不適切である。また、現時点では、国内外のほとんどの検証機関（例：Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Method

of the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods^[16]) や試験所で完全に検証されておらず、受け入れられてもいない。現時点では、ベースラインパラメータを確立するための過去の制御データの大規模な保存場所はない。食品成分の消費パターンの性質（すなわち、慢性的、生涯にわたる曝露）を考慮すると、食品成分の安全性評価には、完全に検証された試験システムから得られた定量的データのみを使用することを規定するだけでなく、ヒトの生涯にわたる曝露を代表するような慢性安全性試験を提供することが重要である。

C. 年齢（投与開始）：

少なくとも 5 日間の適切な馴化期間の後、親動物に被験物質を投与する。雌は交配の最低 4 週間前から、雄は精子形成サイクルを網羅するために曝露の最低 10 週間前から被験物質を投与する必要がある。すべてのテストおよびコントロールの仔（F1）への投与は離乳時に開始すべきである（IV.A 項：[試験の期間](#)も参照）。

D. 数と性別：

実験群および対照群では、1 グループあたり 1 性別につき少なくとも 25 匹のネズミが試験終了まで生存するよう、試験開始時に十分な数の動物を用意する。十分な数の動物を試験終了まで生存させることで、腫瘍の発生など被験物質に関連する影響を客観的に評価することができる。過剰な体重増加（肥満に伴う下垂体の変化など）や、他のストレス要因（寄生虫感染など）の後遺症として起こる可能性のある、化合物以外の動物の病理を軽減することで、生存率を向上させることができる。

FDA は、バイオアッセイや慢性毒性試験のためのラット系統の選択について、他の系統よりも生存率に深刻な問題を抱える系統があるため、申請者及び届出人が慎重に検討することを推奨している。これらの研究は、1 グループあたり雌雄各 70 匹以上の動物から始めることが推奨される。申請人もしくは届出人は、試験に使用するラット系統で生存率が問題となることが予想される場合、1 グループあたり雌雄各 70 匹以上の動物でバイオアッセイを開始すべきである。試験終了まで生存する動物が 1 グループ 1 性別あたり 25 匹未満の場合（例えば、慢性試験では 1 年以上、バイオアッセイでは 2 年以上、IV.A 項：[試験期間](#)を参照）、申立人及び通知人は、注意深く頻繁にケージサイドを観察することで、死んだ動物を早期に発見し、記録することで、自己融解による組織の損失を最小限に抑えるよう、特に注意を払う必要がある。また、がん原性試験や慢性試験における生存率の問題が明らかになった場合には、すぐに FDA に相談する必要がある。

1匹ずつの雄と雌が好ましく、どのグループにも1匹の雄と雌が2匹以上含まれていてはいけません。例えば、申立人が各グループに雌雄各70匹の動物を入れると決めた場合、胎内期には少なくとも70匹／グループの子孫を作る必要がある。したがって、この例では、胎児期の性別ごとの親動物の数は、1グループあたり少なくとも70匹の産子を確保するのに十分な数であるべきである。

中間的な剖検を予定している場合は、各グループの各性別のネズミの総数を、試験終了前に犠牲になる予定の数だけ増やす必要がある。各中間壊死試験には、1グループにつき雌雄各10匹以上のげっ歯類を用意すること。

E. 交配手順 :

交配ごとに、妊娠するまで、あるいは2~3週間経過するまで、雌は同じ用量グループから無作為に選んだ1匹の雄と一緒にすること。交尾の証拠が確認された後は、できるだけ早く動物を分離する必要がある。2~3週間経っても交尾が起こらない場合は、それ以上交尾の機会を与えずに動物を分ける。交配ペアはデータ上で明確に識別されるべきである。兄弟間の交配は避けるべきである。毎朝、すべての雌は膣洗浄液中に精子があるか、または膣栓があるかどうかを調べる必要がある。精子もしくは膣栓が見つかった場合、その日は妊娠0日目とみなされる。出産間近の妊娠中の雌は、巣材を入れた分娩用または出産用のケージに別々に入れること。試験群と対照群の妊娠中の雌は、自然に出産できるようにする。

F. 1回の出産ごとの子の数の標準化 :

間引きによる1回の出産あたりの子の数の標準化は任意である。種の過去の出産数に基づき、出産数を10か8に標準化することができる。生後4日目に、10対10以上（または8対8以上）のすべての仔を無作為に減らして標準化を行うことが推奨される。可能であれば、残された同腹仔は同数の雄と雌で構成されるべきであり、過剰な雄または雌は無作為に選択されるべきである。無作為に選択することは、健康な動物を研究に参加させようとする人間の傾向を防ぐために重要である。

G. 子の選択 (F1) :

1つの出産につき、性別ごとに1匹、または単一性の子の出産の場合は最大2匹の動物を無作為に選択する必要がある。

H. 感染動物 :

一般的に、試験期間中に動物を感染症で治療する場合、治療に使用する治療薬と被験物質の間に相互作用の可能性がないとは言えない。この相互作用は、試験結果の解釈を著しく混乱させたり、複雑にしたりする可能性がある。しかし、感染症の問題が発生した場合、試験のスポンサーは最善の判断で試験を進め、その判断をFDAに報告する必要がある。さらに、FDAは、試験継続の正当性と感染症の影響の可能性について、また、該当する場合は、感染症の治療の正当性と影響の可能性について、完全かつ詳細な説明をするよう求めている。

I. 動物の識別：

試験動物は、その種、系統（および亜系統）、性別、年齢、体重を参照して特徴付けを行う必要がある。それぞれの動物には、固有の識別番号（耳のタグ、埋め込んだ識別チップ、タトゥーなど）を割り当てる必要がある。

J. 飼育：

実験期間中の動物は、発情期と授乳期を除いて一つのケージに入れておくべきである。この推奨事項には、以下の3つの検討事項が反映されている。

- 各ケージに複数の動物が収容されている場合、試験対象の各動物が消費した飼料の量を十分な精度で決定することができない。この情報は、飼料効率（消費された飼料と増加した体重の関係）を決定するために必要である。
- 体重増加の減少が、嗜好性の低下によるものなのか、被験物質を介した毒性によるものなのかを判断する上で、交絡分析の可能性を最小限に抑えることができる。
- 単一ケージに入れられた死にかけの動物や死んだ動物の臓器や組織が、共食いによって失われることはない。

K. 食餌

一般的に、飼料と水は断続的に与えられるべきであり、飼料は被験種の妊娠をサポートするための栄養必要量、ならびに被験種の正常な成長と長寿をサポートするための栄養必要量を満たすべきである。^[25] 特別な事情がない限り、被験物質を投与した動物群の食餌には、対照群の食餌と同レベルのカロリーや栄養素（例：繊維、微量栄養素）が含まれるように注意すべきである。食餌の管理が不十分だと、栄養バランスが崩れたり、カロリー不足になったりして、毒性試験の結果（例：寿命、腫瘍発生背景率）の解釈が混乱したり、試験の結果や再現性が変わったりする可能性がある。しかし、FDAは、カロリー制限食^{[7][8]}や低タンパク食^{[1][15]}を摂取した特定の動物種の生存率

に有益な効果があることも認識している。FDA は、スポンサーが食餌に関する十分な履歴管理データを提供し、試験が適切に実施されていれば、そのような試験結果を受け入れることができる。

毒性試験の動物の食餌を設定する際には、以下のような問題を考慮する必要がある。

被験物質がカロリー値を持たず、食餌のかなりの量（例えば 5%以上）を占める場合、高用量食のカロリー密度と栄養密度の両方が他の群の食餌と比較して希釈されてしまう。その結果、希釈された飼料を不断摂取している動物は、他の投与群の動物よりも多く食べて、高用量飼料のエネルギーおよび栄養素の含有量の違いを補うことができるため、一部の高用量動物は予想よりも高い被験物質投与量を受ける可能性がある。このような状況から、観察された変化が被験物質の明白な毒性によるものなのか、それとも食餌の不均衡によるものなのかを判断するために、これらの動物の飼料消費量を可能な限り正確かつ綿密にモニターすることが特に重要である。この評価をさらに支援するために、2つの対照群を使用することができる。1つの群には、原液の対照食を与え、2つ目の群には、不活性充填剤（例えば、メチルセルロース）を添加した対照食を、飼料中の被験物質の最も高い割合と同じ割合で与えるのである。

被験物質の賦形剤が、対照飼料よりも高いカロリー・栄養価を持つと予想される場合、カロリー・栄養成分の調整が必要となることがある。

不快な味や食感のために被験物質の投与が飼料摂取量に影響を与えると予想される場合には、他の給餌方法や実験計画が必要となることがある。代替案を検討する場合は、FDA との協議を推奨する。

被験物質が栄養の吸収を阻害し、栄養不足や栄養比率の変化をもたらす場合、検討中の毒物学的エンドポイントの評価を混乱させる可能性がある。例えば、脂溶性ビタミンは、ほとんど吸収されない鉱物油や脂肪代替物と優先的に分離するため、これらのビタミンが欠乏する可能性がある。このような可能性は、被験物質を摂取するグループの飼料に追加の栄養強化を行うことで解消できる。適切な栄養強化のレベルは実験的に決定されるべきである。

その他の関連する問題（例えば、天然成分と精製飼料を使用する場合の利点と欠点）については、National Research Council が発行している実験動物の栄養要求に関する出版物で議論されている。^[25]

L. 対照群および化合物投与を受けた動物の割り振り：

動物を対照群および化合物投与群に層別無作為に割り振る。これにより、バイアスを最小限に抑え、化合物治療群と対照群の間に関連する変数の比較が可能となる。一般的には、平均体重もしくは体重範囲をランダム化の基準として使用する。他の特性を無作為化の基準とする場合は、その説明と正当性を示す必要がある。

すべてのグループの動物は、同じ日に実験に使われるべきである。試験に参加する動物の数が多いためにこれが不可能な場合は、数日間にわたって動物を試験に参加させることができる。後者の推奨に従う場合は、同調性を維持するために、対照動物と実験動物の事前に選択した部分を毎日試験に投入するべきである。

M. 死亡率：

劣悪な動物管理による過剰な死亡率は容認できず、試験を繰り返す原因となる可能性がある。

N. 自己融解：

適切な動物管理の実施により、自己融解のために試験で失われる動物および組織・臓器の割合は10%を大幅に下回らなければならない。この基準を超える自己融解は、試験を繰り返す原因となることがある。

O. 剖検：

剖検は、自己融解による組織の損失を最小限にするために、動物が犠牲になった後、あるいは死んでいるのを発見した後、すぐに行うべきである。すぐに剖検できない場合は、自己融解を防ぐのに十分な低温（例：4°C~8°C）で、かつ細胞の損傷を引き起こすほどではない温度で動物を冷蔵する。病理組織学的検査を行う場合は、剖検の際に動物から組織標本を採取し、適切な固定剤に入れておく必要がある。

III. 被験物質

胎内曝露段階のがん原性または慢性毒性試験で使用される被験物質は、申請人及び届出人が上市を意図している物質と同じものでなければならず、適切な場合には、被験物質は構成化学物質または不純物であってもよい。試験期間中、単一ロットの被験物質を使用することが望ましい。それが不可能な場合は、純度と組成が可能な限り類似したロットを使用すべきである。動物実験施設に被験物質の純度、存在する可能性のある不純物の種類と濃度を通知することは、申請人及び届出人の責任である。

A. 同一性：

被験物質の同一性（例えば、単一成分または複数成分の混合物）がわかっていること。申請人及び届出人は、試験化合物の決定方法について FDA に相談することが推奨され、関連するすべての CAS（Chemical Abstract Service）登録番号を提供する必要がある。

B. 組成・純度：

被験物質の組成は、すべての主要成分の名称と量、既知の汚染物質と不純物、および特定できない物質の割合を含めて知られていなければならない。

C. 保管の条件：

被験物質は、研究が完了するまで、その安定性および純度を維持する条件で保管すること。

D. 使用期限：

被験物質の使用期限は既知で、容易に入手可能であるべきである。被験物質は使用期限を過ぎて使用してはならない。

IV. 実験設計

A. 試験期間：

親動物には、交配の最低 4 週間前（雄の場合は精子形成サイクルをすべてカバーするために 10 週間の曝露が望ましい）から被験物質を投与する。F1 動物が離乳するまで、交配前、交配、妊娠、授乳期間中、曝露を継続すべきである。すべての試験および対照の F1 動物への投与は、離乳時に開始し、試験期間中（例えば、慢性試験では 1 年以上、バイオアッセイでは 2 年）、週 7 日継続して行う。

一般的に、FDA は生存率の低下によるがん原性試験の早期終了を推奨しない（II.D 項「数と性別」の議論を参照）。がん原性バイオアッセイは、試験動物の寿命の大部分で実施されるべきである。試験終了まで最適な数の動物を生存させることが望ましいが、FDA は、がん原性バイオアッセイを可能な限り長く、あるいは本ガイダンスで推奨されている 24 ヶ月間を超えない期間で実施することで、より多くの利益とさらなる感受性が得られると考えている。

B. 投与経路：

被験物質の投与経路は、通常のヒトへの曝露に近似していることが望ましく、可能であれば経口経路を使用すべきである。他の経路を使用する場合は、正当な理由を提示すること。試験期間中、すべての被験動物に同じ投与方法を使用すること。被験物質は以下のいずれかの方法で投与すること。

- **食餌内投与：**被験物質のヒトへの曝露が、固形の食べ物か固形と液体を組み合わせた食べ物を通したものになる可能性がある場合。被験物質を食餌に添加する場合、動物は色、匂い、粒子の大きさに基づいて食餌中の基本飼料または被験物質のいずれかを選択的に摂取することができてはならない。被験物質を粉碎飼料に混合してペレット化する場合、ペレット化の過程で被験物質に影響を与えてはならない（例えば、スチームプロセスによるペレット製造時に熱に弱い物質が破壊される場合がある）。被験物質を飼料中に投与する場合、飼料レベルは飼料 1kg あたりの被験物質の mg 数で表すこと。
- **飲料水に溶かして投与：**被験物質が液状で人に摂取される可能性がある場合（例えば、清涼飲料水やビールに含まれている）や、げっ歯類の食餌中に投与することが不適切な場合。飲料水への被験物質の投与量は、水 1ml あたりの被験物質の mg 数で表す。
- **カプセル化もしくは経口挿管（強制経口投与）：**前述の 2 つの方法では満足できない場合や、ヒトへの曝露が少量を継続的に摂取するのではなく、1 回の大きなボラス用量を毎日摂取することを通して起こる予測される場合。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同じ時間に投与すること。1 回の投与で強制経口投与できる最大量は、動物の大きさによって異なるが、げっ歯類では通常 1ml/100g 体重を超えてはならないとされている。強制経口投与する賦形剤がオイルの場合は、0.4ml/100g 体重以下とし、低脂肪食の使用を考慮する必要がある。動物の体重反応に基づいて、1～3 日ごとに容量を調整するのがよい。被験物質を分割して投与する場合は、6 時間以内にすべての用量を投与すること。経口投与される被験物質の用量は、経口投与用賦形剤 1ml あたりの被験物質の mg 数で表すこと。最後に、申請人及び届出人は、カプセル化または強制経口投与による被験物質の投与が、食餌や飲料水への投与と毒性学的に重要な点で同等であると FDA が結論付けることができる情報を提供する必要がある。あるいは、データの適切な解釈ができるように、両方の投与方法に関する代謝情報を提供すべきである。

C. 投与群：

1. 対照群：

試験動物の同時対照群は、すべての試験において基礎飼料を与えられる必要がある。被験物質の担体または賦形剤は、投与される動物群に投与される担体または賦形剤の最大容量に等しい容量で対照動物に投与されるべきである。担体または賦形剤の使用によって試験結果が損なわれないように、担体または賦形剤に関する十分な毒物学的情報を入手する必要がある。被験物質の投与に使用した担体または賦形剤の毒性に関する情報が不十分な場合は、担体または賦形剤に曝露されていない追加の対照群を含めるべきである。その他の点では、対照群の動物は投与群の動物と同じように扱われるべきである。セクション II.K：食餌も参照）。

2. 胎内曝露期のがん原性試験における治療用量の選択

胎内曝露段階のがん原性バイオアッセイでは、被験物質の最低 3 つの用量レベルを使用することが推奨される。母体や胎児への毒性の結果、離乳後の段階で十分な子孫を残すために、試験の胎内段階で低用量を使用することが必要となる場合がある。このプロトコル変更を正当化するデータを提供する必要があり、つまり、用量を選択するためにパイロット試験を実施することが推奨される。また、代謝・薬物動態試験の結果は、適切な投与法を選択する際の指針となるはずである。

胎内曝露段階のがん原性バイオアッセイを設計・実施する際には、以下の点を考慮する必要がある。1) 高用量（最大耐容量）は、試験動物に毒性反応を引き起こすのに十分な量であり、試験データの有意義な評価を妨げるほどの高い致死率を引き起こすべきではない。2) 低用量は、試験動物に毒性反応を引き起こすべきではない。3) 中間用量は、試験動物に最小限の毒性作用（酵素レベルの変化や体重増加のわずかな減少など）を引き起こすのに十分な量であるべきである。被験物質の投与は、すべての用量群で同時に行うことが望ましい（II.L 項：[対照動物と化合物投与動物の割り振りの議論](#)を参照）。

High Dose: 高用量は最大耐容量（MTD）とする。

被験物質の毒性とは無関係な情報に基づいて、胎内曝露段階を伴うがん原性バイオアッセイの用量を選択することは認められない。例えば、被験物質への予想されるヒトの最大曝露量に対する安全性のマージンをあらかじめ決めておき、その用量での試験結果が陰性になると仮定して、最高用量を選択してはならない。

このガイダンスでは、胎内曝露段階を伴うがん原性バイオアッセイにおける最高用量を MTD とすることを推奨している。FDA の科学者は、バイオアッセイの結果の解釈に影響を与える可能性のあるいくつかの要因の一つとして、その物質が MTD で試験されたかどうかの問題を考慮する。バイオアッセイには、試験のために MTD を選択したプロセスの説明を含める必要がある。

MTD は、米国国家毒性プログラム (NTP) により、「最高用量として慢性試験の期間中に投与した場合、新生物の誘発以外のいかなる毒性作用によっても処理動物の寿命を短縮しない用量」と定義されている。^[21] Office of Science and Technology Policy は、「最高用量は、十分な慢性前試験の後、必要に応じて他の関連情報を評価した上で、予測される最小の標的臓器毒性と正常な寿命に合致する最高用量を選択すべきであるが、結果としてがんが誘発される可能性があることは除く」と次のようなアドバイスをしている。^[13] さらに、NTP は、MTD が試験結果の解釈に支障をきたすような重篤な毒性の形態学的証拠を引き起こすべきではないと注意を促している。^[21]

一般的に、MTD は適切な亜慢性毒性試験のデータを慎重に分析した後に推定される。科学界での毒性試験の経験が蓄積されるにつれ、MTD を選択するには幅広い生物学的情報を考慮する必要性が明らかになってきた。例えば、体や臓器の重量の変化、神経学的、血液学的、尿学的、臨床化学的測定における臨床的に有意な変化に関するデータを、より決定的な毒性、肉眼的、病理組織的なエンドポイントと組み合わせて、MTD を推定するために使用することができる。

胎内曝露段階のがん原性試験では、MTD を達成するために高用量を選択すべきであるが、FDA はこの目標が常に達成されるとは限らないことを認識している。長期バイオアッセイの MTD を短期試験の結果から予測するには不確実性がある。MTD の定義には科学的な判断が必要であるため、同じデータを見た有能な研究者が、MTD の推定値を大きく異なるものとすることがある。このような意見の相違は、代謝研究の結果の解釈の違いや、臓器の変化が適応的なものか毒物学的なものかについての結論の違いに基づいている可能性がある。このように、被験物質のどの用量が MTD なのかが不明な場合、申立人及び届出人は FDA と相談して、胎内曝露段階でのがん原性バイオアッセイの適切な高用量 (MTD) を決定する必要がある。

FDA は、胎内被曝を伴うがん原性バイオアッセイで MTD を使用することには、以下のような利点があると認識している。

- 試験に使用されるげっ歯類の数が比較的少ないことなど、バイオアッセイ固有の感度の低さを補うことができる。

- 毒物学で使用される他のモデルとの整合性を図ることができる（例えば、推定される毒性の証拠を引き出すためには十分な高用量を使用すべきであり、また、稀な腫瘍を検出する確率や弱い発がん物質を特定する確率を高めることができる）。
- 異なる研究で得られたデータであっても、MTD で試験された物質のがん原性の強さを比較できるようにすること。^[9]

FDA は、胎内曝露段階でのがん原性試験を MTD で実施することを推奨しているが、その結果、動物やヒトにおける低用量での被験物質の毒性を代表しないような高用量を使用することになる可能性があることを認めている。例えば、高用量の被験物質は、被験物質の解毒に関与する酵素系を飽和させる可能性がある。以上のことから、FDA は内部評価を徹底し、他の権威ある機関とも合意した上で^{[6][26]}、胎内曝露段階であっても、がん原性試験の高用量を選択するためには MTD が依然として最良の選択であると結論づけている。これは、医薬品安全性試験の高用量を選択する際に MTD の使用を推奨している国際調和会議で議論されている原則にも沿ったものであることに留意すべきである。^{[4] [5]}

低用量:

低用量レベルでは、試験動物の正常な成長、発育、寿命を妨げず、毒性の兆候も生じないこと。

中間用量:

中間用量では、毒性の徴候を最小限に抑える必要がある。中間用量として選択される正確な用量は、被験物質の薬物動態学的特性に依存する場合がある。

任意の第 4 投与レベル:

高用量および低用量で投与された被験物質の薬物動態または代謝プロファイルに有意な差がある場合には、任意の（第 4 の）用量レベルを試験に含めることができる。この用量レベルは、低用量で得られたプロファイルと同様の薬物動態または代謝プロファイルをもたらす最高用量であるべきである。任意群の試験動物の数は、被験物質の発がん作用の検出において、高用量群とほぼ同じ感度が得られるように選択すべきである。

3. 胎内被曝を伴う慢性毒性試験における治療用量の選択:

胎内曝露を伴う慢性毒性試験では、被験物質の最低3つの用量レベルを使用することが推奨されている。投与量の選択は、亜慢性試験の結果及びその他の関連する被験物質情報（代謝・薬物動態試験）に基づいて行うべきである。母体や胎児への毒性の結果、離乳後の段階で十分な子孫を残すために、慢性飼育試験の胎児期に低用量を使用することが必要になる場合がある。このプロトコル変更を正当化するデータを提供する必要はある。

FDAは、慢性毒性・がん原性複合げっ歯類試験と胎内曝露段階を同時に実施することは、両タイプの試験に適切な用量レベルを設定して投与することが難しいため、複雑で困難であることを認めている。しかし、プレクロニック試験により、単一のバイオアッセイで使用する治療用量の情報を予測するための合理的な毒性の推定値が得られた場合には、慢性毒性試験と胎内曝露によるがん原性試験を組み合わせることができる。複合試験を実施する前に、申立人・届出人はFDAに相談することをお勧めする。

胎内被曝を伴う慢性毒性試験の治療用量レベルを選択する際の一般的な検討事項は以下の通りである。1) 高用量は、試験動物に毒性反応を誘発するのに十分な高さであり、試験データの有意義な評価を妨げるほどの高い致死率を引き起こさないこと、2) 低用量は、試験動物に生物学的に有意な毒性反応を誘発しないこと、3) 中間用量は、試験動物に最小限の毒性作用（酵素レベルの変化や体重増加のわずかな減少など）を誘発するのに十分な高さであること。

高用量:

慢性毒性試験の高用量では、被験物質の毒性プロファイルが得られるような毒性を示すべきである。我々は、申請人及び届出人が被験物質の毒性に関係のない情報を用量選択の根拠とすることを推奨しない。例えば、被験物質への人間の最大予想曝露量に対して、あらかじめ決められた安全マージンを提供するために、その用量での試験結果が陰性であることを前提として、最高用量を選択すべきではない。しかし、他の試験で毒性が認められない場合、高用量は、他の栄養素との栄養バランスを損なうことなく給餌できる食餌中の被験物質の最高割合（例えば、約5%、他の重要な食餌問題についてはII.H項：[食餌](#)も参照）など、あらかじめ設定されたいくつかの制限値に従うことができる。

一般的に、試験される高用量は、適切な亜慢性毒性試験のデータを慎重に分析した後、に推定される。科学界での毒性試験の経験が蓄積されるにつれ、高用量を選択する際には幅広い生物学的情報を考慮する必要性が次第に明らかになってきた。例えば、体や臓器の重量変化、神経学的、血液学的、尿学的、臨床化学的な測定値の臨床的に有

意な変化に関する亜慢性（90日）試験のデータを、より明確な曝露に関連する毒性、肉眼的、病理組織的なエンドポイントと組み合わせて、慢性毒性試験の高用量を推定するために使用することができる。

慢性毒性試験における高用量は、試験動物の毒性反応を達成するように選択されるべきであり、試験データの意味ある評価を妨げるほどの高い致死率を引き起こすべきではないが、この目標が常に達成されるとは限らないことを当局は認識している。このような状況で、被験物質のどの用量が高用量なのかが不明な場合、申立人及び通知人は、慢性毒性試験の適切な高用量を決定するために、当局と相談する必要がある。

低用量

低用量レベルは、試験動物の正常な成長、発育、寿命を妨げず、他の生物学的に有意な毒性の兆候を生じさせないことが望ましい（例：NOEL または NOAEL）。

中間用量:

中間用量では、毒性の徴候が最小限に抑えられるべきである。中間用量として選択される正確な用量は、被験物質の薬物動態学的特性に依存することがある。

D. システムのコンピューター化

データの生成、測定、または評価に使用されるコンピューター化されたシステムは、優良試験所基準（GLP）の原則の意図に沿った方法で開発、検証、運用、維持されるべきである。¹⁸ FDA は、動物実験データを電子的に送信するために、Standard for Exchange of Nonclinical Data (SEND) フォーマットの使用を承認している。この電子プロトコルの詳細については、FDA に問い合わせることが推奨される。

V. 観察と臨床試験

A. 親動物の観察：

F1 が離乳するまでの間、1日に1～2回、通常の活動から外れた一般的な兆候、病的状態、死亡率について、すべての親動物のケージサイドでの定期的な観察を行う必要がある。通常、複数回の観察の間隔は少なくとも6時間とする。それぞれの動物について個別の記録を残し、可能な限り影響の発現と進行を記録し、できればスコアリングシステムを使用することが望ましい。肉眼的に確認できる、あるいは触知可能な腫

瘍が発生した場合には、以下のパラメータを記録すべきである；発症時間、場所、大きさ、外観、および進行度。

胎内曝露段階を伴う慢性毒性（または慢性毒性・がん原性複合試験）では、通常の活動からの逸脱、罹患率、死亡率などの一般的な兆候だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経失調症、その他の神経系毒性の兆候を検出できるように、ケージの内外で動物に対して一連の拡張臨床評価を行うべきである。ケージ内外の動物に対して実施されるこの拡張臨床検査は、治療開始前に少なくとも1回、治療中は定期的にすべての動物に対して実施する必要がある。この種の評価に関する具体的な情報は、[第IV.C.10章](#)に記載されている（以下の項も参照）。

繁殖に関するパラメータ（例：受胎率指数、妊娠期間、妊娠指数、生児指数など）を収集した場合、試験報告書に記載する。

B. F1 動物の観察：

これらの動物は、試験期間中、少なくとも1日2回、通常の活動からの逸脱、病的状態、死亡の兆候を注意深く観察する必要がある。通常、複数回の観察の間隔は少なくとも6時間とする。一般的な外観の観察と死んだ仔の存在を記録する。同腹仔の総数と性別ごとの仔の数を記録すること。各動物について個別の記録を行い、可能な限り影響の発現と進行を、できればスコアリングシステムを用いて記録すること。肉眼的に見える、あるいは触知可能な腫瘍が発生した場合は、以下のパラメータを記録すべきである；発症時間、場所、寸法、外観、および進行。

胎内曝露段階を伴う慢性毒性（または慢性毒性・がん原性複合試験）では、通常の活動からの逸脱、罹患率、死亡率などの一般的な兆候だけでなく、神経障害、行動変化、自律神経障害、その他の神経系毒性の兆候を検出できるように、ケージ内外の動物に対して一連の臨床評価を実施する必要がある。系統的な臨床検査・観察に関する具体的な情報は、[第IV.C.10章](#)に記載されている。ケージ内外の動物を対象としたこの拡張臨床検査は、年齢に応じたものとし、治療中は定期的にすべての動物に実施する。注意すべき兆候としては、皮膚、毛皮、目、粘膜の変化、分泌物や排泄物の発生、またはその他の自律神経活動の証拠（例：涙、瞳孔の大きさ、異常な呼吸パターン）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに、歩行、姿勢、ハンドリングに対する反応の変化、間代性または強直性の発作、定型的な行動（例：過剰なグルーミング、反復的な旋回）または奇異な行動（例：自虐的な行動、後ろ向きに歩く）の有無も記録する必要がある。試験期間中、毒性および薬理学的徴候により、追加の臨床検査または拡大した死後検査の必要性が示唆されることがある。

C. 体重と飼料摂取データ :

実験動物に対する被験物質の影響を客観的に評価するためには、個々の体重、飼料、水の消費量を正確に測定することが重要である。なぜならば、これらの変数の変化がしばしば毒性の最初の兆候となるからである。これらのパラメータの完全な記録は、毒性誘発性の変化の時間的な発生を評価する上で不可欠である。これらのデータが注意深く記録されていない場合には、被験物質の全体的ながん誘発性の評価が損なわれる可能性がある。飼料消費量および体重増減に影響する変数のいくつかについては、II.K : 食餌および IV.B : [投与経路](#)の項に記載されている。

親動物は被験物質の初回投与の直前に体重を測定し、妊娠中及び授乳中は毎週体重を測定する。被験物質を強制経口投与する場合は、1~3日ごとに体重を測定する。飼料消費量は毎週測定する。被験物質が水中に投与されている場合は、水の消費量を毎週測定すること。

すべてのF1動物の体重は、離乳後最初の13週間は毎週、その後は試験期間中毎月記録すべきである。飼料消費量（被験物質が飲料水に投与されている場合は水消費量）は、体重と同じ間隔で測定すること。

申請人及び届出人は、実験動物による飼料のこぼれを定量化することも試みるべきである。被験物質の投与が以下の条件のいずれかによって影響を受ける可能性が疑われる場合；1) 飼料の嗜好性の問題、2) 体重の顕著な変化、または3) 動物の死亡数の増加、申請人及び届出人は、最初の13週間の期間の後、体重および飼料（水）消費量をより頻繁に測定すべきである（例えば、2週間ごと）。申請人及び届出人は、この蓄積された情報を用いて、被験物質の摂取量を mg/kg 体重/日として算出することも必要である。

D. 臨床試験 :

眼科検査、血液学的プロファイル、臨床化学検査、および尿検査は、以下のセクションに記載されているように、すべてのF1動物で実施されるべきである。

1. 眼科的検査 :

この検査は、実験の最初の2週間、全てF1動物を用い、高い技能を持った研究者によって行われること。終了時の検査結果で、被験物質の投与に伴う眼の変化が考えられる場合は、試験に参加しているすべてのF1動物に対して眼科検査を実施する必要がある。

2. 血液学的検査：

血液学的検査は、試験開始後2週間、試験期間中の3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月の間に、雌雄各グループにつき少なくとも10匹のF1動物に対して実施すべきである。12ヶ月目の測定時にデータの傾向や有意なパラメータの変化（生物学的または統計学的）が観察され、試験が1年以上継続する場合は、18ヶ月目の測定を含めるべきである。

理想的には、各収集時点で同じげっ歯類をサンプリングすべきである。血液サンプルはプールせずに個別に分析すべきである。動物の数が多いために、各採取地点で連続した1日以上血液サンプルを採取する必要がある場合は、毎日ほぼ同じ時間にサンプルを採取する必要がある。

ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および白血球分画数、平均赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、および凝固能の測定（凝固時間、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など）が推奨される。

被験物質は造血系に影響を与える可能性があるため、必要に応じて網状赤血球数の評価や骨髓細胞診を実施するなど、適切な処置を行う必要がある。網状赤血球数は、自動網状赤血球計数装置を用いて、または空気乾燥させた血液塗抹標本から各動物について得るべきである。細胞学的評価用の骨髓スライドを各動物から用意する。造血系への影響が認められる場合のみ、これらのスライドを顕微鏡で検査する必要がある。

3. 臨床化学：

臨床化学検査は、試験開始後2週間、試験期間中の3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月の間に、雌雄各グループにつき少なくとも10匹のF1動物に対して実施すること。12ヶ月目の測定時にデータの傾向や有意なパラメータの変化（生物学的または統計学的）が観察され、試験が1年以上継続する場合には、18ヶ月目の測定を行うべきである。

理想的には、各収集時点で同じげっ歯類をサンプリングすべきである。血液サンプルは空腹時の終わりと給餌前に採取すること。空腹時間は動物種および実施する分析試験に適したものとする。血液サンプルはプールせず、個別に分析すること。試験期間中に複数の日に動物を採取する場合は、各採取日のほぼ同時刻に採血すること。

すべての被験物質に適した臨床化学検査には、電解質バランス、栄養素の代謝、肝臓および腎臓の機能の測定が含まれる。具体的な測定項目は以下の通りである。

肝細胞の評価（以下の5項目のうち少なくとも3項目）

- アラニンアミノトランスフェラーゼ(SGPT、ALT)
- アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(SGOT、AST)
- ソルビトールデヒドロゲナーゼ
- グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
- 総胆汁酸

肝胆膵評価(以下の5項目のうち少なくとも3項目)

- アルカリホスファターゼ
- ビリルビン(総ビルビリン)
- γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GG トランスフェラーゼ)
- 5'ヌクレオチダーゼ
- 総胆汁酸

その他の細胞変化や細胞機能のマーカー

- アルブミン
- カルシウム
- 塩化物
- コレステロール(総コレステロール)
- コリンエステラーゼ
- クレアチニン
- グロブリン(計算値)
- グルコース
- リン
- カリウム
- タンパク質(総タンパク)
- ナトリウム
- トリグリセリド
- 尿素窒素
- FDAは、被験物質の特異な性質により、代替試験の検討が必要な場合があることを理解している。代替試験の適切な正当性は試験報告書に示されるべきである。

標準的な作業手順や機器の校正にもかかわらず、臨床化学分析の結果には日によってかなりのばらつきがあることが珍しくない。²¹ 理想的には、すべての用量群の臨床化学分析を1日で完了すべきである。それが不可能な場合は、潜在的なばらつきを最小限にするような方法で分析を行うべきである。

4. 尿検査：

採取した尿量、尿比重、pH、グルコース、タンパク質の測定、および尿の顕微鏡分析による沈殿物の有無、血液もしくは血球の有無の測定を、試験開始後2週間、試験期間中の3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月に実施することが推奨される¹⁴⁴。12ヵ月目の測定時にデータの傾向または有意なパラメータの変化（生物学的または統計学的）が観察され、試験が1年以上継続する場合には、18ヵ月目の測定を行うべきである。これらの試験は、1グループにつき雌雄各10匹以上のF1動物に対して実施すること。

VI. 剖検と顕微鏡検査

A. 肉眼的剖検

離乳後の段階に選ばれなかった親動物およびF1動物の終わりについて

これらの動物は、試験を継続するF1動物を選択した後に殺されるべきである。毒性徴候や生殖毒性が観察された場合、これらの動物は完全な総剖検を受けるべきである。

衰弱後の段階に選択されたF1動物の終わりについて

これらのF1動物はすべて、外面、開口部、頭蓋、胸腔、腹腔、枝肉、およびすべての臓器の検査を含む完全な肉眼的剖検を受けるべきである。肉眼的剖検は、資格のある病理学者、できれば後に顕微鏡検査を行う病理学者が行うか、その直接の監督下で行うべきである。

B. 臓器重量

最低限量すべき臓器は、副腎、脳、副睾丸、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣、前立腺、甲状腺・副甲状腺、胸腺（あれば）、卵巣、子宮である。重量を測定する前に、臓器を慎重に解剖し、脂肪やその他の隣接した組織を除去する。臓器の重量に対する乾燥の影響を最小限にするため、解剖後すぐに重量を測定する。

C. 顕微鏡検査のための組織の準備

一般に、以下の組織は、10%緩衝ホルマリン（または一般に認められているその他の固定剤）で固定し、切片を作成してヘマトキシリン・エオジン（またはその他の適切な染色剤）で染色し、顕微鏡検査の準備をする必要がある。肺は、固定液に浸す前に固定液で膨らませておく。

- 副腎
- 大動脈
- 骨（大腿骨）
- 骨髄（胸骨）
- 脳（最低でも3つの異なる重量）
- 盲腸
- 大腸
- 子宮体部・子宮頸部
- 十二指腸
- 副睾丸
- 食道
- 眼
- 胆のう（ある場合）
- ハーデリアン腺
- 心臓
- 回腸
- 空腸
- 腎臓
- 肝臓
- 肺（主幹気管支を含む）
- リンパ節（投与経路に関連するもの1つ、遠隔部から1つ）
- 乳腺
- 鼻甲介
- 卵巣および卵管
- 膵臓
- 下垂体
- 前立腺
- 直腸
- 唾液腺
- 坐骨神経
- 精嚢（ある場合）

- 骨格筋
- 皮膚
- 脊髄（頸椎、胸椎、腰椎の3か所）
- 脾臓
- 胃腸
- 精巣
- 胸腺（ある場合）
- 甲状腺・副甲状腺
- 気管
- 尿道膀胱
- 膣
- ジンバル腺
- 以上を示すすべての組織

D. 顕微鏡評価

すべての肉眼的病変は、顕微鏡で検査する。コントロール群および高用量群のF1動物のすべての組織を調べるべきである。特定の組織で治療に関連した影響が認められた場合には、次の低用量レベルの試験でそれらの特定の組織を調べるべきである。影響が認められなくなるまで、次の低用量レベルの試験を継続する。さらに、試験中に早死にした、あるいは犠牲になった親動物およびF1動物のすべての組織を顕微鏡で調べるべきである。病理学的病変や統計的結果の検討・解釈について疑問がある場合には、レッドブック2000の[第IV.B.3章](#)および[第IV.B.4章](#)で追加の議論がなされている。

E. リンパ系臓器の病理組織学的評価

リンパ系臓器の病理組織学的評価は、免疫毒性試験の項に記載されているように実施する必要がある（1993年版レッドブックIレッドブックII草稿のV.D.章参照）。最近発表された論文には、この問題に関する更なる議論が掲載されている。

レッドブック 2000: IV.C.9.a 生殖試験 に関するガイドライン 2007 年 7 月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN):
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

July 2000

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.9.a 生殖試験に関するガイドライン

I. 要旨

米国では、食品医薬品局（FDA）が、すべての消費者にとっての安全性を確保する責任を負っている。これらの食品成分の安全性を判断するためには、一連の試験から得られた適切な情報と結果を FDA に提供しなければならない。1982 年に FDA は、安全性を判断するための適切な試験について食品業界にガイダンスを提供するために、通称 Redbook と呼ばれる「食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全性評価のための毒性学的原則」を発行した。⁽²³⁾1993 年には、技術や食品成分の用途の拡大、安全性の科学的基準の精緻化を踏まえて、FDA はガイドラインを更新しレッドブック I レッドブック II の草案を発行した。⁽²⁴⁾レッドブック I レッドブック II の草案が発行されて以来、多世代生殖試験や雄性生殖への影響評価の手順がさらに精緻化された。多世代試験に関する最新のガイドライン案は、ここではレッドブック 2000 として提供されている。

II. 序論

過去数十年の間に、食品加工の技術は劇的に変化し、食品成分の使用量や種類も増えてきている。米国では、食品成分がすべての消費者にとって安全であることを保証す

る機関として、食品医薬品局（FDA）が設置されている。食品成分に関わる安全性は、連邦規則集で「意図された使用条件の下で、その物質が有害ではないという合理的な確実性」と定義されている。⁽²⁵⁾この規定を満たす「合理的な確実性」を得るためには、一連の試験から得られた適切な情報と結果を当局に提供しなければならない。食品成分の技術や使用方法が拡大したのと同様に、安全性を確立するための科学的基準も洗練されてきた。

安全性の判断のための適切な試験について産業界にガイダンスを提供するために、FDAは「食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全性評価のための毒性学的原則」を発行した。⁽²³⁾この本は一般的にレッドブックと呼ばれている。1993年、FDAは毒物学的プロセスと手順に関する知識の増加、および食品業界の変化に基づいて、ガイドラインを更新し、レッドブックIIの草案を発行した。⁽²⁴⁾

1982年には、懸念レベル2および3の物質の試験の一部として、ラットを用いた三世代生殖試験が推奨されたが、1993年には、懸念レベル2および3の物質の試験の一部として、催奇形性の段階が推奨された。1993年には、懸念レベル2と3の物質については、引き続き催奇形性試験を含む多世代生殖試験が必要とされたが、多世代試験は1世代につき1匹の子孫を使った2世代の試験に簡素化された。

懸念レベルとは、「ある添加物の使用が人の健康に害を及ぼす可能性の度合いを示す相対的な尺度」であると当局は判断している。⁽²⁴⁾懸念レベルは、人間の曝露の程度（用量）と、生物学的システムに対する毒物学的影響に基づいている。懸念レベルには3つの幅広い物差しがある。懸念レベル3は、人の健康に対する最も高い可能性のあるリスクを表す。懸念レベル1は、最も低い可能性のあるリスクを表す。懸念レベル2は、高リスクと低リスクの間である。

また、草案版レッドブックIIには、雄の生殖機能への影響を評価するための一般的なガイドラインや、神経毒性と免疫毒性のスクリーニングがオプションとして含まれている。草案版レッドブックIIが発表されて以来、多世代生殖試験と雄性生殖への影響評価の手順について、さらに改良が加えられた。ここでは、多世代試験に関する最新のガイドライン案を示す。

多世代繁殖試験では、親（F0）の雄と雌に、交配前、妊娠中、F1の離乳期に被験物質を投与する。その後、選抜されたF1世代の子孫に、成人までの成長・発達期および交配期に被験物質を投与する。F1世代の妊娠中の雌は、妊娠期間中およびF2世代の子孫が離乳するまでの間、被験物質を与え続ける。

III. 生殖試験に関するガイドライン

以下に示す生殖試験のガイドラインは、げっ歯類に経口投与される物質に関するものである。生殖試験は、被験物質が雄と雌の生殖システム、子孫の生後の成熟と生殖能力、および数世代にわたる累積的影響に及ぼす影響を評価することを目的としている。試験では、生殖腺機能、発情周期、交尾行動、受胎、分娩、新生児の罹患率、死亡率、授乳、離乳、子孫の成長・発育、子孫の標的臓器に対する物質の影響に関する情報を得ることができる。また、この試験は、その後の試験の参考にもなる。評価されたエンドポイントと算出された指標は、化学物質が生殖と繁殖の変化に関連しているかどうかを FDA が判断するのに十分な情報と統計的検出力を提供しなければならない。追加情報や歴史的な情報は、Collins⁽⁴⁾、Francis and Kimmel⁽⁶⁾と U.S. Environmental Protection Agency⁽²¹⁾に記載されている。

推奨される最小限の繁殖試験は、2 世代で構成され、1 世代につき 1 匹の子孫を残すことである（図 1 参照）。発生毒性試験やその他の毒性試験の結果、被験物質が発生毒性を伴う可能性があるとは判断された場合は、最小限の繁殖試験を拡大する必要がある。本ガイドラインでは、1 世代あたりの産卵数の追加、世代の追加、催奇形性及び発達毒性の影響に関する試験、任意の神経毒性スクリーニング、及び任意の免疫毒性スクリーニングを含めるための任意の手順を記載している。

図 1 2 世代生殖および催奇形性試験

A. 一般勧告

以下の推奨事項は、すべての FDA 毒性試験に適用される。

1. 試験は GLP（Good Laboratory Practice Regulations）に基づいて実施されるべきである。⁽²¹⁾
2. 動物は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に記載されている推奨事項に従って世話をし、維持し、収容すること。⁽¹⁰⁾
3. 以前に実験的な処置を受けていない健康な動物を使用すること。一般的に、治療薬と被験物質の相互作用のリスクなしに、研究の過程で動物を感染症で治療することはできない。雌は妊娠しておらず、無産であることが望ましい。
4. 試験動物は、その種、系統、性別、体重または年齢を参照して特徴づけること。

5. 偏りを最小限にし、統計目的のために実験群と対照群の間の互換性を確保するために、動物を対照群と実験群に層別無作為に割り当てるべきである。各動物には固有の番号を割り当てる必要がある。

B. 投与量範囲確定試験

試験開始前に被験物質の適切な薬物動態・代謝データが得られていない場合は、最適な投与量を決定するために用量範囲探索試験を行うことが推奨される。また、用量設定試験は、妊娠中の動物で行うことが望ましいが、必ずしもそうではない。非妊娠動物を用いた試験と妊娠動物を用いた本試験の結果を比較することで、被験物質が非妊娠動物に比べて妊娠動物では毒性が高いか低いかを確認する必要がある。

C. 本試験

1. 実験動物、種および系統の選択と飼育

多世代試験には費用と時間がかかるため、単位費用あたりの情報量が多い動物種を選択する必要がある。通常、多世代試験にはラットやマウスなどのげっ歯類が選択される。ラットは、動物のサイズが小さく、実験室での繁殖が容易であり、妊娠期間が約3週間で、高い受胎率と自然排卵があるため、好ましい種である。また、マウスに比べてストレスの影響を受けにくく、リッター間およびリッター内での比較が可能である。繁殖力の低い系統は使用すべきではない。交配中を除き、動物は単独で飼育することが望ましい。動物の食餌は、試験種の妊娠および授乳をサポートするためのすべての栄養要件を満たす必要がある。

2. 数、性別、年齢

被験物質への曝露は、通常、ラットが5~9週齢のときに開始する。すべての試験動物および対照動物は、投与開始前に試験条件に順応させる必要がある。慣らし期間は、特別な場合を除き、通常1週間である。各試験群および対照群は、体重および年齢が均一な動物で構成され、約20匹の雄と約20匹の妊娠期近辺の雌を含むのに十分な数の動物で開始する必要がある。この数を達成するためには、通常、最初の親グループ（F0）では1グループあたり雌雄各30匹、連続する各世代の親では1グループあたり雌雄各25匹（各リッターから少なくとも雄と雌が1匹ずつ、1リッターあたり雌雄各2匹まで）で開始する必要がある。

3. 投与群への割り当て

動物は、グループ間の体重差を最小限にするために、層別無作為に試験群と対照群に割り当てるべきである。各動物は一意に識別されるべきであり、各 F1 動物の起源のリッターは識別されるべきである。

4. 投与量の選択

被験物質の最低 3 用量（高用量、中用量、低用量）を使用し、用量に関連する反応と実験のばらつきとの分離を容易にする。高用量では、ある程度の親に対する毒性（体重減少や体重増加など）を示すが、親の死亡率が 10%を超えないようにする。非栄養性添加物の場合、投与量は飼料の 5%を超えてはならない。多量栄養素添加物の食餌試験では、高用量は毒性学的エンドポイントではなく栄養学的効果に基づくべきである。最低用量は、観察可能な有害な親への影響を誘発せず、最小限の安全マージンを提供することが期待されるレベルに設定されるべきである。中間用量は、高用量と低用量の間で算術的または幾何学的な進行を可能にするような間隔で設定すべきである。投与間隔を大きくとるよりも、1 つまたは複数の追加群を追加することが望ましい。

5. 対照群

並行して対照群を設ける必要がある。対照動物は投与動物と同様に給餌し、取り扱うべきであり、被験物質による空気中またはその他の汚染を防止するような方法でケージに入れるべきである。食餌試験の場合、対照群には基本食を与えるべきである。被験物質の担体賦形剤を使用する場合は、対照ラットに投与する賦形剤の量は、いずれの投与群にも最大量の賦形剤を投与すること。被験物質を投与する際に使用する賦形剤の毒性特性に関するデータが十分でない場合は、偽対照群を含めることができる。賦形剤に曝露されていない対照群を追加で試験に含めるべきである。被験物質が食餌摂取量の減少を引き起こす場合は、一対一対応の対照群を検討すべきである。

6. 試験の期間

動物は試験期間中、被験物質に曝されるべきである。被験物質による精子形成への悪影響を検出するために、第一親群（F0）の雄は、交配前の精子形成および精巣上体の通過期間（少なくとも 10 週間）および交配期間中に投与する。最初の親雌（F0）は、交配前に雄と同じ期間（少なくとも 10 週間）曝露し、その後交配・妊娠を経て F1a の仔の離乳まで曝露する。仔（通常は F1a および F2a）は、出生前の期間から出生後の全期間にわたって曝露すべきである。第 3 世代が計画されている場合、これらの産卵群もまた、出生前の期間からその生涯を通じて曝露されるべきである。

7. 物質の投与

被験物質は、食餌、飲料水、または胃管挿管によりげっ歯類に投与することができる。試験期間中、すべての動物に同じ投与経路を使用すること。被験物質を経管投与する場合は、動物の体重に応じて1日または3日ごとに投与量を調整することが望ましい。

8. 交配手順

交配の際は、妊娠するまで、あるいは2~3週間経過するまで、同じ用量群から無作為に選んだ1匹の雄と雌を交配させる（1対1の交配）。雄が死亡した場合は、1匹の雄と2匹の雌のラットを交配させることができる。

交尾の証拠が確認された後は、できるだけ早く動物を分離すること。2~3週間経っても交尾が行われない場合は、それ以上交尾の機会を与えずに動物を分離する。交尾のペアはデータ上で明確に識別する。毎朝、すべての雌を調べ、膣洗浄液中に精子があるか、膣栓があるかを確認し、精子や膣栓が見つかった場合は、妊娠0日目とする。出産間近の妊娠中の雌は、分娩用または産褥用のケージに別々に入れ、巣材を与えてもよい。試験群および対照群の妊娠中の雌は、通常の排泄をさせる。

9. 仔の数の標準化

淘汰による1仔の数の標準化は任意である。系統の過去の出産数に基づいて、出産数を10匹（または8匹）に標準化することができる。標準化は生後4日目に、10頭（または8頭）以上のすべての産仔を無作為に10頭（または8頭）に減らすことで行うことが推奨される。可能であれば、残された同腹仔は雄と雌の同数で構成されるべきである。無作為に選択することは、最も体力のある動物を研究対象として残すという人間のバイアスを防ぐために重要である。

10. 次世代のための親動物の選択

各産仔から少なくとも1頭の雄と1頭の雌を無作為に選び、同じ用量レベルの別の産仔と交配させて次世代を作るべきである。選択できる出産数が少ない場合は、1出産あたり雄2匹、雌2匹を超えてはならない。可能な限り多くの産仔を代表させるべきである。F1の雄と雌の交配は、F0の親動物と同様の方法で行うべきである。兄弟姉妹が試験で交配されないように注意すべきである。交配に選ばれなかったF1の雄と雌は離乳後に終了させること。

11. 任意の第三世代

2世代の生殖試験において、子孫に被験物質の明らかな生殖・形態・毒性影響が認められた場合、被験物質の累積影響を調べるために試験を3世代目まで延長することができる。交配のための動物の選択および追加世代の交配は、第一世代と同じ手順で実施する。F2aの子孫からランダムに交配した動物を交配して第三世代を作るべきである。F3aの動物は離乳させ、剖検するか、より長期の毒性試験に使用する。

12. 任意の2回目の交配

2回目の産卵が必要な場合は、F1aまたはF2aの離乳後約1~2週間後に再度交配を行う。

13. 任意の催奇形期

催奇形性試験は、別の発生試験を実施する正当な理由がない限り、多世代繁殖試験に組み込まれるべきである。生殖試験では、被験物質の胎児毒性を調べるために、F2b及びF3bのいずれかの子どもを用いることができる。催奇形性試験を実施する場合には、膣洗浄液中の精子の存在あるいは膣栓の存在によって妊娠の時期を決定し、これを妊娠0日目とする。出産予定日の約1日前に、雌を安楽死させ、帝王切開を行う。子宮を開き、早期死亡と後期死亡の有無を調べ、子宮体を数える。生きている胎児はそれぞれ子宮から取り出さなければならない。生きている各胎児の体重と性別を決定する。生きている胎児は、肉眼的な奇形がないか、次に骨格や軟部組織の異常がないかを調べるべきである。その他の詳細な手順は、Food and Drug Administration Proposed Testing Guidelines for Developmental Toxicity Studiesに記載されている。

[\(13\)](#)

14. 臨床観察

各動物は毎日少なくとも2回は観察されるべきである。最初の観察では、徹底的な臨床検査を行う。2回目の観察では、ケージの中の動物を観察することもある。妊娠中の臨月の動物や授乳中の動物は、ケージ越しに観察するとよい。観察時間は、被験物質のすべての毒性および薬理学的影響の開始および進行を検出でき、動物および臓器・組織の損失を最小限に抑えることができるように選択すべきである。関連する行動の変化や、死亡率を含む毒性のすべての兆候を記録すること。発情周期の長さおよび正常性は、F0およびF1雌のすべてについて、交尾前の最低3週間および同居中に膣塗抹標本で毎日評価すること。妊娠期間は、妊娠0日目から計算すること。偽妊娠の誘発を防ぐように注意する。

すべての成体および次世代のために選択された子孫について、個々の記録を維持すること。行動異常を含む毒性および薬理的な症状および徴候を毎日記録しなければならない。記録には症状および徴候の発症日、持続時間、および強度を含めるべきである。

被験物質が初めて投与される直前、その後は週1回、そして剖検時に動物の体重を測定する。飼料消費量も最低でも毎週記録する必要がある。被験物質が食餌に含まれている場合、週1回の体重測定でもよい。物質を強制経口投与する場合は、動物の体重に基づいて毎日または3日ごとに投与量を調整するのが最善である。被験物質が水中に投与されている場合には水の消費量を測定すべきであり、被験物質が水分消費に影響を与えると考えられる場合にも測定してよい。

15. 子孫の成長

出産後、可能な限り早く各仔を検査し、仔数、死産、生産、総体的な異常の有無を確認する必要がある。死んだ仔は剖検し、重大な欠陥の可能性と死因を観察する必要があるが、過剰な自己融解で標本が役に立たない場合は除く。

新生児は注意深く観察し、出生後0日目、4日目、7日目、14日目、21日目に性別と体重を記録する。生後の成長やその他の発達指標を観察するためには、他の適切な日でも構わない。

F1の性比または性成熟に治療に関連した影響を示したすべてのF2仔について、ゼロ日目に肛門距離を測定すべきである。交配のために選ばれたF1離乳子については、膈開通または亀頭包皮分離の日の各動物の年齢および体重を記録すること。

16. 任意の神経毒性スクリーニング

多世代繁殖試験は、潜在的な発達神経毒性をスクリーニングするための優れた手段を提供する。発育中の子孫を定期的に検査することにより、治療に関連した発育の変化、神経学的障害の出現、その他の神経系毒性の徴候を検出するのに役立つ情報が得られる。子供の検査は、ダムから離れる期間を最小限にするために、できるだけ短時間で行う必要がある。検査の際には、動物の外見や行動に異常があれば、年齢に応じた身体的な発達（開眼、生殖器の発達、歯の生え変わりなど）や機能的な発達（整直反射、驚愕反応、運動能力など）を測るためのマーカーを記録しておく。別の選択肢として、発達神経毒性をスクリーニングするために、（適切な統計分析に適した数の）仔のサテライト群を使用することができる。認知機能の発達の評価など、他の評価項目を含めることが奨励されるべきである。実験用の子孫の検査から得られたデー

タは、陽性・陰性を含めてすべて文書化し、産仔を統計単位として適切に統計分析を行い、報告すべきである。追加情報は、Sobotka ら。⁽¹⁹⁾

17. 任意の免疫毒性スクリーニング

多世代生殖試験では、非侵襲的な試験（Type I）及び侵襲的な試験（Type II）を用いて、被験物質の発達中の免疫系への影響をスクリーニングし、免疫毒性の可能性を評価することができる。⁽²⁴⁾慢性・急性・亜慢性試験では胎内曝露の影響は通常評価されないため、タイプ I の免疫毒性試験は、曝露した雌雄の F1 子孫を用いて実施する必要がある。綿密な計画を立てることにより、繁殖試験で使用あるいは生産された動物をタイプ I の指標として評価することができ、場合によってはタイプ II の指標とすることも可能である。例えば、慢性・急性・亜慢性試験のデータが得られない場合は、F0 の親雄が交配サイクルを終えた時点で、代表的な動物を犠牲にするか、より長い時間給餌することができる。離乳後、不要となった F0 親雌は、潜在的な免疫毒性の影響を評価するための優れた動物の供給源となる。内曝露の影響を評価するためには、淘汰された仔の新生児標本を用いて新生児のリンパ系器官の組織学的評価を行うことができる。胎繁殖試験では各性別の少数の離乳児のみが選択され、残りの動物は犠牲にして 3 週間後に評価するか、6 週齢または 8 週齢まで成熟させることができる。この時点で、タイプ I 試験もしくは機能的タイプ II 試験を実施することができる。F2 世代にも同様の機会がある。追加情報は、Hinton ら。⁽⁹⁾

18. 肉眼的剖検と顕微鏡検査

すべての成体の雄と雌は、生殖所見の評価に必要でなくなった時点で終了させるべきである。切迫流産、早産、病的状態の兆候が見られたダムは、そのような兆候が見られた日に壊死させるべきである。死んだ仔（産褥期に自然死した仔）は剖検し、過度に自己融解していない限り、肉眼的欠陥の可能性と死因を観察すべきである。

終了時には、すべての親動物を巨視的に検査し、構造的な異常や構造的な変化がないかどうかを調べる必要がある。これには、外面、開口部、頭蓋腔、枝肉、およびすべての器官の検査が含まれる。生殖系の器官には特に注意を払う必要がある。子宮は、着床部位や再吸収があるかどうかを調べる必要がある。子宮を硫化ナトリウム⁽¹⁰⁾や硫化アンモニウムなどの適切な化学物質で染色し、着床部位の可視化に役立てることができる。

a. 仔の剖検

解剖の際には、無選別の F1 および F2 の離乳児のうち、1 つの性別につき少なくとも 2 匹の仔を顕微鏡検査し、構造的な異常や構造的な変化がないかどうかを調べる必要がある。生殖系の器官には特に注意を払う必要がある。

脳、胸腺、脾臓は、構造的な異常や構造的な変化を巨視的に検査した F1 および F2 の仔から秤量する必要がある。剖検の際には、すべての用量群の仔の肉眼的に異常な器官や組織を保存し、その後、病理組織学的に検査すること。

b. 親動物の剖検

脳、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、既知の標的臓器、および生殖器官。雌の子宮および卵巣は重量を測定する。雄の場合、両方の精巣、凝固腺のある精嚢、前立腺の重量を測定する。さらに、病理組織学のために固定される 1 つの精巣上体については、総精巣上体重量を測定し、精子の形態、数、運動性の観察に使用される精巣上体については、総精巣上体重量と尾部精巣上体重量の両方を測定する必要がある。精嚢と前立腺は別々に重量を測定すべきである。前立腺の重量の出所を特定すべきである（例えば、腹側、背側もしくは背外側の前立腺など）。剖検の際には、対側の精巣および精巣上体（非固定の精巣および精巣上体）を、それぞれ均質化抵抗性精子数および尾部精巣上体精子の予備量の決定に利用すべきである。さらに、精子の運動性および精子の形態を評価するために、尾部精巣上体（または近位精管）から精子を採取すべきである。

精巣重量は同一種内ではわずかにしか変化しないので、精巣重量の変化は被験物質が精巣に悪影響を及ぼしたことを示す可能性がある。精嚢および前立腺はアンドロゲン依存性の器官であり、これらの重量の変化は動物の内分泌状態の変化や精巣のアンドロゲン産生能力を示している可能性がある。

臓器の重量は、絶対重量および相対重量（例えば、臓器対身体または臓器対脳の重量）として報告されるべきである。

i. 組織および臓器の固定

剖検の際には、すべての親動物の以下の臓器および組織、またはその代表的なサンプルを固定し、病理組織学的検査に適した培地に保存する。親の雌の場合、膣、子宮頸部、卵巣、卵管、副腎、下垂体、標的臓器、肉眼的に異常な組織を保存すること。親雄の場合、精巣 1 個、精巣上体 1 個、精嚢、凝固腺、前立腺、副腎・下垂体、対象となる臓器、肉眼的異常組織を保存する。精巣組織はブアン液または同等

の固定剤で固定し、病理組織学的検査のために適切な培地で保存すべきである。最近、精巣組織の保存や病理組織学的評価に用いる方法を記載した論文や書籍がいくつか出版されている。[\(8\)](#)、[\(15\)](#)試験に免疫毒性スクリーニングが含まれている場合には、レッドブックIレッドブックII[\(24\)](#)に記載されている適切な手順と臓器に従うべきである。

ii. 一般的な病理組織学的検査

対照群、高用量投与群のF0及びF1動物を性別ごとに10匹ずつ無作為に選んで、臓器の完全な病理組織学的検査を行う必要がある。高用量群で治療に関連した効果が認められた場合、各中間用量群から10匹の動物を無作為に選んで調べるべきである。追加データを得るために、各群の追加動物から保存した組織や臓器を調べることができる。

さらに、中間用量群で繁殖力の低下が疑われる動物の生殖器については、完全な病理組織学的検査を行うべきである。繁殖力低下の兆候としては、交尾、妊娠、種付け、健康な子孫の出産の失敗、発情周期への影響、生殖器官の重量減少、精巣精子数または尾部上体精子数の減少などが挙げられる。

iii. 雌の生殖器の病理組織学的検査

授乳後の卵巣には、初発の卵胞と成長中の卵胞、および授乳期の大きな子宮体があるはずである。病理組織学的検査では、原始卵胞集団の質的な減少を検出する必要がある。また、原始卵胞の定量的な評価も行うべきである。高用量の動物で治療に関連した効果が認められた場合は、すべてのグループを検査する必要がある。以下の評価手法を用いることができるが、動物の数、卵巣切片の選択、切片のサンプルサイズが統計的に適切であれば、他の手法を用いてもよい。物質によって誘発された原始卵胞の減少は、各卵巣の内側3分の1から5つの切片を取り除くことで確認できる。切片の厚さは少なくとも0.1mm (100µm)以上とする。検査では、対照卵巣と比較するために、この10個の切片から原始卵胞の総数を算出する。また、対照卵巣と比較して、成長中の卵胞および子宮体の有無を確認する。追加情報は、[Bolton](#)ら[\(4\)](#)、[Bucci](#)ら[\(2\)](#)および[Heindel](#)[\(1\)](#)に記載されている。

iv. 雄の生殖器の病理組織学

精巣上体の病理組織学的評価には、体部、尾部および帽部の評価を含むべきである。これは、精子肉芽腫、白血球浸潤、内腔内の異常な細胞タイプ、または尾部精巣上体の透明細胞の欠如などの病変を確認するために、精巣上体の3つの領域すべての縦断面を検査することによって達成できる。⁽⁵⁾

精巣の丁寧な病理組織学的検査は、精子形成への影響を特定するための感度の高い方法として認識されている。精巣組織は、精巣の構造、造精の過程、造精の分類などの知識を持って検査すべきである。影響が認められた場合には、その内容を詳細に記述する必要がある。⁽¹⁵⁾ 精巣の影響を定量化する場合には、使用した方法を詳細に記載すること。

精巣の徹底的な組織学的評価には、間質区画と精管区画の検査を含むべきである。精巣の管間細胞コンパートメントの病理組織学的評価には、ライディッヒ細胞、血管、および管内スペースに典型的に見られるライディッヒ細胞以外の細胞タイプの一般的評価が含まれるべきである。精管の一般的な外観に留意すべきであり、これに続いて、精子形成の正常なプロセスの間に起こる出来事の正常な順序の乱れを検出するために、精管コンパートメントの検査を行うべきである。次に、精管上皮を注意深く観察し、多核細胞の存在、生殖細胞層の欠損、生殖細胞変性の増加、生殖細胞の異常な発達、精子放出の遅延または失敗、精管内腔における生殖細胞の存在、およびセルトリ細胞のあらゆる変化（空胞化、脱落、または核の変化）のいずれかを検出すべきである。境界層の一般的な状態にも注意が必要である。

雌の生殖毒性のエンドポイント

生殖毒性のエンドポイントは、通常、受胎から離乳までの被験物質に対する動物の反応を包括する指標で表される。各繁殖試験において、以下の指標を算出する必要がある：雌の受胎率、妊娠率、生児率、離乳率または授乳率、性比、および生後4日目、7日目、14日目、21日目の生存率。

1. 雌の出生率

雌の出生率は、妊娠に至った交配の割合を表す。次のように計算される。（妊娠数／交配数）×100。この指数は、妊娠したダムの総数を反映しており、これには満期出

産、流産、または完全に吸収された子を含む。この指標は、雄のリビドーと繁殖力、および雌の周期性と受容性に依存する。

2. 妊娠指標

妊娠指数は、少なくとも1匹の生きた子孫を残すための妊娠の効率を評価するものである。この指標では、1匹の子孫を持つ子も、2匹以上の子孫を持つ子も同じように数えられる。この指数は以下のように計算される。生きた仔を産んだ仔の数／妊娠数)
 $\times 100$ 。

3. 生産児指数

妊娠指数と同様に、産まれた仔の数に関わらず、失われた仔の数の合計を表す指標（生きて生まれた仔の数／生まれた仔の総数）。

4. 離乳指数

離乳指数とは、4日目から21日目までの仔の生存能力を表すもの。これは以下のように計算される。（21日目に生存していた仔の数／4日目に生存していた仔の数） $\times 100$ 。この指標は、4日目の仔の減少を補正するものである。仔が減っていない場合は、関連指標である授乳指標を以下のように算出する。（21日目に生存していた仔の数／4日目に生存していた仔の数） $\times 100$ 。原因の如何にかかわらず、離乳指数の低下は繁殖上の悪影響を示す。

5. 性比と性別による割合

出生時に雌雄を判定し、体重測定のために雌雄を確認することで、子孫の成長に伴う雌雄の相対的な適合性を算出することができる。雌雄比は、被験物質が一方の性に優先的に作用しているかどうかを検出するのに有用である。このパラメータは通常、以下のように計算される。（雄の数／雌の数）。関連して、（雌または雄の数／動物の総数） $\times 100$ を計算すると、動物の総数に占める雄または雌の割合が得られる。

6. 生存能力指数

生存能力指数とは、生まれてから4日目、4日目から7日目、7日目から14日目、14日目から21日目までの特定の短い期間における子孫の生存能力を示す指標であり、0日目から7日目、0日目から21日目など、より長い期間を反映したものもある。例えば、7日目の生存率指数は以下のように算出される。（7日目に生存していた仔の数／

4 日目に生存していて飼育していた仔の数) × 100。仔の生存能力は、産後の栄養状態の良し悪し、母親の育児放棄、母乳中に排泄される有害物質の産後の吸収などを反映していると考えられる。原因にかかわらず、生存率指標の低下は繁殖に悪影響を及ぼす。出生後の成長やその他の発達指標をモニターするためには、他の適切な日でもよい。

雄の生殖毒性のエンドポイント

雄性生殖毒性のエンドポイントは、発達中の子孫に対する雄性の影響を示す証拠がある場合には、以下のエンドポイントも評価すべきである。対照群および高用量群のそれぞれにおいて、すべての動物でエンドポイントを測定すること。治療に関連した影響が観察された場合、各中間用量群の動物を評価すべきである。

1. 精巣精子数の評価

精巣の精子数は、幹細胞からの精子の産生と、精子形成の全段階における精子の生存の指標である。精子数の測定は、主に精子数が安定している慢性的な研究に用いられるべきであり、短期的な研究では、治療が後期精子集団に影響を与えていない可能性がある。精巣あたりの精子数から、精子産生の効率および 1 日の精子産生率を算出することができる。⁽¹⁴⁾

交配に用いたすべての F0 および F1 世代の雄から第 2 精巣（第 1 精巣は組織学検査に使用）を採取し、精巣の精子数が計数されるまで冷凍保存する必要がある。均質化耐性のある精子数は、精巣を洗剤が含まれた培地で均質化した後、伸長した精子核を計数することにより決定することができる。⁽¹⁴⁾

2. 精子の運動性、形態および数の評価

運動性は、禁欲、サンプルを入手してから評価するまでの時間、培地の pH、サンプルチャンバーの深さ、および温度によって影響を受ける。尾部精巣上体（または近位精管）から得られた精子サンプルを採取し、運動性の高い精子の割合を評価すべきである。⁽¹⁷⁾対照動物の運動性精子の割合が常に高く（70%以上）なるように、サンプル調製時の人工的な細胞死を避けるように注意すべきである。⁽¹¹⁾

精子の運動性は、顕微鏡またはコンピュータ支援精子分析（CASA）システムを用いて評価することができる。⁽¹⁷⁾顕微鏡評価では、精子数および精子形態と運動性の評価を組み合わせるために、十分な深さの許容可能な計数チャンバーを使用する。CASA システムを使用する場合、^{(3),(18),(20)}運動性の評価は、平均経路速度、直進性または線形

指数のユーザ一定義のしきい値に依存する。すべてのサンプルをビデオ撮影またはその他の方法で記録すること。ビデオは生データとして保存してもよい。精子の運動性をビデオ撮影しない場合は、すべての用量レベルのすべての動物から精子の運動性の評価を行うべきである。

げっ歯類の精子の形態は一般的に安定しており、動物種に特徴があり、変動が少ないことから、形態的に異常な精子の増加は被験物質が生殖細胞に到達したことを示している。これは生殖への悪影響と考えるべきである。精子の形態学的分析のために、コントロールおよびすべての用量レベルから交配のために選ばれたすべての F0 および F1 世代の雄から精子を採取しなければならない。

尾部精巢上体または近位精管から採取した精子（サンプルあたり最低 200 個）を固定したウェットプレパラートとして検査し^{(12),(17)}、正常（頭部と中部の両方が正常に見える）または異常（融合、頭部の分離、頭部もしくは尾部の変形など）のいずれかに分類すべきである。⁽²⁶⁾

尾部精巢上体に存在する精子の総数を数えなければならない。⁽¹⁴⁾尾部精子の蓄積量は、質的評価を完了するために使用した懸濁液中の精子の濃度と量、およびその後の残りの尾部組織の混合もしくは均質化によって回収された精子の数から得ることができる。濃縮された懸濁液中の精子は、その後の尾部上体精子数の評価のために凍結することができる。精巢上体の重量との関係で精子数が報告されている場合、精子数の減少を明確にするために、絶対数を報告する必要がある。

データの分析

コントロール群とテスト群の動物の値を統計的に比較する必要がある。以下の手法を用いることができるが、適切であれば他の手法で代用してもよい。受胎率および妊娠率の指標は片側フィッシャー正確検定で分析できる。性比指標については、両側フィッシャー正確検定を用いてもよい。生存率および離乳率のデータは、二項比率の Freeman-Tukey 逆正弦変換で変換してもよい。変換されたデータは、次に、分散分析（ANOVA）に続いて片側保護された最小有意差（LSD）検定によって分析され、ANOVA に続いて保護された LSD 検定（片側）が行われた場合には、対照群と投与群とを比較してもよい。成長（体重増加）および臓器重量の分析については、共分散分析を行った後、保護付き LSD 検定（両側）を行って、対照群と治療群を比較することができる。

生殖試験の結果の報告

すべての繁殖試験の報告書には、試験計画書およびすべての改訂版、すべてのパラメータの絶対値、完全データ（個々の仔）、仔ごとにまとめられ分析されたデータの表など、Good Laboratory Practice Regulations で要求されている情報が含まれていなければならない。妊娠期間中に治療を受けるのは発育中の生物ではなく母動物であるため、データは一般的に、産仔ごとの発生率、または特定のエンドポイントを有する産仔の数および割合として算出すべきである。前のセクションで議論されたすべての主要な指標およびエンドポイントが計算されるべきである。被験物質の投与率（用量）は mg/kg/day（1 日あたり体重 1kg あたりの被験物質の重量（mg））で報告すべきである。

多世代繁殖試験のレビューでよく遭遇する問題としては、対照群または治療群あたりの妊娠動物の数が不十分であること、無作為ではない選択手順、1 同腹仔あたりではなく 1 仔あたりのデータの統計分析などがある。試験を実施する前に、推奨されるガイドラインを注意深く検討し、プロトコルを提出して FDA の審査を受けることで、このような問題をなくすことができるはずである。

繁殖研究における様々な指標に加えて、特定の期間に生存した仔の平均数（例えば、出生から 4 日目までに生存した仔の平均数、または離乳した仔の平均数）のデータを調べる必要がある。この分析では、その時点までの全ての段階における被験物質の影響を総合的に考慮し、各指標を個別に評価するよりも感度の高い指標となる。

試験結果の理解を深めるために、関連する過去の対照データを使用してもよい。使用する場合には、過去のデータをまとめ、試験日、動物の系統、賦形剤、投与経路などの適切な追加情報を提示すること。

レッドブック 2000: IV.C.9.b 発達毒性 試験に関するガイドライン 2000 年 7 月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN:
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

July 2000

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

I. 要旨

米国食品医薬品局（FDA）は、米国で使用される食品成分がすべての消費者にとって安全であることを保証する責任を負う機関である。1982年、FDAは適切な試験に関するガイダンスを提供するために、「Toxicological Principles for the Safety Assessment of Direct Food Additives and Color Additives Used in Food（食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全性評価のための毒性学的原則）」（通称Redbook）を発行した。^①このレッドブックには、食品成分の母親とその胎児への影響を試験するための詳細なガイドラインが記載されていた。しかし、安全性評価やリスク評価の高度化、食品成分の代謝や薬物動態に関する知見の拡大に伴い、1982年に発行されたレッドブックを改訂し、更新する必要性が生じた。1993年には、レッドブックⅠレッドブックⅡの草案^②が公開され、パブリックコメントが行われた。それ以来、試験のエンドポイントや発生のランドマークが改良されてきた。ここでは、最新の発達毒性試験のガイドライン案を示す。

II. 序論

米国食品医薬品局（FDA）は、米国で使用される食品成分がすべての消費者にとって安全であることを保証する責任を負っている機関である。1982年、FDAは「食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全性評価のための毒性学的原則」を発表した。^①その表紙の色から、この本はすぐに「Redbook」と呼ばれるようになった。Redbookには、母親とその胎児に対する食品成分の影響を試験するための詳細なガイドラインが記載されていた。この試験には、催奇形性・発達毒性試験の章と、数世代にわたる生殖試験の章が含まれている。ここでは、催奇形性・発達毒性試験のガイドラインについて述べ、多世代試験のガイドラインについては[第IVC9a章](#)で述べている。

安全性評価やリスク評価の高度化、食品成分の代謝や薬物動態に関する知識の拡大に伴い、1982年の文書を改訂し、更新する必要性が明らかになった。1993年にはレッドブックⅠレッドブックⅡの草案が公開され、パブリックコメントが行われた。^②生殖と催奇形性・発達毒性のガイドラインの章の変更は、広範な文献調査とパブリックコメントに基づいて行われた。1996年末、レッドブックⅠレッドブックⅡのこの章と他のいくつかの章の現行の草案がRedbook Update Symposiumで発表され、ガイドラインは他の国内外の規制団体の現行の草案ガイドラインと比較された。^③それ以来、

試験エンドポイントと発達ランドマークが改良されてきた。ここでは、最新の発達毒性試験のガイドライン案をレッドブック 2000 に掲載する。

発生毒性試験では、少なくとも着床日から分娩予定日の前日までの妊娠動物に被験物質を投与する。出産予定日の少し前に、妊娠した雌を安楽死させ、子宮内容物を調べ、胎児を取り出す。胎児は観察、保存され、骨格や軟部組織の異常がないか調べられる。

発生毒性試験の目的は、受胎前の両親または出生前の母親が被験物質に曝露した結果、発生中の胎児に及ぼす影響を評価することである。副作用は、被験物質の毒性を評価するためのエンドポイントとして用いられる。発育中の生物に対する影響の 4 つの主要な症状は、死亡、構造的異常、成長の変化または遅延、機能的欠陥である。多くの物質では、これらの症状は、投与量、発達段階に応じた曝露のタイミングと期間に関連している。高用量であれば死亡するが、低用量でも生存が可能であれば、奇形、成長遅延、機能不全の子孫が生まれる可能性がある。

III. 発達毒性試験に関するガイドライン

発育毒性試験は、単独の試験として行うこともできるし、多世代生殖試験の一部として行うこともできる。生殖試験と組み合わせて実施する場合、催奇形学的影響の評価は第一世代または第二世代のいずれかで行うことができるが、被験物質への曝露を最大化するために、通常はその世代の最後の子孫で実施する。多世代試験の一環として、胎児は受胎時から被験物質に曝される可能性がある。単独試験では、使用する種の器官形成を含む十分に早い時期に投与を開始し、予想される 分娩日の前日まで継続する必要がある。本ガイドラインは、ラット、マウス、ハムスター、ウサギに経口投与する物質に適用できる。被験物質が、代謝酵素の誘導や肝臓の損傷によって自らの代謝速度を変化させる能力を持っていると考えられる場合には、別の試験でその化合物の催奇形性を評価することを考慮すべきである。

A. 一般的な推奨事項

以下の推奨事項は、すべての FDA 毒性試験に適用される。

1. 試験は GLP (Good Laboratory Practice Regulations) に基づいて実施すること。⁽⁶⁾
2. 動物は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に記載されている推奨事項に従って世話をし、維持し、収容すること。⁽³⁾

3. 以前に実験的な処置を受けていない健康な動物を使用すべきである。一般的に、治療薬と被験物質の相互作用のリスクなしに、実験中に動物を感染症で治療することは不可能である。雌は妊娠しておらず、無産であることが望ましい。
4. 試験動物は、その種、系統、性別、体重または年齢を参照して特徴づけること。
5. 偏りを最小限にし、統計目的のために実験群と対照群の間の互換性を確保するために、動物を対照群と実験群に層別無作為に割り当てるべきである。各動物には固有の番号を割り当てる必要がある。

B. 投与量範囲確定試験

試験開始前に被験物質の適切な薬物動態・代謝データが得られていない場合は、最適な投与量を決定するために用量範囲探索試験を行うことが推奨される。また、用量設定試験は、妊娠中の動物で行うことが望ましいが、必ずしもそうではない。非妊娠動物を用いた試験と妊娠動物を用いた本試験の結果を比較することで、被験物質が非妊娠動物に比べて妊娠動物では毒性が高いか低いかを確認する必要がある。

C. 主な研究内容

1. 実験動物、種および系統の選択

被験物質の薬物動態・代謝データやその他の情報により、発達毒性試験に最も適した種が示唆される場合は、その種を用いるべきである。そのようなデータがない場合、好ましい動物種はラットとウサギである。このガイドラインには、ラットとウサギに加えて、マウスとハムスターに関する情報も含まれている。これらの動物は小型で飼育が容易であり、歴史的に見てもヒトへの影響を推定できる一貫した結果が得られている。選択した系統は高い繁殖力を持ち、催奇形性物質や胚毒に敏感であるべきである。生物種間の投与量のスケールリングは、明白な毒性の違いによって妨げられない限り、生物種間の薬物動態学的な違いに基づくべきである。

2. 動物の飼育方法

交配中を除き、動物の単独飼育を推奨する。餌と水は不断的に与えられるべきである。動物の食餌は、試験種の妊娠をサポートするためのすべての栄養要件を満たすべきである。被験物質自体が栄養素である場合、そのような物質は通常の栄養を阻害するレベルで食餌に取り込まれなければならない可能性があるため、食餌組成には特に

注意を払う必要がある。このような状況下では、基礎飼料を与える対照群を追加する必要があるかもしれない。

3. 数、性別、年齢

試験動物と対照動物はすべて、年齢と大きさが同じで、若くて成熟した初産の妊娠した雌でなければならない。十分な数の雌を使用し、各試験群および対照群が約 20 匹の妊娠したラット、マウス、ハムスター、または妊娠間近のウサギで構成されるようにする。これらは、発達毒性試験のための妊娠動物の最小数である。目的は、被験物質の催奇形性を効果的に評価するために、十分な数の子供を産ませることである。

4. 試験の期間

被験物質は投与期間中、毎日投与することが望ましい。発育毒性試験で推奨される最小投与期間は、着床から出産予定日の 1 日前の帝王切開までである。ラットでは 6 日目から 20 日目まで、マウスでは 6 日目から 18 日目まで、ハムスターでは 4 日目から 15 日目まで、ウサギでは 6 日目から 29 日目までがこの期間のおおよそのタイミングである。また、受精から帝王切開までの妊娠期間中に投与することも可能で、多世代繁殖試験の一環として発達毒性試験を実施する場合、動物は受胎前から剖検されるまで投与される。膣洗浄液に精子が含まれていたり、膣栓がある場合は、妊娠 0 日目とみなす。

5. 投与経路

被験物質または賦形剤は、ヒトの曝露パターンに最も近い経路（食餌または飲料水）で投与すべきである。ヒトへの曝露がボーラス投与である場合や、動物に特定量の被験物質を投与することが不可欠である場合には、経口挿管（強制経口投与）が適切であろう。また、食餌中の薬剤の分析が不可能な場合、食餌中で薬剤が安定していない場合、あるいは薬剤が口に合わない場合にも強制経口投与が必要となることがある。1 回の投与で強制経口投与できる溶液の最大量は、被験動物の大きさによって異なるが、げっ歯類では 1ml/100g 体重を超えてはならない。被験物質を分割して投与する必要がある場合は、投与期間を延長する正当な理由がない限り、6 時間以内にすべての用量を投与すること。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日ほぼ同じ時間に投与し、動物の体重に応じて 1 日または 3 日ごとに投与量を調整することが望ましい。食餌や飲料水の試験では、摂取量は各動物によって異なる。

6. 交配手順

動物の交配は施設内で行うことを推奨する。十分な数の雄を交配させ、大きな遺伝子プールを確保する。兄弟姉妹は交配してはならない。それぞれの雄は1匹または2匹の雌と交配することができる。翌朝、各雌の膣洗浄液中に精子があるかどうか、あるいは精子栓があるかどうかを調べる。膣洗浄液中の精子の存在、または精子栓の存在は、妊娠0日目とみなされる（ウサギの妊娠0日目は、授精が行われた日または観察された日）。

7. 対照群と投与群

健康な動物は、グループ間の体重差を最小限にし、関連する変数の統計的比較可能性を確保するために、層別化されたランダムな方法で試験群および対照群に割り当てるべきである。また、すべてのグループの平均体重が同程度になるような無作為な方法で動物を割り当てることもできる。発育毒性試験では、少なくとも3つの試験群と1つの対照群を使用すること。すべてのグループは同時進行することが望ましい。

被験物質を賦形剤で投与する場合は、被験物質を含まない賦形剤を対照群に最大投与量の賦形剤を投与すること。投与を容易にするために賦形剤等の添加物を使用する場合は、被験物質の吸収、分布、代謝、保持への影響や、被験物質の化学的性質への影響による毒性の変化を考慮する必要がある。また、動物の食物摂取量、水摂取量、栄養状態に対する賦形剤の影響も考慮する必要がある。

被験物質を投与する際に使用する賦形剤の毒性に関するデータが不十分な場合は、偽の対照群も含めるべきである。賦形剤が使用されない場合は、対照群は偽治療を受けべきである。その他の点では、対照群は、被験物質を投与した群と同じ方法で取り扱い、維持しなければならない。

物質の物理的または化学的特性によって制限されない限り、高用量は何らかの発達毒性もしくは母体毒性を引き起こすはずだが、死亡率は約10%を超えてはならない。非栄養性添加物の場合、高用量は食餌の5%を超えてはならない。多量栄養素添加物の食餌試験では、高用量は毒性学的エンドポイントではなく栄養学的効果に基づくべきである。

低用量は、被験物質に起因する観察可能な影響を誘発してはならず、安全範囲を提供することが期待されるレベルに設定されるべきである。中間用量は、低用量と高用量の間で計算プロセスまたは幾何学的プロセスを可能にするように間隔を置くべきである。投与間隔を大きくとるよりも、1つまたは複数のグループを追加することが望ましい。

8. 母体毒性とその意義

母体毒性の指標となるエンドポイントには、死亡率、体重、体重増加、臓器重量、飼料および水の消費量、毒性の臨床症状、肉眼的または顕微鏡的病変などがある。また、補正平均母体重量増加量（初期母体重量と終末期母体重量の差から妊娠中の子宮重量を差し引いたもの）の算出も母体毒性の指標として用いることができる。

様々な被験物質は、雄、雌、または子孫に対して選択的な毒性作用を持つが、他の物質は非特異的な作用を示す。母子ともに被験物質の影響を受けた場合、その発達毒性が母性毒性を介しているのか、それとも母性毒性とは無関係に発生しているのかを判断することは困難である。被験物質の代謝、分布、排泄の違いにより、母体の感受性は胎児の感受性と大きく異なることがある。また、成人にはない発達過程があるため、胎児の反応は母親の反応と大きく異なることがある。

母体毒性を伴わない発生効果は、発達中の生物がより敏感になった結果として発生すると考えられているため、一般的に最も深刻な毒性の現れとみなされている。母体毒性があるにもかかわらず発生効果が認められた場合、その主な原因は推測されることが多い。母性毒性の存在下では、発生効果は常に二次的な毒性作用であるという前提を裏付ける十分な証拠がないため、既定の方法が必要である。最小限の母体毒性の存在下で発生した発生効果は、その発生効果が母体上の影響による疑いのない二次的なものであることが証明されない限り、発達毒性の証拠とみなされる。相当量の母体毒性がある用量でのみ発生効果が観察される場合には、被験物質の毒性に関する適切な評価を行うために、母体毒性と発生効果との間に考えられる関係性を評価する必要がある。

9. 母動物および胎児の臨床観察と検査

試験期間中、各動物は少なくとも1日2回観察されるべきである。1回目の観察では、徹底的な臨床検査を行う。2回目の観察では、ケージの中から動物を観察してもよい。観察時間は、被験物質のすべての毒性および薬理学的影響の開始および進行を検出できるように、また動物および臓器・組織の損失を最小限に抑えるように選択する必要がある。関連する行動の変化や、毒性、病的状態、死亡のすべての兆候を記録すること。

被験物質の初回投与の直前（通常、マウス、ラット、ウサギは妊娠6日目、ハムスターは妊娠4日目）、剖検までの毎週、剖検時に雌の体重を測定する。被験物質を食餌で投与する場合は、週1回の体重でよい。被験物質を強制経口投与する場合は、毎日

または少なくとも3日ごとに体重を測定する。飼料消費量は最低でも週1回測定すべきである。水分消費量は適切に測定する必要がある。試験中に切迫した流産や早産の兆候が見られたダムは、そのような兆候が見られた日に剖検されるべきである。

出産予定日の約1日前（ラットは20日目または21日目、ウサギは29日目、マウスは18日目、ハムスターは15日目）に試験を終了し、その際に母動物を肉眼的病理検査にかける。母動物を殺した後、直ちに子宮摘出により胎児を娩出する。すべての胎児（試験終了前に犠牲になったものを除く）が、胎児の発育のほぼ同じ段階で分娩されるように注意する必要がある。調整後の体重増加を算出するために、無傷の子宮を摘出して重量を測定する。子宮の内容物は、胚または胎児の死亡、および生きている胎児の数を調べる必要がある。死亡した胎児については、通常、子宮内で死亡したおおよその時間を推定し、説明することが可能である（早期死亡および後期死亡）。すべての妊娠動物について、胎児の数を決定する必要がある。

妊娠していないと思われるダムの子宮を、硫化ナトリウムや硫化アンモニウム⁽⁴⁾などの適切な化学物質の溶液で染色し、吸収部位の視認性を高める必要がある。帝王切開時の雌の評価とそれに続く胎児の分析は、無意識のバイアスを最小限にするために先入観なしで行うべきである。

子宮から取り出した後、各胎児の体重と性別を決定する必要がある。胎児を外見的に検査し、正常からのすべての逸脱を記録しなければならない。各胎児の頭頂から尻尾までの距離など、追加のエンドポイントを測定してもよい。ウサギの胎児の性別は内診によって決定されるべきである。それぞれの胎児の体重を測定し、グループごとの性別ごとの平均胎児体重を算出する必要がある。

胎児の骨格や軟部組織の異常を評価すること。げっ歯類では、軟部組織の変化を評価するために、約2分の1の胎児を Bouin's solution で保存し、Wilson serial section 法で切片にする。⁽⁹⁾残りの胎児は準備され、骨格異常の染色を行う(骨は Alizarin red stain、軟骨は Alcian blue stain を選択)。軟部組織または骨格の検査への割り当ては、無作為または交互に行うべきである。別の手法で観察したほうがよい異常が見つかった場合には、交互の手順に従わないこともある。例えば、明らかに骨格に欠陥がある標本は、骨格検査のために準備される。げっ歯類の骨の同定には、Yasuda と Yuki の環椎⁽¹⁰⁾を参考にすることができる。あるいは、すべてのげっ歯類の胎児を新鮮な状態で解剖して^{(1),(5)}軟部組織の異常を発見した後、固定して骨格の異常を調べてもよい。

ウサギの胎児は、軟部組織と骨格の両方の奇形と変異を調べる必要がある。体は新鮮な解剖で軟組織の異常を評価した後、固定して骨格の異常を調べるべきである。ウサギの胎児の頭部の少なくとも2分の1は、頭部の内部構造を評価する必要がある。この評価には、少なくとも眼球、脳、鼻腔、舌を含める必要がある。

10. 病理組織学

発育毒性試験を単独で実施する場合、帝王切開時に臓器に異常が認められない限り、病理組織検査を行う必要はない。

11. 測定されたエンドポイント

妊娠期間中は発育中の生物ではなく母動物が治療の対象となるため、データは産仔あたりの発生率、または特定のエンドポイントを有する産仔の数と割合として算出する。母体毒性の程度は、投与群で観察された胚毒性や胎児毒性の関連性を評価する上で有益であると考えられる。母動物の毒性を測定するためのパラメータとしては、体重や調整体重、飼料や水分の消費量、日々の臨床観察、臓器重量などの剖検データなどがある。

妊娠期間中に治療を行った場合、着床に影響が出る可能性がある。しかし、着床後に治療を開始した場合、受胎率と着床率は対照群と治療群で同じになるはずである。一腹あたりのエンドポイントとしては、着床数、産卵体数、生きている胎児数（雌雄別）、死んでいる胎児数、吸収された胎児数を測定する必要がある。生きている胎児の場合、雄と雌の平均体重、および正常な胎児の発育からのすべての乖離の1同腹仔あたりの発生率（骨格および内臓の分析）も報告する必要がある。

12. データの解析

対照群と試験群の動物の値を統計的に比較すること。以下の手法を用いることができるが、適切であれば他の手法で代用してもよい。母体の体重は、初期体重を調整した後、共分散分析により比較し、その後、保護された最小有意差検定により分析してもよい。胎児の体重は、入れ子式分散分析を用いて評価してもよい。仔の異常は、フィッシャーの正確検定で比較してもよい。胎児の生存率および仔ごとの異常の発生率は、Freeman-Tukey arc-sine 変換を用いてデータを変換した後、分散分析によって比較することができる。

発達毒性試験の結果報告

すべての試験の報告書には、試験プロトコルおよびすべての改訂版のコピー、すべてのパラメータの絶対値、完全なデータ（個々の産児）、産児ごとにまとめられ分析されたデータの表など、GLP で要求される情報が含まれていなければならない。妊娠期間中は発育中の生物ではなく母動物が治療の対象となるため、データは産児ごとの発生率として、または特定のエンドポイントを持つ産児の数と割合として計算する必要がある。被験物質の投与率（用量）は、mg/kg/day（1日の体重 1kg あたりの被験物質の重量（mg））で報告すること。

発生毒性試験のレビューでよく遭遇する問題としては、対照群または治療群あたりの妊娠動物の数が不十分であること、無作為ではない選択方法であること、データの統計分析を産児あたりではなく、胎児あたりで行っていることなどが挙げられる。試験を実施する前に、推奨されるガイドラインを注意深く検討し、また当局がプロトコルをレビューすることで、このような問題を解消することができる。

試験結果の理解を深めるために、関連する過去の対照データを使用することができる。使用する場合には、過去のデータをまとめ、試験日、動物の系統、使用した動物、賦形剤、投与経路などの追加情報を適切な方法で示すべきである。

レッドブック 2000: IV.C.10 神経毒性 試験 2007年7月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN:
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

July 2000

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

レッドブック 2000

第 IV 章 C.10 神経毒性試験

1. [要約](#)
2. [背景](#)
3. [神経毒性評価](#)
 - A. [スクリーニング](#)
 1. [神経毒性スクリーニングの要素](#)
 2. [神経毒性スクリーニングのためのプロトコル設計における留意点](#)
 - B. [特殊な神経毒性試験](#)
 1. [影響の特徴づけ](#)
 2. [用量反応関係](#)
4. [参考](#)

I. 要約

本章では、神経毒性と、成人および発育期の生物に生じる可能性のある神経系への幅広い悪影響を定義している。本章では、食品成分の神経毒性の可能性を評価することにより、ヒトの神経毒性のリスクを効果的に最小化する必要性に重点を置いている。本章では、神経毒性の評価に必要な情報の性質と範囲を説明し、食品成分としての使用が提案されている化学物質の安全性を評価するための毒物学的試験の一環として、これらの情報を日常的に入手するための戦略を提案している。FDA が提唱する毒物学的試験の基本的な戦略と同様に、神経毒性の可能性の評価は、段階的な試験の構造化されたプロセスを通じて最も効果的に行われるであろう。このプロセスでは、提案されている食品成分の初歩的な段階の試験で推奨されている毒性試験の一部として、最初に化学物質の神経毒性の兆候をスクリーニングする。神経毒の可能性が指摘された化学物質は、その後、神経系への影響範囲の確認と特徴づけ、無毒性レベルの定量的な決定を含む用量反応特性を決定するための特別な神経毒性試験の候補となる。ここでは、神経毒性スクリーニングおよび特殊な神経毒性試験の基本的な要素を示し、プロトコルの設計において考慮すべき原則的な点を議論する。

II. 背景

生物がその環境下で適切に機能する能力を著しく損なう変化を有害とみなす。**神経毒性**とは化学物質、生物学的物質、物理的物質への曝露が、発達期または成人の神経系の構造または機能的完全性に及ぼすあらゆる悪影響を指す。神経毒性には、生化学的、形態学的、行動学的、生理学的な異常が含まれ、その発現は有害物質への曝露直後から遅延し、その期間は一過性の場合もあれば持続する場合もある。これらの異常は、その重症度に応じて、生命を脅かす結果となる場合もあるが、より一般的には、生活の質の低下をもたらす。神経毒性は、有害物質が神経系の要素に直接作用する場合と、他の生物学的システムに作用して神経系に悪影響を及ぼす場合がある。安全性の観点からは、化学物質が神経系に直接または間接的に作用することで生じる神経毒性は、化学物質の毒物学的プロファイルの重要な要素である。しかし、神経系以外の毒性に続いて神経毒性が発生する場合は、後者の方がより感度の高いエンドポイントとなる。

1982年、FDAは食品成分の毒性試験に関するガイドラインを発表した。^② このガイドラインでは、神経毒性は明確には議論されておらず、定義もされていないが、神経系の毒性を評価するために伝統的に用いられてきた毒性試験には一定の要素が含まれていた。一般的には、神経組織の日常的な病理学的評価や、ケージサイドでの毒性の臨床症状の観察などが含まれていた。1985年、FDAはFASEB（Federation of American Societies for Experimental Biology：米国実験生物学会連合）に、神経毒性を検出するための現行のFDAガイドラインの有用性を評価するよう依頼した。^③ FASEBの報告書では、現行のガイドラインは、化学物質の神経毒性を評価するためにFDAに提供すべき情報の性質と範囲に関して、あまりにも広範で非特異的であるという結論が出された。現在実施・報告されている従来の毒性スクリーニング試験から得られる限られた情報は、一般的な神経病理や明らかな神経機能障害を伴う明らかな神経系毒性を検出する程度のものである。行動・生理機能障害や発達神経毒性など、重篤度は低いと同様に重要な他の神経毒性については、一貫性のある体系的な文書化された情報はほとんどない。神経系の構造的・機能的完全性に対する悪影響の範囲に関する不完全な文書化は、神経毒性の危険性の全範囲を効果的に評価することを制限する。^④ 現在のFDAガイドラインは、神経毒性の評価に必要と思われる情報の性質と範囲をより明確に説明し、安全性評価プロセスの一環としてこれらの情報を得るための戦略を提案することを目的としている。

最近まで、神経毒性は、明らかな神経病理学的病変を伴う神経障害や、痙攣、麻痺、振戦などの明らかな神経機能障害と同一視されていた。ドウモイ酸、鉛、有機水銀、ヘキサシアン、二硫化炭素、トリオルソクレシルホスフェートなど、化学物質によって誘

発される神経障害の例は、ヒトが曝露する可能性のある化学物質の神経毒性を評価する必要性を強調している。⁽⁵⁾ 神経障害は神経毒性の現れとして適切に認識されているが、現在では、神経系の毒性を示す可能性のある他の多くのエンドポイントがあることが明らかになっている。⁽⁶⁾ 現在進行中の神経系毒性の研究では、毒性物質が直接的、間接的に引き起こす生化学的、構造的、機能的な異常の多様性が明らかになっている。⁽⁷⁾ 神経毒性のある化学物質は、必ず分子レベルで作用を開始し、細胞の神経化学プロセスを変化させる。これらの変化の質的な性質やその大きさは、生理学的または行動学的な異常として表現される神経系の機能障害を伴う細胞構造の変化や神経病理学的な影響をもたらすようなものである可能性がある。⁽⁸⁾ 成人や発育途上の生物における運動協調性の欠如、感覚障害、学習・記憶障害、感情の変化、覚醒状態の変化などは、神経毒性の可能性を示す機能的指標として認識されている障害の例である。注目すべきは、生理学的または行動学的な機能障害は、明らかな神経病理学的徴候やその他の毒性の徴候に先立って、あるいはそれらがなくても生じることがあるということである。⁽⁹⁾ このことは、バルビツール酸塩、アンフェタミン、エタノール、鉛、一酸化炭素などの神経活性化学物質を、明らかな神経障害の兆候がほとんどないレベルで曝露した場合に起こる行動障害に代表される。⁽¹⁰⁾ このような神経病理と機能的変化の乖離には、化学物質の本質的な毒性や、特に曝露量や曝露方法など、さまざまな要因が関係していると考えられる。神経障害を神経毒性の第一基準とし続けることは、単純すぎるし、成人や発育期の生物に対するより広範な神経毒性の影響に関する現代の懸念を十分に反映していない。

神経毒性の評価には様々なアプローチがあるが、中でも神経病理学的評価と組み合わせた行動学的検査は、標準的な毒性試験の中で、神経系の機能的発達と完全性を比較的包括的に評価するための実用的な手段である。⁽¹¹⁾ 行動とは、内部および外部からの一連の刺激に対する、神経系によって組織化された生物の適応的な反応である。行動反応は、感覚、運動、認知、注意、統合的な要素を含む複数のニューロンサブシステムと、一連の生理学的機能の統合された最終産物である。⁽¹²⁾ そのため、行動は、神経系の複数の機能要素の状態を示す測定可能な指標となる。行動学的検査は非侵襲的であるため、被験物質の神経毒性を長期的に評価するために繰り返し適用することができ、治療に関連した持続的または遅延的な影響を含む。⁽¹³⁾ さらに、神経細胞の機能は、体内の他の器官系（循環器系、内分泌系、免疫系など）の状態に影響されることがあるため、ある種の行動変化は、他の器官系における重大な一次毒性を間接的に反映している可能性がある。このため、神経毒性の評価には、すべての毒物学的データを統合的に解釈することが必要であることを強調しておく必要がある。

行動学的検査は、安全性評価における信頼できる毒物学的指標として確立されている。神経行動学的および神経発達学的試験法の標準化と妥当性の確認において、かな

りの進展が見られた。⁽¹⁴⁾ その結果、成体および発育途上の生物の神経系の機能的完全性に悪影響を及ぼす化学物質の可能性を判断するために、様々な行動学的手法が利用できるようになった。⁽¹⁵⁾ 行動学的な試験は、毒性試験のプロトコルに容易に組み込むことができ、神経病理学的な評価と合わせて、神経毒性の危険性を評価する能力を高めることができる。⁽¹⁶⁾

神経系の毒性は人間の健康に影響を与える可能性があるため、食品成分として提案されている化学物質の神経毒性の可能性を評価することは、その化学物質の毒物学的プロファイルに不可欠な要素となる。⁽¹⁷⁾ 現在の科学技術は、化学物質の神経毒性を効果的に評価するための十分な手段を提供している。⁽¹⁸⁾ ヒトにおける潜在的な神経毒性のリスクを効果的に最小化するためには、必要な情報を得るために利用可能な最善の科学を用いることが重要である。実験的な動物モデルで確認された神経毒性の影響は、必ずしも人間に起こりうるものと正確に比較できないことを明確にしておく必要がある。それにもかかわらず、これらの影響は、治療に関連した神経系への影響を示し、ヒトにおける健康への悪影響の可能性を予測していると解釈されている。神経科学の進歩に伴い、神経毒性の基礎となるプロセスについての理解はますます深まるであろう。これにより、神経毒性を評価する能力が高まり、潜在的なヒトのリスクをより予測できるようになり、また、利用可能な神経毒性情報を規制上の決定をサポートするために、より確実に適用できるようになるだろう。⁽¹⁹⁾

III. 神経毒性評価

被験物質の神経毒性の全領域を評価することの信頼性は、日常的な毒性試験の目的として、神経毒性の検出と評価が明確に盛り込まれているかどうか直結する。⁽²⁰⁾ FDAが提唱する毒性試験の基本的な戦略や、専門家委員会、科学委員会、健康関連団体の推奨事項に沿って、神経毒性の評価は、構造化された段階的な試験のプロセスを通じて最も効率的に行われる。⁽²¹⁾ 各段階の試験では、評価の異なる側面に焦点を当てる。第一段階の試験では、まず化学物質を様々な用量レベルでスクリーニングし、神経系を含む毒性の臨床的・病理学的徴候があるかどうかを調べる。神経系に悪影響を及ぼす証拠を示した化学物質は、神経系への影響の範囲を確認し、さらにその特徴を明らかにするため（すなわち影響の特徴づけ）、用量反応速度を決定するため（すなわち用量反応の決定）に、NOAEL（無毒性量）の定量的な決定を含めて、その後の特定の神経毒性試験の候補として推定的に特定される可能性がある。

神経毒性の試験・評価を段階的に行うことで、入手可能な情報の妥当性や追加試験の必要性を科学的に判断するための複数の判断ポイントを設けることができる。このような判断を容易にするために、各レベルの試験結果の評価には、被験物質の神経毒性

に関する具体的な要約文を含めるべきである。神経系は、体内の他の器官系と動的に相互作用するため、神経系への悪影響は、被験物質のすべての重大な毒性作用を総合的に評価する中で、評価されるべきである。この観点から、神経毒性の要約文には、入手可能なすべての関連する毒性データの総合的な評価を反映させるべきである。これには、神経系毒性の検出に特化した試験（例：神経病理、行動異常、神経化学変化、生理学的変化）から得られる情報だけでなく、他の毒性の指標に焦点を当てたより一般的な毒物学的試験（例：一般的な臓器の病理、成長、発育、食物や水の摂取、内分泌状態における有害な変化）から得られる情報も含まれる。

従来の毒性評価項目の中には、神経生物学的な意味合いを持つものがあり、それは他の項目よりも明らかである。例えば、高用量であっても神経系に特異的な催奇形性を誘発する化合物は、低用量でも神経系機能の発達に悪影響を及ぼすことが疑われる。しかし、他の種類の毒性については、神経毒性の重要性があまり明らかでない場合がある。例えば、ホルモンバランスを変化させる化学物質は、内分泌状態と神経系が相互に関連していることから、神経系の構造的または機能的完全性に影響を与えることが疑われる。一般的な毒性の指標とされている成長の変化も、神経毒性の存在を示唆する場合がある。発育中の生物では、異常な成長は、授乳中の子供へのケアが不十分な母親の治療に関連した神経毒性を反映している可能性がある。成人の場合、食物や水の摂取量の変化に起因する成長の変化は、基礎的な神経系の機能障害を反映している可能性がある。というのも、飲食はどちらも神経細胞の制御下にある神経筋および生理学的要素を伴う消費行動だからである。しかし、このような一般的な毒物学的エンドポイントは、それ自体が神経毒性の証拠となるものではないことを明確にしておく必要がある。むしろ、他の入手可能なデータと合わせて考えると、このような影響は、治療に関連した神経系への影響の可能性を示すことになる。繰り返しになるが、神経毒性の可能性を評価する際には、入手可能なすべての毒物学的データを統合的に解釈する必要性を強調することが重要である。

A. スクリーニング

神経毒性を評価する最初の段階では、神経系に悪影響を及ぼす可能性のある化学物質を特定するためのスクリーニングが行われる。スクリーニングの主な目的は検出であることは明らかである。神経毒性の可能性が高いと判断された化学物質は、通常、より具体的な神経毒性試験を実施する候補として検討される。このような状況下では、スクリーニング法によって得られる情報の性質と程度は、神経毒性のNOAELを決定するための十分な根拠とはならない。むしろ、NOAELを正確に決定するためには、後続の試験段階で得られる、より具体的な神経毒性に関する情報が必要となるだろう。

スクリーニングで有意な神経毒性の可能性が確認されなかった場合には、通常、神経毒性のNOAELを定義する根拠も必要性もない。

神経毒性のスクリーニング情報には、基本的に3つの情報源がある。1つは構造活性相関（SAR）を利用するもの、2つ目は公表されている文献やその他の資料に依拠するもの、3つ目は経験的な試験に依拠するものである。しかし、神経毒性に関するSARデータベースはまだ開発中であるため、神経毒性物質を特定するためのSARの有用性や信頼性は、現時点ではかなり限定的である。公表されている文献やその他の文書化された情報を利用することは、この種の情報が利用可能であり、規制の適用に適している場合には、神経系に影響を与える可能性のある化学物質を特定する上で重要な価値を持つ。しかし、この種の情報は通常散在しており、多くの食品成分では利用できないのが普通だ。現時点では、神経毒性のスクリーニングデータを得るための主な手段は、経験的な試験である。化学物質の神経毒性のスクリーニングに必要な実験データは、提案されている食品成分の「入り口レベル」の試験に推奨されている毒性試験の一部として、日常的に入手されるべきである。神経毒性のスクリーニング情報は、比較的高用量の被験物質を短時間に曝露した成体動物をスクリーニングする短期試験（例：14～28日間のげっ歯類および非げっ歯類）や、亜慢性試験（例：90日間のげっ歯類および非げっ歯類）で最も適切に作成することができる。また、周産期に曝露された子孫の発達神経毒性をスクリーニングするための生殖・発達試験を実施した。他の種類の毒性試験（例：慢性試験）で神経毒性のスクリーニング情報を開発することは、確実に受け入れられ、奨励される。

神経毒性のスクリーニングでは、有効かつ費用対効果の高い方法を用いて、迅速かつ日常的に多数の化学物質を用いて、神経系に対する即時的または遅延的な悪影響の有無を検出することが必要である。⁽²²⁾ 神経毒性は、神経系の組織の非常に特異的なレベルまたは複数のレベルにおいて、神経系に関わる広範な形態的および機能的な異常として現れる可能性がある。⁽²³⁾ これまでの食品成分の毒性試験のガイドラインでは、神経組織のいくつかの切片を用いた一般的な病理学的評価と、ケージ内の試験動物に明らかな毒性の兆候がないかどうかを観察するという、構造化されていないカジュアルな観察から得られる情報に基づいて、神経毒性の影響を特定していた。⁽²⁴⁾ この方法では、より深刻な形態の神経毒性を中心に検出していた。検出の範囲を最大化するために、スクリーニングは、神経系の末梢、中枢、自律神経の代表的な様々な病理学的変化や機能障害を検出できるように十分に包括的でなければならない。⁽²⁵⁾ 生殖・発達研究においては、年齢に応じた神経毒性スクリーニングにより、子孫の身体的・機能的発達に対する治療関連の影響を検出できるようにすべきである。

1. 神経毒性スクリーニングの要素

基本的な神経毒性スクリーニングの要素には、系統的な臨床評価と併せて、特定の病理組織学的検査が含まれるべきである。

- 特定の病理組織学的検査

特定の病理組織学的検査は、脳、脊髄および末梢神経系のすべての主要な領域および要素を代表する組織試料を用いて行うべきである。神経系のすべての主要な部位および要素を含む場合には、使用する切片の数よりも、神経組織の病理組織学的検査の慎重さおよび所見の記録に重点を置くべきである。スクリーニングの目的では、組織の浸漬固定または体内かん流のいずれも許容される。典型的には、最初の検査は、対照群および最高用量群の組織を用いて実施する。陽性の所見があった場合には、他の線量群の組織の検査を行う。未熟な神経系の形態学的評価においては、年齢的に適切であるという概念も考慮すべきである。⁽²⁶⁾

- 系統的な臨床評価

実験動物の系統的な臨床評価は、重大な神経学的障害、行動異常、生理学的機能不全、および神経系毒性のその他の徴候を検出するために選択された、明確に定義された臨床試験および観察を用いて、ケージの内外で行われるべきである。通常、臨床検査では、動物の外見、体の姿勢、体重に加えて、痙攣、震え、麻痺、その他の神経障害の兆候、運動量や覚醒度などのエンドポイントの発生率と重症度を評価するのに以下の十分な情報を提供しなければならない。取り扱いやその他の刺激に対する動物の反応、運動協調性と力強さ、歩行、一次感覚刺激に対する感覚運動反応、過剰な流涙や唾液分泌、毛繕い、下痢、多尿、眼瞼下垂、消費行動の異常、その他の異常行動や神経系毒性の兆候など。年齢に応じた試験に対応するため、発達神経毒性の可能性に関するスクリーニングには、実験用の子孫における代表的な身体的特徴（例えば、体重、外生殖器の発達）および機能的マイルストーン（例えば、整直反射、驚愕反応、運動発達）の出生後の発達の測定を含めることができる。機能評価画面を実施する際には、まず動物を自宅のケージ内で観察し、その後、開放されたアリーナに移動して観察と操作テストを完了する必要がある。必要に応じて、学習や記憶のテスト、感覚機能や運動行動の定量的な測定など、神経毒性のより高感度で客観的な指標をスクリーンの一部として含めることができる。⁽²⁷⁾さらに、神経毒性のスクリーニング情報は、その他の関連する毒物学的所見で補完することが重要である。

2. 神経毒性スクリーニングのプロトコル設計における考慮点

成体⁽²⁸⁾や発育中および成熟期の子孫⁽²⁹⁾に適した神経毒性スクリーニングの設計および実施の参考となる文献は多数ある。神経毒性スクリーニング情報を得るためのプロトコル設計の過程では、以下の点を考慮すべきである。

- 各試験所は、神経毒性の評価における継続的な能力を示す履歴データベースを作成し、維持するべきである。神経毒性スクリーニングは、GLP 要件に準拠し、手順を適切に実施するための十分な訓練を受けた担当者が実施する有効な試験方法で構成されるべきである。神経毒性を検出するために提案されたスクリーニングの信頼性および感度は、過去または同時に得られた陽性対照データによって証明されなければならない。
- 定の試験において神経毒性スクリーニングを完全かつ一貫して適用するために、各試験計画書には、その試験で使用する特定のスクリーニングについて、その構成、従うべき試験手順、スクリーニングを実施する期間、調べるべき神経構造、使用するエンドポイント、データの記録・分析方法などの詳細な説明を含めるべきである。特試験の実施中、詳細な臨床評価は、必要に応じて用意された検査・観察用のチェックリストを用いて、体系的に実施されなければならない。すべての実験手順は文書化されるべきである。
- 神経毒性スクリーニングは、一般毒性試験及び生殖毒性試験のいずれにおいても日常的に行われることを意図しているため、スクリーニングの具体的な構成及び記録されるエンドポイントは、試験の特定の焦点に合致したものでなければならない。特に、試験対象となる動物の年齢（及び種）に適したものでなければならない。例えば、潜在的な発達神経毒性をスクリーニングするためには、繁殖試験の各実験群からの代表的な雌雄の子孫に対して系統的な評価を行い、それらの子孫における代表的な身体的ランドマーク（例えば、体重や外生殖器の発達）や機能的マイルストーン（例えば、整直反射、驚愕反応、運動発達）の発生・成熟の測定を含むことが適切であろう。離乳前の仔の評価は、例えば仔を雌から引き離す期間を最小限にするなど、主要な繁殖試験の完全性を維持するように計画すべきである。発育中もしくは成熟した子孫の基本的なスクリーニングを補完するために、学習・記憶のテスト、感覚および運動機能の定量的な測定など、神経毒性の他の、より感度の高い、またはより客観的な指標を任意で含めることが、別々のまたは衛星子孫に奨励されるであろう。また、未熟な神経系の形態学的評価においては、年齢に適した概念を考慮すべきである。⁽³⁰⁾ 成体、発育期及び成熟期の子孫⁽³¹⁾の神経毒性スクリーニングに適した臨床試験の設計及び実施の指針となる出版物が多数存在している。⁽³²⁾

- 試験は、神経毒性作用の一貫性、可能であればその発症、持続、可逆性に関する情報を提供するために、試験期間中、代表的な間隔で実施されるべきである（可能であれば、治療前のベースラインを含む）。
- スポンサーまたは試験所の判断により、神経毒性スクリーニング試験を実施するために、サテライトグループの動物を使用することができる。
- 測定されるエンドポイントの変動性を考慮した有効な統計解析を行うために、各実験群及び対照群から十分な数の雌雄の動物を使用すべきである（一次毒性試験プロトコルのガイドラインで推奨されている）。可能な限り、試験の選択は、最小数の動物を使用して最高レベルの検出性を得るべきである。成人期の研究では、個々の動物を統計単位として使用するのが一般的であるが、発育期の研究では、一般的に仔が適切な統計単位であると考えられる。スクリーニングを目的とした場合、最初の組織化学的検査には対照動物と高用量動物の組織を用いることができる。治療に関連した影響が認められた場合には、低用量群の組織を引き続いて調べる必要があるであろう。
- 実験計画には、例えば、治療群に無作為に割り当て、可能な限り実験者が治療条件を知らない状態で試験を実施するなど、不慮のバイアスを最小限に抑えるための手段を含めるべきである。飼育条件、食餌及び栄養状態、概日周期、試験間の相互作用、環境条件及び取扱いなど、交絡する可能性のある変数を管理するために適切な手順を踏むべきである。例えば、発育期の神経毒性の可能性をスクリーニングする際には、妊娠中または授乳中の雌の直接臨床評価を制限し、そのような取り扱いによる母体の行動への影響を最小限に抑えるべきである。
- 毒性試験で日常的に得られる神経毒性スクリーニング情報を最大限に活用するために、実験データは正確に記録し、文書化し、FDAに報告しなければならない。すべての肯定的な効果の要約表を提示すべきである。さらに、収集したすべてのデータ（陽性および陰性）をFDAに提出し、審査担当者が実際の試験結果を確認できるようにすること。必要に応じて、適切で受け入れ可能な統計手順を用いてデータを分析すること。この情報は、他の関連する毒性データとともに、試験化学物質が神経系の構造的または機能的な完全性に悪影響を及ぼす可能性についての総合的な評価に組み込まれるべきである。この評価に基づいて、被験物質が特別な神経毒性試験を必要とするような潜在的な神経毒性の危険性を示しているかどうかについて、明確なステートメントを作成する必要がある。追加的な神経毒性試験のための試験プロトコルは、有効な最新の方法論を用いて作成しなければならない。
- 神経毒性評価のためのプロトコル設計および試験の過程では、FDAとの協議の機会が設けられ、奨励されている。

化学物質の神経毒性を評価するための *in vitro* システムの開発に注目が集まっている。⁽³³⁾ *In vitro* の方法は、生きた動物の使用を最小限に抑えるなど、実用的な利点があるが、*in vitro* の結果と全動物の神経毒性反応との相関性を検証するための研究が必要である。このようなシステムは、適切に検証されれば、潜在的な神経毒性のスクリーニングや、作用機序やメカニズム情報の解明に特に有用であると考えられる。

スクリーニングで得られた情報は、被験物質が神経毒性を示すかどうか、また、神経毒性の確認や特徴を明らかにするための追加試験、NOAELs の定義、その他の必要な情報を得るために推奨すべきかどうかを判断するために使用される。この評価を行う際には、神経毒性のスクリーニング情報を科学的に解釈するために多くの考慮事項がある。これらには、スクリーニング評価の妥当性と完全性、検出された影響の性質と重大度、用量間の影響の一貫性、試験内の試験間隔間の影響の一貫性、異なる種類の毒性試験における影響の再現性、他の毒性作用の存在、神経毒性を生じる用量と他の毒性作用を生じる用量との差のマージンが含まれる。スクリーニングによってこれらの問題に対処するための情報が得られるかどうかは、潜在的な神経毒性の危険性を特定する上での信頼度を高め、スクリーニングからより包括的な神経毒性情報の作成に進む必要性を判断する上で役立つ。このような特殊な神経毒性試験を実施するかどうかは、FDA と相談して決めるべきである。

特別な神経毒性試験

SAR、経験的スクリーニング、またはその他の情報源により、ある化学物質が神経毒性を持つと推定された場合、その化学物質は追加の神経毒性試験の候補となる。スクリーニングで神経毒性が確認されなかった化学物質は、例外もあるが、通常はその後の神経毒性試験を推奨しない。特別な神経毒性試験では、神経毒性作用の特徴を明らかにし、用量反応関係を決定することに重点を置く。

1. 影響の特徴付け

神経系に悪影響を及ぼす化学物質を推定的に特定した後、次のレベルの試験では、その化学物質によって神経系がどのような性質や程度で影響を受けるのかを判断することに焦点を当てる（特性評価）。このレベルでは、スクリーニングで発見された神経毒性の影響をさらに特徴づけ、試験化学物質が成熟および発達した生物の神経系の構造および機能的完全性に対して、他の、おそらくより微妙な影響を与えるかどうかを判断するための研究が行われる。この段階での神経毒性の詳細な評価には、影響の性質と重症度、影響の発現の時間的パターン（特に遅延神経毒性が発生した場合）、影響の持続時間に関する情報が含まれる。微小な神経病理学的所見の検出を向上させ

るために、組織をその場で灌流固定し、関連する神経構造を強調するための特殊な染色を用いて詳細な病理組織学的検査（スクリーニング時に実施した病理組織学的検査よりも詳細な検査）を実施すべきである。⁽³⁴⁾

このレベルの神経機能評価では、主要な下位機能（例：認知、感覚、運動）の有害な変化を検出するために、行動学および生理学的テストのコアバッテリーを定期的に行うべきである。⁽³⁵⁾ 例えば、ある化学物質がスクリーニング中に痙攣を誘発することが観察された場合、その化学物質の痙攣の可能性と痙攣を誘発する特性は、第2段階の試験でより具体的に特徴づけられるべきである。

2. 用量反応関係

化学物質の神経毒性を定義する際の重要な要素として、NOAEL（no-observed-adverse-effect level）があり、通常は以前の試験で特定された最も関連性の高い感度の高いエンドポイントを使用する。NOAELをより定量的に決定するためには、十分なデータを取得して、断続的および連続的な曝露などの反復曝露試験における用量反応および用量-時間関係を徹底的に明らかにする必要がある、通常は最も関連性が高く感度の高いエンドポイントを使用する。

特別な神経毒性試験のプロトコルは、FDAと協議の上、試験手順の適切性と信頼性、管理手段の適切性、実験デザインと試験スケジュール（頻度と期間）の適切性など、神経毒性スクリーニングのプロトコル作成に関わるものと同様の要素を考慮して作成されるべきである。一次毒性試験プロトコルのガイドラインに沿って、特別な神経毒性試験は当初、主要な種としてげっ歯類を用いて実施される。しかし、必要に応じてFDAと協議の上、より信頼性の高い種間外挿に必要な情報を得るために、ケースバイケースで非げっ歯類を用いた神経毒性試験を推奨する場合がある。⁽³⁶⁾

特別な神経毒性試験の段階では、神経毒性の危険性をより包括的に評価するための追加的な関連情報を開発する努力が確実に奨励される。例えば、治療に関連した神経化学的变化の発生、被験物質の薬物動態特性、あるいは被験物質に対する生物の感受性を調節する要因に関する情報は、化学的に誘発される神経毒性の基礎となる神経生物学のプロセスの理解を深めるのに役立つだろう。このような機構的な情報があれば、入手可能な動物実験データをより信頼性高く解釈し、ヒトの神経毒性リスクを予測することができる。

レッドブック 2000: VI.B. 疫学

2001年10月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN:
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

October 2001

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

[レッドブック 2000 の目次に戻る](#)

1. [記述的疫学研究](#)
 - a. [相関関係研究](#)
 - b. [症例報告](#)
2. [分析的疫学研究](#)
 - a. [横断的研究](#)
 - b. [プロスペクティブ研究](#)
 - c. [レトロスペクティブ研究](#)
 - d. [メタ分析](#)
3. [疫学研究の参考文献](#)

疫学とは、特定の集団における健康関連の状態や事象の分布とその決定要因を研究し、この研究を健康問題の制御に応用することである。⁽⁵⁾ 疫学研究の目的は、特定の物質への曝露と健康状態の変化との関係を明らかにすることである。

疫学データは、CFSAN が安全性を評価する上で重要であり、CFSAN は、研究の道筋やさらなるヒトでの研究が最も生産的になる指標として使用している。研究集団の選択、適切な対照群の選択、曝露評価、交絡変数の調整または制御に使用する方法、統計分析など、疫学研究の適切な実施と文書化のためのガイドラインについては、ここでは説明しない。適切なガイドラインが別の場所で公表されているため⁽⁴⁾、申請人は疫学データを提出する前に参考にとすること。

疫学研究には、記述的研究と分析的研究の2つの主要なカテゴリーがある。記述的研究は、変数の既存の分布に関するものであり、仮説の検証や因果関係の推論は行わな

い。分析的研究は、関連性、特に仮説が立てられた因果関係を検証することを目的とし、特定のリスク要因の影響を特定または測定することに焦点を当てている。

1. 記述的疫学研究

記述的疫学研究は、比較的安価に実施することができ、通常、短期間で終了する。しかし、このような研究では因果関係の推論ができないため、その有用性は限られている。一般に、記述的疫学研究は、仮説を立てるため、あるいは、より長期間で費用のかかる分析的研究を実施する十分な理由があるかどうかを示す証拠を提供するための前哨手段である。

a. 相関的研究

相関的研究は、生態学的研究とも呼ばれ、グループ化された集団データを用いて、集団全体の曝露パターンと集団全体の疾病発生率や死亡率とを関連付ける。これらの研究は、個人の曝露と疾病の関係を調べるものではないため、従来、科学的仮説を明確に検証するというよりも、仮説を生み出すために有用であると考えられてきた。そのため、相関研究の結果は、他の種類のデータがなければ、関係性を示すには不十分である。

b. 症例報告

症例報告は、CFSAN が頻繁に評価する記述的な疫学研究の一種である。因果関係を強く示唆するような逸話や臨床観察結果は、因果関係の可能性を示すことがある。その後、リスクを検証して定量化し、交絡因子の役割を決定するために、分析的な疫学研究を行うことができる。

1つ目は、査読付きの医学文献に掲載された報告であり、2つ目は、CFSAN が実施している自主的な（「パッシブ」とも呼ばれる）有害事象モニタリングシステムの1つまたは複数に記録された報告である。

The Adverse Reaction Monitoring System (副作用モニター制度：ARMS) - 消費者および医療従事者から、食品による副作用の疑いに関する自発的な報告を収集する。

The Cosmetic Adverse Reaction Monitoring System (化粧品副作用モニター制度：CARMS) - 化粧品の副作用に関する消費者および医療従事者からの自発的な報告を収集するシステム。

さらに、CFSAN は、FDA の [MedWatch](#) プログラムを通じて、規制対象製品に関連する副作用に関する報告を受けている。⁽⁴⁾

2. 分析的疫学研究

分析的疫学研究は、記述的研究よりも情報量が多いが、その実施には費用と時間がかかる。CFSAN が安全性評価において一般的に考慮している分析的疫学研究の種類には、横断的研究、プロスペクティブ研究、およびレトロスペクティブ研究がある。このような研究の結果は、入手可能な場合、規制対象製品の総合的な安全性評価に使用される。さらに、分析的疫学研究は、1990 年の栄養表示・教育法によって認可された食品上の健康強調表示および食品表示に関する CFSAN の規制の科学的基盤を構成している。

a. 横断的研究

横断的研究とは、個人をある時点でのみ観察する研究であり、このような研究は一般に測量として知られている。ある特定の時点における研究集団の各メンバーまたは代表的なサンプルについて、疾患の有無および原因と思われる要因の有無を決定する。横断的研究の利点は、比較的安価に実施でき、比較的短時間で終了することができることである。しかし、クロスセクション研究では、曝露と疾病の時間的順序については何も明らかにされず、必然的に現在の曝露を過去の曝露の代替として使用することになる。また、横断的研究では、疾病の発生率ではなく、疾病の有病率しか測定できない。

b. プロスペクティブ研究

コホート研究や追跡研究とも呼ばれるプロスペクティブ研究では、研究者は曝露者と非曝露者からなる研究集団を選び、両集団を追跡して疾患の発生率を測定する。この集団は、疾患の発症や経過に影響を与えると考えられる因子や、危険因子の有無（例えば、何らかの物質への曝露や非曝露）によって特徴付けられる。一般に、研究は、大規模な集団を対象とした研究、長期間にわたる研究、またはその両方を意味する。この種の研究デザインは、疾患と特定の曝露との関連を示す十分な証拠（臨床観察や記述的疫学研究から得られたもの）がある場合、曝露はまれだが曝露者の疾患発生率が高い場合、そして曝露から疾患までの期間が短い場合に有効である。プロスペ

クティブ研究の最大の利点は、対象となる疾患の罹患率を直接測定できることであり、したがって、絶対リスクや相対リスクも直接測定できる。また、特定の曝露と複数の疾病との関連を分析することができ、曝露と疾病との時間的な関係を確立することができる。

プロスペクティブ研究には、以下のような多くのデメリットがある。明確な結果を得るためには、大規模な調査集団と長期間の観察が必要となるため、研究の実施が困難で費用がかかること、2) コホートのすべてのメンバーを追跡しないと、バイアスが生じる可能性があること、3) 研究期間が疾患の潜伏期間よりも短くなる可能性があること、例えば、高齢になる前に研究を中止すると、がんなどの多くの重要な疾患が見逃される可能性があること、そして最も重要なことは、4) プロスペクティブ研究は希少疾患の研究には非常に非効率的であることである。

例えば、ベンゼン、ダイオキシン、塩化メチレンの安全性評価には、職業コホート研究やがん原性物質に偶然さらされた人間集団の研究が用いられている。FDA は、ミシガン州のコホートにおける PBB への偶発的な曝露に関するプロスペクティブ研究や、セーシェル諸島の妊婦（およびその子孫）のコホートにおける魚のメチル水銀への曝露に関する研究にも資金援助を行っている。

c. レトロスペクティブ研究

症例対照研究としても知られるレトロスペクティブ研究では、特定の疾患を持つ症例と、その疾患を持たない適切な対照群を選び、両群の過去の病因となりうる因子への曝露に関するデータを得ることができる。そして、2つのグループの曝露率を比較する。症例対照法は、ほとんどのがんのようなまれな疾患を研究する場合に適している。というのも、プロスペクティブ研究で結論を出すためには、非常に多くの人が必要になるからである。複数の曝露や要因と特定の疾患との関連を検出することは可能であるが、病因の交絡という問題を回避するために、一般的にレトロスペクティブ研究は、感染症などの何らかの特異的な原因を有する疾患の研究に用いられる。

症例対照研究では、曝露集団と非曝露集団のいずれにおいても疾患の発生率がわからないため、絶対リスクや相対リスクを直接求めることはできない。しかし、レトロスペクティブ研究では、症例の曝露オッズを対照の曝露オッズで割ったオッズ比によって相対リスクを推定することができる。オッズ比は、対象となる症例が曝露に関してすべての症例を代表しており、対照となる症例が曝露に関してすべての対照を代表しており、研究対象となる疾患が稀である場合に、相対リスクの良い近似値となる。

レトロスペクティブ研究は、プロスペクティブ研究に比べて、費用や時間がかからずに実施できる。また、対象となる疾患の症例のみを抽出するため、エンドポイントの決定にバイアスがかからない。しかし、症例の検出と選択、および曝露の評価においては、しばしばバイアスが生じる。対照群は、調査対象となっている要因を除き、被曝した症例と同一でなければならないが、この要件は実際には達成が困難な場合が多い。前向き研究と同様に、競合する危険因子や交絡因子をコントロールしようとすると、しばしば問題が生じる。研究者は、コントロールを選択する際にマッチングを行うか、統計的に層別を行うか、あるいは回帰モデルを使用することにより、既知の交絡因子を調整することができる。

症例対照研究の結果は、FDAの安全性評価において、主に安全性の全体的な評価にさらなる情報を加えるために頻繁に使用されてきた。過去には、FDAはNational Bladder Cancer Studyや人工甘味料の使用など、関心のある化合物に関する症例対照研究を支援してきた。また、FDAは食品由来の病気が発生した際に、症例対照研究の結果を慎重に検討し、感染源となった可能性の高い食品を特定する。この結果をもとに、特定の食品を微生物学的検査の対象とすることで、その食品から病原体を回収することができる。

d. メタ分析

メタ分析とは、「個々の研究から得られた分析結果の大規模な集合体を、知見を統合する目的で統計的に分析すること」と定義されている。⁽³⁾よくできたメタ分析の結果は、異なる研究の結果を共通の尺度で提示する方法として受け入れられることがある。しかし、誤った結論を導く可能性があるため、結果を一つの値にまとめようとする前に、注意が必要となる。⁽²⁾

メタ分析を適切に実施するためのガイドライン^{(6),(7)}として査読付きのいくつかの文献には以下のものがある。

- 研究の組み入れと除外の基準を明確にし、このプロセスにおけるバイアスを回避する。
- 各研究における研究対象者の特性、その介入、および結果が比較可能であるかどうかを判断すること。
- 研究からデータを抽出するために、明確に定義された方法を用いること。
- 複数の研究の結果を一貫した方法で表現すること。
- データの評価に適切な統計的手法を用いていること。

FDA がメタ分析を評価する場合、FDA はこのような分析を、仮説に関するデータの有効性を確認するための最大の根拠というよりも、主に補助的な証拠として考える。メタ分析のデザインの健全性と、個々の研究のデータの質を評価し、データの重要性を判断するために、FDA は各メタ分析を慎重に精査しなければならない。このような精査には、メタ分析に使用されたオリジナルの研究のレビューが必要となる。

全ての動物に対して。

レッドブック 2000: VII. 用語解説 頭字語と定義

2007年4月

発行元：

Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety (CFSAN):
米国食品安全・応用栄養センター 食品添加物安全局)

April 2004

食品成分の安全性評価のための毒性学的原則

頭字語	定義
Act	「The Act」, 例: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (連邦食品医薬品化粧品法)
ABS	染色体異常
ADI	一日許容摂取量
A/G	アルブミン・グロブリン
ANOVA	分散分析
B-cells	Bリンパ球

頭字語	定義
B/T	Tリンパ球・Bリンパ球比
CAC	がん評価委員会
CAS	化学情報検索サービス機関
CCFAC	コーデックス委員会食品添加物・汚染物質部改
CFR	連邦規則集
CFSAN	食品安全応用栄養センター
CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CMI	細胞性免疫
CSO	消費者安全管理者
DNA	デオキシリボ核酸
DTH	遅延型過敏症
EAFUS	米国で食品に使用される全物質（データベース）
ECVAM	欧州代替法評価センター

頭字語	定義
EDI	推定一日摂取量
ELISA	酵素結合免疫吸着検査法
EPA	(米) 環境保護庁
FAP	食品添加物申請
FASEB	米国実験生物学会連合
FASP	食品添加物の安全性プロファイル
FCS	食品接触物質
FCN	食品接触物質通知書
FDA	米国食品医薬品局
GLP	優良試験所基準
GMPs	製造管理および品質管理に関する基準
GRAS	一般的に安全と認められる
HGPRT	ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ

頭字語	定義
HTD	最高投与量
IARC	国際がん研究機関
ICH	日米EU医薬品規制調和国際会議
Ig	免疫グロブリン
JECFA	FAO/WHO 合津食品添加物専門家会議
LOEL	最低影響量
LPS	リポ多糖体
LSD	最小有意差（統計的検定について）
MFO	混合機能オキシダーゼ
ML	L5178Y マウスリンパ細胞
MLA	マウスリンフォーマ試験
MLR	混合リンパ球反応
MTD	最大耐容量

頭字語	定義
OECD	経済協力開発機構
OFAS	食品添加物安全性局（CFSAN）
PAFA	食品添加物の優先度ベース評価（データベース）
PALS	動脈周囲リンパ管
PB-PK	生理学的薬物動力モデル
PHA	フィトヘムアグルチニン
PWM	ヤマゴボウマイトジェン
QAU	品質保証部門
QRAC	定量的リスク評価委員会
QRAs	定量的リスク評価
RBC	赤血球
レッドブック I	食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全性評価のための毒性学的原則（1982）
レッドブック	ドラフト版食品に使用される直接食品添加物および着色料の安全

頭字語	定義
I レッドブック II	性評価のための毒性学的原則 (1993)
レッドブック 2000	食品成分の安全性評価のための毒性学的原則(2000, 追加修正 2001, 2003, 2004)
RIA	放射性免疫測定
RNA	リボ核酸
SAR	構造活性相関
SCE	姉妹染色体交換
SHE	シリアンハムスター胚細胞
SOP	標準作業手順
SRBC	ヒツジ赤血球
T-cells	T リンパ球、または胸腺由来の細胞
TK	チミジンキナーゼ
UDS	不定期 DNA 合成

頭字語	定義
WBC	白血球
WBA	全身オーラジオグラフィー

ガイダンスドキュメント タイトル一覧

CPG Sec :

- ・ CPG Sec 500.200 食品添加物 - 「GRAS」 (2005 年 11 月)
- ・ CPG Sec 587.300 着色料 (2005 年 11 月)

業界向け指針 :

- ・ 食品添加物局 (OFAS) への規制上の申請、第 IV 部 - 食品添加物・着色料に関する申請 (草案) (2010 年 3 月)
- ・ 食品添加物局 (OFAS) への規制上の申請、第 VI 部 - GRAS 通知 (草案) (2010 年 3 月)
- ・ ヒトまたは動物用の食品に使用することが意図された物質の GRAS についてよくある質問 (2016 年 10 月)
- ・ 着色料に関する請願 - 食品、医薬品、化粧品、医療機器用の着色料についての化学・技術的データの提出に関する FDA の推奨 (2009 年 7 月)
- ・ 食品添加物に関する請願の迅速審査 (2010 年 10 月)
- ・ 食品添加物および着色料に関する請願前諮問 (2005 年 4 月)
- ・ 食品添加物または着色料の請願審査に関する質問と回答 (2011 年 4 月)
- ・ 直接食品添加物の請願に用いる化学・技術的データの提出に関する推奨 (2009 年 3 月)
- ・ 酵素製剤としての食品添加物の請願および GRAS 通知で提出する、化学・技術的データについての推奨 (2010 年 7 月)
- ・ 食品で使用される添加物について推奨される毒性学的試験の概要一覧 (2006 年 6 月)
- ・ 毒性学データ報告用ひな形 (2005 年 5 月)

CPG Sec 500.200 食品添加物 – 「GRAS」 2005年11月

最終版

発行元：

食品安全・応用栄養センター
統制問題事務局

背景：

連邦食品・医薬品・化粧品法第 409 条は、食品に添加される物質は、研究を目的とした例外規定を遵守していない限り、当該物質が安全に使用できる条件を提示した規制を遵守していない限り、もしくは、当該物質が「一般的に安全である (Generally Recognized As Safe: GRAS)」と認められていない限り、安全ではないと規定しています。GRAS 物質すべてを一覧表示することは実践的ではないものの、FDA では、適正製造規範に沿った特定の用途で使用される物質の多くを、GRAS として特定しています。米国連邦規則集第 21 巻第 182、184、186 部を参照してください。米国連邦規則集第 21 巻 182.1 (b) では、以下に挙げる適正製造基準が GRAS 物質に適用されています。

- 食品に添加する物質の量は、目的とする技術上の効果を実現する上で適度に必要量を超えてはならない。
- 食品原料として、もしくは食品として使用することを目的とした物質はすべて、食品として妥当な品質を有するものとし、食品原料として調製し、取り扱わなくてはならない。

FDA による定期的な調査、および消費者や事業からの苦情により、業界が常に適正製造基準を遵守してはいないことが頻繁に明らかになっています。

ポリシー：

使用を認定する規制が存在する GRAS 物質もありますが、以下に挙げる内容のいずれかが該当する場合、GRAS 物質を食品に添加することにより、食品の品質が損なわれる恐れがあります。

- 当該物質が、食用として使用する上で一貫した品質を備えていない。
- 当該物質が、適正製造基準の原則に沿って使用されていない。つまり、GRAS 物質としての使用において期待される効果を実現するために必要な量を超えて添加されている。
- 「特定の使用限量」がある中、当該物質が特定の技術上の効果を目的として使用されていなかったり、当該物質を GRAS として使用する上での「特定の使用限量」を超えて使用されたりしている。

上述の内容が一つでも該当する場合は、CFSAN/*コンプライアンス*局/法執行部（HFS-605）まで、適切な規制上の対応を推奨してください。

アスタリスクに挟まれた部分は、新規または改定後の情報です。

発行：86/06/01

改定：95/03、96/08、05/05

更新：05/11/29

コンプライアンスポリシーに関する指針 (CPG)

CPG Sec 587.300 着色料

2005年11月

最終版

発行元：

食品安全・応用栄養センター

統制問題事務局

背景：

着色料の状況は、着色料に関する規制を参照すれば完全に判断できるとは限りません。つまり、着色料の許可を停止する旨の指令が発行された場合でも、当該着色料の使用を引き続き容認する移行期間が設定されていることから、承認済み着色料の最終版や仮の一覧に当該着色料が記載されていない場合でも、その使用が合法となる場合があります。さらに、ある着色料を特定の用途で使用する許可が停止されたとしても、許可されていない着色料を使用していることが判明した企業に対しては、状況を鑑み、必ずしも当局が対応を実施するとは限りません。

規制上の対応に関する指針：

着色料が違法に使用されていると考えられる場合、自治体は当局からの対応を推奨する前に、当該着色料の使用許可に関する状況や当該着色料が使用されている製品の状況を、CFSAN/*コンプライアンス*局/法執行部 (HFS-605) と確認してください。プログラムの現場担当者は、CFSAN/*コンプライアンス*局/法執行部 (HFS-605) との検討を行わずに、許可されていないと考えられる着色料が使用されたあらゆる製品のリコールを指導したり、示唆したりしてはなりません。

着色料に関する分野で違反が確認された場合は、プログラム現場担当者が、CFSAN/*コンプライアンス*局/法執行部 (HFS-605) へ、事実すべてを添えて、リコールもしくはその他の適切な規制上の対応を推奨することができます。

アスタリスクに挟まれた部分は、新規または改定後の情報です。

発行：80/10/01、改定：89/08/31、95/03、2005/05、更新：05/11/29



指針文書

業界向け指針：食品添加物局（OFAS） への規制上の申請、第 IV 部 – 食品添 加物・着色料に関する申請（草案）

2010 年 3 月

草案

施行用としない。法的拘束力を有しない推奨を記載。

発行元：

食品安全・応用栄養センター

法的拘束力を有しない推奨を記載

草案 – 施行用としない

2010 年 3 月

[目次と導入部（第 I 部）](#)

規制上の申請すべてに関する情報

- [第 I 部：はじめに](#)
- [第 II 部：共通事項](#)
- [第 III 部：全般的な配慮事項 – 電子形式](#)
- [第 IX 部：FDA 参考文献](#)
- [第 X 部：付録](#)
- [書式、指示事項、ダウンロード可能なフォルダへのクイックリンク](#)

プログラム対応分野に関する規制上の申請

- [第 IV 部：食品添加物または着色料に関する申請](#)
- [第 V 部：食品接触物質に関する提出](#)

- [第 VI 部：GRAS 通知](#)
- [第 VII 部：バイオテクノロジー最終諮問](#)
- [第 VIII 部：新規タンパク質に関する諮問](#)

全体[\[印刷用 PDF 版\]](#)

IV. 食品添加物または着色料の請願についての具体的な情報

本文書のセクション IV では、食品添加物請願（FAP）および着色料請願（CAP）について説明します（請願の提出）。FAP は米国連邦規則集第 21 卷 171.1 に沿って、CAP は米国連邦規則集第 21 条 71.1 に沿って提出する必要があります。当局は受理した請願に番号を付与し（それぞれ FAP No. または CAP No.）提出内容を確認して、食品添加物の使用に関する規制を制定するか、連邦規則集第 21 卷に加えるかを決定します。

- A. [請願提出に関する一般的な情報](#)
- B. [電子形式での請願提出について](#)
- C. [提出済みの請願に電子形式の修正や更新を実施する場合](#)
- D. [食品添加物・着色料のマスタファイル](#)

A. 請願提出に関する一般的な情報

1. 書式 FDA3503 の各部分は、FAP や CAP の項目にどう関連するのですか？

表 IV-1 に、FAP と CAP の項目と、書式 FDA3503 で各項目が関連する部分を記載しています。

表 IV-1

書式 FDA3503 に記載されている FAP と CAP の項目

FAP と CAP の項目	書式 FDA3503 の該当部分
提出に関する基本情報	I
請願者（および請願者を代表する弁護士や代理人）に関する情報	II
行政全般の情報	III
食品添加物の請願についての具体的な情報	IV. A
着色料の請願についての具体的な情報（料金等）	IV. B
同一性	V
行政上の内容	VI

表 IV-1

書式 FDA3503 に記載されている FAP と CAP の項目

FAP と CAP の項目	書式 FDA3503 の該当部分
行政上の専門的内容	VI
化学に関する内容	VI
安全性に関する内容	VI
環境に関する内容	VI
署名	VII
該当なし	VIII（添付文書一覧）

2. 新規請願はどう準備すればよいですか？

新規に提出する請願は、書式 FDA3503 の項目が記載された順序に合わせて、請願の項目を一連の文書に記載して準備してください。これらの項目の概要は、

本文書の表 IV-1 に一覧表示しており、書式 FDA3503 の記入方法でも説明しています（[付録 1](#) を参照）。書式 FDA3503 の項目に対応しないデータや情報を請願に記載する場合は、当該データや情報を、その種類に基づき、提出文書内の論理上適切な位置に配置するようにしてください。

3. 提出する請願には、提起する規制を記載する必要がありますか？

請願を提出することによって食品添加物に関連する既存の規制や承認済み着色料の一覧に変更が生じる可能性がある場合は、提起する規制を請願に記載する必要があります（米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c)G および米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c)H を参照）。提出する請願が、食品添加物に関する新規の規制や、承認済み着色料の一覧への新規追加に関する内容の場合は、提起する規制を請願に任意で記載することができます（米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c)F および米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c)F を参照）。

4. 請願の提出時に、提起する耐容量を記載する必要がありますか？

安全性を確保する上で耐容量が求められる場合には、提起する耐容量を請願に必ず記載してください（米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c)F および米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c)F を参照）。

B. 電子形式形式での請願提出について

電子形式の請願提出に関する一般的な質問と回答

5. 電子形式で FAP や CAP を提出する際は、どう準備すればよいですか？

FAP や CAP を電子形式で提出する場合は、ダウンロード可能な「請願提出ロードマップ (Petition Submission Roadmap)」のフォルダ構造を用いて準備してください（指示については[付録 1](#) を、ロードマップについては[付録 15](#) を参照）。「請願提出ロードマップ」全体は、「主要ディレクトリ (Main directory)」というフォルダ名が付けられたフォルダ内にあります。「主要ディレクトリ」には第 1 階層フォルダが 6 つ入っており、第 1 階層フォルダには、第 2 階層や第 3 階層のサブフォルダが入っているものがいくつかあります。これらのフォルダやサブフォルダについては、以下に示す図 IV-1 で概要を説明しています。

図 IV-1

「請願提出ロードマップ（主要ディレクトリ）」内のフォルダ・サブフォルダ構造の概要

- 主要ディレクトリ
 - 行政上の内容
 - 非公開情報の指定
 - 墨消し文書
 - 受信文書
 - 修正
 - 更新
 - 行政上の専門的内容
 - 化学に関する内容
 - 試験
 - 安定性
 - 技術上の効果
 - 移行
 - その他
 - 方法
 - 参考文献
 - 安全性に関する内容
 - 試験
 - 遺伝毒性試験
 - 短期毒性試験（げっ歯類）
 - 短期毒性試験（げっ歯類以外）
 - 亜慢性毒性試験（げっ歯類）
 - 亜慢性毒性試験（げっ歯類以外）
 - 一年毒性試験（げっ歯類以外）
 - 慢性毒性試験または複合慢性毒性試験、発がん性試験（げっ歯類）
 - 発がん性試験（げっ歯類）
 - 生殖試験
 - 発達毒性試験
 - 免疫毒性試験
 - 代謝および体内動態試験
 - 神経毒性試験
 - 眼科試験

- 皮膚試験
 - ヒト試験
 - その他の試験
 - 参考文献
 - 出版物
 - その他
 - 環境に関する内容
 - 環境に関する機密情報
 - 試験
 - 参考文献
 - その他
6. 「**請願提出ロードマップ（主要ディレクトリ）**」内の各フォルダ・サブフォルダは、どのような場合に使用するのですか？

各フォルダ・サブフォルダは、表 IV-2 に従って使用します。「主要ディレクトリ」はフォルダ構成で全体の提出内容を示すものなので、「主要ディレクトリ」にファイルを直接置かないようにしてください（図 III-1、図 IV-1 を参照）。「主要ディレクトリ」にはフォルダのみが表示されます。

表 IV-2

「**請願提出ロードマップ**」の「**主要ディレクトリ**」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
「行政上の内容」フォルダ	新規の提出や CAP 関係の料金に関わるファイル、墨消し済しを施した電子ファイルを送信する場合は常に使用します

表 IV-2

「請願提出ロードマップ」の「主要ディレクトリ」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
「非公開情報の指定」フォルダ	公開免除の条件を満たすデータや情報を送信する場合は常に使用します
「墨消し済み」フォルダ	墨消しを施した文書を送信する場合は常に、提出内容が新規、修正、更新であるかどうかに関わらず、当該文書を「行政上の内容」フォルダ内の「墨消し済み」サブフォルダに置きます
「受信文書」フォルダ	特定のファイルは一切、「受信文書」フォルダに直接置かないでください。「受信文書」フォルダには、サブフォルダのみが表示されます
「受信文書/提出書式」サブフォルダ	請願の修正や更新を送信する場合は常に使用します
「受信文書/修正」サブフォルダ	当局からの連絡への返信として提出済みの内容について送信するデータや情報が、化学に関する内容、安全性に関する内容、環境に関する内容等その他のフォルダの

表 IV-2

「請願提出ロードマップ」の「主要ディレクトリ」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
	対象とならない場合にのみ使用します
「受信文書/更新」サブフォルダ	提出済みの内容について自主的に（当局からの連絡への返信としてではなく）送信するデータや情報が、化学に関する内容、安全性に関する内容、環境に関する内容等その他のフォルダの対象とならない場合にのみ使用します
「行政上の専門的内容」フォルダ	提出内容が新規、修正、更新であるかに関わらず、提起する規制、提起する耐容量、着色料のバッチ認証免除に関する情報を送信する場合は常に使用します
「化学に関する内容」フォルダと、該当するサブフォルダ	提出内容が新規、修正、更新であるかどうかに関わらず、化学に関するデータや情報を送信する場合は常に使用します
「安全性に関する内容」フォルダと、該当するサブフォルダ	提出内容が新規、修正、更新であるかどうかに関わらず、安全性に関するデータや情報を送信する場合は常に使用します

表 IV-2

「請願提出ロードマップ」の「主要ディレクトリ」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
「環境に関する内容」フォルダと、該当するサブフォルダ	提出内容が新規、修正、更新であるかどうかに関わらず、環境に関するデータや情報を送信する場合は常に使用します
「その他」フォルダ	その他一切のフォルダやサブフォルダの対象とならない、個別の提出に関するデータや情報を送信する場合は常に使用します

*提出済みの内容に関する修正や更新を送信する場合は、「主要ディレクトリ」の名称を変更して、提出に関する当局の指定を反映させてください（例：FAP9A9999、CAP9C9999）。

7. 電子形式の請願を提出する際、ファイル名はどう付けばよいですか？
 本文書のセクション III.C と [付録 12](#) に記載された内容に従い、一般項目と具体的項目の両方を用いて各ファイルに名前を付けてください。請願の提出専用のファイル名に使用する一般項目は、表 IV-3～IV-11（下記）の例に記載しています。

個別の請願提出における「行政上の内容」および「行政上の専門的内容」フォルダ内のファイルに関する質問と回答

8. 「行政上の内容」フォルダには、どのようなサブフォルダやファイルを置くべきですか？

表 IV-3 に、「行政上の内容」フォルダに置くべきサブフォルダとファイルを記載しています。

表 IV-3

請願の「行政上の内容」フォルダ内のサブフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用
行政上の内容	<i>Form3503_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	提出に含まれる特定の情報一部と、提出した文書の一覧	N/A
行政上の内容	<i>CoverLetter_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	書式 FDA3503 に加えて添え状を送る場合、合わせて提出する添え状	米国連邦規則集第 21 卷 71.1、米国連邦規則集第 21 卷 171.1
行政上の内容・機密情報の指定	<i>DesignationOfConfidential Information_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	提出内容に含まれる、非公開情報として指定	米国連邦規則集第 21 卷

表 IV-3

請願の「行政上の内容」フォルダ内のサブフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用
		したデータや情報の説明	20.61(d)
行政上・墨消し済みの内容	<i>RedactedBySubmitter_... _YYYY-MM-DD.pdf</i>	提出内容に含まれるファイル1つもしくは複数からコピーした後、非公開情報として内容を消去することにより変更を加えたデータや情報	N/A*

*N/A とは、「該当なし」を意味します。

9. 「行政上の専門的内容」サブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-4 に、「行政上の専門的内容」フォルダに置くべきファイルを記載しています。

表 IV-4

提出する請願の「行政上の専門的内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用
<i>ProposedRegulation_…_YYYY-MM-DD.pdf</i>	食品添加物に関する規制や承認済み着色料の一覧に用いる文面の案	米国連邦規則集 第 21 巻 71.1(c) H、米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) G
<i>ProposedTolerance_…_YYYY-MM-DD.pdf</i>	安全性を確保する上で耐容量が求められる場合、食品添加物に関する規制や承認済み着色料の一覧に記載する、耐容量の規定に用いる文面案	米国連邦規則集 第 21 巻 71.1(c) F、米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) F
<i>ExemptCertification_…_YYYY-MM-DD.pdf (CAP only)</i>	着色料についてバッチ認証が不要である理由。意図された用途における安全性が確立されたことを示す裏付けデー	米国連邦規則集 第 21 巻 71.1(c) G

表 IV-4

提出する請願の「行政上の専門的内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用
	タも含む（該当する場合）	

請願提出における「化学に関する内容」フォルダ、「安全性に関する内容」フォルダ、「環境に関する内容」フォルダ内のファイルに関する質問と回答

10. 「化学に関する内容」のフォルダ（「化学に関する内容」サブフォルダのどれか、ではなく）には、どのファイルを直接置くべきですか？

表 IV-5 に、「化学に関する内容」フォルダに置くべきファイルを記載しています。

表 IV-5

請願提出の「化学に関する内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
<i>Identity_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	添加物の物理的、化学的、生物学的特性ならびに、添加物の化学的同一性や組成について書式	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A、米国連邦規則集第 21 卷

表 IV-5

請願提出の「化学に関する内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用 または指針
	FDA3503 に記載されてい ないあらゆる情報	171.1(c) A
<i>UseAndTechnicalEffect_..._ YYYY-MM-DD.pdf</i>	添加物を使用する食品、 当該食品における使用 量、添加物を使用する目 的に関する情報ならび に、使用目的に関する指 示・推奨・提案すべて	米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) B、米国連 邦規則集第 21 巻 171.1(c) B、米国連 邦規則集第 21 巻 170.3(n)、米国連邦 規則集第 21 巻 170.3(o)
<i>Labeling_..._ YYYY-MM-DD.pdf</i>	CAP：添加物について提 起する成分表示の見本 FAP：添加物について提 起する成分表示の見本 と、添加物の使用理由に 応じて適用される、最終 食品に関する連邦食品・ 医薬品・化粧品法の該当 条項により求められる 成分表示の見本すべて	米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) B、米国連 邦規則集第 21 巻 171.1(c) B

表 IV-5

請願提出の「化学に関する内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用 または指針
<i>ManufacturingMethod_..._ YYYY-MM-DD.pdf</i>	製造過程に関する情報と、請願者以外で添加物の製造・加工・梱包作業のいずれかに携わる人物に関する情報	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c) A、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(j)
<i>Residues_..._ YYYY-MM-DD.pdf</i>	添加物を梱包に使用した場合、添加物の残留物がどのように発生するのか、およびどのような残留物の発生が合理的に予想されるのか	米国連邦規則集第 21 条 71.1(c) B、米国連邦規則集第 21 条 171.1(c) B
<i>Specifications_..._ YYYY-MM-DD.pdf</i>	CAP：添加物の成分を規定し、反応により生じる副産物やその他不純物を特定・制限する仕様。 FAP：求める成分の最小容量を規定し、反応により生じる副産物やその他不純物を特定・制限す	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c) A、 参考資料 7 、 参考資料 8

表 IV-5

請願提出の「化学に関する内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用 または指針
	<p>る仕様。上記の情報が入手できない場合は、その理由を記した書面を添えてください。</p>	
<p><i>ExposureEstimates_..._YYYY-MM-DD.pdf</i></p>	<p>参考資料 7、9 に記載された手法以外で、請願者が OFAS に対し、一日の摂取量を推定する際に使用を望む手法の根拠。 CAP：当該添加物について想定される消費や関連する暴露量ならびに、当該添加物を原因として食品・薬物・化粧品の内部や表面に形成されるあらゆる物質を当局が検討する際に使用できる完全なデータ。また、ヒトや動物の食物に当該添加物が使用された場合に生じる累積効果。</p>	<p>米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) E、参考資料 7、参考資料 9</p>

11. 「化学試験」サブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-6 に、「化学に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダに置くべきサブフォルダとファイルを記載しています。

表 IV-6

請願の「化学に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のサブフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
化学に関する内容/試験/ 安定性	<i>StabilityData_..._ YYYY-MM-DD. pdf</i>	安定性データと、必要に応じて使用期限。CAP には、安定性を維持するために必要な、梱包および表示に記載する注意事項を必ず入れてください。	米国連邦規則集 第 21 巻 71.1(c) A、米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) A、 参考資料 7 、 参考資料 8
化学に関する内容/試験/ 意図された効果	<i>IntendedEffect_..._ YYYY-MM-DD. pdf</i>	FAP のみ：食品添加物が意図された物理的効果またはその他技術上の効果を発揮すること、もしくは当該添加物が食品の成分となったり直接・間接的に食品の特徴に影響を及ぼした	米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) C、 参考資料 7

表 IV-6

請願の「化学に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のサブフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
		<p>りすることが合理的に予期されること、および上記を実現するにあたり必要な分量を立証するデータ。対照データと併せて評価ができるよう、これらのデータには十分に詳細な情報を入れてください。</p>	
<p>化学に関する内容/試験/移行</p>	<p><i>MigrationData_..._YYYY-MM-DD.pdf</i></p>	<p>消費者の食品添加物への暴露量を推定できるだけの十分な情報。</p>	<p>米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) B、参考資料 7</p>
<p>化学に関する内容/試験/その他</p>	<p><i>[Sweetness Potency]_..._YYYY-MM-DD.pdf</i></p>	<p>甘味効果の試験</p>	<p>該当なし</p>

12. 化学に関する内容の「方法」と「参考文献」サブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-7 に、化学に関する内容の「方法」と「参考文献」サブフォルダに置くべきファイルを記載しています。

表 IV-7

提出する請願の化学に関する内容の「方法」と「参考文献」サブフォルダ内のファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
化学に関する内容/方法	<i>AnalyticalMethod_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	FAP と CAP: 未加工、加工済み、最終食品に加えられた添加物の量を判断する際に実施可能な方法の説明、および当該添加物の使用により食品の内部または表面に生成されるあらゆる物質の説明。CAP: 純色、中間色すべて、補助色、および着色料のその他の成分を判断する際に実施可能な方法の説明。	米国連邦規則集 第 21 巻 71.1(c) C、米国連邦規則集 第 21 巻 171.1(c) D、 参考資料 7 、 参考資料 8
化学に関する内容/参考文献	付録 12 を参照	参照したあらゆる学術出版物	参考資料 7 、 参考資料 8 、 参考資料 10 、 参考

表 IV-7

提出する請願の化学に関する内容の「方法」と「参考文献」サブフォルダ内のファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
			資料2

13. 「安全性に関する内容」のフォルダ（「安全性」サブフォルダのどれか、ではなく）には、どのファイルを直接置くべきですか？

表 IV-8 に、「安全性に関する内容」フォルダに置くべきファイルを記載しています。

表 IV-8

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダ内のファイル

ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
<i>ToxicologyNarrative_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	提出する請願について実施した安全性試験の結果や結論の要約と、学術出版物に記載の関連する安全性試験の要約。	参考資料2

14. 「安全性試験」サブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-9 に、「試験」サブフォルダに置くべきファイルを例示しています。

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
安全性に関する内容/試験/遺伝毒性試験	<i>Ames_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/短期毒性試験（げっ歯類）	<i>ShortTermToxicity_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/短期毒性試験（げっ歯類以外）	<i>ShortTermToxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/亜慢性毒性試験（げっ歯類）	<i>SubchronicToxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/亜慢性毒性試験（げっ歯類以外）	<i>SubchronicToxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/一年毒性試験（げっ歯類以外）	<i>ChronicToxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/慢性毒性試験または複合毒性試験/発がん性試験（げっ歯類）	<i>ChronicToxicity_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/発がん性試験（げっ歯類）	<i>Carcinogenicity_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/生殖試験	<i>ReproductiveToxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/発達毒性試験	<i>ReproductiveToxicityTeratology_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/免疫毒性試験	<i>Immunotoxicity_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/代謝および体内動態試験	<i>PharmacokineticRats_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/神経毒性試験	<i>Neurotoxicity_..._MMMM-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/ヒト臨床試験	<i>HumanClinical_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	米国連邦規則第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則第 21 卷 171.1(c) E、 参考資料 15 、 参考資料 16

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		料 16
安全性に関する内容/試験/疫学試験	<i>Epidemiology_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	参考資料 15 、 参考資料 16
安全性に関する内容/試験/眼球試験	<i>OcularIrritation_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	参考資料 17
安全性に関する内容/試験/皮膚試験	<i>DermaL_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	参考資料 17
安全性に関する内容/試験/その他試験	<i>[内容を表すファイル名]_..._YYYY-MM-DD. pdf</i>	米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) D、米国連邦規則集第 21 卷 171.1(c)

表 IV-9

提出する請願の「安全性に関する内容」フォルダの「試験」サブフォルダ内のフォルダとファイル

サブフォルダ	ファイル名の例	該当する規制の引用または指針
		E

15. 請願の「環境に関する内容」フォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-10 に、「環境に関する内容」フォルダに置くべきファイルを記載しています。

表 V-10

「請願提出ロードマップ」の「環境に関する内容」フォルダ内のフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
環境に関する内容	<i>EA_ … _YYYY-MM-DD.pdf</i>	「環境影響報告書 (EIS)」もしくは「重大な	米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c)

表 V-10

「請願提出ロードマップ」の「環境に関する内容」フォルダ内のフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
		影響なし (FONSI)」を作成すべきかどうかを FDA が判断する上で必要となる、十分な証拠や分析が簡潔に記載された、一般公開文書	J、米国連邦規則集第 21 巻 171.1(c) H、米国連邦規則集第 21 巻 25.40、 参考資料 19
環境に関する内容	<i>ClaimCategorical Exclusion_..._YYYY-MM-DD.pdf</i>	(1) 適用除外行為の指定を求める根拠とする米国連邦規則集のセクション、(2) 適用除外行為の基準を遵守した旨	米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) J、米国連邦規則集第 21 巻 171.1(c) H、米国連邦規則集

表 V-10

「請願提出ロードマップ」の「環境に関する内容」フォルダ内のフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
		<p>を記した書面、(3) 申請者の知る限り、「環境評価」の提出が求められる特別な状況は存在しない旨を記した書面。</p>	<p>第 21 巻 25.15、米国連邦規則集第 21 巻 25.30、米国連邦規則集第 21 巻 25.32 参考資料 19</p>
<p>環境に関する内容/環境に関する機密情報</p>	<p><i>MarketVolume_ ... _YYYY-MM-DD.pdf</i></p>	<p>合衆国法典第 18 編第 1905 条、合衆国法典第 21 編 331(j) または 360j(c) に基づき、公開が免除されているデータと情報</p>	<p>米国連邦規則集第 21 巻 25.51、参考資料 19</p>

表 V-10

「請願提出ロードマップ」の「環境に関する内容」フォルダ内のフォルダとファイル

フォルダ/サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報	該当する規制の引用または指針
環境に関する内容/試験	…_YYYY-MM-DD.pdf	環境上の結果や影響に関する研究報告	参考資料 19
環境に関する内容/参考文献	…_YYYY-MM-DD.pdf	環境に関する内容を記した出版物の参考文献（出版済みの研究、抜粋）	参考資料 19

C. 提出済みの請願に電子形式の修正や更新を実施する場合

16. 提出済みの請願に加える修正や更新には、何が推奨されますか？

本文書の[セクション III.F](#)に記載されている、電子形式での修正や更新に適用される一般的な推奨事項を参照してください。

提出済みの請願の修正や更新を送信する場合は、当局からの一通の通知にまとめられた複数の質問に回答する修正であっても、対象分野（行政上の内容、化学に関する内容、安全性に関する内容、環境に関する内容）に関連する提出物

を個別のファイルで準備してください。続いて、準備したファイルを、請願提出ロードマップに従って適切なフォルダ・サブフォルダに置いてください。

例を挙げると、FAPに加える修正に、「化学に関する内容」のファイルが2つ（仕様の訂正が1つと、分析方法の訂正が1つ）、イヌを用いて実施した亜慢性毒性試験について当局から送られた質問に対する回答となる「安全性に関する内容」のファイルが1つ、および訂正済みの「環境評価」が記載されたファイルが1つ、といったファイルを準備することになります。この例では、以下の作業を実施することになります。

- 訂正済みの仕様が記載されたファイルを、「化学に関する内容」フォルダに直接置く
- 訂正済みの分析方法が記載されたファイルを、「化学に関する内容/方法」サブフォルダに置く
- 毒性試験に関する当局からの質問に対する回答が記載されたファイルを、「安全性に関する内容/試験/亜慢性毒性試験（げっ歯類以外）」サブフォルダに置く
- 訂正済みの「環境評価」を、「環境評価」フォルダに置く

17. 「受信文書」サブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 IV-11 に、「受信文書」フォルダのサブフォルダ2つに置くべきファイルを記載しています。

表 IV-11

提出する請願における「追加情報/受信文書」サブフォルダ内のファイル

サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報
受信文書/修正	YYYY-MM-DD_ Form3503_... .pdf	修正用に作成した、回答用の資料を添えた書式

表 IV-11

提出する請願における「追加情報/受信文書」サブフォルダ内のファイル

サブフォルダ	ファイル名	ファイル内の情報
受信文書/修正	<i>YYYY-MM-DD_Amendment_…pdf</i>	その他一切のフォルダ（例：化学に関する内容、安全性に関する内容、環境に関する内容）に該当しない修正
受信文書/更新	<i>YYYY-MM-DD_Form3503_…pdf</i>	更新用に作成した、回答用の資料を添えた書式
受信文書/更新	<i>YYYY-MM-DD_Update_…pdf</i>	その他一切のフォルダ（例：化学に関する内容、安全性に関する内容、環境に関する内容）に該当しない更新

18. FAP を修正する場合のフォルダ構成例は、どこにありますか？

架空の既存 FAP (FAP 0A9999) を標準ロードマップで配置したものに加える修正の例を以下に挙げます。フォルダ名は太字、ファイル名は斜体で示しています。混乱を避けるため、空のフォルダは省略しました。この例での修正は、FDA から 2006 年 11 月 20 日付で送られた、詳細な情報を求める書簡に対する回答となっています。各ファイル名が、修正が提出された日付で始まっていることに注意してください（ファイル名の慣習については、本文書の[セクション](#)

[III.C](#)と[付録 12](#)を参照)。当局ではこれらの修正文書を、組織内のデータベースファイル上に作成してある FAP 0A9999 用の対応するフォルダに、現在までに提出された文書とともに置きます。(提出済みの文書は再提出しないでください。)

- FAP 0A9999
 - 行政上の内容
 - 受信文書
 - 修正
 - *2006-12-07_Form FDA 3503_InResponseToFDA2006-11-20 Letter.pdf*
 - 化学に関する内容
 - 方法
 - *2006-12-07_ResponsesToFDA2006-11-20ChemistryQuestions_(AnalyticalMethod_...).pdf*
 - 安全性に関する内容
 - 試験
 - 亜慢性毒性試験
 - *2006-12-07_SubchronicToxicity_Study5567_Emulsi fierX_Rats_OralGavage_ 2000-11-08.pdf*
 - 環境に関する内容
 - *2006-12-07_EA_Revised_Emulsi fierX.pdf*

D. 食品添加物・着色料のマスターファイル

19. 書式 FDA3503 の各部分は、FMF や CMF の項目にどう関連するのですか？

表 IV-12 に、FMF と CMF の項目と、各項目が関連する書式 FDA3503 の該当部分を記載しています。

表 IV-12

書式 FDA3503 に記載されている FMF と CMF の項目

FMF と CMF の項目	書式 FDA3503 の該当部分
提出に関する基本情報	I
マスターファイルを担当する企業（および当該企業を代表する弁護士や代理人）についての情報	II
行政全般の情報	III
「食品添加物・着色料のマスターファイル」に具体的に必要な情報	IV. C
同一性	V
行政上の専門的内容（予定された FAP や CAP に先立ち提出する場合）	VI
化学に関する内容	VI

表 IV-12

書式 FDA3503 に記載されている FMF と CMF の項目

FMF と CMF の項目	書式 FDA3503 の該当部分
安全性に関する内容	VI
環境に関する内容	VI
署名	VII
該当なし	VIII (添付文書一覧)

20. 書式 FDA3503 の項目に従って準備した電子形式の提出用マスターファイルは、どう配置すべきですか？

書式 FDA3503 の項目に従って準備した電子形式の提出用マスターファイルは、ダウンロード可能な「請願提出ロードマップ」に示されているフォルダ構造を用いて配置してください（指示については[付録 1](#)を、ロードマップについては[付録 15](#)を参照）。一般的に、書式 FDA3503 の項目に沿った電子形式の提出用マスターファイルを準備する際の詳細については、本文書のセクション III と IV. B の推奨内容に従ってください。

指針文書

業界向け指針：食品添加物局（OFAS） への規制上の申請、第 VI 部 – GRAS 通 知（草案）

2010 年 3 月

草案

施行用としない。法的拘束力を有しない推奨を記載。

発行元：

食品安全・応用栄養センター

法的拘束力を有しない推奨を記載

草案 - 施行用としない

2010 年 3 月

[目次と導入部（第 I 部）](#)

規制上の提出すべてに関する情報

- [第 I 部：はじめに](#)
- [第 II 部：共通事項](#)
- [第 III 部：全般的な配慮事項 - 電子形式](#)
- [第 IX 部：FDA 参考文献](#)
- [第 X 部：付録](#)
- [書式、指示事項、ダウンロード可能なフォルダへのクイックリンク](#)

プログラム分野に関する規制上の提出

- [第 IV 部：食品添加物または着色料に関する提出](#)
- [第 V 部：食品接触物質に関する提出](#)
- 第 VI 部：GRAS 通知

- [第 VII 部：バイオテクノロジー最終諮問](#)
- [第 VIII 部：新規タンパク質に関する諮問](#)

全体[\[印刷用 PDF 版\]](#)

VI. 「一般的に安全と認められている (GRAS)」対象 に関連する通知の提出に具体的に必要な情報

本文書のセクション VI では、GRAS 通知の提出について説明します。GRAS 通知^[2]の提出は任意です。この手順を通して提出者は、米国連邦規則集第 21 卷 170.30 の下、ある物質の特定の使用が GRAS であるという判断に基づき、物質の当該使用が連邦食品・医薬品・化粧品法で求められる製造販売承認から免除されるという見方を当局に伝えます。受理した提出にはファイル番号 (GRAS 通知番号 [GRN]) を付与し、提出者には書面にて回答します。

- A. [「一般的に安全と認められている \(GRAS\)」対象に関連する通知の提出についての一般事項](#)
- B. [「一般的に安全と認められている \(GRAS\)」対象に関連する通知を電子形式で提出する場合](#)
- C. [提出済みの GRAS 通知に電子形式の修正や補足を加える場合](#)

A. 「一般的に安全と認められている (GRAS)」対象に関連する通知の提出についての一般事項

1. 書式 FDA3667 の各部分は、GRAS 通知の項目にどう関連するのですか？

表 VI-1 に、GRAS 通知の項目と、各項目が関連する書式 FDA3667 の該当部分を記載しています。

表 VI-1

書式 FDA3667 に記載されている GRAS 通知の項目

GRAS 通知の項目	書式 FDA3667 の該当部分
提出に関する基本情報	I
通知者（および通知者を代表する弁護士や代理人）に関する情報	II
行政全般の情報	III
用途	IV
同一性	V および VI
製造方法	VI
仕様	VI

表 VI-1

書式 FDA3667 に記載されている GRAS 通知の項目

GRAS 通知の項目	書式 FDA3667 の該当部分
食品摂取による暴露	VI
使用度の自己制限	VI
1957 年以前の一般的な使用（該当する場合）	VI
GRAS と判断する根拠に関する包括的な考察	VI
文献目録	VI
署名	VII
該当なし	VIII（添付文書一覧）

2. 新規 GRAS 通知は、どう準備すればよいですか？

新規に提出する GRAS 通知は、GRAS 通知の項目を、書式 FDA3667 内の項目の順序に合わせて配置した文書として準備してください。これらの項目の概要は、本文書の表 VI-1 に一覧表示しており、書式 FDA3667 の記入方法でも説明しています（[付録 5](#)を参照）。書式 FDA3667 の項目に対応しないデータや情報を提出に入れる場合は、当該データや情報を、その種類に基づき、提出文書内の論理上適切な位置に配置するようにしてください。

B. 「一般的に安全と認められている (GRAS)」対象に関連する通知を電子形式で提出する場合

3. 電子形式の GRAS 通知は、どう準備すればよいですか？

GRAS 通知を電子形式で提出する場合は、ダウンロード可能な「GRAS 通知提出ロードマップ (GRAS Notice Submission Roadmap)」に示されているフォルダ構造を用いて準備してください（指示については[付録 5](#)を、ロードマップについては[付録 15](#)を参照）。「GRAS 通知提出ロードマップ」の全体は、「主要ディレクトリ (Main directory)」というフォルダ名が付けられたフォルダ内にあります。「主要ディレクトリ」には、第 1 階層フォルダが 3 つ入っており、それぞれ「行政上の内容」、「GRAS 通知」、「受信文書」と名前が付けられています。「受信文書」フォルダには、第 2 階層サブフォルダが 3 つ入っており、それぞれ「提出書式」、「修正」、「補足」と名前が付けられています。これらのフォルダやサブフォルダについては、以下に示す図 VI-1 で概要を説明しています。

図 VI-1

「GRAS 通知提出ロードマップ」の「主要ディレクトリ」にあるフォルダとサブフォルダの概要

- 主要ディレクトリ
 - 行政上の内容
 - GRAS 通知
 - 受信文書
 - 提出書式
 - 修正
 - 補足

4. 「GRAS 通知提出ロードマップ」内の各フォルダ・サブフォルダは、どのような場合に使用するのですか？

各フォルダ・サブフォルダは、表 VI-2 に従って使用します。特定のファイルは一切、「主要ディレクトリ」に直接置かないでください。「主要ディレクトリ」にはフォルダのみが表示されます。

表 VI-2

「GRAS 通知提出ロードマップ」*の「主要ディレクトリ」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
行政上の内容	新規 GRAS 通知や墨消しを施した電子ファイルを送信する場合に常に使用します
GRAS 通知	新規 GRAS 通知を送信する場合にのみ使用します
受信文書	特定のファイルは一切、「受信文書」フォルダに直接置かないでください。「受信文書」フォルダには、サブフォルダのみが表示されます。
受信文書/提出書式	提出された GRAS 通知の確認中、もしくは提出された GRAS 通知に対して当局が返信を送った後に情報を送信する場合に常に使用します

表 VI-2

「GRAS 通知提出ロードマップ」*の「主要ディレクトリ」で各フォルダ・サブフォルダを使用する場合

フォルダ/サブフォルダ	使用する場合
受信文書/修正	提出された GRAS 通知を当局が確認している間に情報を送信する場合に常に使用します
受信文書/補足	提出された GRAS 通知に対して当局が返信を送った後に情報を送信する場合に常に使用します

*GRAS 通知の修正や補足を送信する場合には、「主要ディレクトリ」の名前を変更し、当該通知について当局から付与された番号を反映させてください。

5. 電子形式の GRAS 通知を提出する際、ファイル名はどう付けるのですか？

本文書の[セクション III.C](#)と[付録 12](#)に記載された内容に従い、一般項目と具体的項目の両方を用いて各ファイルに名前を付けてください。GRAS 通知の提出専用のファイル名に使用する一般項目は、表 VI-3（下記）の例で示しています。

6. 各フォルダとサブフォルダには、どのようなファイルを置くべきですか？

表 VI-3

「GRAS 通知提出ロードマップ」でのファイルの配置

フォルダ/ サブフォル ダ	ファイル名	ファイル内の情報
行政上の内 容	<i>Form3667_..._YYY Y-MM-DD. pdf</i>	作成済みの回答用資料を添えた書式 FDA3667
行政上の内 容	<i>CoverLetter_..._ YYYY-MM-DD. pdf</i>	書式 FDA3667 に加えて添え状を送る場合、合わせて提出する添え状
行政上の内 容	<i>DesignationOfCon fidential Information_..._ YYYY-MM-DD. pdf</i>	提出内容に含まれる、非公開情報として指定したデータや情報の説明（米国連邦規則集第 21 巻 20 Subpart D）
行政上の内 容	<i>RedactedBySubmit ter_ ... _YYYY-MM- DD. pdf</i>	非公開情報として内容を消去することにより変更を加えた、提出に含まれるデータや情報のコピー
GRAS 通知	<i>GRASNotice_..._Y YYY-MM-DD. pdf</i>	書式内に記載されていない、以下に挙げる情報が含まれたファイル <ul style="list-style-type: none"> ○ 目次 ○ 書式 FDA3667 の第 IV 部で触れていない、同一性に関するあらゆる追加情報 ○ 製造方法 ○ 食品としての品質を備えた原料の仕様 ○ 食品摂取による暴露 ○ 使用度の自己制限 ○ 1957 年以前の一般的な使用（該当する場合） ○ GRAS の状態を判断する根拠に関する包括的な考察 ○ 文献目録

表 VI-3

「GRAS 通知提出ロードマップ」でのファイルの配置

フォルダ/ サブフォル ダ	ファイル名	ファイル内の情報
		○ その他の情報
GRAS 通知	[その他各種情報]_..._YYYY-MM-DD.pdf	提出した GRAS 通知を評価する際に、FDA に考慮を求めるその他各種情報を含んだファイル 1 つ以上 (例: 専門的な会報)
受信文書/ 提出書式	YYYY-MM-DD-Form3667_..._.pdf	作成済みの回答用資料を添えた書式 FDA3667
受信文書/ 修正	YYYY-MM-DD_Amendment_... .pdf	該当する場合、提出された GRAS 通知を当局が確認している間に追加で提出する情報が記載されたファイル。取り扱う論点が 2 件以上ある修正には、「目次」を付けてください。
受信文書/ 補足	YYYY-MM-DD_Supplement_... .pdf	該当する場合、提出された GRAS 通知に対して当局が返信を送った後に追加で提出する情報が記載されたファイル。取り扱う論点が 2 件以上ある補足には、「目次」を付けてください。

C. 提出済みの GRAS 通知に電子形式の修正や補足を加える場合

7. 提出済みの GRAS 通知に加える修正や補足には、何が推奨されますか？

本文書の[セクション III.F](#)に記載されている、電子形式での修正や補足に適用される一般的な推奨事項を参照してください。

GRAS 通知に加える修正や補足を送信する際は、提出内容を 1 つのファイルにまとめてください。修正や補足で 2 件以上の論点を扱う場合は、ファイルに「目次」を入れ、提出文書内で情報の位置を特定しやすくするためブックマークを付けてくだ

さい。続いて当該ファイルを、GRAS 通知の「受信文書/修正」サブフォルダまたは「受信文書/補足」サブフォルダに置いてください。

[2]当局では、上記の手順を米国連邦規則集第 21 卷 170.36 で確立すべく、規則を提案しました（連邦広報 1997 年 4 月 17 日、62 FR 18938）。本指針の発行日時点において、この規則提案に基づいた最終規則は未発行です。

指針文書

業界向け指針：ヒトまたは動物用の食品に使用することが意図された物質の GRAS についてよくある質問

2016 年 10 月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

動物薬センター

よくある質問（FAQ）の一覧は、「一般的に安全と認められている」もしくは「GRAS」として知られる食品物質の分類に関する一般的な質問に対する回答を手軽に探せる場を提供する目的で設けています。

本 FAQ では、ヒトや動物用の食品に含まれる物質の使用が GRAS とみなされるかどうかに関する規制上のプロセスや検討内容についての一般的な質問を取り扱います。

食品安全・応用栄養センター（CFSAN）では、ヒト用の食品に使用することを意図した GRAS 物質に関するより詳細な情報を、CFSAN サイト内の「[一般的に安全と認められている \(GRAS\) 対象](#)」ページで提供しています。動物薬センター（CVM）では、動物用の食品に使用することを意図した GRAS 物質に関するより詳細な情報を、CVM サイト内の「[一般的に安全と認められている \(GRAS\) 対象に関する通知プログラム](#)」ページで提供しています。ヒト用の食品や動物用の食品における物質の用途が GRAS となるかどうかについての詳細を CFSAN や CVM に問い合わせるには、セクション III を参照してください。

本指針には、CFSAN が 2004 年 12 月に発行した以前の版「GRAS についてよくある質問」を更新・改定した内容を記載しています。更新版である本指針は、当局が 2016 年 8 月 17 日に発行した最終版の規則（81 Fed. Reg. 54960）の条項を参照し、ヒト用の食品に使用する物質および動物用の食品に使用する物質に言及しています。

本指針にはまた、2016年10月17日発行の指針に照らし編集上の変更も加え、質問14への回答を明確化しました。

本指針を含むFDAの指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。

FDAの指針で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味しています。

[指針をダウンロード](#)

[原料、添加物、GRAS、梱包に関する指針文書や規制情報の詳細](#)

業界向け指針：着色料に関する請願 - 食品、医薬品、化粧品、医療機器用の 着色料についての化学・技術的データ の提出に関する FDA の推奨 2009 年 7 月

最終版

発行元：

食品安全・応用栄養センター

1997 年 1 月発行、2009 年 7 月改定

I. はじめに

本文書では、食品、医薬品、化粧品、または医療機器で使用する着色料の承認を求める請願を審査するにあたり、米国食品医薬品局の食品添加物安全事務局が必要と考える、化学・技術的データの提出についての指針を説明します。本文書に記載されている推奨は、現在許可されていない用途での物質（着色料）の使用が連邦規制の対象となる食品、医薬品、化粧品、または医療機器に着色を行うことを提起する請願者に向けた内容となっています。本文書に記載されている推奨は、文書内で引用されている連邦食品・医薬品・化粧品法もしくは連邦規則集（CFR）第 21 巻に代わるものではありません。

本指針を含む FDA の指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味しています。

II. 考察

法令に従い、着色料は安全であることが証明され、承認された物質として米国連邦規則集に記載されてから、食品、医薬品、化粧品、または一部の医療機器の着色に使用しなくて

はなりません。着色料のこのような使用に関心を持つ者は、米国連邦規則集第 21 巻第 71 部に従い、提起する着色料の用途について請願を提出し、当該用途の安全性と適正を示すデータを食品医薬品局（FDA）に提出することができます。FDA は、書面による申請を受理した場合、これらのデータを生成するために計画された実験の妥当性について助言を提供します（米国連邦規則集第 21 巻 70.42(c)）。請願内のデータ、追加データ、一般からの意見を審査した結果、当局が請願対象の着色料が提起された用途において安全かつ適切であると判断した場合は、新規規制を発行もしくは既存の規制に変更を加えることで、当該着色料について提起された用途を承認します。当該着色料は、バッチ認証を免除された場合は米国連邦規則集第 21 巻第 73 部に、バッチ認証の対象となった場合は米国連邦規則集第 21 巻第 74 部に記載されます。

データが着色料の請願を承認する上で適切かどうかは、使用の度合いや種類、および体組織に侵入する恐れのある着色料や不純物の量に左右されます。外用の化粧品に使用する着色料の請願では一般的に、不純物も含め着色料が皮膚に浸透しないことが示された場合、または使用がごく少量の場合には、食品に使用する着色料と比較して、必要となるデータの量は非常に少なくなります。

着色料の請願に記載するデータや情報で、一般に公開されるものとされないものは、米国連邦規則集第 21 巻 71.15 に記載されています。データや情報の機密性についての質問がある場合は、食品添加物安全事務局、請願審査部に問い合わせてください。

III. 法令・規制上の要件

A. 法令上の要件

連邦食品・医薬品・化粧品法第 201 条(t)で、着色料は以下の通り定義されています。

「合成もしくは類似の工程、または抽出、分離、もしくは生成によって、野菜、動物、鉱物等の起源から、同一性に中間的もしくは最終的な変更を加えることで作られた染料、色素等の物質で... 食品、医薬品、または化粧品、あるいは人体や人体のいずれかの部位に添加または適用した場合、添加または適用した対象に（単独、もしくは他の物質との反応を介して）色を加えることのできる物質であり... 「色」という用語には、黒、白、中間色の灰色も含まれる...」

食品（連邦食品・医薬品・化粧品法第 402 条(c)）、医薬品や医療機器（同法第 501 条(a)(4)）、化粧品（同法第 601 条(e)）は、同法第 721 条(a)の意味において安全でないとされる着色料を含有している場合、品質が損なわれているとみなされます。

連邦食品・医薬品・化粧品法第 721 条(a)では、着色料が安全でないとみなされる条件が定義されています。簡潔にまとめると、食品、医薬品、化粧品、または医療機器の内部や表面で使用される着色料は、(1) 当該着色料を承認されたものとして記載している規制がない、(2) 当該使用が規制上許可されていない、(3) 当該着色料とその使用が規制に準拠していない、という場合には安全でないとみなされる、ということになります。機器の内部や表面で使用する着色料は、当該着色料が人体もしくは動物の体に相当な期間にわたり直接接触する場合においてのみ、本条の対象となります。

コールトールの染髪剤は、連邦食品・医薬品・化粧品法第 601 条(a)の下、着色料規制の要件から限定的に免除されている化粧品です(同法第 721 条(a))。コールトール染髪剤は、元来石炭のタールから合成された有機染料でしたが、現在は石油や石炭原料から合成されています。染髪に使用するコールトール染料には、FDA からの事前承認は不要です。連邦食品・医薬品・化粧品法第 601 条(a)の下、未承認のコールトール染料を含有している染髪製品は、当該製品について特定の注意事項および事前のパッチテストの適切な指示が表示されている場合は、品質が損なわれているとはみなされません。同法第 601 条(a)ではまた、「染髪剤」という用語には睫毛や眉毛の染料は含まれない、と規定されています。現在、睫毛や眉毛の染料として承認されている着色料はありません。

連邦食品・医薬品・化粧品法第 721 条(b)では、着色料の承認に関する法的要件が説明されています。簡潔にまとめると、FDA が安全性データを審査する際に検討する全般的な分野は 4 つあります。この内、本文書の推奨に最も関連する内容は以下の通りです。

「(I) 純粋な染料、および当該着色料に含まれている中間物質やその他不純物すべて、(II) 食品、医薬品、機器、または化粧品の内部もしくは表面に使用されている当該添加物、および (III) 当該添加物の使用によりこれら対象物の内部もしくは表面に生成されるあらゆる物質、の同一性や量を判断するために必要となる実施可能な分析方法が利用可能であること。」
(連邦食品・医薬品・化粧品法第 721 条(b)(5)(A)(iv))

同法第 706 条(b)の規制内容に基づいて公示された、米国連邦規則集第 21 巻の第 70 部と第 71 部では、着色料の請願に求められる形式、行政上の要件、情報とデータについてさらに詳しい内容が説明されています。

B. 着色料に関する請願内の化学・技術的データに適用される規制要件

(米国連邦規則集第 21 卷 71.1)

着色料に関する請願の審査に適切な化学・技術的データは、後述の通り、米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) セクション A、B、C、E、F、G で説明されています。データは、米国連邦規則集第 21 卷 71.1(f) の内容に従って提出する必要があります。セクション D、H、I、J は、本推奨では触れません。

(1) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A

- 同一性

請願には、対象の着色料の名称や関連する情報すべてを必ず記載してください。記載する情報には、化学的同一性、組成、当該着色料を特定する際に依拠する化学・物理試験の説明を入れてください。(米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A)

提起する着色料を特定するための情報は、可能な限り完全な形で提出し、一般的に以下の内容を入れるようにします(適宜)：

1. 着色料の一般的にまたは通常使用されている名称。
2. 当該着色料による着色に大きく影響する成分の正式な名称(化学情報データベースサービス[CAS]や IUPAC に記載されている名称等)。色を持つ物質で同一性情報に記載されていないものは不純物とみなされ、その仕様は「化学的仕様」セクションの内容に従い提起することができます。
3. 着色料の同義語、広く用いられている別名、商標名。
4. 同一性情報に記載されている色素成分すべての化学式、構成、分子量。
5. 入手可能な場合は、同一性情報に記載されている着色料と色素成分の CAS 登録番号。新規成分の CAS 登録番号は、CAS に書面で申し込むことで入手できます。
6. 植物や動物に由来する着色料については、その起源に関する完全な説明(植物または動物の分類、一般名、属や種、その他あらゆる下位分類)。
7. 着色料の同一性を立証する、化学・物理・生物学的試験の説明とその結果のデータ(例：NMR とマススペクトル、元素分析、生物学的起源の写真)。
8. 請願に着色料レーキの使用が含まれる場合は、当該着色料レーキの説明を入れる必要があります(例については、米国連邦規則集第 21 卷 74.340(a)(3)、74.1340(a)(3)、74.2340(a)(2)を参照)。説明には、基質や沈殿物の同一性(組成も含む)に加え、レーキに含まれる色すべてについて想定される範囲を入れる必要があります。現在の承認では、(1)食品、医薬品、化粧品の着色での使用が認証されているレーキには、基質としてアルミナのみ、およびレーキのカチオンとしてア

ルミニウムもしくはカルシウムのみが含有されており（米国連邦規則集第 21 巻 82.51）、(2) 医薬品や化粧品、外用薬や外用化粧品への使用が認証されているレーキには、米国連邦規則集第 21 巻 82.1051 もしくは 82.2051 でそれぞれ指定されている基質やレーキカチオンのみが含有されています。1996 年 3 月 4 日に FDA がレーキを米国連邦規則集第 21 巻第 74 部に恒久的に記載し、食品レーキ用のカチオンとしてのカルシウムを削除する旨を提案したことを留意してください（61 FR 8372）。

- 物理・化学・生物学的性状

請願には、物理・化学・生物学的性状に関する情報を必ず記載してください。（米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) A）

提起する着色料の代表バッチの性状に関する情報と、入手できる場合には、主な色素成分の性状に関する情報を、通常は以下に従い（適宜）入れてください。

1. 物理的性状--物理的な外観、融点及び沸点の範囲（該当する場合）、各種一般的な溶媒における溶解性、臭気等。
2. 化学的性状および分光的特性-- (1) 空気、水、光、酸、基剤、温度による影響等、着色料の化学的性状、および (2) 紫外線・可視光線のスペクトル等、着色料の分光的特性（適切な溶媒と pH にて）の説明。着色料の中には、赤外線や NMR、マススペクトルが適切なものもあります。
3. 粒子径を操作する技術や道具を用いて着色料が製造もしくは加工されていたり、製造時の副産物として改変された粒子を着色料が含んでいたりする等、着色料が意図された技術的效果を発揮する上で粒子径が重要である場合は、粒子径（平均値と分布）、形、表面積（平均と分布）、表面電荷（ゼータ電位）、粒子の形態学的情報、その他粒子径に依存する性状（例：凝集、集簇、分散）に関するデータを適宜記載してください。

- 化学的仕様

請願には、着色料の成分を規定し、反応により生じる副産物やその他不純物を特定・制限する仕様を記載する必要があります。（米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) A）

提起する着色料の化学的仕様に関する推奨は以下の通りです。

1. 請願者は、商品を定義し、提起する着色料の組成を同一性とともて反映する化学的仕様を提起してください。請願者は、個別の具体的な成分をすべて明確に特定して

ください（例：一般的にまたは通常使用されている名称、IUPAC や CAS の名称、可能であれば CAS 登録番号も使用）。提起する化学的仕様には、当該着色料についての安全性試験を実施する際に使用した代表的なバッチの組成を厳密に反映させてください。提起された仕様が代表的なバッチに見られる成分の量と大きく異なる場合は通常、内容の正当性を証明する必要があります。レーキについてはすべて、仕様を別途記載してください。承認済み着色料の化学的仕様の例は、米国連邦規則集第 21 巻第 73、74、82 部の既存の規制で示されています。化学的仕様には一般的に、着色料組成に関する以下の要素を記載します（該当する場合）：

- 揮発性物質（条件、最大割合を具体的に）
 - 可溶性、抽出性、不溶性物質（溶媒や条件、割合を具体的に）
 - 残留塩（同一性、最大割合）
 - 可溶性の不純物（同一性、溶媒や条件を具体的に、最大 mg/kg [ppm]）
 - 未反応の中間体および関連する化合物（同一性、最大割合、mg/kg [ppm] もしくは $\mu\text{g/kg}$ [ppb]）
 - 従属色（同一性、最大割合）（従属色とは、着色料の同一性には含まれていなくても、主な色素成分に構造的に類似した色素物質を指します）
 - 着色料の同一性に含まれている個別の成分（同一性、最小・最大割合）
 - 残留殺虫剤（最大 mg/kg [ppm]）
 - 残留溶媒（同一性、最大割合もしくは mg/kg [ppm]）
 - 灰分（最大割合）
 - 重金属（同一性、最大 mg/kg [ppm]）
 - 合計色素量（アッセイ、最小割合）。特定された色素成分や従属色による影響も含む場合があります。
 - 着色料の同一性や機能に粒子径が大きく関わる場合は、必要に応じて着色料の粒子径、形、表面の性状に関連するパラメータ
2. 請願者は、仕様に準じていることと仕様が適切であることを示すため、請願に記載した手順に従って製造した着色料のバッチ数点に実施した分析を提出してください。別の採取法が正当であるという有効な説明を提供しない限り、請願者は安全性試験に使用したバッチを含め、5 つ以上のバッチを分析することが推奨されます。使用する分析法は、下記で説明する通り、請願者が示したものと同一にしてください。
3. 請願者は、毒性に関して特定の懸念がある（化学的発がん性等）不純物が提起する着色料に存在する可能性を考慮してください。請願者は、製造過程、提起する着色料に関する化学的文献、関連する化合物、関連する承認済み着色料の仕様を確認してください。発がん性物質（例：4-アミノビフェニル、アニリン、ベンジジン等の非スルホン化芳香族アミン）や発がん性物質へと分解される恐れのある化合物

(1,3-ジフェニルトリアゼン等)、もしくは発がん性物質へと代謝される可能性のある化合物（ジアゾ化・カップリングされた非スルホン化芳香族アミン等）が存在する可能性が高い場合は、これらの推定される不純物について仕様の根拠を提示する上でさらに調査が必要となる可能性があるため、請願者はFDAに問い合わせる指示を仰いでください。

4. 請願者は、好ましい内容と好ましくない内容ともに、分析結果をすべて、明確かつ簡潔に報告してください。結果と結論を完全に評価する上で十分な分析結果が含まれる生データの例を、提出内容に入れてください。機器に表示された曲線のコピーや、研究ノートをプリントアウトしたもの等を生データとして使用できますが、すべて適切にラベリングしてください。情報は、結果や計算がすべて明確に解釈・評価できるような形で提示してください。必要に応じて、追加の生データを提出してください。

- 製造過程の説明

請願には、着色料の製造に使用した手法、施設、管理について完全な説明を記載してください。これらの情報で、当該着色料が繰り返し製造できる組成を持つ物質であることを立証できるようにしてください。当該物質の特徴や管理内容の信頼性に影響を与えない、代替的な製造手法や管理方法、および製造手法や管理方法の応用を、適切な範囲で指定することもできます。

請願には、製造過程において化学的な変化を生じるかどうかに関わらず、未反応・未混合のあらゆる着色料の合成、抽出、その他生成手法に使用した物質すべての一覧を記載してください。各物質は、具体的な特定に適宜必要な構造式を用いて、一般的にもしくは通常使用されている名称および完全な化学名称により特定できるようにしてください。商標権のある製剤が成分として使用されている場合は、当該商標名に続いて組成の完全な定量的説明を記載してください。承認済みの物質についてはどれでも、適切な代替物質を指定できます。

請願者が着色料の製造、加工、梱包作業すべてに携わっていない場合は、各作業の一部を担当する者をそれぞれ特定し、作業の該当する部分を指定してください（米国連邦規則集第21巻71.1(c)A）。

請願が対象とする着色料の製造過程の説明に関する推奨は、以下の通りです。

1. 製造過程の説明には通常（適宜）、反応条件（試薬、試薬の配合・混合法、温度、時間、溶媒、pH、気圧）、および中間体や最終生成物の濃縮、分離、精製に関する

条件を記載します。純度、仕様への準拠、製品の一貫性を保証するために採用する製造管理（試薬の仕様・起源・純度、および試薬、反応用混合物・製品についてのアッセイ・分析・クロマトグラフィー・スペクトル・その他の試験等）を説明してください。着色料が植物もしくは動物性の起源からの抽出物を用いて製造されている場合は、採用した溶媒、加工補助剤、残留溶媒を除去するための手順等、条件すべての完全な説明を提出してください。着色料が組織や細菌、酵母の培養もしくは発酵によって製造されている場合は、製造過程と管理について同様の説明を提出してください。これらの説明は、当該製造過程と管理によって、特定の同一性を有する生成物ができることを示す内容としてください。

請願者が採用しなかった代替の製造手法で、請願者が知っているものも提示してください。

請願に着色料レーキの使用が含まれる場合は、当該レーキを製造する際に使用する手順を請願で説明してください。

対象の物質、および適正製造規範に従った当該物質の調製を特定または説明する、もしくは当該物質の組成・同一性・性状の管理を可能とするその他一切の情報も請願に記載してください。

- 安定性データ

請願には安定性データを必ず記載してください。また、着色料の同一性、強度、品質、または純度を保証する必要があることがデータに示されている場合は、採用予定の使用期限に加え、安定性を維持するために必要な梱包および表示上の注意事項もすべて請願に記載してください。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) A）

請願が対象とする着色料の安定性データに関する推奨は、以下の通りです。

1. 請願には、着色料そのものの安定性を立証するデータを記載してください。着色料が明らかに安定していたり、安定していることが過去に示されたりしている場合は、適切な参考文献および考察を記載した、当該安定性に関する文書を提出することでデータの記載に代えるものとします。安定性データには、使用および暴露の実際の条件を反映させてください。例としては、製品に使用できるよう着色料を頻繁に開閉する容器に保存することが一般的である場合には、安定性試験には大気や湿気に暴露される期間を入れるようにする、ということが挙げられます。着色料が日光やその他の光に晒される可能性が高い場合には、試験にはそれらの内容を入れてください。着色料が使用者の手元にある間に有していると想定される寿命を通して

安定性が正確に評価できるよう、試験には十分な期間を設けてください。この目的においては通常、2年間の試験で十分です。

2. 提起する着色料に過度な不安定性が見られる場合、請願者は当該着色料の承認を提案することはできませんが、使用期限付きとなり、使用期限を超えて当該着色料を製品に使用することは、連邦食品・医薬品・化粧品法の意味において、製品の品質が損なわれたとみなされる結果につながります。請願者は、安定化した着色料混合物としてのみ着色料を使用することを、当該混合物の安定性に基づき、使用期限を設定して、もしくは設定せずに提案することができます。ただし請願者は、安全な使用が確保できる方法で当該着色料が製造・使用できることを明確に示す必要があります。
3. 提起する着色料に過度な不安定性が見られる場合、請願者は主要な分解物を特定する方法とデータを提示してください。そのようなデータが利用できない場合、請願者はデータを提示する代わりに、発生し得る分解物の化学的な機序に基づいた説明とともに、当該データが利用できない理由を説明してください。この説明は、確実な化学理論に基づき、利用できる学術文献で裏付けられる内容にしてください。

(2) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) B

- 使用と制限

請願には、使用を提起する着色料の量ならびに実現を目指す着色効果を、提起する用途に関連する指示、提案、示唆すべてを添えて必ず記載してください。着色効果が、梱包資材に使用されている着色料により発生する、もしくは発生することが合理的に予測される場合、請願者はこの着色効果がどう発生するのか、およびどのような残留物が合理的に想定されるのかについて示す必要があります。

着色料の安全性を保証する上で限界耐容量が求められる場合、意図された物理的もしくはその他技術的な効果を実現するため合理的に必要な水準を超える量が使用できると安全性データが示していたとしても、提起する使用量はその水準を超えないようにしてください。目的とする着色効果を実現するために合理的に必要な量の着色料を使用することが安全性データによって裏付けられない場合、提起された耐容量は確立されないということになります。請願者は、確実な着色料化学に従って着色料の使用を提起することが求められています。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) B）

耐容量やその他使用限度量に関する推奨は、米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) (F) に考察が示されています。請願が対象とする着色料の使用や制限の情報に関するその他の推奨は、以下の通りです。

1. 着色される製品および目的とする効果を実現するために必要な着色料の量を説明する情報を提供してください。FDA が製品に使用されている着色料を判断する上で提起された方法が合理的であると確認し、ヒトの暴露量を推定できるようにするため、この情報は明確に記載し、裏付けてください。
2. 請願が対象とする着色料の使用や制限は、提起された耐容量と使用限度量に準じた内容にしてください（必要な場合）。目の部位（米国連邦規則集第 21 巻 70.5(a)）、注射剤（米国連邦規則集第 21 巻 70.5(b)）、手術用縫合糸（米国連邦規則集第 21 巻 70.5(c)）、着色が標準化されている食品（米国連邦規則集第 21 巻 70.10(a)(3)）に使用することが意図されている製品についての一般的な制限により、これらの用途には特別の承認や認証が求められます（例：請願にて具体的に申請され、規制上認められていない限り、着色料の承認ではこれらの使用は許可されません）。

- 表示

請願には、着色料について提起する表示の見本を必ず入れてください。タイプされた表示内容もしくはその他の形式の草案は、草案の内容と完全に一致する印刷済みの最終版が、当該着色料の製造販売に先立ち準備でき次第提出されるのであれば、請願の検討対象として受理されます。印刷済みの表示は、連邦食品・医薬品・化粧品法の要件に明確かつ厳密に準拠する必要があります。（米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) B）

請願が対象とする着色料に表示する情報に関する推奨は、以下の通りです。

1. 請願者は、着色料を入れる大型容器に使用する表示の例を提出内容に入れてください。請願者は、着色料の表示に関する要件については米国連邦規則集第 21 巻 70.25 を、個別の表示要件の例については米国連邦規則集第 21 巻 73.30(d) および 73.295(d) を参照してください。必要に応じて、安定性を維持するために必要な注意事項も表示に入れてください。
2. 着色料を含有する製品の表示に具体的な要件がある場合、請願者は審査用に、製品表示の例を提出に入れることができます。請願者は、着色料を含有する製品の表示に関する要件については米国連邦規則集第 21 巻 101.22、201.20、501.22、第 701 部を、個別の表示要件の例については米国連邦規則集第 21 巻 74.705(d)(2) を参照してください。

(3) 米国連邦規則集第 21 巻 71.1(c) C

- 化学的仕様を実行するための分析方法

請願には、純色、中間色すべて、補助色、および着色料のその他成分すべてを特定する際に実施可能な方法の説明を必ず記載してください。(米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) C.

1)

請願者は、着色料について指定された物質すべてを特定するための、実証済みの分析手法を提示してください。請願に着色料レーキの使用が含まれている場合は、当該レーキについて指定された物質すべておよび当該レーキを調製する際に使用する基質を特定するための方法を請願に記載してください。参考文献として触れた方法について出版されている資料(必要に応じて英語の翻訳)のコピーも提出してください。分析物について提起する仕様が、通常見られる分析物の量を大幅に上回る場合は、これらの推奨に一定の変更を加えることができます。化学的仕様を実行するために用いる分析方法には、以下に挙げる一般的な形式が推奨されています。

1. **説明**--原則、対象、限界を述べ、方法の要旨を簡潔にまとめてください。当該方法を適用できる基質の種類に関する情報(着色料レーキと混合物を中心に)、当該方法を妨げる物質の種類、および定量限界を含む分析能の範囲も記載してください。
2. **設備と試薬の一覧**--(一般的な実験備品以外で)分析の実施に必要なものを提示してください。
3. **分析物の標準試料**--各分析物について起源を説明し、精製手法、精製の証明、分析のアッセイと方法、安定性、保存条件を示してください。
4. **手順**--適切な訓練を受け、技術を有する分析者が、当該手順に特別慣れていなくても従うことができ、正確で再現可能な結果を得ることのできる手順の詳細を説明してください。当該手順の要素すべてを、サンプル調製から、分析上の判断、最終的な結果を得るために必要な計算に至るまで説明してください。特別な手法、注意点、解釈、その他有用もしくは必要な情報があれば記載してください。
5. **キャリブレーション**--特異度もしくはその他関連する度数を 0 から ca 125~200% まで示す、等間隔の分析物濃度を 5 つ以上用いてください。ブランクやコントロールも入れてください。マトリックス効果が有意でない場合は、着色料の基質なしでキャリブレーションを行っても構いません。マトリックス効果がないことを確認するため、標準添加法によるキャリブレーションや分析が求められる場合があります。キャリブレーション曲線が直線的でない場合は、追加のキャリブレーションポイントが必要となります。
6. **回収試験**--比較的純度の高い着色料もしくは精製された着色料の分析と、本基質および既知の分量の標準試料の分析を繰り返し実施してください。標準試料は、着色料の抽出物ではなく、着色料自体の各分量に加えてください。続いて、標準試料を加えた着色料を分析してください。着色料や着色料のレーキを完全に溶解しない方法では、分析物の一部が基質に取り込まれて失われないようにしてください。再現

性を示すため、各分析物について、仕様基準にまで標準試料を加えた着色料の分析を5回以上実施してください。回収が分析物の濃度から独立していることを確認し、定量限界を確かめるため、仕様基準の1/2と1/8にまで混合した着色料について、同様の分析が求められる場合があります。 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) レベルで60%未満の回収、 $0.1\text{ mg}/\text{kg}$ (ppm) レベルで80%未満の回収 (W. Horwitz, *Anal. Chem.* (1982), vol. 54, ページ67A-76A)、またはそれ以上のレベルで85%未満の回収については、回収を正当化するための説明を提供してください

7. **調査**—提起する着色料の代表的な製造ロット5つ以上の分析結果を、ブランクとコントロールとともに提示してください。色素成分や不純物による干渉がないことを確認してください。複数のサンプルについて、三重（もしくはそれ以上）の分析を実施して、精度を推定できるようにしてください。
8. **結果の分析**—結果データについて有用な統計的評価が実施できるよう、キャリブレーション、分析、回収実験を計画してください。信頼水準には、95%が使用できます。キャリブレーション実験から、仕様基準でのブランクの上限、定量限界、信頼区間を各分析物について計算できます。仕様基準での回収試験から、回収率および信頼区間を各分析物について計算できます。代表的なロットの分析から、分析物の濃度について信頼区間を計算できます。これらのデータから、分析物を判定し、仕様を設定して実行するための方法が持つ利点について判断を下すことができます。
9. **同定**—化学・物理試験の説明と、提起する着色料に見られる特定の不純物が何であることを示す、試験結果のデータを提出してください。
10. **考察**—試験方法または分析結果について、関連する考察を記載してください。結論及びその意義についても、考察を述べてください。分析結果の不確実性について、科学に基づく予測も報告してください。実験が適切にデザインされていれば、データを統計処理することでこの種の情報が得られます。統計学的なデザインや分析の原則についての考察は本推奨が対象とする範囲を超えているため、この点については、関連する文書を参照するか、管轄機関に問い合わせてください。

一般的に、同一研究室内で適切とされる精度は、分析値 $1\text{ mg}/\text{kg}$ (ppm) に対する変動係数 (CV) が10%未満となっており、分析値が1/100になるごとにCVは2倍になります。

- 製品に使用されている着色料の定性・定量的判断

請願には、生・加工済み・最終製品の状態にある食品、医薬品、化粧品で着色料の使用を提起するものすべてについて、着色料の分量を判断するために実施可能な方法の説明を必ず記載してください。（提起する試験は、食品、医薬品、化粧品の管理を目的として使用できるものであり、適切な設備を備えた研究室や訓練を受けた担当者により得られる一貫した結果とともに適用できるものであること。）（米国連邦規則集第21巻71.1(c) C. 2）

請願者は、製品への添加を提起する着色料を、製品内で特定するための方法を提供してください。さらに、製品が含有し得る着色料の量を制限する規制上の耐容量が求められる場合、請願者は提起する着色料を製品内で定量的に特定する方法を提示する必要があります。請願者は、適切な技術を有する、訓練を受けた研究員が実施でき、この特定に用いることのできる分析方法を説明してください。この方法は、具体的、精密、正確で、信頼性のあるものにしてください。この方法は、必要に応じて法廷での反対尋問における細かい取り調べに対応できる内容である必要があります。ただし同時に、現実的な内容とし、実験室の多岐にわたる条件下で実施できる方法でなくてはなりません。特定の個人や、特殊で高度な設備によってのみ実施できるような、過度に複雑もしくは高度な方法であってはなりません。一般的な分析用実験室で行われる共同試験で検査できる分析方法にしてください。このような方法には、以下に挙げる形式が推奨されます。

1. **説明**—原則、対象、限界を述べ、方法の要旨を簡潔にまとめてください。当該方法を適用できる商品の種類に関する情報（着色料レーキと混合物を中心に）、当該方法を妨げる物質の種類、および定量限界を含む分析能の範囲も記載してください。
2. **設備と試薬の一覧**—（一般的な実験備品以外）で、分析の実施に必要なものを提示してください。
3. **着色料の標準試料**—起源を説明し、規制上の耐容量が存在したり提案されたりしている場合は、アッセイも記載してください。
4. **手順**—適切な訓練を受け、技術を有する分析者が、当該手順に特別慣れていなくても従うことができ、正確で再現可能な結果を得ることのできる手順の詳細を説明してください。当該手順の要素すべてを、サンプル調製から、分析上の判断、最終的な結果を得るために必要な計算に至るまで説明してください。特別な手法、注意点、解釈、その他有用、もしくは必要な情報もすべて記載してください。
5. **キャリブレーション**—特異度もしくはその他関連する度数を 0 から ca 125~200% まで示す、等間隔の分析物濃度を 5 つ以上用いてください。ブランクやコントロールも入れてください。製品のマトリックス効果が有意でない場合は、基質なしでキャリブレーションを行っても構いません。マトリックス効果がないことを確認するため、標準添加法によるキャリブレーションや分析が求められる場合があります。キャリブレーション曲線が直線的でない場合は、追加のキャリブレーションポイントが必要となります。
6. **回収試験**—製品に含まれる着色料を特定するため、着色料が使用されていない製品と、提起された量の最低水準で着色料が使用された製品を分析します。規制上の耐容量が存在するもしくは提案されている場合は、既知の分量の着色料を使用した製品と使用していない製品の定量分析を繰り返し実施してください。着色料は、製品の抽出物ではなく、製品自体の各分量に加えてください。続いて、着色料を加えた

製品を分析してください。製品を完全に溶解しない方法については、色素の一部が基質に取り込まれて失われないようにしてください。提起する規制上の耐容量まで着色料を加えた製品について、分析を4~5回以上実施してください。回収が分析物の濃度から独立していることを確認し、定量限界を確かめるため、耐容量の0.5倍と1.5倍にまで着色料を加えた製品に同様の分析を実施してください。

7. **調査**—規制上の耐容量が存在もしくは提案されている場合は、提起する着色料入り製品の代表的なサンプル、ブランク、コントロールの分析から得られる結果を記載してください。製品の基質による干渉がないことを確認する必要があります。複数のサンプルについて、三重（もしくはそれ以上）の分析を実施して、精度を推定できるようにしてください。
 8. **結果の分析**—規制上の耐容量が存在もしくは提案されている場合は、結果データについて有用な統計的評価が実施できるよう、キャリブレーション、分析、回収実験を計画・実施してください。信頼水準には、95%が使用できます。キャリブレーション実験から、耐容量でのブランクの上限、定量限界、信頼区間を計算できます。耐容量での回収試験から、回収率および信頼区間を計算できます。着色された製品の分析から、着色料の濃度に関する精度と信頼区間が計算できます。これらのデータから、着色料を判定し、耐容量を設定して実行するための方法が持つ利点について判断を下すことができます。
 9. **同定**—化学・物理試験の説明と、製品内に見られる着色料が何であるかを確認する試験結果のデータを提出してください。
 10. **考察**—試験方法または分析結果について、関連する考察を記載してください。結論及びその意義についても、考察を述べてください。分析結果の不確実性について、科学に基づく予測も報告してください。実験が適切にデザインされていれば、データを統計処理することでこの種の情報が得られます。統計学的なデザインや分析の原則についての考察は本推奨が対象とする範囲を超えているため、この点については、関連する文書を参照するか、管轄機関に問い合わせてください。
- 着色料の使用により製品の内部または表面に形成されるあらゆる物質を、特定・判定する

請願には、着色料の使用により食品、医薬品、化粧品内部もしくは表面に形成されるあらゆる物質を特定および判定する方法の説明を必ず記載してください。（請願者が721(b)(5)(A)(iv)の条項に基づき、このような方法は一切必要ないと考える場合は、方法を記載する代わりに、その考えの根拠について説明した文書を提出してください。）（米
国連邦規則集第21巻71.1(c)C.3)

一般的に、請願者は、着色料の使用が安全かどうかを判断する際にこれらのデータが不要であるという旨を記した文書を、根拠をする理由とともに提出することができます。しかし当局は、着色料と製品の間で発生し得る化学的な相互作用を理由に安全性に関する疑問が生じる場合には常に、請願者に当該情報を提供するように求めることができます。

(4) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) D

- 安全性に関する調査

本推奨の対象ではありません。

(5) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) E

- 暴露可能性の予測

請願には、想定される着色料の消費や着色料を原因とするその他関連する暴露や、当該着色料を原因として食品、医薬品、化粧品内部もしくは表面に形成されるあらゆる物質への暴露を、その他あらゆる内容とともに担当委員が検討する際に参照可能な完全なデータを必ず記載してください。また、ヒトや動物の食品に含まれる当該添加物に累積効果がある場合には、同種のまたは化学的・薬学的に関連するあらゆる物質もしくは耐容量か耐容量の免除が確立している食品添加物や殺虫剤等も含む食品内の物質を考慮して、担当委員が検討する際に参照可能な完全なデータを必ず記載してください。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) E）

請願が対象とする着色料への暴露量の推定は、安全性評価において非常に重要です。一日当たりの推定暴露量は、提起する使用条件における着色料の安全性を確立するために、どのような種類の動物飼料試験をどの程度実施する必要があるかを決定するのに役立ちます。着色料レーキの使用が提起されている場合は、当該レーキの想定される使用および当該レーキに入れる色素全体の範囲を評価することで、色素そのものへの推定暴露量が得られるようにしてください。

食品に使用する着色料

請願者は、着色料への恒常的な一日当たり推定暴露量を得るのに十分な情報を必ず提供してください。食品に使用されている添加物について分析もしくは推定した量から、一日当たりの食事に含まれると推定される着色料の濃度および推定一日摂取量（EDI）が計算できます。暴露分析に必要な情報の種類には、着色料の組成、不純物の濃度、着色料の使用

が意図されている食品もしくは食品群、および想定される一般的な使用量と最大使用量などが挙げられます。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) E）

医薬品に使用する着色料

請願者は、着色料への推定暴露量を得るのに十分な情報を必ず提供してください。着色料の組成、不純物の量、着色料の仕様を提起する医薬品や医薬品の種類、想定される一般的な使用量と最大使用量を記載してください。請願者は、当該着色料を使用する医薬品が長期的もしくは習慣的な使用のために処方されるのか、それとも短期的な使用のために処方されるのかを示してください（何日間、何週間等）。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1 (c) E)

化粧品に使用する着色料

化粧品から肌への着色料の移行は、100%移行するものとして評価します。皮膚透過試験が提出された場合は、100%移行とする想定に基づく結果を調整するのに用います。評価に有用な情報には、着色料の組成、不純物の量、想定される使用量等が挙げられます。

医療機器に使用する着色料

医療機器への使用が想定される着色料（縫合糸やコンタクトレンズ等）については、100%移行とする場合の移行量を製品の寿命全体を通して平均させることで、着色料の組織への移行を最も容易に求めることができます。実際に移行試験を実施することも可能です。暴露分析に有用な情報の種類には、着色料の組成、不純物の量、機器の最長寿命および一般的な寿命、機器に使用する着色料について想定される一般的な使用量や最大使用量等が挙げられます。機器から移行する着色料の実際の移行率に関する情報は、推定暴露量を求める際に用いることもできます。請願者は、同時並行的に実施を検討している移行試験について当局に問い合わせることができます。

コンタクトレンズの内部または表面に使用される着色料への推定暴露量に関する情報については、指針文書「業界向け指針：コンタクトレンズの内部または表面に使用する着色料について、食品安全・応用栄養センターへ提出する着色料に関する請願を準備する」を参照してください。暴露量の推定に関するより詳細な情報は、FDA の食品添加物安全事務局、請願審査部に問い合わせることで入手できる場合があります（後述の「その他の論点に関する情報」を参照）。

(6) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1(c) F

- 提起する耐容量とその他の使用限量

着色料の安全性を確保する上で、耐容量や使用限量が求められる場合には、着色料の使用について提起される耐容量とその他使用限量を請願に必ず記載してください。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1 (c) F）

- 提起する規制

請願には、提起する規制を入れることができます。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1 (c) F）

提起する規制を請願に入れることが推奨されます。提起する規制は提出データに基づく内容とし、提起する着色料の同一性、仕様、使用と制限、表示、認証状況を詳細に説明するセクションを設ける必要があります（米国連邦規則集第 21 卷第 73、74 部を例として参照）。請願者は、当局が着色料規制の同一性に関するセクションに取り入れられるような、製造方法の簡単な説明も記載することができます。請願に着色料レーキの使用が含まれる場合は、当該着色料レーキも提起する規制に入れる必要があります（例については、米国連邦規則集第 21 卷 74.340 (a) (3) と (d)、74.1340 (a) (3) と (c)、74.2340 (a) (2) を参照）。

着色料の使用に耐容量や使用限量が提起されている場合は、提起する規制の「使用と制限」セクションにて、特定の使用、使用量、その他使用限量を説明してください。安全性を確保する上で特別な耐容量や使用限量が求められない場合は、当該セクションで、食品、医薬品、または化粧品を着色するための着色料の使用を「一般的に適正製造規範に準ずる量を用いる」と表現することができます。請願者は、現在承認されている着色料の使用と制限の例について、米国連邦規則集第 21 卷第 73、74 部を参照してください。

(7) 米国連邦規則集第 21 卷 71.1 (c) G

- バッチ認証の免除

バッチ認証の免除を申請している場合は、当該認証が不要であると考えられる理由を請願に必ず記載してください（意図された用途における安全性を確立する裏付けデータを入れること）。（米国連邦規則集第 21 卷 71.1 (c) G）

認証の免除を求める請願では、公衆衛生の維持にあたり当該認証が不要である理由を必ず示してください（米国連邦規則集第 21 卷 71.18）。着色料の認証が必要かどうかを決定する際に FDA が考慮する要素には、着色料の組成、製造過程、存在し得る不純物、毒性の可能性、承認済み仕様の遵守を保証するために必要な分析方法、着色料の組成の可変性等が

あります（米国連邦規則集第 21 卷 71. 20(b)）。バッチ認証の免除が認められている着色料の例については、米国連邦規則集第 21 卷第 73 部を参照してください。特定の使用においてバッチ認証が免除された着色料でも、その他の使用においてはバッチ認証を受ける必要がある場合があります。

(8) 米国連邦規則集第 21 卷 71. 1(c) H、I、J

- 既存の規制、料金、署名、環境評価の変更

本推奨の対象ではありません。

C. サンプルに関する規制要件（米国連邦規則集第 21 卷 71. 4）

着色料、着色料の成分として使用する製品、着色料の使用を提案している食品・医薬品・化粧品の成分として使用する物質、または当該着色料を含有する食品・医薬品・化粧品について、担当委員がサンプルを要求する場合があります。（米国連邦規則集第 21 卷 71. 4）

請願には、提起する着色料について、請願で説明されている過程に従って製造された五（5）種の異なる製造・パイロットバッチ（毒性学的試験用に提出したバッチも含む）からのサンプルを添付してください。仕様がこれらサンプルの組成に基づく場合があるので、請願者はこれらのサンプルが、提起する着色料の今後製造されるバッチの代表になると想定してください。上記に加え、何らかの代替的な製造過程を請願で提案している場合には、当該プロセスで製造するサンプルも提供してください。

D. その他の論点に関する情報

本推奨は、行政、毒性学、微生物学、栄養学、環境学に関する審査や、請願者が満たさねばならない場合がある表示上の要件すべてを網羅しているわけではありません。これらの論点についての情報が必要な場合は、以下に問い合わせてください。

食品添加物安全事務局、食品安全・応用栄養センター、請願審査部
Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition
Division of Petition Review, HFS-265
Food and Drug Administration
5001 Campus Drive
College Park, MD 20740
電子メール：premarkt@fda.hhs.gov

本指針は、米国食品医薬品局、食品安全・応用栄養センターの請願審査部が作成しました。

指針文書

業界向け指針：食品添加物に関する請願の迅速審査

2010年10月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

I. はじめに

本指針は業界関係者に向けて作成されており、食品安全に多大な影響を及ぼすことが想定される一部の食品添加物に関する請願について実施する迅速審査で用いる基準や手順を説明します。本指針は、1999年1月4日付の指針「業界および食品安全・応用栄養センター職員向け指針：食品添加物に関する請願の迅速審査」の改定版です。

本指針を含むFDAの指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味しています。

II. 迅速審査

FDAは、食品添加物の一定の使用に関する請願を迅速な方法で審査することが、食の安全を目指す上で有用だと考えています。食中毒の発生を抑える目的で添加物が使用される場合、迅速審査が一般的に検討されます。放射性物質や二酸化塩素といった化学物質を使用して各種食品内の病原体の数を減らす旨の請願をFDAが受領した場合などが、迅速審査の例として挙げられます。

食品添加物の請願を迅速審査用に作成するということは、当該請願がその他保留中の食品添加物請願に先立ち審査されるということの意味します。つまり、当該請願が該当する審査を待つ順番の先頭に置かれるということになります。

迅速審査が行われる請願には、標準審査の対象となる同等の請願に適用される規制や要件すべてが適用されます。従って、迅速審査用の請願内容を裏付けるため、米国連邦規則集第 21 卷 171.1 の定義に準じ、有効な科学的エビデンスが求められます。同様に、安全性やデータ提示に関する基準についても標準審査と変わらない内容が迅速審査で適用されます。

基準

食品供給における安全性を大幅に高めることを意図した食品添加物をより迅速に承認するため、FDA は、以下の基準を満たす添加物申請について迅速審査を検討します。

1. 提起される添加物の用途が、ヒト病原体（例：大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、サイクロスポーラ、リステリア）への暴露や、食品の内部や表面でこれら病原体の毒素を大きく抑えることである。
2. 請願が米国連邦規則集第 21 卷 171.1 に準じて作成されており、対象の添加物を承認するかどうかの決定において参照できる十分なデータや情報が記載されている（請願内容が、受理の基準を満たしている）。

手順

1. **申請が迅速審査の対象かどうかを判断する。** FDA で食品添加物の請願を受領する度に、当局の長が適切な部署の長に諮問し、当該請願が迅速審査の基準を満たしているかどうかを判断します。また、請願を行う者が当該請願は上述の迅速審査の基準を満たしていると考えられる場合、その者は FDA に請願を提出する際に根拠を提示して基準への準拠を示してください。
2. **迅速審査の決定。** 迅速審査が行われるかどうかは、請願が提出された時点で決定されます。また FDA は、審査を開始した後で請願が迅速審査の対象であると判断した場合、当該請願を迅速審査に切り替える場合があります。消費者安全担当官および審査担当者は、迅速審査の対象となっていない請願について、提出後の審査中および審査結果の決定期間中に、これらの請願に迅速審査を実施すべきかどうかを決定するための時間を取る必要があります。
3. **文書作成と審査の実施。** 迅速審査が決定された後、請願を担当する消費者安全担当官が上述の基準を用いて、当該請願を迅速審査に切り替える旨を記載した書面の覚書を行政上の記録として作成します。迅速審査への切り替えは、FDA が請願者に書面で通知を行います。また、食品添加物の請願が提出後に迅速審査の対象外となった場合にも、FDA は請願者に通知を行います。
4. **人員の管理。** 審査部の長が、迅速審査対象の請願を最も効率的な方法で審査し、迅速審査として履歴を管理し、規定された時間枠内で審査を確実に完了する責任を負

います。FDA は、迅速審査の対象となる請願を審査するには追加の人員が必要となる場合があるため、本方針の実施により FDA の他の作業に影響が及ぶことを認識しています。迅速審査実施の一環として、以下に挙げる人員に関する問題すべてを考慮する必要があります。

- a. 審査部門内で影響を受けている職員間では、シフト制の導入が必要となる場合があります
 - b. 必要とされる人員を再配置する場合、他部署の科学者からのサポートを依頼しないと標準審査の待機状況が大きく影響を受ける恐れのある部分においては、他部署の科学者からのサポートを依頼する場合があります
 - c. 審査部門では、迅速審査の対象となっている請願の審査が終了した後に標準審査（非迅速審査等）の対象となっている請願の審査を行う場合があります
5. **請願の審査。** 審査を待つ順番以外では、迅速審査対象の請願を審査する手順に変更は一切行われません。
6. **モニタリング。** 審査部門の長は、審査担当者の配置が適切であるかどうかを判断するため、迅速審査の対象となっている請願の状況を定期的に（約 90 日毎）確認し、迅速審査および標準審査を待機する順番に迅速審査が及ぼしている影響を評価します。
7. **一般への公開。** 請願を上述の迅速な手順で審査するという事実は、関心を寄せるあらゆる者に向けて一般公開されます。迅速審査対象の請願に関する情報については、FDA の食品添加物安全事務局に問い合わせてください（Office of Food Additive Safety, 5001 Campus Drive, College Park, Maryland, 20740-3835, 240-402-1200）。

[1]本指針は、米国食品医薬品局、食品安全・応用栄養センターの請願審査部が作成しました。

指針文書

業界向け指針：食品添加物および着色料に関する請願前諮問

2005年4月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

本指針は、この論点に関する食品医薬品局 (FDA) の見解を示しています。本指針は、いかなる人物に対しても権利を発生させたり付与したりすることではなく、FDA や一般市民を法的に拘束することはありません。代替的な解釈で該当する法令や規制の要件を満たすことができる場合は、当該解釈を適用する場合があります。本文書に関する質問は、FDA 食品添加物安全事務局、請願審査部 (HFS-265)、Andrew Zajac (アンドリュー・ザジャック) に問い合わせてください (Office of Food Additive Safety, Division of Petition Review [HFS-265], 5001 Campus Drive, College Park, Maryland, 20740-3835, 240-402-1267、電子メール：andrew.zajac@fda.hhs.gov)。

本文書は、食品添加物および着色料の新規使用について、利害関係者と請願前諮問を実施する際に FDA が用いる手順を明示することを目的としています。これらの手順は、請願前諮問が効率的かつ可能な限り生産的に行われることを確実にするために用いられます。

はじめに

本指針を含む FDA の指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨と

してみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味しています。

請願前諮問は、食品添加物や着色料の今後の使用が関連する、業界と FDA との間の対話です。請願前諮問には以下の二種類があります。(1) 今後の請願に関する要件と手順を話し合うための FDA との会合 (例: 米国連邦規則集第 21 卷 171.1 または 71.1 における規制上の要件) と (2) FDA に提出した情報と、今後の請願に関するコメント (例: データの提出や試験プロトコールの提案)。

対象範囲

FDA は、食品添加物および着色料の請願を円滑に作成できるよう、会合を含めた請願前諮問を推奨しています。請願前諮問では、請願の可否を検証したり、情報の質や量が請願提出の最低条件を満たしているかどうかを確認したりできます。請願前諮問は、安全な使用条件を確立する方法に疑問がある場合には特に推奨されます。また FDA は、一部のデータの解釈について不明な点がある場合や、そのような不明点が安全性に関する全体的な判定の結果に影響するほど重大である場合に、請願前諮問を実施することを推奨しています。例を挙げると、バイオアッセイのデータに合理的でありつつも異なる解釈を適用することで、対象の物質が有する恐れのある発がん性についての結論が変わる可能性がある場合に、諮問が推奨されます。

FDA は請願の審査に関する指針文書を数点発行しており、これらの文書は当局のウェブサイト「[指針文書 \(Guidance Documents\)](#)」で入手できます。FDA は、これらの指針文書を参照することで、請願の準備に関する疑問の多くが解決すると考えています。従って、利害関係者は請願前諮問を要請する前に FDA の請願指針を参照することが強く推奨されます。

手順

請願前会合

請願前会合については、以下の手順に従ってください。

1. 請願前会合の要請は書面にて (書簡、電子メール、ファックス等)、請願提出者が FDA との会合を希望する日時の三週間前までに FDA の食品添加物安全事務局 (OFAS) に提出してください。要請には、会合の目的についての考察を述べた議題 (要請者が目指す結果)、会合への参加が予定される FDA 関係者以外の人物一覧、想定される所要時間、会合の日程案を記載してください。要請に記された会合の目

的に基づき、会合で必要となる FDA の専門分野を決定します。また、要請の初回提出時に裏付け情報を提供し、FDA の担当者が諮問会合の準備をする十分な時間を確保できるようにすることは、双方にとって有益となります。

2. 要請は FDA で受理された後、当局の文書追跡システムに登録され、管理番号が付与されます。OFAS 内の消費者安全担当官 (CSO) が要請の担当として任命され、会合を調整します。
3. CSO は通常、相談内容のメモを取り、議事録を作成 (通常は会合日から三週間以内) する役割を担います。議事録は完全・簡潔な内容で、約束が交わされた内容に焦点を当てつつ会合の経過をまとめたものとなります。議事録には、会合の逐語録として用いることができるほどの詳細は記載されません。議事録は会合に参加した別の FDA 職員が確認して、イニシャルを記載します。当該請願前諮問用に作成したファイルに、議事録の複製を保管します。

FDA に提出した請願前情報

請願前に FDA へ自主的に提出した情報 (試験プロトコール、分析方法、毒性・暴露評価対策等) は、FDA が以下の方法で扱います。

1. 請願前情報は、書面または電子形式で OFAS に提出することができます。提出資料の一部が外国語で記載されている場合は、正確かつ完全な英語の翻訳を添えてください。当該情報について「着色料・食品添加物マスターファイル」の作成を請願者が希望する場合は、その旨を提出時の書簡に明記してください。請願前情報はすべて、FDA の文書追跡システムに登録され、管理番号が付与されます。
2. 当該情報についてマスターファイルが作成された場合、FDA は請願者に、当該情報が保管されたマスターファイルの番号を書面で通知します。
3. OFAS 内の CSO が正式な連絡窓口として任命され、FDA による情報の審査を監督し、あらゆる回答を作成・発行します。
4. 人員に余裕がある場合、食品添加物および着色料に関する請願の効率的な提出を目指し、FDA は請願前情報に対するコメントの要請すべてに応じるよう努めます。一定の例外が存在するものの (大規模な毒性試験の報告等)、FDA はこのような要請を受領した際は、利用可能な人材と労働力の状況に応じて、受領から 90 日以内に書面にて回答するよう努めます。請願の審査には関連する法的な時間枠が適用されますが、請願前の提出にはこのような期限は一切ありません。請願前提出より請願が優先されます。そのため、状況によっては、当局が請願前提出から 90 日以内に回答を提示することができない場合があります。
5. 回答はすべて、現在入手可能な情報に基づきます。新たな情報が発生することで FDA の見解が変わる場合があります。FDA は、要請者に回答の書簡を送った後に対

象の添加物に関する追加情報を得る場合があります。追加の情報により当該物質の安全性に関して疑問が生じた場合、FDA は要請者に追って指導を行う場合があります。

請願前諮問に関する情報の開示性

FDA に提出されたあらゆる情報は記録として取り扱われ、米国連邦規則集第 21 巻第 20 部の下、情報公開法に即した要請に従うこととなります。しかし、請願前諮問の一環として提出された情報は、開発中の原料や製品に関して FDA へ自主的に提出された情報として取り扱われます。米国連邦規則集第 21 巻 20.111(d) では、そのようなデータや情報は、食品添加物や着色料について提出された請願で参照されるまでは、一般には通常公開しないとされています。請願前の情報が FDA へ提出された請願で後日参照された場合、当該情報には、食品添加物か着色料の請願どちらで参照されているかに応じて、米国連邦規則集第 21 巻 171.1(h) または米国連邦規則集第 21 巻 71.15 の下、公開規定が適用されます。

業界向け指針：食品添加物または着色料の請願審査に関する質問と回答

2011年4月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

I. はじめに

本指針は、食品添加物または着色料に関する請願の提出に関してよくある質問に対する回答を、業界関係者が素早く検索できるようにするための資料です。本指針は、2006年4月発行の指針「請願審査に関する質問」の改定版です。本指針には更新された情報が記載されており、食品添加物または着色料に関する請願内の情報を開示することについての質問に対する回答を示しています。

本指針を含むFDAの指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味しています。

II. 質問と回答

- A. [食品添加物または着色料の請願は、どのような場合に提出する必要がありますか？](#)
- B. [食品添加物安全事務局へ請願を提出する必要があるかどうかを判断するには、誰に問い合わせればよいですか？](#)
- C. [請願の提出が必要だと判断した場合、何から着手すべきでしょうか？](#)
- D. [請願で提供する情報は、情報開示法の下、要請に応じて開示されるのでしょうか？](#)

- E. 請願の提出後、問い合わせ先はどこになりますか？
- F. 提起する添加物の安全な使用を裏付けるための科学的資料は、どのように準備すべきでしょうか？
- G. 添加物に関する安全性評価の基本的な要素は何ですか？
- H. 添加物についての行政上の記録とは、何を意味しますか？
- I. 模範的な食品添加物・着色料の請願には、どのような要素が不可欠ですか？
- J. 適切な化学的情報を記載した請願は、どう作成すればよいですか？
- K. 環境に関する提出を適切に準備するには、どうすればよいですか？
- L. 請願が対象とする食品添加物の安全性を示す上で必要な毒性情報の種類は、どのように決定すべきですか？
- M. 安全性を立証するのに必要な情報を提示する毒性試験は、どうデザインすべきですか？
- N. 毒性学的情報が問題なく受理されるようにするには、上記以外に何が推奨されますか？
- O. 毒性試験の結果は、どのように提示・考察すべきですか？
- P. 毒性試験内の治療に関する効果の意義を評価する際、どのような要素が考慮されますか？
- Q. 請願が OFAS で受理された後、どのように審査されるかについてのごく簡単な概要を示していただけませんか？
- R. 食品添加物および着色料を承認する過程の特徴を一部示していただけませんか？
- S. 受領通知が発行された後、連邦広報で最終版の規制が発表されるまでに通常どのくらいの期間を要しますか？

A. 食品添加物または着色料の請願は、どのような場合に提出する必要がありますか？

食品内で技術的な効果を発揮することが意図されているあらゆる食品添加物、および食品・医薬品・化粧品・医療機器で使用されるあらゆる着色料で相当な期間にわたり人体に接触するものは、使用を規定する規制条項に準じているか、調査目的の使用として規制から免除されている場合を除き、安全でないとみなされます。食品添加物または着色料に関する請願は、当該添加物の新規使用を許可する規制の発行を要請するために提出し、必要な裏付けデータや情報を必ず記載しなくてはなりません。

請願を提出する前に、食品添加物については米国連邦規則集（CFR）第 21 巻第 170～199 部、着色料については同第 73 部と第 74 部に記載されている FDA の規制を参照して、対象の添加物について意図する使用がすでに規制の対象となっていないかどうかを確認してください。また、食品添加物データベース「[米国内で食品に添加されている物質すべて](#)（Everything Added to Food in the United States - EAFUS）」も、必要に応じて参照し

てください。添加物の食品への使用が既に規制されているのであれば、当該添加物は「分類」とともに EAFUS に記載されています（米国連邦規則集第 21 巻の規制）。具体的な申請が受理されるようにするには、適用される規制の条項（例：同一性、仕様、使用限度量）を添加物が必ず満たすようにしてください。

B. 食品添加物安全事務局へ請願を提出する必要があるかどうかを判断するには、誰に問い合わせればよいですか？

食品添加物安全事務局に、以下に挙げる方法のいずれかで問い合わせてください。

郵便

FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition
HFS-200
5001 Campus Drive
College Park, MD 20740-3835

電子メール：premarkt@fda.hhs.gov

受信した問い合わせは、消費者安全担当官（CSO）に割り当てられ、請願の提出が必要かどうかを決定するにあたり CSO がサポートします。

C. 請願の提出が必要だと判断した場合、何から着手すべきでしょうか？

FDA のウェブサイトでは、「[業界向け指針：食品添加物および着色料に関する請願前諮問](#)」をはじめとする各種指針文書が参照できますので、請願の準備を始めるにあたり適宜利用してください。

D. 請願で提供する情報は、情報開示法の下、要請に応じて開示されるのでしょうか？

請願の一部として提出された情報には、当該請願が着色料についてなのか食品添加物についてなのかに基づき、米国連邦規則集第 21 巻第 20 部、米国連邦規則集第 21 巻 71.15(a)、または米国連邦規則集第 21 巻 171.1(h) の情報開示条項が適用されます。FDA は、米国連邦規則集第 21 巻 71.1(a) および米国連邦規則集第 21 巻 171.1(c) で FDA への提出が求められている、三部（意図された用途に食肉、食肉製品、または鶏肉製品での使用が含まれる場合は四部）複製した請願書の一部について、請願者が業務上の秘密もしくは商業上や財務上の機密情報と考える部分については、指定するか墨消し等を施すことを推

奨めています。FDA は、指定もしくは墨消しされた情報のすべてを、米国連邦規則集第 21 卷第 20 部による開示規定の対象外とすることに同意するとは限りません。

E. 請願の提出後、問い合わせ先はどこになりますか？

消費者安全担当官（CSO）が、各請願の担当として指名されます。CSO は、FDA の専門官に諮問する際の窓口となります。CSO はまた、会合を調整したり、審査の進捗についての情報を提供したりします。

F. 提起する添加物の安全な使用を裏付けるための科学的資料は、どのように準備すべきでしょうか？

FDA では、請願の準備に活用できる指針文書を各種取り揃えています。

- [毒性学に関する指針文書：1993 年レッドブック II 草案、2000 年レッドブック、毒性学データ報告用ひな形](#)
- [化学に関する指針文書](#)
- [着色料の請願に関する指針文書](#)
- [環境に関する指針文書](#)

指針と規制の違いに関する注意点：規制とは、[米国連邦規則集](#)（CFR）内で法により定義された要件を指します。食品添加物および着色料に関する請願の書式要件は、米国連邦規則集第 21 卷 171.1 と 71.1 にそれぞれ概要が示されており、厳密に従うことが求められます。規制とは異なり、本指針を含む FDA の指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。本質問事項への回答内に一覧で示した指針文書には、請願者が科学に基づく審査のために情報をそろえる際に役立つポイントが記載されています。これらの文書は、請願者が情報を一貫して適切な方法で提出する上で活用することを意図して作成されています。

G. 添加物に関する安全性評価の基本的な要素は何ですか？

基本的な要素とは以下を指します。

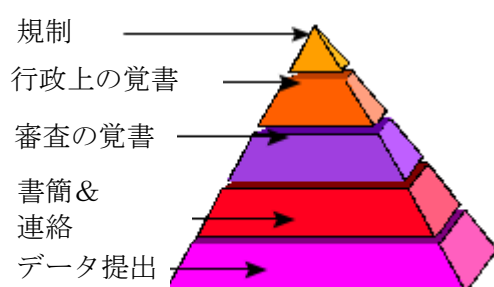
- 同一性
- 暴露の可能性
- 安全性の評価

- 使用条件の制限（安全な使用を確実にするために必要となる場合があります）

H. 添加物についての行政上の記録とは、何を意味しますか？

行政上の記録には、以下に概要を示す要素等が含まれます。

行政上の記録の 作成



- データが請願者によって提出される
- FDA と請願者の間で連絡が行われる
- 連絡を通して確認した内容に従い、FDA がデータを審査し、覚書を作成する
- FDA が最終版の規制を発行する。規制は当該添加物の特定の使用を承認し、法的な取り調べに対応可能な内容を必ず有し、FDA の信頼を支えるものとなる

I. 模範的な食品添加物・着色料の請願には、どのような要素が不可欠ですか？

- 添加物の同一性と組成
- 提起する用途
- 使用量
- 意図された効果を立証するデータ
- 定量的な検出法
- 提起する用途（該当する食品、医薬品、化粧品、機器での使用）での推定暴露量
- 安全性試験すべての完全な報告
- 提起する耐容量（必要時）
- 環境に関する情報（国家環境政策法[NEPA]の改定後内容[62 FR 40570、1997年7月29日]で求められる場合）
- 料金（着色料の請願のみ）

- 請願書のセクションすべてを通して、以下の項目に関連する内容も含め、一貫性のある情報の確実な提供
 - 化学
 - 毒性学
 - 環境科学
 - その他関連する試験（微生物学等）

J. 適切な化学的情報を記載した請願は、どう作成すればよいですか？

- [化学に関する指針文書](#)を参照してください。着色料については、「[業界向け指針：着色料に関する請願 - 食品、医薬品、化粧品、医療機器用の着色料についての化学・技術的データの提出に関するFDAの推奨](#)」を参照してください。
- 実施した試験の適性、およびFDAの指針文書から大幅に逸脱した場合に当該試験に及ぶ影響を評価してください。これらの逸脱や影響については、請願内に考察を入れてください。
 - あらゆる試験のデザインおよび結果の評価は、指針に形式上従うのではなく、確立された科学的な原則に基づくようにしてください。
 - 適切な指針から大幅に逸脱する場合は、根拠を説明し、試験に及ぶ可能性のある影響を考察してください。
- 以下の内容を確実に実現するためにも、都度試験を開始する「前」に、プロトコルの審査について食品添加物安全事務局（OFAS）に問い合わせてください。
 - 適切な試験データの提出
 - 妥当な分析方法論の使用
 - 妥当な実証方法論の使用
- 以下に挙げる項目に関するものも含め、請願内容を裏付ける生データはすべて提出してください。
 - サンプル
 - 標準試料
 - キャリブレーション曲線の構成
 - 検出限界（LOD）および定量限界（LOQ）の判断
- 以下の内容も含め、分析方法の完全な説明を提出してください。
 - サンプルの検査
 - 標準試料の調製
 - 計算例
- 以下の例を含む、その他関連情報をすべて提出してください。
 - 技術的内容のパンフレット
 - 製品安全データシート（MSDS）

- 摂取量を推定するための方法論と計算
- 適宜、参考文献（英語）
- 結果を考察してください。
 - 解釈や結論は科学的に立証できる内容とし、データで裏付けてください。
 - データは科学的に立証できる方法で解釈し、明確に説明し、査読文献で裏付けしてください。

K. 環境に関する提出を適切に準備するには、どうすればよいですか？

以下に挙げる指針は、適用除外行為の申請や環境評価（EA）の提出書類を作成する際に提出者が参考とすることを意図しています。同指針は、環境に関する提出の内容を当局が審査する際に有用な情報の種類を推奨しており、米国連邦規則集第 21 巻第 25 部に記載の、1997 年 7 月 29 日に改定された国家環境政策法（NEPA）の実施規制を参照して作成されています。

業界向け指針：食品安全・応用栄養センターへ提出する、適用除外行為の申請や環境評価を作成する

特殊な状況により、提起された行為が環境に重大な影響を及ぼすと示された場合、通常は評価の対象外となる行為すべてについて、当局が EA の手配を要請します。特殊な状況の例は、指針内で述べられています。多くの場合、適用除外行為は、提出文書内の他の情報を審査することで決定・確認されます。CFSAN は稀に、適用除外行為の基準が満たされていることを追加情報を用いて立証することを推奨します（米国連邦規則集第 21 巻 25.32(i)および(q)に基づく申請の場合には特に）。

試験が必要な場合は、[環境評価における技術的支援に関するハンドブック](#)を参照してください。

適用除外行為の申請や EA を準備するためのサポートが必要な場合は、環境上の結果や影響に関する試験を実施する前に環境審査チームに電子メール (premarkt@fda.hhs.gov) で問い合わせてください。EA が必要な場合は、当局から以下の内容を推奨します。

- 具体的な指針文書で示されている書式上の項目すべてを完全かつ正確に記載する

- 環境評価（EA）と、請願内の前出のセクションとの一貫性を確保する
 - 例としては、対象の添加物と EA で提起された使用が、請願書のセクション A、C、G と同じであることが挙げられます。
- 結論すべてを、データ、計算、もしくは科学的な文献からの情報で裏付ける
- 適切な参考文献を記載する（英語）
- あらゆる機密情報を、請願書の付録に記載する
- 上記以外の推奨
 - 請願を準備する際は、早い段階で環境審査チームに連絡してください。
 - ワークシートやチェックリストを用いて、EA の要素すべてが完全にそろっていることを確認してください。
 - 問題なく完了した EA の例について、過去に作成・規制された請願を参照してください。

L. 請願が対象とする食品添加物の安全性を示す上で必要な毒性情報の種類は、どのように決定すべきですか？

- FDA の [毒性学に関する指針（1993年レッドブック草案および2000年レッドブック）](#) を参照してください。
- 毒性学に関する追加の指針も有用となる場合があります。
 - [米国環境保護庁（EPA）](#)
 - [経済協力開発機構（OECD）](#)（外部リンクに関する免責事項）
 - [規制調和国際会議（ICH）](#)
- 米国連邦規則集第 21 巻第 58 部に記載の、非臨床試験規制に関する医薬品の安全性試験の実施に関する FDA 基準（GLP）。
- 実施した試験の適性、および FDA の指針文書から大幅に逸脱した場合に当該試験に及ぶ影響を評価してください。これらの逸脱や影響については、請願内に考察を入れてください。
 - あらゆる試験のデザインおよび結果の評価は、指針に形式上従うのではなく、確立された科学的な原則に基づくようにしてください。
 - 適切な指針から大幅に逸脱する場合は、根拠を説明し、試験に及ぶ可能性のある影響を考察してください。

M. 安全性を立証するのに必要な情報を提示する毒性学的試験は、どうデザインすべきですか？

OFAS に問い合わせることが推奨されます。本指針の質問 II. B での説明に従い、OFAS に問い合わせてください。消費者安全担当官（CSO）が提出された請願についての連絡窓口として任命されます。毒性に関する内容の審査官は、以下の目的で任命されます。

- 安全性を保証する上で必要な毒性学的情報は何かを決定する
- プロトコールの全体もしくは一部を審査する（試験対象の物質は適切か、等）
- 毒性試験の最中に発生する重大なプロトコール逸脱に対応するための適切な方法話し合う

N. 毒性学的情報が問題なく受理されるようにするには、上記以外に何が推奨されますか？

- 試験目録と既存の毒性試験データの概要を提供してください。
- 添加物および主要な不純物に関する毒性学の文献検索結果を、使用した検索パラメータとともに提出してください。当局が推奨するデータベースには、[Science Direct](#)（外部リンクに関する免責事項）、[Pub Med](#)、[Tox line](#) などがあります。
- 請願が対象とする物質について利用可能な未出版の毒性試験すべてに加え、安全性評価に不可欠な出版済みの毒性試験について、完全な報告を提出してください。
- 各毒性試験は個別に判別できるようにしてください。
- 試験や引用文献は、英語の版を提供してください。

O. 毒性試験の結果は、どのように提示・考察すべきですか？

- 申告された結果を審査官が独立して評価し、検証できるようなデータを入れてください。以下に例を挙げます。
 - 試験物質の投与に応じた濃度や安定性に関する生データ
 - 評価項目すべてに関する、個別の動物データ
 - 病理研究者による解説および非腫瘍性・腫瘍性病変の概要一覧
- 結果を考察してください。以下に例を挙げます。
 - 統計的に有意な効果について意見を述べる
 - 経時的データやコントロールデータを、必要に応じて提供する
 - 文献等で裏付けられない内容は記述「しない」こと。データは科学的に立証できる方法で解釈し、明確に説明し、査読文献で裏付けしてください。

P. 毒性試験内の治療に関する効果の意義を評価する際、どのような要素が考慮されますか？

治療に関する効果を評価する際、治療群と対照群の差の有意性を判定する上で考慮する要素には以下が挙げられます。

- 用量に関連する傾向
- 再現性
- 関連する所見
- 差の度合いと種類
- 男女両方の性での発生

参照元 : *Principles and Methods of Toxicology*, Third Edition (1994), Chapter 17, page 668.

Q. 請願が OFAS で受理された後、どのように審査されるかについてのごく簡単な概要を示していただけますか？

食品添加物に関する請願の審査過程で用いる要素の一部を非常に簡略化した内容を、以下で図示します。これは反復して実施する過程で、請願が対象とする添加物の使用により危害は発生しないと合理的に確信できるとする意見の一致が当局内で得られるまで、過程内の手順の一部が繰り返し実施される場合があります。

新規請願の受領

↓

- 請願の受領が適切かどうかを OFAS が評価（適切であれば、受領通知が連邦広報で発表される）
- CFSAN 外での審査の要否を決定

↓

消費者安全担当官が、請願内の該当箇所を外部専門家に提示し評価を受ける

↓

化学的審査	毒性審査	環境審査	その他政府 専門家による 評価	「外部」(政府 関係者以外) 専門家による 評価
同一性、仕様、製造、使用、機能、推定暴露量を検証する。分析手法を評価する。	安全性試験を評価する。	環境データを評価する。	ケースバイケースで必要に応じて実施。	ケースバイケースで必要に応じて実施。
可能性のある暴露量を計算する。	許容可能な暴露量を決定する。	環境に関する覚書を作成する。	報告書を作成する。	報告書を作成する。

↓

審査結果に続き以下を行います。

- 安全性に関する仮の結論を導く
- 必要に応じて諮問委員会からの見解を受領する
- 最終的な安全性評価を完了する
- 行政上の記録を蓄積する
- 連邦広報に記載する最終版の規則の草案を完成する

↓

当局による最終審査を完了します。

最終版の規制を連邦広報で発表します。

規制が連邦規則集に記載されます。

R. 食品添加物および着色料を承認する過程の特徴を一部示していただけますか？

- 発行される規制は「汎用的」なものであり、医薬品や医療機器に適用される「ライセンス」とは異なります。
 - 規制が示す使用条件に準拠している者は誰でも、規制の範囲内の使用において、対象の添加物を用いることができます
 - 従って、一切の決定を下す前に、安全な使用に関するこのような条件を慎重に考慮する必要があります
- 承認は、安全性に基づいてのみ付与されます。
 - リスクとベネフィットについて明示されたバランスはありません
 - 安全性自体は、法的な基準に基づきます
- 使用を許可する規制が発効する旨が連邦広報で発表されるまでは、食品添加物や着色料を使用することは法令で禁じられています。食品添加物については、最終版の規則が発行された時点で規制が有効となります。着色料については、最終版の規則の発行から 31 日が経過してから、当該規則が有効となります。
 - 規則を正式に制定するには、異議申し立て、聴聞会、訴訟の機会を設けることが求められます
 - 連邦広報に記載する、決定の根拠を説明した詳細な序章を作成しなくてはなりません

S. 受領通知が発行された後、連邦広報で最終版の規制が発表されるまでに通常どのくらいの期間を要しますか？

直接食品添加物に関する請願を提出してから最終版の規則が発行されるまでの期間は平均で 24 か月です。着色料の請願では、承認プロセスが大幅に変動します。請願が対象とする化学物質について最終版の規則が発行されるまでの期間は以下の要因に左右されます。

- 請願の規模（審査するページ数）
- 請願の複雑度
- 補足資料の数（追加提出）
- 審査する結果の数

指針文書

業界向け指針：直接食品添加物の請願 に用いる化学・技術的データの提出に 関する推奨 2009年3月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

目次

- I. [はじめに](#)
- II. [権限](#)
- III. [請願の準備に関する推奨](#)
 - A. [同一性](#)
 - B. [製造過程](#)
 - C. [同一性と純度に関する仕様](#)
 - D. [食品添加物の安定性](#)
 - E. [意図される技術上の効果と使用](#)
 - F. [食品内の添加物分析の方法論](#)
 - G. [摂取推定量](#)
- IV. [追加情報と要件](#)
 - I. [はじめに](#)

本文書では、FDA 食品安全・応用栄養センター（CFSAN）の食品添加物安全事務局（OFAS）が、直接食品添加物の安全な使用に関する規制を求める請願を審査する上で必要と考える化学・技術的データの種類を説明します。

米国連邦食品・医薬品・化粧品法および米国連邦規則集第 21 卷 (21 CFR) 170.3 (h) (i) に準じ、食品添加物については、食品に意図的に添加する前の段階で、意図された使用条件において安全であるということを証明しなくてはなりません（被害につながらないという合理的な確証を提示する、ということです）。食品添加物は現在、直接添加物、二次的
直接添加物²、間接添加物³、および電離放射線源に分類されています⁴。連邦食品・医薬品・化粧品法第 201 条(s)では、一般的に安全と認められている（GRAS）⁵物質の使用は、食品添加物の定義から除外されています。米国連邦規則集には、GRAS として承認・認証されている食品原料の規制が記載されています。本文書は、直接食品添加物（米国連邦規則集第 21 卷第 172 部に成文化されている、食品に直接添加される物質）に関する請願を提出するための指針です。着色料は、米国連邦規則集第 21 卷第 73、74 部に成文化されていますが、本文書では取り扱いません⁶。

本文書は、2006 年 3 月付の指針「直接食品添加物の請願に用いる化学・技術的データ」の改定版で、同指針に優先します。

本指針は、多くの請願に関連するニーズを取り上げることを目指していますが、推奨の中にはすべてのケースに当てはまらないものもあります。請願が対象とする添加物や使用に推奨が該当しないと思われる場合、請願者は、当該添加物や使用の安全性を評価し規制を普及させる上で、本文書で推奨されているデータが不要である理由を説明する必要があります。

本指針を含む FDA の指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は必ずしも法的要件ではなく、示唆や推奨を意味しています。

II. 権限：法令・規制上の要件

連邦食品・医薬品・化粧品法第 409 条(b) (2)では、食品添加物の請願における法的要件が説明されています。簡単に説明すると、これらの要件では以下に挙げる一般的な五分野の情報が網羅されています。

1. 添加物の同一性
2. 添加物について提起する用途
3. 添加物に意図された技術上の効果
4. 食品内の添加物を分析する方法

5. 添加物に関する安全性調査すべての完全な報告

また、請願者は要請に応じて、添加物の製造で（関連して）用いる方法、施設、管理の完全な説明[第 409 条 (b) (3)]や、添加物のサンプルおよび添加物が使用される食品のサンプル[第 409 条 (b) (4)]を提出する必要があります。

[米国連邦規則集第 21 卷 171.1\(c\)](#)では、基本五分野の情報および上述の科学的データ、その他行政上の情報、環境評価、提起する表示の見本も含め、食品添加物の請願でのデータ要件が詳細に説明されています。本指針文書では、化学に関連する事項のみを取り扱います。

[米国連邦規則集第 21 卷 171.1\(h\)](#)で説明されている通り、食品添加物の請願に含まれるデータや情報の中には一般に公開されるものがある一方、公開されないものもあります。この点についての質問は、OFAS に問い合わせてください⁷。

III. 請願の準備に関する推奨

A. 同一性

食品添加物を明確に特定・特徴付けることのできる情報を提供してください。以下に挙げる項目等が対象となります。

1. 正式な化学名称。化学情報データベースサービスや IUPAC に記載されている名称は添加物の名称として使用できます。
2. 一般名、同義語、または商標名。
3. 化学情報データベースサービス (CAS) 登録番号。請願が対象とする食品添加物、当該添加物内の不純物や分解物の CAS 登録番号は、食品に添加することが意図された化学物質を OFAS が詳細に特定するのに役立ちます。これらの情報が提供されることで、当該食品添加物の使用に起因する、食品内の各種化学物質への暴露や安全性が判断しやすくなります。新規化合物の CAS 登録番号および学術名についてのサポートは、CAS 利用者サービスに書面で問い合わせることで得ることができます (CAS Client Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH, 43210-0012)。
4. 実験式、構造式、および分子量や式量。
5. 食品添加物の組成。混合物については、対象の混合物の組成を合理的に定義する上で現実的に可能な数の成分を特定してください。また、混合物内の化学組成情報と各成分の同一性、および物質収支も提示してください。

6. 天然由来の食品添加物については、起源の情報（例：系統名、属、種、気候やその他地理的な要因に基づく変異性）。
7. 物質を特定する際に「固有の特徴」として用いることのできる、詳細な特徴付けを可能とする情報。例としては、食品添加物の化学・物理的性状に関するデータ（例：融点、沸点、比重、屈折率、旋光度、pH、溶解性、反応性）や、クロマトグラフィー・分光学・分光測定の詳細なデータ（例：核磁気共鳴からのスペクトル、赤外線、電子吸収、質量スペクトル）が挙げられます。粒子径を操作する技術や道具を用いて添加物が製造もしくは加工されていたり、製造時の副産物として改変された粒子を添加物が含んでいたりする等、添加物が意図された技術的効果を発揮する上で粒子径が重要である場合は、粒子径（平均値と分布）、形、表面積（平均と分布）、表面電荷（ゼータ電位）、粒子の形態学的情報、その他粒子径に依存する性状（例：凝集、集簇、分散）に関するデータを適宜記載してください。

[米国連邦規則集第 21 卷 171.1\(c\) A](#) に準じ、このような情報が入手できない場合は、入手できない理由を記した文書を提出してください。

B. 製造過程

食品添加物の製造方法についての情報は、意図された成分および添加物内に存在し得るあらゆる不純物（例：残存する出発物質、副反応産物、反応物質または添加物の分解物）両方を特定し、特徴付ける際に必要となります。既知の毒物を有する恐れのある天然由来の食品添加物に関しては、製造過程において毒物の量を管理・抑制・濃縮する能力について請願者が言及する必要があります。

製造過程の考察には、使用する試薬、溶媒、触媒、加工助剤、精製助剤、特殊設備等の一覧に加え、反応条件（例：時間、温度、pH）および製造管理（反応副産物やその他不純物の発生を抑えるために実施する手順も含む）すべてを記載した過程そのものの詳細な説明を入れてください。請願者はまた、添加物の代替製造法を知っている場合には当該製造法を指定し、可能な限り完全に説明してください。あらゆる場合において、添加物の製造では適正製造規範（GMP。後述のセクション C で触れます）を遵守する必要があります。

C. 同一性と純度に関する仕様

請願が対象とする食品添加物の同一性と純度に関する仕様を提起してください⁸。当該食品添加物に関する仕様が、食品用公定化学品集（FCC）第 6 版（2008）もしくは最新版⁹等で出版されている場合は、それらの出版物を引用し、参考文献として適切に示してください。

い。食品添加物請願の本セクションで提供するデータは、当該食品添加物の完全な組成分析を表すようにしてください。提起する仕様には以下の情報を入れてください。

1. 当該食品添加物の説明（例：物理的性状、臭気、色、溶解性）。天然由来の原料を使用する食品添加物については、原料自体を明確に特定してください。
2. 使用した方法や適切な方法を引用した参考文献も含む、食品添加物の同定試験。
3. 使用した方法や適切な方法の参考文献も含む、添加物の純度アッセイ。
4. 食品添加物の物理化学的特性（例：灰分、含水量、融点、密度、屈折率、pH）。
5. 食品添加物の同一性や機能に粒子径が大きく関わる場合は、必要に応じて添加物の粒子径、形、表面の性状に関連するパラメータ。
6. 不純物や汚染物の上限値。
 - a. 鉛の上限値を提起してください。また、ヒ素に加え、カドミウムや水銀等重金属の量を管理する必要がある場合は、これらの上限値も考慮してください。
 - b. 天然の毒物で既知のものすべての上限値、または天然由来の原料を使用する食品添加物の内部や表面に存在する汚染菌の上限値を提起してください。
 - c. 残留反応物質、反応副産物、残留溶媒の上限値を提起してください。

食品供給では引き続き鉛の量が懸念事項であることを踏まえ、鉛について提起する仕様には特に注意を払ってください。鉛の実際の量を判定し、判定に従って仕様を提起してください。対象の食品添加物の起源と製造過程、適切な分析方法論の利用可能性、および当該食品添加物へのヒトの暴露の可能性を考慮し、提起する仕様は技術的に実現可能な範囲でできるだけ低く設定することを心掛けてください。

提起する仕様に準拠していることを示すため、対象の食品添加物のバッチを5つ以上分析してください。分析方法が一般的な標準試験（例：FCC や AOAC インターナショナル[AOAC]の手法）である場合は、参考文献の提示のみが必要となります。方法が一般的でない場合、一般的な方法を新規食品添加物に適用する場合、または変更を加えた標準方法を使用する場合は、当該方法および当該方法の検証データを詳細に説明してください（分析データ要件の考察についてはセクションFを参照）。

D. 食品添加物の安定性

添加物が湿度、空気、温度等の環境条件に対して敏感な場合や、その他安定性に限界がある場合には特に、添加物の安定性を示すデータを入れてください。安定性試験は、食品添加物に想定される寿命を通して、意図された使用条件の下で実施してください。

安定性試験の内容は理解ができるよう簡潔にまとめ、十分な詳細を記載してください。機器上の記録のコピー、データの要約、分析方法等、生データはすべて提供してください。

E. 意図される技術上の効果と使用

食品添加物は、多岐にわたる技術上の効果を得るために使用されています。例を挙げると、添加物は抗菌剤、保水剤、調味料、界面活性剤、安定剤、または増粘剤として分類されます。[米国連邦規則集第 21 卷 170.3\(o\)](#) で定義されている通り、これらの用語は、食品添加物を意図的に食品に添加することで得られる物理・技術的な機能的効果を示しています。添加物の量は、当該添加物が目指す食品内での技術上の効果を得る上で合理的に必要な量を超えないようにしてください ([米国連邦規則集第 21 卷 172.5\(a\)\(1\)](#))。

添加物の意図された用途および使用量に関する考察には、以下の情報を入れてください。

1. 添加物を使用する食品の種類。請願が対象とする使用の範囲は、申請する使用すべてが安全であることを示すデータを提供する請願者の負担に応じ、可能な限り広くしてください。ただし、請願者がこのような負担を抑えたいと考える場合には、当該使用に適用することが意図されている制限を必ず明示してください。例として、申請する添加物の使用が一部の焼き製品（ケーキやパイ等）に限定され、他の焼き製品（パン等）には該当しない場合、対象となる焼き製品を請願内で指定してください。
2. 使用が意図される各食品内の添加物の量。濃度（重量比）として示される、最大使用量と通常の使用量（1 キログラムあたり何ミリグラム、1 キログラム当たり何グラム等）を提示してください。
3. 添加物が食品で発揮することが意図される技術上の効果を記した文書。添加物の技術上の効果が粒子径に関連する場合、当該文書では、添加物の粒子に依存する性状が機能（溶解性、粘度、安定性、抗菌性能、抗酸化能等）にどう影響するのかを説明してください。
4. 保存や加熱時に形成される分解物の同一性や量等、食品が消費される中で添加物に生じる結果。
5. 表示の見本も含む、使用についての推奨、提案、指示すべて。

データを提出し、意図される技術上の効果を得るために必要な添加物の量を示してください。意図された技術上の効果を得るために最低限必要な量を示すには、当該食品添加物の機能を、提起する使用量を超える量と下回る量の、異なるいくつかの量で評価する必要があります（例：意図された使用量の 1/2 倍、1 倍、2 倍）。食品添加物によっては、技術上の自己制限量を有しているものがあります。つまり、自己制限量を超えて食品に使用さ

れると、食品の味や外観が損なわれたり、その他人間の消費に適さない形状となったりするような食品添加物がある、ということです。そのような場合には、提起する自己制限量を超える量と下回る量のいくつか異なる量で、添加物が食品に及ぼす効果を示すデータを提供してください。

意図された技術上の効果を示すために必要なデータの深さと程度は、添加物間で異なる可能性があります。例としては、データが簡素な官能検査から複雑な化学分析にまで多岐にわたる、ということが挙げられます。方法がいかに高度であるかに関わらず、どの実験も、コントロールの必要性を考慮しつつ慎重にデザインしてください。比較的新しい物質や新規の技術上の効果については、物質が添加されている食品やされていない食品のサンプルが分析用に求められる可能性があります。ただし請願者は、請願の審査中に FDA から明示的に求められない限り、そのようなサンプルを提供しないでください。

F. 食品内の添加物分析の方法論

食品が有する可能性のある物質（添加物、添加物に関連する不純物や分解物質）の量に適用する限度次第で添加物の安全な使用を保証できるかどうか左右される場合は、この限度量を実際に使用する目的で、該当する物質を定量化できる方法を示してください。食品内の物質量を定量化するには、適切な設備を備えた実験室で然るべき訓練を受けたスタッフが容易に用いることができる実用的な分析方法が必要となります。分析方法は、具体的、正確、精密で、信頼性のあるものを必ず指定してください。ただし、非常に特別な設備を備えた実験室や、特殊な訓練を受けたスタッフしか実施できないような、過度に高度で複雑な方法であってはなりません。分析試験を外部に委託している場合、委託先の研究室からの生データ、委託先研究室が使用した方法、関連する検証データを、請願で提示してください。分析方法を規制内で参考文献としてのみ示す場合については、米国連邦規則集第 21 卷 51.9(b)(2) で、参考元の分析方法のタイトル、日付、版、著者、発行元、認識番号を規制内で特定しなくてはならない、とされています。

分析方法が適切とみなされるようにするために、一般的に推奨される形式は以下の通りです。

1. **緒言。** 原則、対象、限界にも触れた、方法の簡潔な要約を記載してください。緒言では、当該方法を用いる可能性のある食品の種類、当該方法で検出できる物質、当該方法に干渉する物質の種類を説明してください。
2. **対象。** 一般的な研究道具を除き、試薬（試薬のグレード、あらゆる試薬を調製する際のプロトコールも含む）、設備、計測器具（型番号も含む）、コンピューターソフト

トウェア等の詳細な説明を記載してください。「類似」もしくは「同等」の物質や設備が適切である場合は、その旨を述べてください。

3. **サンプル調製。** 添加物やその他対象となる分析物を含有する食品サンプルの調製を、段階を追って完全・明確・簡潔に説明してください。別々の製造ロットもしくはバッチ5つからのサンプルを、三重の分析用に調製してください。ブランクやコントロールのサンプルも三重で分析してください。

方法を認証するため、FDA は添加物のサンプルを要求する場合がありますが、そのようなサンプルは要求があった場合にのみ提供してください。サンプルが要求される場合、分析用に提出する必要があるサンプルの種類と分量について FDA が指示を出します。

4. **標準溶液。** サンプルを調製して得られる食品抽出物に想定される物質濃度も範囲とする異なる濃度5つで、添加物もしくはその他対象となる分析物を含有した標準溶液を調製し、三重で分析してください。例としては、食品抽出物内の添加物の濃度が 1.0 µg/ml の場合、標準溶液は、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 µg/ml で調製することになります。これらの溶液を分析することで得られるデータを用いて、標準・キャリブレーション曲線を示してください。
5. **設備の較正と設定。** 設備の較正、サンプルの導入、分析の実施を、実験の設定やシステム実行パラメータとともに、段階を追って詳細に説明してください。分析を正常に実施するために必要な、あらゆる注意点や特別な指示も記載してください。該当する場合は、トラブルシューティングの技術も示してください。
6. **検出限界と定量限界¹⁰。** 検出限界とは、分析方法の信頼性を維持して検出できる分析物の最低濃度を指します。ブランクサンプル（物質を添加していない食品マトリックス等）5つを三重に分析して検出限界を求めることが推奨されます。ブランクシグナル（ブランクサンプルでの分析物の反応や、実際もしくは予測される分析物ピークに近いベースライン幅での分析物の反応）を計測し、シグナル平均値、ブランクの標準偏差も計算してください。検出限界は、ブランクシグナル平均より標準偏差3つ分上になります。ブランクサンプルを用いて検出限界を判断することが現実的でない場合は、実際または予測される分析物シグナルに近いベースラインで測定したピークツーピーク・ノイズから判断してください。

分析物を定量化する範囲は検出限界より上にしてください。定量限界は、ブランクシグナル平均より標準偏差10個分上になります。

7. **検証。** 一般的な検証では、スパイク試験と回収試験を行います。これらの試験に使用するサンプルには、対象の添加物を含有している食品に見られる濃度に近い、既知の濃度の分析物を加えてください。回収率は以下の通り定義されます。{[a - b]

/ c} x 100%において、「a」が分析物を加えたサンプルで分析を通して測定された分析物の量、「b」が「バックグラウンド」量（分析物を加えていないサンプルで測定された分析物の量）、「c」が分析物を加えたサンプルに入っている分析物の量、となります。

スパイク試験と回収試験には、添加物を加えて調製した食品を使用したサンプルを用いてください。分析物を加えない（「バックグラウンド」サンプルは、添加物を含有する食品を調製したものを使用してください。分析物を加える（「スパイク」）サンプルは、「バックグラウンド」サンプルと同一の内容に、既知の量の分析物を加えて（「スパイク」して）ください。通常、「スパイク」するサンプルには、添加物の一般的な使用量や分析物の濃度（該当する場合は、検出限界）の半分・同量・二倍を加えます。スパイク量の範囲は、使用量の範囲全体や、あらゆる規制上の耐容量を網羅したり対象に入れたりできるよう、十分に広く設定してください。サンプルはすべて三重に分析してください。スパイク試験の結果は、0.1 mg/kg を上回る分析物濃度で80~110%の回収を示し、0.1 mg/kg を下回るものでは60~110%の回収を示す必要があります。

場合によっては、独立した分析手法を用いて分析対象の添加物の同一性を確認する必要があります。必要時にはFDAが当該情報を要求します。

8. **データの精度と統計処理。** データの統計処理に関する考察は、本文書の対象外となります。従って、この点については適切な資料を参照してください。しかし請願には、データ分析に使用した統計手法の考察を、特別な技法やその他関連する情報とともに記載してください。通常、分析値が0.1 mg/kgを超える場合は相対標準偏差が10%未満、分析値が0.1 mg/kgを下回る場合は相対標準偏差が20%未満で、実験の精度が適正であることが示されます。分析値がmg/kgの範囲を上回る場合、精度は10%より優れていると一般的に想定されます。
9. **データの報告。** バランスのとれた分析報告を提出してください。報告には好ましい結果と好ましくない結果の両方を入れてください。データを独立して評価するのに十分な生データも報告してください。生データには、機器上の記録のコピー、ノートのコピー、パソコンからのプリントアウト等が該当します。また、生の分析データに基づき、キャリブレーション曲線を示したり食品サンプル内の分析物量を特定したりする際に使用したサンプル計算も提出してください。

G. 推定摂取量

食品添加物の規制に関する請願過程の一環として、対象の添加物を含有する食品を食することで消費者が摂取する添加物やその副産物の量を必ず推定してください。この推定量

は、推定一日摂取量（EDI）と呼ばれ、食品添加物の恒常的な摂取量（添加物の寿命全体を通した一日の摂取量平均）を示す目的で用いられています。EDI は通常、「平均的」な消費者と「大量」消費者について計算します。当局は「大量」消費者を「平均的」な消費者と比較して、特定の食品を継続的により多量に消費する者とし、対象集団のサブグループに属するとみなしています。推定を目的とする場合、部分対象集団である「大量」消費者は一般的に、対象の食品を消費する者の 90 パーセントとします。

OFAS は食品添加物の EDI を、請願者から提供される以下の情報に基づいて計算します。

1. 当該添加物を使用する特定の食品
2. 各食品に使用される添加物の通常・最大使用量
3. 添加物の使用によって特に影響を受ける可能性のある部分対象集団の同一性（例：乳児用粉ミルクや低カロリー食品に使用する添加物）
4. 既存の規制が対象とする食品添加物を新しい方法で使用したり使用量を増加したりすることが請願で提起されている場合、請願が対象とする使用に伴い消費が増加することが想定される状況
5. 食品添加物が自然に発生する物質でもある場合、請願が対象とする使用に伴い消費が増加することが想定される状況。食品に自然に発生する添加物の濃度や、食品の推定消費量を記載してください。

OFAS は、食品添加物の推定摂取量を計算する際には通常、一定の基本的な推測を行います。これらの推測では摂取量をやや高めに推定することが一般的です。OFAS はまず、対象の添加物が請願に示されている最大量で使用されていると想定します。続いて、当該添加物を用いて調製することが意図されている食品すべてに当該添加物が使用されていると想定します。

ただし、利用可能なデータや食品添加物の意図された使用次第で、OFAS は EDI の計算に別の方法を検討する場合があります。例としては、当該添加物の一般的な使用量を適用したり、当該添加物を使用して調製された食品の市場シェアを考慮したりする、ということが挙げられます。EDI の計算に別の方法を使用することを希望する場合、請願者はその方法を適用する根拠を、裏付け文書を添付して請願内で完全に説明する必要があります。

消費者の摂取量を推定する際に OFAS が採用する手法は、別の箇所でもより広範に考察されています¹¹。

OFAS は食品添加物について EDI を判定しますが、請願者は独自に計算した EDI を請願内で示すことが推奨されます。請願者は、EDI を計算することを選択した場合、食品の消費デ

一夕に関する情報を上記で引用した文書¹¹を参照して調べてください。請願者は、食品添加物を使用して調製することが意図されている食品すべてに添加物が最大量で使用されていると想定して求めた EDI 平均（「平均的」な消費者を示すため）と 90 パーセントイルの EDI（「大量」消費者を示すため）を、最低限記載してください。EDI の計算には、別の方法を採用することが適切である場合もあります。ただし EDI は、請願が対象とする規制の下で許可されることになる合理的な消費状況に基づいて求めなくてはなりません。請願者の現在の販売計画のみに基づいて求めてはいけません。

時として、摂取量の推定に必要な食品消費や使用量の情報が、不適切であったり利用できなかったりする場合があります。新規物質について考えられる摂取量を予測するにあたり、現在の食習慣を信頼できる情報として外挿できない場合、摂取量の推定が難しくなります。このような場合、摂取量を推定するために新しい手法を取り入れる必要がある可能性があります。該当する例には、食事に取り入れるマクロビオティックの原料（脂質の置き換え等）となり得る食品添加物の摂取量等が挙げられます。適切な手法について合意を目指すにあたり、請願者は他の指針¹¹を確認したり、OFAS に諮問したりすることができます。

IV. 追加情報と要件

本推奨では、請願者が満たす必要のある行政、毒性学、微生物学、栄養学、環境評価、表示に関する要件は取り扱っていません。これらの要件やその他の要件についての情報ならびに食品添加物の請願に関する具体的な質問がある場合は、食品添加物安全事務局（Office of Food Additive Safety, 5001 Campus Drive, College Park, MD, 20740-3835）に問い合わせるか、[食品および化粧品に関する指針文書](#)を参照してください。

1. 本指針は、米国食品医薬品局、食品安全・応用栄養センター（CFSSAN）、食品添加物安全事務局の請願審査部が作成しました。

2. 直接食品添加物と間接食品添加物のどちらにも完全に該当しない、いわゆる二次的直接食品添加物とされる食品添加物の分類は、[米国連邦規則集第 21 巻第 173](#) に成文化されています。二次的直接食品添加物は、食品の製造や加工時に機能が求められる食品添加物で、最終製品に存在することは通常想定されていません。残留物が最終製品に存在する可能性はあるものの、これら残留物は食品内で何らかの技術上の効果を発するとは考えられていません。二次的直接食品添加物の例には、酵素固定剤やイオン交換樹脂、その他加工助剤等が挙げられます。提起する用途に応じて、二次的直接添加物に関する請願を審査す

際には異なる化学・技術的データが必要となります。二次的 direct 添加物のデータ提出に関する情報については、食品添加物安全事務局にお問い合わせください (Office of Food Additive Safety, 5001 Campus Drive, College Park, MD, 20740-3835)。

3. 食品や物質の製造時に食品や物質に接する加工設備等の道具は、道具自体もしくは道具の成分が直接的な接触を介し、意図せずして食品の成分となった場合、間接食品添加物 (食品接触物質、FCS) とされます。間接添加物は、米国連邦規則集第 21 巻第 174~178 部に成文化されています。1997 年食品医薬品局近代化法 (FDAMA) 第 309 条は、連邦食品・医薬品・化粧品法第 409 条を改定し、FCS とされる食品添加物を評価する際に FDA が用いる主な手段として、食品接触通知 (FCN) を規定しています。FCN の手順についての詳細は、ウェブサイト「[食品接触通知の作成：行政上の手続き](#)」と「[食品接触通知および食品接触物質に関連する食品添加物請願の作成：化学的観点からの推奨](#)」に記載されています。通知プログラムは作成されていますが、同プログラムによって間接食品添加物の請願の提出が免除されることはありません。FCS について食品添加物の請願が求められる状況は、食品接触通知の作成に関する OFAS の行政指針に概要が記されています。同指針は「[食品接触通知の作成：行政上の内容](#)」に記載されています。

4. [米国連邦規則集第 21 巻第 179 部](#)を参照してください。

5. 米国連邦規則集には、GRAS 物質の規制に関するセクションが二部設けられています。第一のセクションは[米国連邦規則集第 21 巻第 182 部](#)で、1958 年に連邦食品・医薬品・化粧品法へ修正が加えられる前に一般的に使用されていた物質が記載されています。第二のセクションは[米国連邦規則集第 21 巻第 184 部](#)で、1969 年の大統領指令以降、当局が GRAS として認めている物質が記載されています。本指令では、当局が GRAS 一覧上の原料すべての状況について、これら原料の使用を GRAS と認める、これら原料を 1958 年より前から認められていたものと明示的に判断する、もしくはこれら原料は食品添加物として規制されるべきと結論付けることを目的として、安全性審査を開始することが求められました。

1997 年以降、FDA は GRAS 通知プログラムを実施しています (提起された規則：[62 FR 18937](#))。同プログラムは、ある物質の特定の使用が GRAS であるという判断を、通知者が FDA に報告できる自主的な取り組みです。プログラムでは、通知者が GRAS と判断した根拠の要旨を FDA に提出することができると同時に、FDA は当該判断の根拠に関する質問や懸念事項を取り上げる機会を得ることができます。GRAS 通知プログラムに関する追加の情報は、[GRAS 通知プログラム](#)を参照してください。当局は現在、「一般的に安全と認められている」対象に適用される規則の最終版を作成しています ([整理番号：97N-0103](#))。

6. 食品、医薬品、化粧品に使用する着色料についての化学・技術的データの提出に関する指針。

7. 情報開示法 (FOIA) を通して FDA に情報や記録を求めるための指針は「[FDA に情報や記録を要求するためのハンドブック](#)」に記載されています。

8. 仕様は、食品に使用する物質が「食品としての品質を備えている」と立証するにあたり最低限の基準としてのみ用いることができます。食品添加物が食品としての品質を備えているとみなされるためには、汚染、望ましくない分解物質の生成、誤表示等が存在しない衛生条件の下で製造、梱包、保存、輸送されていることも求められます。このような問題を防ぐための管理やシステムが、操業全体を通して、製造者、加工者、梱包者、流通者によって確立されていなくてはなりません。このような管理やシステムが同一性と純度に関する仕様の遵守と併せて実践されていれば、「適正製造規範」もしくは GMP に準じているとみなされます。GMP に関するさらに詳しい説明は、食品用公定化学品集 (FCC) に記載されています。

9. FCC のコピーは、米国薬局方協会から取り寄せることができます (United States Pharmacopeial Convention, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852、1-800-227-8772) 。<http://www.usp.org> (外部リンクに関する免責事項) 。

10. 環境化学におけるデータ取得とデータ品質評価に関する指針[(1980) Anal. Chem. 52:2242-2249 および(1983) Anal. Chem. 55:2210-2218]。

11. 食品添加物の摂取量を推定する際に FDA が用いることがある手段の一部についての考察は、文書「[食品に含まれる物質の食事を通じた摂取量予測](#)」に記載されています。

業界向け指針：酵素製剤としての食品添加物の請願および GRAS 通知で提出する、化学・技術的データについての推奨

2010 年 7 月

最終版

発行元：

食品安全・応用栄養センター

目次

- I. [はじめに](#)
- II. [背景](#)
- III. [考察](#)
- IV. [請願および GRAS 通知の作成に関する推奨](#)
- V. [追加情報](#)

I. はじめに

本文書では、FDA 食品安全・応用栄養センターの食品添加物安全事務局（OFAS）が酵素製剤としての食品添加物の請願や GRAS 通知を審査する際に検討する化学・技術的データを説明します。

本推奨では、微生物学、毒性学、環境学上の検討に関連するデータや情報には触れません。また、酵素を固定する際に使用する物質の安全性についても検討の対象外とします。これらの物質については、食品添加物の請願もしくは食品接触通知を通して承認を受けてください。本指針は適宜更新し、酵素製剤の製造および使用における新たな進展を反映します。

本文書は、1993 年 1 月付の指針「酵素製剤：食品添加物および GRAS 承認の請願に関する化学的観点からの推奨」の改定版で、同指針に優先します。

本指針を含む FDA の指針文書は、法的拘束力のある義務を規定するものではありません。指針では義務を規定するのではなく、論点に対する当局の現在の見解が説明されています。従って、指針はあくまでも、特定の規制や法的要件が引用されていない限り、推奨としてみなす必要があります。当局の指針で使用される「してください」等の表現は必ずしも法的要件ではなく、示唆や推奨を意味しています。

II. 背景

食品加工で使用される酵素製剤には、食品内で意図された技術上の効果を発揮する役割を担う活性酵素が含まれています。時として、酵素製剤には二種類以上の活性酵素が入った混合物が含まれていることがあります。酵素製剤内の酵素には、植物、動物組織、微生物等多様な生物学的起源に由来するものがあります。これらの起源から得た酵素は、希釈剤、保存料、安定剤、その他食品への使用が適切な物質等、意図的に加えられる原料を用いて調製されます。酵素製剤には、酵素を生成する微生物を増殖させるために使用した発酵培地の残留物等、酵素の起源や製造過程に由来する成分が含まれていることもあります。食品加工で使用される酵素製剤の量はごくわずかで、大抵は最終食品までに除去されるか不活化されています。例を挙げると、スターチをブドウ糖や高濃度果糖コーンシロップに加工する際に用いる酵素はシロップの精製段階で除去され、焼き製品で使用する酵素は焼き工程の高温で不活化されます。

酵素製剤は[米国連邦規則集第 21 巻第 173 部 \(21 CFR 173\)](#) の下、二次的 direct 添加物として規制される場合があります。二次的 direct 添加物を含む食品添加物の法的な位置付けは、請願の審査を通して確立されます。連邦食品・医薬品・化粧品法第 409 条 (b) (1) (21 U.S.C. 348(b) (1)) では、規制の発行を提起する請願は誰でも提出できるとされています。同法第 409 条 (b) (2) (21 U.S.C. 348(b) (2)) では、食品添加物の請願における法的要件が説明されています。食品添加物の請願に関する要件は、米国連邦規則集第 21 巻 171.1 に詳細な考察が記載されています。

連邦食品・医薬品・化粧品法第 201 条 (s) (21 U.S.C. 321(s)) では、一般的に安全と認められている (GRAS) 物質の使用が食品添加物の定義から除外されています。物質が安全であるという証拠 (GRAS 基準の「技術的要素」) がある場合や、当該証拠が一般的に知られており、資格を持つ専門家によって受け入れられていると結論付けられる根拠がある場合には、当該物質は意図された使用条件において GRAS であると認めることができます。米国連邦規則集第 21 巻には、GRAS として承認されている食品原料や、GRAS 承認請願を通して GRAS と承認された食品原料に関する規制が記載されています。FDA は以前、酵素製剤についての GRAS 承認請願を見直しました。GRAS 承認請願の見直しが無事に完了したことで、米国連邦規則集第 21 巻第 184 部の規制が整備されました。GRAS 承認プロセスは当局

が提起した規制の下、自主的な通知プログラムに置き換えられました（米国連邦規則集第 21 卷 170.36 案[62 FR 18938、1997 年 4 月 17 日、一般的に安全と認められている対象 - GRAS]）。

III. 考察

上述の通り、酵素製剤は、製造販売承認プロセスを通して二次的 direct 添加物として規制するか、GRAS と判定することができます。いずれの場合であっても、安全性の判断は酵素製剤について意図された使用条件に限定されます。

A. 酵素製剤の請願

連邦食品・医薬品・化粧品法第 409 条 (b) (2) では、食品添加物の請願における法的要件が一般的な五分野の情報にわたって説明されています。

1. 添加物の同一性
2. 添加物について提起する用途
3. 添加物に意図された技術上の効果
4. 食品内の添加物を分析する方法
5. 添加物に関する安全性調査すべての完全な報告

[米国連邦規則集第 21 卷 171.1\(c\)](#) では、行政上の情報も含め、食品添加物の請願で提示するデータの詳細が説明されています。酵素製剤に関する食品添加物請願には、上記の基本五分野に関連するデータと情報を入れてください。ただし、これら各分野における具体的な情報は、対象の酵素に加え意図的に添加された原料を含有し、酵素の起源や製造過程に由来する未特定成分も含有している可能性のある酵素製剤の性質に沿った内容にしてください。化学的な問題に関する実験データは明確かつ簡潔に記載し、生データや適切な分析方法で裏付けしてください。

[米国連邦規則集第 21 卷 171.1\(h\)](#) に記載されている通り、食品添加物の請願に含まれるデータや情報の中には一般に公開されるものがある一方、公開されないものもあります。この点についての質問は、OFAS に問い合わせてください。

B. 酵素製剤に関する GRAS 通知

安全性の一般的な認識は科学的な手順に基づきますが（米国連邦規則集第 21 卷 170.30(b)）、1958 年 1 月 1 日より前の期間に食品に使用された物質については、食品での一般的な使用経験（米国連邦規則集第 21 卷 170.30(c)）に基づきます。科学的な手順を

通して GRAS を判断する際には、対象の物質そのものに加え、意図された使用条件における当該物質の安全性について、食品に直接もしくは間接的に添加される物質の安全性を専門とする学术界全体で共有されている知識が必要となります。この判断は、政府外部の資格を持つ専門家によって下される場合があります。

FDA は、物質が GRAS であるという判断を個人が FDA に通知できる自主的な通知プログラムを提起しました（米国連邦規則集第 21 卷 170.36 案[62 FR 18938、1997 年 4 月 17 日、一般的に安全と認められている対象 - GRAS）（[連邦広報通知 - GRAS に関する提案](#)もしくは [GPO ウェブサイト](#)[62 FR 18938 を検索]で入手可能）。GRAS 通知に記載されたデータや情報が、審査時点において対象の物質に関する安全上の懸念にはつながらないという場合には、意図された使用条件において当該物質が GRAS であるという通知者の結論に対して FDA からの質問はない、という旨を記した書簡を FDA から発行します。

近年、食品加工での使用が意図される酵素製剤が、GRAS 通知プログラムを通して科学的な手順に基づき多数審査されました。酵素製剤に関する GRAS 通知には、GRAS 免除申請、有能な科学者が当該酵素製剤は意図された使用条件においては安全と考えることが合理的に確実である旨を示した技術情報、学术界でその情報が一般的に知られ、受け入れられているという証拠を記載します。技術情報には、同一性、製造方法、仕様、使用量、食品摂取による暴露、毒性学的試験等を記載しますが、情報はこれらに限定はされません。

GRAS 通知内の技術情報は、食品添加物の請願で使用するものと実質的に同じです。ただし FDA は、GRAS 通知ではデータと情報の要約のみを提出し、詳細な記録や生データは、FDA からの要請があった際に審査ができるよう別途保管しておくことを推奨しています。FDA は、GRAS 通知に商標権に関わる情報を記載することは控えるよう呼び掛けています。その理由は、情報開示法に準じ通知が一般に公開されるからです。GRAS 通知に商標権に関わる情報が記載されている場合、通知者は当該情報が機密情報である旨を明示してください。FDA は指定された情報を審査し、当該情報が米国連邦規則集第 21 卷第 20 部の下、一般公開の例外となるかどうかを判断し、その決定に沿って当該情報を公開または保護します。

また GRAS 通知には、意図された使用条件の下で酵素製剤が GRAS であるという判断を提示するにあたり通知者が依拠した、一般に利用可能で受け入れられているその他あらゆるデータや情報についての考察を、GRAS とする判断に相反するとも考えられるあらゆる情報の考察とともに記載してください。必要な裏付けデータの量や質は GRAS 通知によって異なります。具体的な案件におけるデータ一式の準備について質問がある場合は、GRAS 通知を提出する前に当局の担当者に相談することができます。通知者は、[GRAS 通知プログラム](#)に関する FDA からの情報も確認できます。

IV. 請願および GRAS 通知の作成に関する推奨

A. 同一性

請願書もしくは GRAS 通知の「同一性」セクションには、対象の酵素製剤の特徴を可能な限り完全に記載してください。特徴の記載には、酵素の同一性および特徴、酵素の起源、最終酵素製剤を入れてください。「同一性」として考慮する項目は以下の通りです。

1. 酵素の同一性

- 一般名称、系統名、国際生化学・分子生物学連合の推奨に準じた酵素委員会 (EC) 番号²
- その他の名称
- 存在する場合は、化学情報データベースサービス登録番号 (CAS 番号)
- 酵素活性、基質の特異性、触媒反応
- 酵素の同一性や意図された用途を裏付ける上で利用可能もしくは必要である場合は、比活性、分子量、アミノ酸配列、温度や pH に影響を受ける安定性や活性
- 意図された使用条件の下で酵素の働きに影響する、化学・遺伝的な手法により導入された構造修飾
- 食品アレルギーとなり得るかどうかを評価する上で有用となる可能性のある酵素の特徴。アレルギーの可能性の評価に関連する情報は、学界が現在示している見解に一致する内容とし、当該酵素の起源についての検討、当該酵素のアミノ酸配列と既知アレルギーのアミノ酸配列の比較、当該酵素のペプシン消化に対する感受性、その他関連する情報を、入手可能であれば提供してください。

2. 酵素の起源の特徴

食品加工に現在使用されている酵素は、動物組織、植物性物質、微生物に由来するものです。これらの起源は、学術出版物「酵素製剤」第 6 版 (2008) (「その他の要件」のセクション) や食品用公定化学品集 (FCC) の最新版³で説明されている原則に従う必要があります。酵素の製造に用いる動物組織は、適用される米国食肉検査要件に準拠し、適正衛生基準に従って取り扱う必要があります。酵素の製造に用いる植物性物質および微生物の増殖に用いる培地には、通常の使用条件下で最終食品に健康上有害な残留物を一切残さない成分を使用する必要があります。発酵プロセスは管理された条件の下で実施し、毒物やその他好ましくない物質の温床となり得る微生物による汚染を防いでください。

酵素の製造に用いる微生物は分類を特定し、非病原体であり無毒であることを示す必要があります。しかし、微生物の菌株には、通常は無毒と考えられていても、毒素の合成につながる条件の下で培養されると毒素を発生するものがあります。酵素の起源としてそのような微生物を用いる場合、発酵プロセスを調整して毒素の合成を防ぎ、最終酵素製剤に安全でない量の毒素が存在しないことを確実にするため、適切な試験を実施してください。一方、そのような微生物を遺伝的に修飾し、毒素の合成に関与する生物化学的経路を不活化することもできます。これは、古典的な突然変異誘導や遺伝子工学的手法によって実施できます。酵素の起源として使用する微生物の同一性および安全性に関連する情報で該当するものがある場合には、現在および過去における食品や食品原料での使用も含め、すべて記載してください。

遺伝子組み換え微生物（GMM）⁴に由来する酵素については、追加の情報を提供してください。このような微生物は、導入したあらゆる DNA に関して特徴を完全に説明してください。対象の酵素をコードする遺伝子を含む、導入した DNA の起源、その他あらゆる遺伝子（選択マーカーをコードする遺伝子等）、遺伝子の発現に必要な調節 DNA 配列を特定してください。酵素をコードする遺伝子は、既知の微生物や環境から採取した不明な微生物に由来していたり、遺伝子シャッフルとも呼ばれる分子進化を介した各種起源に由来する遺伝子プールから生成されたりします。酵素をコードする遺伝子はまた、伝統的もしくは部位に特異的な突然変異誘発により合成もしくは修飾することで、酵素の性状を特定の食品の応用条件に適応させたり、酵素の生成を強化させたりすることもできます。

宿主微生物も、特定の内因性遺伝子を不活化させたり欠失させたりすることで修飾できます。こうすることで、有害な可能性のある二次的な代謝物（マイコトキシン等）の合成を抑制したり、目的の酵素の生成や食品加工での機能を阻害する恐れのある他の酵素の生成を最小限に抑えたりすることができます。GMM からの酵素の生成に関与する手法や手順はすべて説明してください。

3. 酵素製剤の組成

食品加工で用いる商用の酵素製剤は通常、化学反応を触媒して技術上の効果を発揮する酵素に加え、安定剤、防腐剤、希釈剤として使用される物質を含有しています。酵素製剤はまた、生成用の微生物や製造過程に由来する成分も含有している場合があります。酵素製剤の特徴を説明する際は、以下の情報を提供してください。

- 希釈剤、安定剤、防腐剤に加え、酵素製剤に用いたその他あらゆる物質の同一性と量

- 酵素製剤に存在している可能性のある、生成用の微生物に由来する二次酵素についての情報
- 酵素の分離や精製に用いた生成用の微生物や物質に由来する他の代謝残留物に関する情報
- 商用酵素製剤および毒性試験に使用した酵素のバッチ両方について、有機固形物の合計内容（TOS）。TOS とは、酵素の起源や製造過程に由来する、酵素製剤内に存在する有機化合物すべての合計を指します⁵。TOS は以下の式で計算します。

$$\text{TOS (\%)} = 100 - A - W - D$$

上式において各記号は以下を意味します。

A = 灰分の割合

W = 水の割合

D = 希釈剤およびその他の製剤原料の割合

B. 製造過程

原料物質を問わず、酵素製剤は最新の適正製造規範（cGMP）を遵守して製造する必要があります。組織培養も含む、動物性もしくは植物性の物質から得た酵素製剤については、原料物質の特徴に加え、酵素の分離や精製の手順も説明してください。

微生物から得た酵素製剤については、培地の適切な増殖条件および純度や遺伝的安定性を維持するために必要な手順と管理すべてを含め、発酵プロセスを説明してください。細胞物質や発酵ブイオンからの酵素の分離も（当該酵素が細胞内酵素か分泌酵素であるかに応じて）、化学・物理的処理や品質管理すべてを含めて説明してください。発酵および後続の下流加工に使用した物質はすべて（消泡剤や凝集剤を使用した場合はそれらも対象とする）特定し、食品加工での使用に適していることを示してください。

C. 同一性と純度に関する仕様

酵素製剤は、学術出版物「酵素製剤」第6版（2008）もしくは最新版の食品用公定化学品集（FCC）に記載されている酵素製剤の純度仕様に従うようにしてください³。請願や通知

は、当該仕様に準拠していることを証明するにあたり、酵素製剤の異なるバッチ数点の分析に依拠するようにしてください。仕様に用いた標準の分析方法（例：FCC で説明されている方法）については、参考文献を記載してください。一方、製造元で改良した方法等、非標準的な方法は、検証して説明してください。また、活性単位も定義してください。

微生物を起源とする酵素製剤には、抗生物質、毒素（タンパク毒素やマイコトキシン等）が含まれないようにし、タンパク毒素を生成したり治療用抗生物質を不活化させるタンパク質を生成したりする形質転換可能な DNA コーディングは使用しないでください。このような物質が存在しないことを生成用の菌株の特徴に基づき証明できない場合は、適切な試験を実施して、当該酵素製剤に生物学的に有意な量でこれらの物質が含まれていないことを示してください。

D. 意図される技術上の効果と使用

酵素製剤が使用されている、もしくは使用が意図されている食品や食品群はすべて特定し、当該酵素製剤の技術上の効果を説明してください。各食品もしくは食品群の TOS に基づき、使用量もしくは使用量の範囲をメートル法で示してください（例：食品 1 キログラムあたりの TOS をミリグラムで表示）。

食品内で酵素製剤に生じる結果を説明してください。酵素製剤は食品に残存することがある一方、消費される前に食品から除去されることもあります。もしくは、食品の製造段階（焼き工程等）で不活化されることもありますが、最終食品で活性を維持している場合もあります。酵素製剤が食品から除去される場合は、「消費される」食品内に存在する酵素製剤 TOS の推定残留量を、可能であれば示してください。

酵素活性により食品内に生成される反応物質を特定し、これらの物質の安全性を確保してください。

E. 摂取推定量

食品添加物の請願や GRAS 通知には、食品の摂取を通じた酵素製剤への推定暴露量（推定一日摂取量、EDI）を記載してください。EDI は、食品の摂取量および食品内の酵素 TOS 量に基づいて求めてください。最終食品における実際の TOS 量が不明である場合は、TOS として表現される使用量に基づき EDI を計算することが許容されます。食品消費データの引用元は参考文献として記載し、簡潔に説明してください。

V. 追加情報

A. 食肉、鶏肉、卵製品で使用される酵素製剤

FDA と FSIS は、食品添加物や着色料の請願および GRAS 通知の対象となる食肉、鶏肉、卵製品の内部や表面での使用が意図される物質を同時に審査するための内容を定めた覚書 (MOU) [6](#)を作成しました。酵素製剤が食肉・鶏肉製品の内部や表面で使用されることが意図されている場合、FDA は同 MOU に従い、米国農務省の食品安全検査局 (FSIS) に諮問します。

同 MOU に準じ、意図された使用条件下での物質の安全性に関連する情報を FDA が評価する一方、FSIS は当該物質の使用が適切である旨を裏付けるデータを評価します。従って、食肉・鶏肉製品の内部もしくは表面で使用される酵素製剤に関する食品添加物の請願もしくは GRAS 通知には、当該酵素製剤の安全性と使用の適性両方に関連する情報を記載する必要があります。酵素製剤使用の適性については、提起する使用条件の下で、意図される技術上の効果を達成するために必要な最低限の量で当該酵素製剤を使用する旨を示すデータを提出してください。これらのデータは、酵素製剤の使用が意図される食肉・鶏肉の各分類について提供してください。FDA はこの情報を FSIS に提供し、MOU に従って合同審査を調整します。

FSIS は、米国連邦規則集第 9 卷 590.5 の定義に従い、卵製品の製造で使用する物質の適性も評価します。よって、FSIS が規制する卵製品での使用が意図される酵素製剤について FDA に提出する食品添加物請願や GRAS 通知には、卵製品で当該酵素製剤を使用することの適性に関する情報を記載してください。

B. アレルゲン原料を含有する酵素製剤

酵素製剤に関する食品添加物の請願や GRAS 通知には、[2004 年食品アレルギー表示・消費者保護法](#) (FALCPA) の条項が適用となる主要な食品アレルギーに由来するタンパク質の存在に関する情報を記載してください。FALCPA は、主要な食品アレルギーそのもの、もしくはそれらアレルギーを含有する食品で FDA の規制対象となるものすべての表示で、請願または通知の過程を通して当該原料の表示が免除されていない限り、食品起源のアレルギー名称を公開することを義務付けています。FALCPA によると、主要な食品アレルギーは、乳、卵、ピーナッツ、ナッツ類、大豆、小麦、魚、甲殻類の食品いずれか、およびこれらの食品に由来するタンパク質を含有する原料、と定義されています。主要な食品アレルギーの食品起源の名称は、乳、卵、ピーナッツ、特定のナッツ類 (アーモンド等)、大豆、小麦、特定の種の魚 (カレイ等)、特定の種の甲殻類 (カニ等) となります。

主要な食品アレルギーに由来するタンパク質が酵素製剤に含まれており、当該アレルギーを通常含有していない食品にこの酵素製剤が使用されている場合は、請願や通知の結果としてアレルギー表示の免除が認められていない限り、当該酵素製剤には FALCPA の条項が適用される可能性があります。例えば、酵素製剤が小麦で調製されており、小麦タンパクを通常含有していない食品での使用が意図されている場合、このような状況となります。[食品アレルギーの表示に関する要件](#)についての詳細な情報は、食品表示と栄養に関する FDA の指針文書に記載されています⁷。

1 本指針は、米国食品医薬品局、食品安全・応用栄養センターのバイオテクノロジー・GRAS 通知審査部が作成しました。

2 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/search.html> (外部リンクに関する免責事項)

3 食品用公定化学品集、第 6 版 (2008)。米国薬局方協会。印刷物として、もしくは以下のウェブサイトで入手可能。

<http://online.foodchemicalscodex.org> 

4 「遺伝子組換え微生物」 (GMM) という用語は、本文書の目的において、現代の組み換え DNA 技術を用いて修飾された微生物を指します。ただし、科学的な意味で本用語はより広範な対象を指しており、伝統的もしくは rDNA 手法のいずれかによる意図的な遺伝的修飾すべてを包含します。

5 NRC/NAS、1981 年。1978 年酵素調査データ要旨。全米研究評議会・米国科学アカデミー。ワシントン D. C.、1981 年。米国商務省。米国科学技術情報サービス。

6 米国農務省食品安全検査局と米国保健福祉省食品医薬品局の間に締結された覚書。

[\[www.fsis.usda.gov/Regulations_&Policies/Labeling_FDA_MOU/index.asp\]\(http://www.fsis.usda.gov/Regulations_&Policies/Labeling_FDA_MOU/index.asp\)](http://origin-</p></div><div data-bbox=)

<http://www.fda.gov/AboutFDA/PartnershipsCollaborations/MemorandaofUnderstandingMOUs/>

[DomesticMOUs/ucm112604.htm](http://www.fda.gov/AboutFDA/PartnershipsCollaborations/MemorandaofUnderstandingMOUs/DomesticMOUs/ucm112604.htm)

7 [http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/
FoodLabelingNutrition/ucm059116.htm](http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodLabelingNutrition/ucm059116.htm)

本文書は、1993年1月発行の「酵素製剤：食品添加物およびGRAS承認の請願に関する化学的観点からの推奨」に優先します。

指針文書

業界向け指針：食品で使用される添加物について推奨される毒性学的試験の概要一覧

2006年6月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

本文書に関する質問は、食品安全・応用栄養センター（CFSAN）のジニョン・パク（Jin Young Park、電話：240-402-1271、電子メール：jinyoung.park@fda.hhs.gov）またはアンドリュー・J・ザジャック（Andrew J. Zajac、電話：240-402-1267、電子メール：andrew.zajac@fda.hhs.gov）にお問い合わせください。

I. はじめに

本文書は、食品で使用される直接食品添加物および着色料に関する安全性評価において、懸念の度合いに応じて実施される最低限の毒性試験の概要を提示することを目的としています。本文書の情報は、懸念の度合いを判断したり、食品で使用する直接食品添加物や着色料に関する毒性試験の程度や種類を判断したりする際の、一般的な指針として使用できます。具体的な質問については、食品添加物安全事務局、請願審査部の適切な規制担当官にお問い合わせることが推奨されます。本文書は2006年に再編成されており、1993年のレッドブック II 草案で発表された情報をまとめています。本文書は、1983年および1997年に発行された過去の版に優先します。重大な変更は加えられていません。

II. 背景

食品で使用される直接食品添加物や着色料の安全性評価では、当該添加物の化学構造（低[A]、中[B]、高[C]）から予測される毒性の可能性に基づき、懸念レベルを判定（低[I]、中[II]、高[III]）したり、ヒトの累積暴露量を推定したりします。詳細は、[1993年レッドブック II 草案の第 III 章](#)を参照してください。添加物の懸念レベルを判定する際は、構造上の注意に関する情報よりも暴露に関する情報に重点が置かれることがよくあります。その他の情報も、食品添加物や着色料の懸念レベルを判定する際に利用可能であれば考慮し、安全性に関する最終的な判定はケースバイケースで下します^[2]。

間接食品添加物（現在は食品接触物質と称されています）の安全性評価で最低限実施する毒性試験の推奨についての詳細は、「[業界向け指針：食品接触物質に関する食品接触通知の作成：毒性学に関する推奨](#)」を参照してください。

III. 食品で使用される添加物に推奨される毒性学的試験の概要一覧

	懸念 レベル 低 (I)	懸念 レベル 中 (II)	懸念 レベル 高 (III)
毒性試験 ^[3]			
遺伝毒性試験	X	X	X
げっ歯類を使用した短期毒性試験	X ^c	X ^{a,c}	X ^{a,c}
げっ歯類を使用した亜慢性毒性試験		X ^c	X ^{a,c}
げっ歯類以外を使用した亜慢性毒性試験		X ^c	X ^{a,c}
げっ歯類以外を使用した一年毒性試験			X ^c
げっ歯類を使用した 慢性毒性試験 または複合毒性試験・発がん性試験			X ^c
げっ歯類を使用した発がん性試験			X
生殖試験		X ^c	X ^c

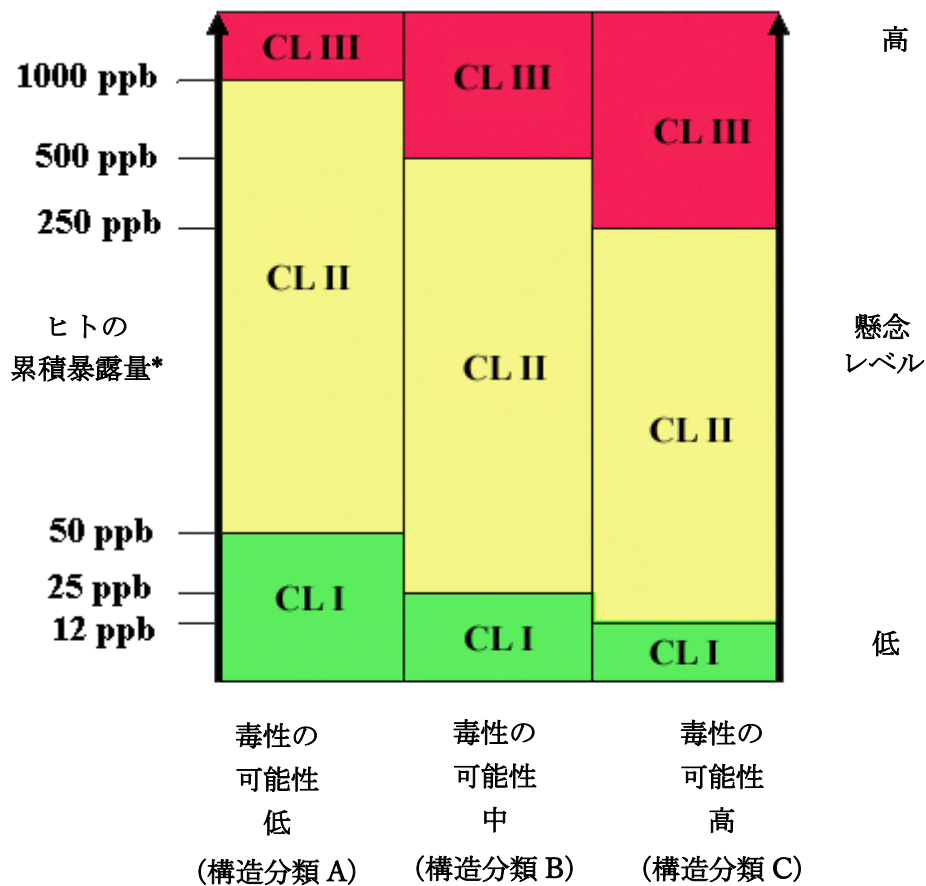
毒性試験 ^[3]	懸念 レベル 低 (I)	懸念 レベル 中 (II)	懸念 レベル 高 (III)
<u>発達毒性試験</u>		X ^{b,c}	X ^{b,c}
代謝試験および体内動態試験 (1993年レッドブック II 草案から PDF[90 KB] で入手可能)		X ^b	X ^b
ヒト試験 (1993年レッドブック II 草案から PDF[86 KB] で入手可能)			X ^b

^a 追加の試験を実施する際、事前に必要な場合。

^b 利用可能なデータや情報で示された場合。

^c 神経毒性および免疫毒性のスクリーニングを含む (1993年レッドブック II 草案から PDF[156 KB] で入手可能)。

IV. ヒトの暴露および化学構造に関連する懸念レベル (CL)



*ヒトの累積暴露量は、食事を通した一日の添加物消費量の10億分の1で表示しています (ppb、食事1 kgあたり μg と同等)。ppbを一日の体重1 kgあたり μg に変換し、一日当たり食事量が3 kgと推定し、20で除しています。

図の説明

この図は、提起された使用によって対象の物質に予測されるヒトの暴露量、および添加物の毒性情報が存在しない場合に考慮される既知の毒物との構造的類似性に基づく毒性の可能性を鑑みて、食品に使用する直接食品添加物や着色料に適用する最低限の懸念レベルを示しています。構造に関する情報に基づき、添加物は以下に挙げる大分類三つの内いずれかに指定されます。分類Aは毒性の可能性が低いもの、分類Bは毒性の可能性が中程度のもの、分類Cは毒性の可能性が高いもの、となります。各構造分類(A、B、C)内で、ヒトの推定暴露量に基づき当該添加物にまず適用する懸念レベルを決定します。各構造につ

き懸念レベルを定義する本図は、推奨される暴露限界点を示しています。懸念レベルから、添加物の新規使用もしくは拡大使用における毒性学的安全性を評価するために必要な、最低限推奨される一連の毒性試験を導くことができます。分類Aの構造では、ヒトの累積暴露が0～50 ppbのものは懸念レベル (CL) Iとされ、50～1000 ppbのものはCL II、1000 ppbを超えるものはCL IIIとされます。分類Bの構造では、ヒトの累積暴露が0～25 ppbのものはCL I、25～500 ppbのものはCL II、500 ppbを超えるものはCL IIIとされます。分類Cの構造では、ヒトの累積暴露が0～12 ppbのものはCL I、12～250 ppbのものはCL II、250 ppbを超えるものはCL IIIとされます。

^[1]本指針は、米国食品医薬品局、食品安全・応用栄養センター (CFRAN)、食品添加物安全事務局の請願審査部が作成しました。

^[2]新規添加物の安全性を裏付ける上で推奨される最低限の毒性学的試験には、添加物の化学構造や暴露量を問わず、懸念レベル III の添加物に一般的に推奨される試験も含まれています。また、添加物の代謝物や分解物、および存在し得る不純物の安全性を立証するため、毒性学的試験がこれらの成分について必要となる場合があります。

^[3]これらの毒性学的試験に関する最新の指針で使用した参考文献は、[2000年レッドブック](#)の末尾の関連章もしくは[1993年レッドブック II 草案](#)内の章にハイパーリンクされています。

本文書は「食品添加物の毒性学的試験」(1983年発行、1997年更新)に優先します。

指針文書

業界向け指針：毒性学データ報告用ひな形 2005年5月

最終版

整理番号：

[FDA-2013-S-0610](#)

発行元：

食品安全・応用栄養センター

当局の指針文書で使用される「してください」等の表現は、法的要件ではなく示唆や推奨を意味することを留意してください。

食品医薬品局（FDA）は、毒性学データの提出に関連するひな形を9種提供しています。ひな形は以下の通りです。1) げっ歯類での亜慢性毒性試験、2) イヌでの亜慢性毒性試験、3) 遺伝毒性試験：試験管内細菌復帰突然変異（エームス）試験、4) 遺伝毒性試験：試験管内マウスリンパ腫チミジンキナーゼ突然変異アッセイ、5) 遺伝毒性試験：哺乳類赤血球小核試験、6) 遺伝毒性試験：試験管内哺乳類染色体異常試験、7) 子宮内相での慢性毒性試験、8) 慢性（一年）イヌ毒性試験、9) 二世代生殖毒性試験。これらのひな形は、食品添加物や着色料の安全な使用に関する請願や通知を裏付けるため、各試験から得られた毒性学データの概要を業界関係者が提出する際に任意のツールとして使用できます。本指針は、業界関係者が毒性学的情報に関する当局の最新の推奨に準じ、標準的な書式や語彙を用いて毒性学報告を作成するためのサポートを提供することを目的としています。ひな形を使用することで評価に用いるデータが一貫した予測しやすい形式で提示できるため、当局は毒性学的情報の評価を迅速に実施できます。当局は業界へのサポートとして「実験的試験の計算ガイド」も提供しています。

同ガイドでは、食品添加物や着色料に関する請願や通知を裏付ける上で毒性報告を提出することが妥当だとする、FDAの現在の見方や推奨を説明しています。しかし、ここで紹介する毒性学データ用ひな形は、連邦食品・医薬品・化粧品法（FFDCA）や連邦規則集（CFR）に代わるものではありません。FDAは、適用される法令および規制に準じて提出されている情報を適切な情報とみなします。食品添加物および着色料を説明するための毒性データや情報に関する要件は、米国連邦規則集第21巻第71、170、171部に記載されてい

ます。食品接触物質、直接食品添加物、着色料、GRAS 通知等、具体的な製品分類での毒性学上の推奨に関する指針も、当局から提供されています。これらの指針は、当局のウェブサイト（[食品原料・梱包に関する指針文書](#)）から入手できます。

当局は他の毒性試験用のひな形も引き続き作成していくため、他のひな形も今後利用できるようになる可能性があります。

毒性試験用ひな形

ここで紹介するひな形は、ウェブアクセス用の HTML 形式もしくは Microsoft Word 文書となっています。ウェブアクセス用の HTML 版では、視覚障害を持つ方向けにスクリーンリーダーを使用できるようになっています。

文書タイトル	ウェブアクセス用 HTML 文書	Word 2000 ひな形
1. 亜慢性毒性試験（げっ歯類）	ウェブアクセス版	ひな形 (474KB)
2. 亜慢性毒性試験（イヌ）	ウェブアクセス版	ひな形 (610KB)
3. 遺伝毒性試験：試験管内細菌復帰突然変異（エームス）試験	ウェブアクセス版	ひな形 (250 KB)
4. 遺伝毒性試験：試験管内マウスリンパ腫チミジンキナーゼ突然変異アッセイ	ウェブアクセス版	ひな形 (176KB)

文書タイトル	ウェブアクセス 用 HTML 文書	Word 2000 ひな形
5. 遺伝毒性試験：哺乳類赤血球小核試験	ウェブアクセス版	ひな形 (117KB)
6. 遺伝毒性試験：試験管内哺乳類染色体異常試験	ウェブアクセス版	ひな形 (201KB)
7. 子宮内相での慢性毒性試験	ウェブアクセス版	ひな形 (962KB)
8. 慢性（一年）イヌ毒性試験ひな形	ウェブアクセス版	ひな形 (1.1MB)
9. 二世世代生殖毒性試験	ウェブアクセス版	ひな形 (86KB)

その他利用可能な資料：実験的試験の計算ガイド
[Excel スプレッドシート](#) (86KB) 形式となります。

Synthetic and Natural Food Colorants

Robert R. Maronpot^{a)} Shim-mo Hayashi^{b)}Maria Bastaki^{c)}^{a)} Maronpot Consulting LLC

1612 Medfield Road, Raleigh, North Carolina 27607, USA

^{b)} Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Japan^{c)} International Association of Color Manufacturers (IACM), Washington DC, USA

Summary

There is increasing contemporary appeal and interest in natural versus synthetic food and beverage colorants based on increasing health awareness and global demand for chemical-free food products. There are many commonalities in defining and regulating food colorants among countries and specifics are provided for the United States, the European Union, and Japan.

Overall global guidance for food colorant safety and marketing is provided by international bodies such as the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Codex Alimentarius Commission (CAC) and contemporary safety assessment standards and regulations are in place in many countries to maximize protection of consumers.

FFI Journal, 225(2): 100–110, 2020

<合成および天然着色料>

要旨：

健康意識の向上とケミカルフリー食品の世界的な志向を背景に、近年、食品および飲料に使用する着色料は合成着色料から天然着色料へ関心と需要が移りつつある。各国の着色料の定義と規制には多くの共通点があり、米国、EU および日本からはその詳細が提供されている。FAO/WHO 合同食品添加物専門会議 (JECFA およびコーデックス委員会 (CAC) といった国際的な組織からは、着色料の安全性からその製造販売に至るまでの全般的なグローバルガイダンスが提供されており、消費者の安全を最大限に確保すべく、最新の安全性評価基準と規制が多くの国々で整備されている。

1. Food Color and Consumer Expectations

食品に着色料を加えるという時代を超えた習慣は、初期のインダス渓谷文明の紀元前 3500 年までさかのぼり、キャンディメーカーが製品の外観を向上させるために天然エキスやワインを添加した紀元前 1500 年頃から一般的になった。

食品着色添加物は、消費者の期待を満たすことを目的とした製品の処方に重要な役割を果たしている。食べる前でも、消費者の食品の第一印象は視覚的なものだ。色は消費者にとっての食品の感覚的体験を向上させ、製品の味と一致させるために添加されている。人間は

進化と伝統によって文化を超えていると味を関連付けるように条件付けされている。脳は観察の最初の 90 秒以内に色と味を自動的に結び付け、この評価の 75%は色に基づくものだということが示されている。したがって、飲食業界が高品質な食品着色料の一貫した有用性に依存し、あらゆる選択肢のため食品着色料市場を当てにしていることは何も不思議ではない。

現代の消費者の中には、「クリーンラベル」製品に興味を持ち、食品着色料を含む天然由来の原材料を重視するひが増えている。この傾向は、主に消費者の間での健康意識の高まり、健康的なライフスタイルに関する認識の変化、そして世界中の“化学物質を含まない”食品への需要の高まりによって引き起こされている。消費者の嗜好のトレンドを満たすためには、天然の食品着色料は自然界に存在し、すべての製造と抽出プロセスは非水系溶剤を使用していない必要がある。これらの基準は本質的に「天然着色料」という用語の根本的な定義を構成しているが、以下に説明するように、同じ材料であっても異なる規制当局の管轄区域では他の定義がある場合もある。食品の「自然さ」に対する消費者の期待と認識には、合成着色料、香料、甘味料、保存料などの添加物の不使用が含まれる。消費者は魅力的な食品を求め、食品の選択と受け入れは色の感覚刺激的効果に影響されるが、同時に、天然着色料のような食品添加物が安全であることを期待している。

現代において食品着色料が市場に与える財務的影響は、数十億ドル規模の試みである。天然および合成食品着色料市場は、2019 年末までに 23 億ドルに達すると予測されている。複合年間成長率は 7%を超え、世界の食品着色料市場は 2024 年までに 46 億ドルに達することも予測されている。製品のタイプ別にみると、2019 年の世界の食品着色料市場では、天然色素が最大のシェアを占めると推定される。

2. Synthetic Food Colorants

初の合成着色料モーベインは、1856 年 William Henry Perkins 氏によって開発された。1900 年代初頭、アニリンに由来した化学的に合成された着色剤は、簡単に生成でき、伝統的に使用されてきた天然着色料と比べ安価で、かつ優れた着色特性を持ち、より均一でより優れた特性を有し、天然着色料よりも幅広い色相の配列を包含し、食品に不要な風味を付与することなく容易にブレンドされた。食品着色料として使用される合成染料は、異なる食品マトリックスにおける多用途性や主要構造フレーム上のアゾ基や他の異なる置換基の数を制御することにより、鮮やかで均一な色を生成する能力をもつため魅力的である。添加された色は、食品の感覚刺激特性を改善するために使用されてきた長い歴史があり、認証された着色料は食品着色料の人気タイプであり続けている。

食品に色を付けるという長い歴史は、食品着色料としての物質の不正かつ有害なくつかの使用例によって中断された。例えば、パンを白くするために石灰、チョーク、ミョウバン、砕いた骨まで加えたり、漬物の色に銅を使用したり、お菓子の色に水銀、赤銅、白鉛、銅塩、ヒ素を加えたりした。このような行為の有害影響は 1800 年代初頭に知られるように

なったが、ヨーロッパでは規制の試みは十分に実施されず、アメリカでは初期の規制は無視されていた。最終的に、ヨーロッパでは 1899 年の食品工丹生防止法 (Food Adulteration Act, 1899) が、米国では 1906 年のワイリー法 (Wiley Act, 1906) が食品着色のための金属塩の使用を禁止したことで強制力のある規制が定着した。

19 世紀後半に始まった工業化時代に伴い、食品の準備は家庭の台所から加工食品の商業生産へと徐々に移行していった。食品加工は、新鮮な食品に含まれる天然色素の損失をもたらした。一般的に新鮮さを連想させる魅力的な色を維持する必要性は、合成着色料の使用を促進した。いくつかの食品着色料の安全な使用の選択肢も存在したが、残念ながらいくつかの明らかに有毒な原料の使用を含む食品の混合物のひどい事件があった。その結果、最終的にはより洗練された規制や改正が発展し、安全性のテストが行われるようになり、現在も使用されている合成着色料の短いリストが承認されることとなった。一つは業界から提供された使用レベルに基づいて、もう一つは市場にある製品において分析的に決定された濃度に基づいて行われた二つの暴露評価では、各色の一日の推定摂取量 (EDI) は、米国の人口、異なる年齢にわたり低く、各色において確立されているいつ日の許容摂取量 (ADI) を大幅に下回っていることが報告されている。

3. Natural Food Colorants

食品着色添加物が天然であるとみなされるためには、自然化に存在し、天然の原料を含む必要がある。それらは植物、動物、後部、もしくは微生物由来の者であってもよく、発色団は抽出や製造中に化学的に修飾されてはならない。いくつかの管轄区域では、化学的に合成された天然色素と同一の化学構造を持つ物質を「天然ものと同一」と呼ぶ特別なカテゴリーが認められている。

使用されている天然着色料のリストは、長く、国によって様々である。ほとんどの天然着色料は、カロテノイド、ベタニン、カラメル色素、各種果汁、アナトー、カルミン、リコピン、パプリカ、ウコン、サフランなどに分類される。特に青色の色素は自然界では珍しく、現在日本ではクチナシ科の植物「クチナシ・ヤスミノイデス」から得られる青色色素の使用が認められており、各国では藻類「スピルリナ・ブラテンシス」から抽出した青色色素も使用が認められている。

天然着色料に関する多くの出版物では、進化する（または現代の）消費者の嗜好や食事への欲求は、合成着色料より天然のものが好まれていることに言及しています。天然着色料の使用増加に対するこのような関心は、合成着色料の摂取と、感受性亜集団における子供の注意欠如・多動性やアレルギーなどのいくつかの状態の悪化との間に噂される関係性に影響されてきた。しかし、専門家による科学的な安全性の評価がされ、規制当局による承認が継続されているにも関わらず、合成着色料に対する国民の懸念は依然として残っており、天然由来の色素を求める現在の市場動向の形成において影響力を持っている。天然着色料に対する消費者の関心は、科学のおよび一般の文献で発表されている健康上の有益性の主張に

も影響を受けている。したがって、産業界はコストと安定性を考慮に入れながらも、新しい天然色素の開発と既存の天然色素の新しい用途を積極的に追求している。

コストと安定性の懸念に対処するための現代の取り組みには、マイクロカプセル化やナノフォーミュレーション、単体材料の使用、色の損失を減らすための金属イオン封鎖材や酸化防止剤の使用、加工や包装の改善のような様々な技術的な選択肢の研究が含まれている。生産コストに対処するため、細胞培養物を用いた天然色素のバイオ開発や、糸状菌や海洋菌を染料源として使用することが検討されている。微生物由来の色素は、植物からの抽出に比べて比較的 low コストで大量生産が可能である。

4. Defining and Regulating Food Colorants in the US

米国では、着色添加物の安全な使用に関する規制が 1950 年代から 1960 年代に策定され、その後の改正によってさらに改良されたことにより安全な食品供給を確保するための効果的な取り組みが容易になった。米国食品医薬品局 (FDA) は、着色料を「食品、医薬品、化粧品、または人体に添加・塗布する場合に色を付与する染料、顔料、物質」と定義している。着色添加物が化学的に合成されている場合は「認証着色添加物」、天然由来 (植物、動物、鉱物由来) の場合は「認証免除」と分類される。米国では、合成または天然由来に関係なく、全ての食品着色料は食品添加物とみなされ、同じ安全性要項と承認プロセスの対象となる。欧州の着色添加物と食品着色料の区別 (後述) とは対照的に、米国の食品着色料の定義にはそのような区別はない。しかし、米国の規制では、果汁及び野菜ジュースに由来する色は、認証着色添加物の除外リストに含まれている。

米国では食品用として認可されている FDA 認証 (FD&C) の着色添加物が 9 種類あり (表 1 参照)、そのうち 5 種類はアルミニウム・レーキとしても使用されている。これらは安全性について厳密にテストされており、製造管理及び品質管理に関する基準 (GMP) に一致する水準で、重度、副次的な色、重金属については、米国 FDA のラボによるバッチ認証を受けている。2 つの例外を除いて、認証を受けた FD&C の着色添加物はすべての食品に使用することができる。例外は成熟したオレンジの皮のみに使用することが承認されているシトラスレッド No.2 と、フランクフルトやソーセージの表面やケーシングのみに使用することが承認されているオレンジ B である。合成着色料は色調が豊富で、安全性に優れ、低コストで製造できる。

米国の着色料規制に関する詳細については、本号の Cox, J. Interesting Aspects of Color Additive Regulation in U.S. pp.137~143 を参照。

FDA は、認証が免除され、恒久的に食品への利用のために記載されている 30 以上の着色料をリスト化している。広く使用されている認証免除の着色料には、アナトー抽出物、βカロテン、カンタキサンチン、コチニール抽出物カルミン、脱水ビーツ、果汁、パプリカ、リボフラビン、サフラン、二酸化チタン、トマトリコピン抽出物、ウコン、野菜ジュースなどがある。これらには、植物、動物、鉱物資源から得られた色素や、天然着色料 (天然と同一)

の合成バリエーションが含まれ、特定の除外色の使用は特定の食品カテゴリーに限定されている場合がある。FDA 認証を免除された色は、一般的に他国では天然色素とみなされる。FDA は、チェリーヨーグルトに含まれるチェリーのように、食品に自身の色素を加える食品成分を着色添加物とはみなしていない。

すべての着色料添加物は FDA によるは販売前承認を必要とし、承認された後は、食品および飲料製品のラベルにそのアイデンティティを明確に表示しなければならない。食品に添加される他の物質とは異なり、着色添加物には GRAS（一般的に安全と認められている）による免除はない。FDA によるすべての着色添加物の承認には、関連する FDA ガイダンスに定められた手順に従って、適切な安全性評価と使用目的への適合性を証明することが求められている。さらに、デラニー条項（動物やヒトで発がん性があることが示されている物質の使用を禁止する）は、原産地に関係なく、色材添加物を含む食品に添加されるすべての物質に適用される。

米国で新しい食品着色料を市場に出すためのプロセスは、承認済着色料と認証外着色料と同じであり、米国 FDA 食品添加物安全局への色素添加物請願書（CAP）の提出が必要である。請願者と FDA との間では、CAP プロセスを通じて請願者を支援するための一連のコミュニケーションが行われることがある。CAP を成功させるために必要な情報には、着色料の化学同一性と構成、製造方法、着色料の仕様と純度データ、安定性、意図された使用容量と予測される人体への暴露、着色料を販売するための技術的な正当性などが含まれる。安全性の証明必要とされ、一般的には FDA レッドブックの要求事項に従った一連の毒性試験が行われる。FDA は、毒性試験と無毒性量に基づいて着色料の ADI を決定する。着色料の販売承認を得るためのこのプロセスは 1 日の許容摂取量（ADI）を決定するための WHO/FAO JECFA のプロセスに似ている。米国における食品中の着色料の存在は、その着色料が免除されているかどうかにかかわらず、製品ラベルに表示されなければならない。認証された色素は、製品ラベルに名前と FD&C 指定で表示されるが、認証外の色素（例：色の添加）を表示するために、より一般的な言葉が使用されている。ラベリング要項は、連邦規則法典（CFR）で定義されており、製品ラベル上で認証色からの除外色を表記するために「自然」という用語を使用することは認められていない。

5. Defining and Regulating Food Colorants in the European Union

欧州では、食品着色料は Annex（付録）I として食品添加物規制に該当し、以下のように定義されている。

“Colours（着色料）”とは、食品に色を付与、または発色をよくする物質であり、通常は食品として消費されず、食品の特徴的な成分として通常は使用されない食品および天然由来の天然成分を含む。栄養成分または香成分にたいする色素の選択的抽出をもたらす物理的または化学的抽出によって得られた食品およびその他の食用天然由来物質から得られた調整物は、本規則内では色素の意である。

EUの色素添加物規制では、「天然」を定義しておらず、「天然」と「合成」の区別もしていない。米国のラベル表示義務とは異なり、EUの表示義務には色素の名称は含まれておらず、その代わりにEナンバーが必要とされているが、これは色素の由来に関する情報を提供していない。さらに、EUでは食品着色料を、食品着色料として、着色性を有する風味として、着色食品としての3つに分類している。「着色食品」とは、選択的抽出を行わずにそのもとから得られた食用原料を意味し、6倍以上の色素の濃縮をもたらす抽出と定義されている。例えば、パスタを着色するために、抽出せずにほうれん草をそのまま使用することは「着色食品」であるが、ほうれん草から選択的に抽出された顔料（6倍以上の濃縮度）は、例えばパスタに適用された場合、「食品着色」添加物を意味する。EUが許可している天然由来の着色料は、抽出手順の議論と化学物質の分類ごとにレビューされている。

EUはまた、食品着色料の原産地に関わらず厳しい安全性評価要項を保持している。12カ国以上の加盟国があるEUでは、1962年に食品着色料に関する最初の指示が合意され、Eナンバー分類システムの確立につながったため、規制の策定には長い年月を要した。しかし、加盟国は、どの食品にどのような添加物が含まれているか、またどのようなレベルの食品が含まれているかを選択する際の採用と実施に関して、独自の柔軟性を保持している。着色料の安全性に関する具体的なリスク評価は、関連リスク評価機関である欧州食品安全機関（EFSA）とその科学パネルが食品添加物の安全な使用を評価することにより、EUに提供されている。食品添加物の純度に関するEUの規制は、JECFAの勧告に沿ったものである。2008年から、EUの古い指令は、食品添加物に関する最新の枠組み指令に置き換えられ、着色料食品対食品着色料添加物の決定のための決定木プロセスを確立したガイダンス文書が公表された。2017年の時点で、EU内の食品に使用するための色素添加物として39色が認可されていた。

米国の表示要項と同様に、EUでも添加物の正式名称またはEナンバーどちらか一方を含む特定のラベル表示指定がある。一部の添加物には追加の表示要項があり、6種類の合成着色料については「子供の活動や注意力に悪影響を及ぼす可能性があります」との警告ラベルが記載されている。

6. Defining and Regulating Food Colorants in Japan

日本で初めて食品の安全性と安全な食品添加物のリストアップを扱った包括的な法律は、厚生省（現厚生労働省）が制定した1947年の食品衛生法（FSA）であった。これは食品の安全衛生に関する最初の総合的な法律であり、食品添加物のポジティブリスト制度（「指定制度」）を設立し、食品検査の基準や仕様を定めたものである。この制度では、厚生労働大臣が安全と指定した添加物のみを食品に使用することができる。しかし、この指定制度は、1995年にFSAが改正されるまでは、化学的に合成された添加物のみ適用されていた。現在では、一部の例外を除き、合成・天然由来に関わらず、すべての種類の添加物が等しく安全性指定制度の対象となっている。FSAは、「食品添加物」を、(i)食品の製造過程で食品中

または食品に使用される物質、または(ii)食品の加工または保存を目的として使用される物質と定義している。したがって、「食品添加物」には、着色料や保存料などの最終製品に残留する物質と、殺菌剤やろ過助剤などの最終製品に残留しない物質の両方が含まれることになる。日本では、食品添加物が天然由来であるか否かにかかわらず、上記の目的で使用される物質はすべて食品添加物に分類される。

FSA の食品添加物は、以下のように「指定」と「既存」に分けられている。この2つの添加物リストは、1995年のFSAの改正時に作成された。それ以降、新規添加物（化学的に合成された物質や天然由来の物質を含む）はすべて指定制度で評価されるようになった。日本で食品への使用が認められている指定食品添加物と既存の食品添加物は、以下のURLに記載されているものに限定されており、着色料、保存料、殺菌剤、製造剤などが含まれているが、天然香料や一般の食品添加物として使用されているものは含まれていない。

●指定添加物

指定添加物とは、FSA 第10条に基づき安全性が評価され、人の健康を害するおそれがないと判断された物質として厚生労働大臣が指定したものである。

<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-desin.add-x>

●既存食品添加物

日本国内で広く使用されており、人が消費してきた歴史のある物質であることから、FSAの指定制度に含まれる安全性評価を経ずに、例外的に日本国内での使用・流通が認められている物質がある。これらは既存の食品添加物と呼ばれ、既存食品添加物リストに掲載されている。

<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-exst.add>

●食品添加物の使用基準

使用基準を有する食品添加物（すなわち、対象となる食品と使用上限値/残留物制限値）は、これらの物質を使用する場合には、これらの基準を満たすものでなければならない。

<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/stanrd.use>

指定制度の対象外となる物質には2つの分類がある。「天然香料」と「食品添加物として使用される一般食品」である。

これらに該当する添加物の例は以下である。

●天然香料

これらの物質は、動植物から得られる天然物であり、香料として使用されるものである。（例：バニラ香料、カニカマ香料）。使用量は一般的に非常に少ない。

<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-nat.flavors>

●食品添加物として使用される一般食

一般に食品として飲食に供される物質であり、食品添加物としても使用されている物質（例：いちご果汁、寒天）である。

<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-general.provd.add>

FSA は、厚生労働省が食品添加物の仕様と規格の公式な取りまとめを作成することを要求している。コンピレーションには、個々の添加物の成分仕様、及びこれらの添加物の製造と使用のための規格が含まれている。この取りまとめは、科学技術の進歩に応じた新しい試験方法や改良された試験方法を導入し、規格の国際的な調和を図るために定期的に更新されている。日本食品添加物規格書は、食品添加物の公式コンピレーションの英訳である。

http://www.nihs.go.jp/dfa/dfa-j/shokuten_kikaku_j.html

7. International Guidelines for Food Colorants

食品添加物の安全性、基準、ガイドラインに取り組むために設立された国際機関は 2 つある。FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) は、国際的に合意された基準だけでなく、各国間の食品法の調和を促進するための独立した科学的専門家委員会として 1955 年に設立された。JECFA の科学委員会は、特定の食品添加物の技術的な目的を検討し、リスク評価を行い、安全に使用するための条件を定義し、FAO、WHO、およびこれらの機関の加盟国に専門的な助言を提供するとともに、補助的な一般委員会 (<http://www.fao.org/fao-whocodexalimentarius/committees/en/>) を通じてコーデックス委員会 (CAC) にも助言を行っている。食品添加物、汚染物質、自然発生毒性物質に関する CAC への助言は、食品添加物に関するコーデックス委員会 (CCFA) を通じて提供されている。色素添加物については、JECFA は文献、政府の情報源及び産業界からのすべての関連情報を考慮して、ヒトの安全な暴露レベルである 1 日の許容摂取量 (ADI) を決定する。ADI は、利用可能なすべての毒性研究から得られたハザード特性に関する最高の科学的データと、着色剤の代謝と薬物動態に関連するデータに基づいている。JECFA は、安全な食品規格の国際的な調和に貢献することを目的として、食品中の着色料の量に関するデータを基に、ADI に基づいて、1 日の推定摂取量 (EDI) を考慮して安全性を判断している。JECFA が食品への使用が安全であると判断した食品着色料は、国内規則でコーデックスを採用している国、または自国の食品規則がなくてもコーデックスを参考にしていない国では一般的に許容されている。

CAC は、添加物や食品添加物の規制を含む食品規格に関する事項について、FAO と WHO の共同作業を実施するために 1963 年に設立された。CAC の目標の一つは、健康と技術に影響を与える食品規格、ガイドライン、世界的な食品関連の習慣を開発することである。コーデックス・アリメンタリウスの重要な活動は、すべての国で安全な食品生産のための参考基準としての文書を作成し、各国間の食品法の調和を促進することである。色を含む食品添加物の使用に関する規定を含むコーデックス食品添加物一般規格 (GSFA) は毎年更新されている。

8. Safety Assessment of Food Colorants

直接添加された食品着色料の安全性評価は、食品添加物リスク評価の一部であり、国際機

関（JECFA など）の公表された安全性評価ガイドライン、および各国（オーストラリア、カナダ、日本、米国など）のガイドラインや地域の管轄区域（EFSA など）のガイドラインに従って実施される。ほとんどの国で食品添加物の安全性に関する規制が整備されており、安全性評価のプロセスが異なる場合もあるが、データ要件、必要とされる毒性試験、承認物質のリスト、および直接食品添加物の市販前承認の要件には多くの共通点がある。食品着色料を含む食品添加物に関するいくつかの一般的な安全原則は、すべての国や地域で普遍的に適用されている。直接添加された食品着色料は、細胞及び遺伝的損傷を特定するための *in vitro* 試験及び *in vivo* 毒性を試験するための動物試験を最低でも含む安全性評価試験を受け、さらに生殖毒性及び発がん性の試験を含む場合もある。

着色添加物の安全性評価は、以下のような有害性評価、暴露評価、リスク評価の一般原則に則っている。

- ・ 集団全体の中で陰性、すなわち絶対的に影響がないことを証明できる試験システムがない。*in vitro* および *in vivo* での安全性試験システムは毒性の代理モデルに過ぎず、そこから一般的な生物メカニズムに基づいてヒトへの影響を推定することができる。
- ・ 食品添加物の安全なヒトの摂取用量は、一日の許容摂取量（ADI）と呼ばれ、よく設計された動物試験から導き出され無毒性量（NOAEL）に基づいている。
- ・ 有害物質を形成する可能性のある他の食品成分との相互作用の可能性を考慮しなければならない。
- ・ 使用用量は、ヒトに害を及ぼさない使用条件を科学的に判断したものでなければならない。工学的影響に必要な使用用量は ADI に対するヒトの暴露量を推定するために使用され、必要に応じて ADI を超えないように最大用量（ML）が設定される。
- ・ 特異的に影響を受けやすいヒトの亜集団を考慮しなければいけない。

米国 FDA は、FDA Redbook で定義された試験パラメーターを持つ食品着色添加物を含む、食品に添加されるすべて物質に対して厳格な試験ガイダンスを実施している。しかし、予想されるヒトの摂取量、毒性に関する警告構造、または毒性の予備データのどれかに基づいた物質の潜在毒性に関する異なる懸念レベルがある。懸念レベルは、必要とされる毒性試験の範囲を決定する。最初の試験結果と、追加試験の必要性につながる可能性のある重要な問題や発見の解釈には専門家の科学的判断が必要である。人に害を及ぼす可能性のある危険性を予測する上で懸念レベルが高いほどより広範な動物試験が必要となる。

欧州では、すべての食品添加物は、安全性評価、技術に対する必要性およびその添加物の使用が消費者を誤解させないことの保証に基づいて使用条件が認可、そしてリスト化されなければならない。EU 指令では、特定の食品着色料を含む食品に対する着色料の使用条件や表示要項を具体的に規定指定している。食品着色添加物のリスク評価と安全性は、公表されているすべての関連する科学的毒性研究や、ヒト暴露に関するデータのレビュー、潜在的なアレルギーの誘発性の考慮に基づいて、いくつかの公表されている EFSA のガイダンス文書に記載されているように EFSA の専門家パネルによって評価されている。2016 年現在、の

食品添加物及び栄養添加物（ANS）の EFSA 科学パネルは、2009 年以前に使用が許可されていた 41 種類の食品着色料について、利用可能な新たな研究を視野に入れた安全性の再評価を完了させた。EFSA は、EU で認可される前の新しい食品着色料の新規使用の安全性評価を担当している。

2003 年 5 月に制定された日本の食品安全基本法では、内閣レベルの食品安全委員会が設置され、食品添加物規制の基礎となっている。食品安全委員会は、食品に含まれる有害物質を特定し、科学的知見と組み合わせて、食品の摂取量に基づいて健康へのリスクを決定する。最大使用量の決定は、厚生労働省と農林水産省に委ねられている。食品添加物の安全性を評価するために必要なデータを定義するためのガイドラインは、日本食品安全委員会（FSC）によって定められている。

上記のように異なる国や管轄区域で実施される食品着色添加物の安全性評価は、国際的なリスク評価ガイダンス文書と一致している。上記のガイダンス文書はすべて、食品着色料を含む食品に添加される化学物質のリスク評価のための同様の手順について説明している。さらに、JECFA、米国 FDA、EFSA、または日本の FSC によって使用されているこれらのリスク評価基準および手順は、合成または天然由来にかかわらず食品着色料に適用される。天然由来の食品着色料については、原産地からの摂取量や、原産地の食品の安全性に関する長い歴史を考慮している。これらの考慮事項は安全性評価に含まれている。化学的に合成された物質と比較して天然由来の抽出物の複雑な組成は、JECFA の安全性評価ガイダンスに記載されているように、不純物の可能性や共同抽出された天然成分の濃縮度に注意を払いながら、その製造工程や組成に関する追加情報を必要とすることがよくある。欧州では、着色食品として定義されている着色添加物は、添加物ではなく食品として定義されていることを理由に、食品連鎖と動物衛生に関する常任委員会、EU 加盟国及び関連する利害関係者によって作成され、2013 年に公表された非公式のガイダンス文書に記載されているように、異なる安全性基準で評価されている。欧州委員会のこのガイダンスの実施を支援するために、共同研究センターが 2015 年に技術報告書を発表した。2013 年のガイダンス文書は現在、欧州委員会による法的な審査が行われており、終了後には更新版が再発行されることが期待されている。

Natural Food Colorants: Current Knowledge and Research Trends

Delia B. Rodriguez-Amaya

Emeritus Professor of the University of Campinas
School of Food Engineering - FEA, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80,
Campinas, SP 13083-862, Brazil

Summary

Consumers' demand for the replacement of synthetic color additives, along with the technical difficulties encountered with the use of natural colorants, has intensified research in this area. Currently, commercial natural colorants are derived mainly from a number of plant sources of carotenoids, anthocyanins, betanin, and chlorophylls, augmented by carotenoids obtained by microbial fermentation. The meticulous studies on the structural features, stability, and transformations during food processing and storage are providing a wealth of information on how to handle these notoriously unstable

compounds. New and economically viable plant sources of anthocyanins and betacyanin and optimization of microalgal production of carotenoids to guarantee economic feasibility on an industrial scale are being pursued. Efficient and green extraction, stabilization methods, production of high quality colorants with wide color spectrum, and appraisal of human health effects are also important research objectives. Encapsulation, microencapsulation and nanoencapsulation are widely evaluated as stabilizing techniques.

FFI Journal, 225(2): 111–130, 2020

<天然食品着色料：最新の知識と研究動向>

要旨：

合成着色料の代替を求める消費者の声に加え、食品への天然着色料の使用で直面した技術的な課題が天然着色料の研究分野を進展させてきた。現在、市場に流通する天然着色料は主に、植物原料由来のカロテノイド類、アントシアニン類、ベタニン、クロロフィル類と微生物由来のカロテノイド類である。色素構造の特徴や安定性、食品の加工工程および保管期間中の退色についての詳細な試験により、安定性の乏しきで悪名高い天然着色料の取り扱い方法については多くの知見がもたらされている。アントシアニンとベタシアニンについては、新規で安価に生産可能な植物原料が求められており、カロテノイドについては工業規模で安価に供給可能な微細藻類による生産の最適化が求められている。収率のよい緑色の抽出法や安定化、多彩で高品質な着色料の製造およびヒトの健康への影響評価も重要な研究課題である。安定化技術としてはカプセル化、マイクロカプセル化、ナノカプセル化が広く評価されている。

1. Introduction

天然色素は、固有の成分として、多くの食品に魅力的な着色を与える。カロテノイドは、植物由来の食品やいくつかの動物由来の食品（赤みを帯びた鮭など）の黄色（トウモロコシのような）、オレンジ色（ニンジンやオレンジのような）、赤色（トマトやスイカのような）の発色に関連している。果物や野菜の鮮やかな赤（イチゴのような）、紫（ナスのような）、紺色（ブルーベリーのような）はアントシアニンによるものである。赤いピーツはベタニン、緑の野菜は葉緑素によって着色されている。また、天然由来の色素は、食品に着色料として添加され、目的の色を得ることができる。このレビューでは、後者に焦点を当てている。

合成着色添加物は依然として世界の食品着色料市場を占めているが、毒性や健康への悪影響を考慮して、徐々に天然の資源から得られるものにとって代わられつつある。食品をできるだけ自然なものにしたいという消費者の要求は、技術の進歩と相まって、天然着色料の研究と商業的な関心を集めてきた。この傾向は、天然色素・着色料の健康効果、特に慢性疾患の発症リスクの低減に対する科学的な支持が高まっていることから、さらに加速している。

しかし、天然着色料は、安定性が低く、コストが高く、合成染料のように利用が容易ではないことに加えて、着色力が弱く、食品成分との相互作用が起こる可能性があり、色相の範囲が限られていることを考えると、人工着色料の代替は困難な課題である。天然着色料の特性を改善し、より大きな安定性と使いやすさを促進するために、広範な研究が行われてきた。

着色料は、以下のいくつかの理由で食品に添加されている。

- ・食品にすでに存在する色を強調するために、消費者が期待するよりも控えめ。
- ・バッチ間の食品の色の均一性を確保するため。
- ・加工によってその色が影響を受けている食品の原型に戻す。
- ・そうしないと実質的に無色になってしまう特定の食品（砂糖菓子、ソフトドリンクなど）に色をつける。

品質の悪さを隠したり、模造品を本物と偽るために使用してはいけない。

2. Carotenoid-based Natural Colorant

天然の食品着色料の中では、カロテノイド系の着色料が主流である。市販されているカロテノイドのほとんどは化学合成の産物であるが、多くの豊富な天然資源からの抽出や微生物発酵によって製造された天然着色料も市場に出回っている。

脂質可溶性カロテノイドは、非環状（例えばリコピン）であってもよいし、分子の片側または両末端に6員環（例えば β -カロテン、アスタキサンチン）を有していてもよい（図1）。例外的に、カプサンチンおよびカプソルピンは5員環を有する。炭化水素系カロテノイドはカロテン（例えば、 β -カロテン、リコピン）と呼ばれ、酸素化誘導体はキサントフィル（例えば、ルテイン、アスタキサンチン）と呼ばれている。

食用カロテノイドは、ほとんどが C40 テトラテルペノイドである。例外は、炭素骨格が

通常の C40 構造の片方または両端から断片を除去することによって短縮されているアポカロテキシンとクロセチン (図 1) がある。

中央に位置する共役二重結合系は、カロテノイドの魅力的な色を与える光吸収発色団を構成している。カロテノイドの色 (淡い黄色) を認識するためには、少なくとも 7 つの共役二重結合が必要である。9 つの二重結合を持つ非周期的なクロセチンは黄色であり、ビキシンは、合計 11 の共役二重結合 (図 1) を持つ、両方ともオレンジ色の赤である。ビキシンの二重結合の一つは Z(cis)配位であり、Z-二重結合の吸収極大値はわずかに短波長にシフトしている。11 個の共役 E(trans)-二重結合を持つ非環状のリコペンも赤色である。環化により環状二重結合の π 電子が鎖状のものと面外に出てしまうため、11 個の共役二重結合を持つ β -カロテンも、二重結合のうち 2 個が β -環状であるため、黄橙色になる。10 個の共役二重結合を持つルテインは黄色である。

赤色のカプサンチンは、カルボニル基の二重結合、ポリエン鎖の二重結合 9 個、 β 環の二重結合 1 個 (合計 11 個のタキサンチンは β 環の 2 つの二重結合と 2 つのカルボニル基の二重結合で伸びたポリエン鎖の 9 つの共役二重結合を持ち、鮮やかな赤色をしている。

2-1. Plant derived Carotenoid Colorant

植物由来のカロテノイド着色剤については、2 つの問題点が指摘されてきた。第一に、植物源の風味が着色する製品に持ち越されてしまい、相性が悪い場合がある。しかし、香辛料と着色料の両方を兼ねるパプリカやサフランの場合、最終製品では原料の風味や色が大いに評価される。第二に、栽培品種/品種の違い、収穫時の成熟度、土壌組成、気候条件などにより、着色成分の濃度が原料中で大きく変化する可能性があることを考慮すると、バッチ間の実質的なばらつきが発生する可能性がある。

植物由来のカロテノイドをベースにした天然着色料には、食品添加物としての長い歴史があり、アナトー、パプリカ、サフランなどがあるが、これらはすべて米国食品医薬品局 (USFDA) の認証対象外の着色料リストに入っている。

オレンジ色から赤色のアナトーは、中南米に自生すると考えられている熱帯の樹木である *Bixa orellana* の莢膜の果実の種皮に由来する。現在では多くの熱帯諸国で生産されているが、ペルーとブラジルが主な生産国となっている。油性エキス、水溶性エキス、懸濁液、乳濁液、カプセル化製品、乾燥粉末などに利用可能である。バター、マーガリン、チーズ脂、シリアル、ポップコーン油、バターミックス、焼き菓子、アイシング、スナック菓子、アイスクリーム、サラダドレッシング、製菓、ヨーグルト、ドリンク、デザート、肉製品など幅広い製品に使用されている。

油性アナトー調製物の主な色剤は、ジカルボン酸アポカロテノイドのモノメチルエステルであるビキシンである。ほとんどのカロテノイドは、自然界に存在するすべての E 構造とは対照的に、ビキシンは通常 9Z 型である (図 1)。加水分解 (鹼化) は、水溶性ノルビキシンからジカルボン酸を解放する。

ビキシンは pH に敏感で、低 pH になると黄橙色からピンク色に変化する。熱安定性は 100°C で良好だが、125°C 以上では良くなる。他のカロテノイドと同様に、光への暴露には問題がある。ロスは、異なる保存条件の下で、オレオレジンと比較してアナトー粉末ではるかに高いことが判明した。

パプリカは、赤唐辛子 (*Capsicum annuum*) のさやから得られる深紅色の辛味のある粉末である。パプリカのオレオレジン、粉砕した粉末を溶媒で抽出して製造される。オレオレジンには、食用植物油に溶かしたものや水に混和したものもある。パプリカの風味と相性の良い製品は、肉製品、スープ、ソース、サラダドレッシング、プロセスチーズ、スナック菓子、菓子、焼き菓子などに限られる。

パプリカには複雑に混ざったカロテノイドが含まれているが、その中でも特に顕著なのがカプサンチンとカプソルビンである。カプサンチンは、片方の端が環状になって β 環に、もう片方の端が環状になって 5 つの κ 環になっている (図 1)。カプソルビンは両端が環状して κ 環になっている。

パプリカは光に弱い。数ヶ月間日光に当てると 95% の色落ちが予想される。パプリカを高温で保存すると、暗闇でも色が抜けてしまう。

サフランは、*Crocus sativus L.* の花の乾燥した柱頭である。その色は、カロテノイドジグルコシドクロシン、diapocarotenediolic 酸クロセチンの digentiobioside に由来している。クロセチンは、対称なアポカロテノイドである (図 1)。カルボン酸と糖成分が分子を水溶性にしている。サフランはよくスープ、肉製品、チーズ、および他の多くの食品で使用されている。サフランの国際市場は、労働集約的な収穫のコストが高いため生産量が減少しているが、スペインが独占している。

リコピンの健康上の利点、中でも前立腺がんについて世界的関心が寄せられており、リコピンを豊富に含むトマトに注目が集まっている。オレオレジンとしてのトマトリコピン抽出物やトマトリコピン濃縮物は、黄色、オレンジから赤色の粉末、水分散性製剤などが市販されている。

マリーゴールド (特に *Tagetes erecta L.*) の花はルテインの商業的供給源です。マリーゴールドルテインは、食品の着色料として、鳥の脂肪、皮膚、卵黄の色素沈着を改善するために家禽飼料の添加物として使用されている。もともとはメキシコやアメリカの温暖な地域で栽培されていたが、現在では他の熱帯・亜熱帯地域でもマリーゴールドは帰化している。主な着色成分は、脂肪酸でエステル化されたオール E-ルテインである。

米国では、マリーゴールド粉末は鶏のエサにのみ使用が認められている。ルテイン濃度が 20% くらい高いマリーゴールド抽出物は、栄養補助食品への利用が認可されているが、食品着色料としての使用は認められていない。EU では、ルテイン製剤は認可された食品添加物である。

マリーゴールド色素は、粉末状、抽出物、またフリールテインとして商用化されている。マリーゴールド粉末は、天日または日陰で乾燥させた花から得られ、包装する前に粉末状に

なる。主に家禽の飼料に添加される。濃縮マリーゴールド抽出物は有機溶媒抽出法で得られ、食品用植物油と混合して製品化されたり、大豆やコーンミールと混合して家禽用飼料に添加されたりする。マリーゴールド抽出物は、サラダドレッシング、アイスクリーム、乳製品、ベーカリー製品、ジャム、および菓子に通常使用される。フリールテインは、マリーゴールドのオレオレジンを経験した後、精製・結晶化して得られる。主に栄養補助食品に利用されている。

アルファルファ、イラクサ、ブロッコリーなどの植物の抽出物からなるキサントフィルペーラストは、ヨーロッパで利用されている。主なカロテノイドは緑葉のカロテノイド（ルテイン、 β -カロテン、ビラクスンチン、ネオキササンチン）である。

2-2. Carotenoid Colorants from Microbial Sources

莫大な可能性と多くの論文が発表されていることに反映された幅広い研究関心にもかかわらず、微生物由来のカロテノイドの商業生産に至ったのは、微細藻類 *Dunaliella* sp 由来の β カロテン、微細藻類 *Haematococcus pluvialis* 由来のアスタキサンチン、真菌 *Blakeslea trispora* 由来の β カロテンのたった3種類である。他の微生物や他のカロテノイドを用いて製造過程をよりコスト競争力があり持続可能なものにする必要がある。

β カロテンのために培養される種は一般的に *Dunaliella salina* と *D. bardawil* である。オーストラリア、中国、イスラエル、日本、米国で商業生産が行われている。この生産は、細胞壁を持たない単細胞藻類であることを利用しており、 β -カロテンを多く生産している。ハロトレラント性があるため、競合する微生物や捕食者のいない開放塩水大量培養が可能である。海水が豊富で塩分や栄養分が豊富な沿岸域での栽培に適している。

Dunaliella β カロテンは、 β -カロテン抽出物、ヒト用デュナリエラ粉末、飼料用デュナリエラ乾燥物の3つの形状で用いられている。バイオマスは安全性が確認されており、そのまま食品処方に使用することができる。様々な処方および用途に、食用油中で、または食品グレードの有機溶媒で抽出される。

合成アスタキサンチンが市場を占めているが、天然製品に対する消費者の需要の増加は、*Haematococcus* による天然アスタキサンチンを生産する機会を与える。光学活性アスタキサンチンを合成するためのコストと複雑さはまた、米国（コナ、ハワイ）、日本、イスラエル、カナダが主要な生産国である *Haematococcus* アスタキサンチンの生産を試す価値を付けた。

Haematococcus アスタキサンチンの生産が商業化する前は、アスタキサンチンの天然素材はオキアミ油と粉末、ザリガニ油、および *Xanthophyllomyces dendrorhous* 酵母（旧名：*Phaffia rhodozyma*）であった。しかし、これらの素材はアスタキサンチンの濃度が低かった。

Haematococcus は高濃度のアスタキサンチンを持つが、工業的利用は、長期に渡る開放淡水地での独立栄養培養とカロテノイドを開放するために強靱な細胞壁を破壊する必要が

あるため制限されている。

*Dunaliella*とは異なり、*Haematococcus*は淡水藻類であり、他の微生物との競争や汚染の影響を受けやすく、野外での培養は非常に困難である。屋内での培養は効果ではあるが、環境制御が可能であるという利点がある。*Haematococcus*によるアスタキサンチンの生産のために、改良された技術が開発されている。スウェーデンでは、完全密閉型の光バイオリアクター（人工光）が利用されている。ハワイでは、閉鎖型リアクターと開放型培養池の組み合わせが利用されている。

大規模な屋外システムでは、2段階プロセスが採用されている。最初に、pH、温度、養分レベルを慎重にコントロールしながら、最適に近い生育条件の下で植物細胞を生産する。十分な量の植生細胞が生産されると、培養は、環境と栄養ストレスにさらされる。商業システムでは、硝酸塩およびリン酸塩の奪取、温度および光の増加、または培地への塩化ナトリウムの添加によって、アスタキサンチン産生を誘導する。

2-3. Stability and Alterations of Carotenoids during Processing and Storage of Food

不飽和カロテノイド分子は、食品の加工および保存中に幾何学的異性化および酸化の影響を非常に受けやすい。自然界の通常の形態である全 E-カロテノイドの Z 異性体への異性化についてはこれまでに十分解説されている。それは、酸、熱、および光によって促進される。

立体障害により、E-Z 異性化は β -カロテンの 9-Z-、13-Z-、および 15-Z-異性体の形成に制限される。対称分子であるため、このカロテノイドの 9'-Z-異性体と 13'-Z-異性体は、9-Z-異性体と 13-Z-異性体に相当する。非対称ルテインは、13-Z-異性体、9-Z-異性体、15-Z-異性体に加えて、13'-Z-異性体、9'-Z-異性体に異性化する。環状カロテノイドの 5,6-二重結合は環形成に関与しているため、5-Z-異性体は形成されない。しかし、非環状リコペンでは、この二重結合が阻害されず、9-Z-、13-Z-、15-Z-異性体とともに 5-Z-リコペンが生成される。

酸化的分解反応は、酸素の利用可能性とカロテノイドの構造に依存する。光、熱、金属、酵素、過酸化物によって刺激され、抗酸化物質によって阻害される。これはポリエン鎖の異性化、エポキシ化、開裂を伴う。初期酸素攻撃の部位は、分子の片側の共役二重結合系の末端二重結合であり、その後、分子の反対側の末端二重結合である。 β -カロテンを例にとると、全 E- β -カロテンの一部は初期に Z-形態に異性化する。その後、Z-異性体と E-異性体の両方がエポキシ化されて全 E- β -カロテン-5,6-エポキシドになり、 β -カロテン-5,8-エポキシドに容易に変換される。 β -カロテン-5,6-エポキシドの反対側のエポキシ化は、 β -カロテン-5,6,5',6'-ジエポキシドを形成する。5,6 から 5,8-エポキシドへの転位により、それぞれ β -カロテン-5,8-エポキシドおよび β -カロテン-5,8,5',8'-ジエポキシドが得られる。

リコペンのエポキシ化は、末端共役二重結合および単離二重結合の両方で起こり、リコペン-5,6-エポキシドおよびリコペン-5,6,5',6'-ジエポキシドが、リコペン-1,2-エポキシドおよ

β-リコペン-1,2,1',2'-ジエポキシドとともに形成される。これらのエポキシドと環化の組み合わせは、より複雑なスキームをもたらす。

β-カロテンの開裂により、β-アポ-15-カロテナール、β-アポ-14'-カロテナール、β-アポ-12'-カロテナール、β-アポ-10'-カロテナール、β-アポ-8'-カロテナールが生成される。同様に、リコペンは、アポ-15-リコペナール、アポ-14'-リコペナール、アポ-12'-リコペナール、アポ-10'-リコペナール、アポ-8'-リコペナール、およびアポ-6'-リコペナールを形成する。

事後もしくは逐次的な断片化は、脂肪酸酸化で生成されるものに類似した低分子量の一連の化合物をもたらす。ポリエン鎖の異なる部位で直接開裂して揮発性フラグメントにすることも可能である。さらに、初期揮発性物質の変換も起こり得る。カロテノイドの酸化によって形成される揮発性化合物は、したがって、4つのタイプに分類される。それはつまり、ポリエン鎖から直接来る短い非環状化合物、切断された非環状（例えば、リコペンから）および環状末端基（例えば、β-カロテンから）、カロテノイドの逐次切断からの揮発性化合物、およびポリエン鎖の非環状フラグメントからの環状化合物を含む一次切断生成物から形成される二次生成物である。主にアルデヒド類、ケトン類、アルコール類、炭化水素類、フラン類、ピラン類です。今では色を失っているが、食品や飲料の好ましいまたは好ましくない香りや風味に貢献している。

他のカロテノイドと同様に、ビキシンは、特に熱処理中に異性化や酸化分解を受けやすい。しかし、ビキシンは9-Z型であるため、異性化はZ型からE型へ、あるいはさらにジZ型へと逆行される。両方の形態およびビキシン自体が開裂を受け、最初に、4,8-ジメチルエチルテトラデカヘキサエンジオク酸のC-17モノメチルエステルのような着色された分解生成物になる。連続的な断片化は、低質量の揮発性化合物につながる。

モデル系では、アナトーは容易に分解され、着色された分解生成物および揮発性物質であるm-キシレンおよびトルエンを形成した。しかし、食品（カスタードパウダー、押出スナック、マーガリン、パン粉など）では分解が遅く、どの食品のヘッドスペースにも芳香族化合物は検出されませんでした。

E-Z異性化が起こると、わずかなスペクトルシフトがあるだけで、製品の色は影響を受けないか、わずかに明るくなるだけである。しかし、酸化が起こると、共役二重結合の数が7個以下になるまで発色団は徐々に短くなり、その時点で無色になる。

3. Anthocyanin-based Natural Colorants

水溶性アントシアニンは、フラボノイド科に属している。それらは、食品中で一般的に見られる以下の6つのアグリコンアントシアニジンの配糖体またはアシルグリコシドである：最も頻繁に発生しているアントシアニジンとしてシアニジンと、ペラルゴニジン、シアニジン、ディルフィニジン、ペオニジン、ベツニジン、およびマルビジン。アントシアニジンは、ヒドロキシルおよびメトキシル置換基を変化させたフラビリウム(2-フェニルベンゾピリリ

ウム) 構造であり、酸素を含む 3 つの炭素の複素環 (環 C) で連結された 2 つの芳香環 (環 A および B) からなる (図 2)。

アントシアニン部分の共役二重結合系 (8 個の二重結合) は、アントシアニンの鮮やかな色を示す発色団を構成している。環 B は水酸基とメトキシル置換基の数や位置が異なる。一般に、水酸化すると青みが増して安定性が低下し、メチル化すると赤みが増して安定性が向上する。

食品に含まれるアントシアニジンの数は限られているにもかかわらず、グリコシル化とアシル化により、アントシアニンの並外れた多様性が得られる。アントシアニンは、水酸基の数や位置、メチル化の程度が異なるだけでなく、糖の部位の同一性や数、結合位置、糖のアシル化の程度、アシル化剤の同一性なども異なる。アントシアニンは単純なもの (例: ぶどうアントシアニン-3-グルコシド) (図 2) から複雑な構造 (例: 紫芋ピオニジン-3-カフェオイル-p-ヒドロキシベンゾイルソフォ-ロシド-5-グルコシド) まで様々であり、安定性や色相にも違いがある。

グリコシル化は、通常 C 環の C-3 (3-グリコシド)、または A 環の C-3 と C-5 の両方 (3, 5-ジグリコシド) で起こるが、A 環の C-7、および B 環の C-3'、C-5'、および C-4' にも見られる。最も一般的な糖はグルコースであるが、アントシアニンには他の糖 (他の単糖類、二糖類、三糖類も含む) が存在している。糖の部位は、脂肪族または芳香族酸でアシル化されていてもよい。アシル置換基は、通常、C-3 糖に結合し、6-OH にエステル化され、またはそれほど多くはないが糖の 4-OH にエステル化される。Zhao らによってレビューされたように、グリコシルアシル化はアントシアニンを安定化する。

アントシアニンには多くの可能性のある植物素材があるにもかかわらず、USFDA の天然着色料のリストには、ブドウ色抽出物とブドウ皮抽出物だけがのっている。紫紅色のブドウ果皮エキスは、古くから飲料、ジャム、ゼリー、アイスクリーム、ヨーグルト、ゼラチンデザート、フルーツ缶詰、トッピング、菓子などの幅広い食品に使用されてきた。ブドウを圧搾して果汁を取り除いた後に残る果汁の水性抽出物から調製されます。しかし、アントシアニンの安定性が低いことや、食品マトリックス中の他の化合物との相互作用により、その利用は限られてきた。

3-1. Stability and Alterations of Carotenoids during Processing and Storage of Food

アントシアニンの安定性と色は、アントシアニンの化学構造と濃度、食品マトリックスの性質、温度、pH、光、酸素、酵素、金属イオン、他のフラボノイドやフェノリック、アスコルビン酸、糖類、亜硫酸塩など、多くの要因によって影響を受ける。

食品と同様に、水溶液中では、アントシアニンは pH によって構造変化を起こし、顕著な色の変化を示す。そのため、アントシアニン着色料の使用は酸性食品に限られる。2 以下の pH では、オレンジ色から赤色のファビリウムカチオンが優勢である。pH3~6 では、C-2 の水による求核攻撃により無色のヘミケタール (カルピノール擬塩基) が得られます。開環互

変異性化によって、カルビノール偽塩基は (Z) カルコンに異性化することができる無色から黄色の (E) カルコンを生じさせる。わずかに酸性から中性の条件では、フラビリウムカチオンの脱プロトン化により、青から紫のキノイダル塩基が生成される。

熱処理中にアントシアニンは、加水分解、水の求核性攻撃、環分裂、および重合を受け、その結果、色の損失と褐色化 アントシアニンは、2 つの主要な経路によって分解される。第一の経路では、水による求核性攻撃により、アントシアニンは無色のカルビノール基に変化する。その後、ピリリウム環が開き、カルコンが形成され、これが切断されてクマリン誘導体と B 環に対応するフラグメントになる。第二の経路では、最初にアントシアニンが加水分解されて安定性の低いアントシアニジンが得られ、これは無色のカルビノール基に変換され、その後 α -ジケトンに変換される。 α -ジケトンはその後、アルデヒドと安息香酸の誘導体に断片化される。両方の経路からの生成物が重合し、食品の褐変を引き起こす。

アントシアニジンの切断は、色を失うためには必要はない。水の求核性攻撃のようにこの環の C-2 に置換基を導入したり、重亜硫酸塩とのスルホン酸付加体形成のように C-4 に置換基を導入すると、共役二重結合系の中間点の二重結合が除去され、脱色が起こる。

4. Betalain-based Natural Colorants

ベタレインは、赤～赤紫色のベタシアニンと黄色～橙色のベタキササンチンからなる水溶性の窒素系色素である。これらは、ベタラム酸とシクロドーパ [シクロ-L-(3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン)] とアミノ化合物 (アミノ酸またはアミンまたは誘導体) とのイモニウム共役体であり、それぞれの化合物は、ベタラム酸とシクロドーパ [シクロ-L-(3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン)] とのイモニウム共役体である。例としては、レッドビートのベタニン (図3)、サボテン梨のインディカキササンチン (ベタラム酸がプロリンに連結したもの) などが挙げられる。

ベタシアニンは、グリコシル化とアシル化により、多様な構造を持つ。ベタニジンのアグリコンは、通常、グルコースと結合しており、時にはグルクロン酸、ソフォロース、ラムノース、アピオースなどと結合している。さらに修飾は、糖部分の脂肪族または芳香族酸のエステル化によって行われる。

ベタラミン酸の共役二重結合系は、ベタシアニンの鮮やかな色の発色を担う発色団を構成している。ベタサンチンと比較して、ベタシアニンの深色移動が 50~70nm であるのは、シクロドーパの芳香環の二重結合が共役化して電子共鳴系が拡張されたためである。

ビート根ベタニンは天然の食品着色料として商品化されており、EU や USFDA の認可を受けている。主に乳製品、菓子、アイスクリーム、デザート、飲料、ソーセージなどの着色料として使用されている。硝酸塩の含有量が多く、ジオスミンやピラジン誘導体による土っぽい風味があるため、利用は限られている。

4-1. Alterations of Betanin during Processing and Storage of Food

ベタレインの安定性は、色素の構造と濃度、食品マトリックスの性質、分解酵素（ペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、グルコシダーゼ）、他の食品化合物、水分活性、pH、金属カチオン、温度、O₂、大気、光、H₂O₂によって影響を受ける。ベタレインは3から7までの幅広いpH範囲で安定するため、低酸性食品や中性食品への応用に適している。ベタニン¹はpH4-5で最も安定している。

ベタレインを多く含む食品を加工する際には、赤色の変色が大きな問題となる。ベタレインは加工中に脱グリコシル化、C15異性化、脱水素化、加水分解、脱カルボキシル化を受ける。その反応はベタレインによって異なる。ベタニンは主に加水分解を受けやすい。

ベタニンはpHが6以上の場合や熱処理中に、鮮やかな黄色のベタラム酸と無色のシクロドーパ-5-O-β-グルコシドに切断される。ベタニンの部分的な再生は短期の加熱の後に起こる。アスコルビン酸、イソアスコルビン酸、メタリン酸、およびグルコン酸は、加熱後の赤ビートジュース顔料の再生を改善した。

異性化は、酸性またはアルカリ性の条件、または熱処理によって誘導することができる。ベタニンのように、異性化は発色団に影響を与えず、赤色が維持される。

脱グリコシル化は基本的には赤色を維持するが、酸化の影響を受けやすくなる。ベタニンのグルコースはβ-グルコシダーゼの存在下、強酸性、高温下で切断される。ベタニンの赤色からネオベタニンの黄色へと色が変わるのは、この脱水素が原因である。

ベタニンはC-2、C-15、C-17のいずれかの位置で脱炭酸されている。モノデカルボキシル化されたベタニンは、その後、ジデカルボキシル化ベタニンおよびトリデカルボキシル化ベタニンに変換される。C-2 または C-15 の脱炭酸はベタニジンの発色団に変化を与えず、元のベタシアニンの色を維持する。C-17で脱炭酸すると、この位置のカルボン酸基がベタラム酸の共役二重結合系と共役するため、赤色がオレンジ色に変化する。モノデカルボキシル化ベタニンは、非デカルボキシル化ベタシアニンよりも分解に対してかなり安定であることが示された。イソベタニンやネオベタニンもベタニンと同様の方法で脱炭酸される。

赤ビートの長時間の熱処理では、複数の脱カルボキシル化によって、またはベタニンの脱カルボキシル化および脱水素化の複合によって、多様なベタシアニン分解生成物が形成されることがある。赤ビートと紫ピタヤの精製抽出物から、モノ、ジ、トリデカルボキシル化されたベタシアニンの混合物とそれに対応するネオベタシアニンが同定された。主な生成物は、17-デカルボキシベタシアニン、17-デカルボキシイソベタニン、2-デカルボキシベタニン、2,17-ジデカルボキシベタニン、2,17-ジデカルボキシイソベタニン、14,15-脱水素化ネオベタニンであった。ベタニン、フィロカクチン、およびヒロケレンニンを加熱すると、対応する脱炭酸ベタシアニンとともに脱炭酸ネオベタニンが得られた。

5. Chlorophyll-based Natural Colorants

クロロフィル a と b は、高等植物の代表的な緑色色素である。クロロフィルはポルフィリンで、ピロール環がメチン橋で結合し、二重結合系が共役ループを形成している大環状の

テトラピロール色素である。中心に位置するマグネシウム原子が 4 つのピロールの窒素と配位している。クロロフィル a は C-3 でメチル基とクロロフィル b はフォルミル基を持っている。炭素数 20 のモノ不飽和イソプレノイドアルコールであるフィトールは、C-17 でプロピオン酸部位とエステル化されている。共役二重結合の閉回路は、それらが光を吸収し、色を提供する発色剤である。

緑の野菜の変色は、主に鮮やかな緑色のクロロフィルがオリーブグリーンまたはオリーブブラウンのフェオフィチンに変換されることで構成されている。これは、酸性条件または穏やかな熱処理の下で起こり、マグネシウム原子は、フェオフィチンを形成するために水素に置き換えられている。長時間の加熱や高温では、C-10 でのカルボメトキシ基の除去をもたらす、加熱処理された緑の野菜で観察されるように、ピロフェオフィチンを生じさせる。

クロロフィルは最も豊富な天然色素であるが、その不安定性と高い生産コストによって着色剤としての使用が制限されてきた。クロロフィルを直接食品着色料として使用するには、2 つの大きな制限があり、その第一は、中心となる Mg が失われやすいことである。第二の問題は、長い疎水性フィトール鎖とマクロサイクルの第五等環によって付与された、その高い疎水性である。

通常、アルファルファを採用し、Cu 塩との処理は、より安定した銅クロロフィリンを生産し、Cu と Mg を交換する。メタノール水酸化ナトリウムを使用してクロロフィリンのアルカリ加水分解（ケン化）は、フィトールを除去し、顔料の水溶性を増加させ、同素環を開きます。Na⁺イオンはポルフィリンのカルボン酸基に結合して構造を安定化させ、得られる分子は Na-銅-クロロフィルまたは Na-Cu-クロロリンと呼ばれている（図 3）。

6. Other Natural Colorants

ウコンとウコンオレオレジン、*Curcuma longa* L. の乾燥根茎または抽出物を粉砕して調製される。主な発色原理は黄色に着色されたクルクミン（図 3）であり、水には不溶で油脂にはやや可溶である。色の強度は高く、非常に少量であれば食品系の着色には十分である。熱安定性に優れており、系がかなりアルカリ性になるまでは pH の影響を受けない。酸化に強く、抗酸化作用があると考えられている。しかし、光に対する安定性は劣る。

スパイスとして、ウコンは風味と黄色の組み合わせで評価されている。多くのカレーレシピに欠かせない食材である。現在、食品メーカーでは粉末のスパイスよりもウコンのオレオレジンを多く採用している。インドが主な供給国で、中国がそれに続いている。

コチニールエキスとは、昆虫 *Dactylopius coccus* L. Costa の乾燥体から抽出した水性アルコール抽出物である。ペルーはコチニールの世界最大の生産国であり、輸出市場の 90% 以上を占めている。発色剤はカルミン酸（図 3）で、水に非常に溶けやすく、pH によって色に変化する。酸性の培地ではオレンジ色で、pH が 6 から 8 まで上昇すると赤色に変化し、pH が高くなるとバイオレット色に変化する。カルミン酸のエキスは熱、ライトおよび酸素によい安定性を表わす。

アルミニウム湖の形態はカルミンと呼ばれる。Carmine にライト、上昇させたおよび延長された加熱、酸素および水活動へのよい安定性がある。清涼飲料水やアルコール飲料、ベーカリーや乳製品、製菓、漬物などに使用されている。ブラジルでは、カルミン酸とその類似体は、押出穀類製品、パスタ、ノンアルコール飲料、ソース、ジャム、フィリングに採用されている。カルミンは食品着色料としてベタニンやアントシアニンと競合するが、その主な制限は低 pH での不溶性である。

キャラメルは、炭水化物の熱によるアラメル化によって生成される黒褐色の液体です。これは低質量化合物と高質量化合物の複雑な混合物であり、褐色は後者によるものである⁵⁾。ほとんどの製品では、キャラメルは非常に優れた安定性を持っていますが、それは低い錫の値を持っています。キャラメルは、コーヒーエンハンサー、瓶入り飲料、缶入り飲料、ドライミックス飲料、キャンディ、焼き菓子、アイシング、乳製品、グレービー、菓子などに使用されてきた。

7. Research Trends

7-1. Search for New Sources

市販されている天然着色料のリストは、基本的に長い間停滞している。この分野の研究が活発化していることから、産業界のニーズと消費者の期待に応えられるようにリストを拡充することが期待されている。

2014 年に発表された論文を精査した結果、食品カロテノイドに関する最も研究されているトピックは、食品のカロテノイド組成、健康上の利点、加工効果、分析方法、微生物生産、*in vitro* の生体親和性の順であることがわかった。食品着色料として機能するカロテノイドの新しい植物源の探索は優先事項ではなかった。その代わりに、7.2 節で説明されているように、かなりの努力が微生物生産にあてられた。それにもかかわらず、食品のカロテノイド組成に関する広範な研究は、いくつかの可能性のある植物源を明らかにした。その一例が、今ではよく知られているアジアのガックの果実であり、リコピンの含有量が非常に高いことが示されている。

アントシアニンについては、不安定なブドウの着色料だけが USFDA のリストにあるが、より良い植物源の探索と抽出効率と安定性の向上に向けた研究が熱心に行われてきた。着色剤としてのアントシアニン源の例としては、赤大根、赤キャベツ、黒ニンジン、赤紫サツマイモなどが挙げられる。

これまで、グリコシル化とアシル化の複雑なパターンを持つアントシアニンを含む原料が好まれてきたが、pH の変化、熱処理、光への曝露に対して非常に耐性があることが示されている。この安定性は、コピグメント化、自己組織化、金属錯体化に起因している。注目すべきことに、ブドウの主要なアントシアニンは、3-モノグルコシド (図 2) および 3,5-ジグルコシドであり、これは、ブドウ着色剤の不安定性を説明することができる。

ベタシアニンは食品着色料として使用するための唯一の商業的な供給源であり、ベタニ

ンが主な着色成分である。他にも、*Ullucus tuberosus*、*Basella rubra* (Malabar spinach)、サボテンナシ、赤紫のピタヤ、アマランサスなどの植物の供給源を探し、評価する努力が増えている。

7-2. Processing Technology and Stabilization

カロテノイドをベースとした他の天然着色剤に関する現在の研究では、次のような点にも焦点を当てている。

- ・従来の抽出方法を、より環境に優しい溶媒を使用し、超臨界抽出、加圧液体抽出、マイクロ波アシスト抽出、超音波アシスト抽出など、より良い色の抽出物をより多くの収率で得られる新しい技術に置き換えること。

- ・安定化技術としてのカプセル化、マイクロカプセル化、ナノカプセル化の利用。

ビキシンやノルビキシン、パプリカのオレオレジン、サフランのカロテノイド、*H.pluvialis*のアスタキサンチンオレオレジン、トマトパルプ廃棄物からのリコピン抽出物、その他の個々のカロテノイドの安定化のためにカプセル化が検討されている。

アントシアニンの安定化方法としては、コピグメントの添加、加工・保存時の O₂ の排除、カプセル化などが挙げられる。ミロカプセル化/カプセル化は、安定性、溶解性、分散性、バイオアベイラビリティを向上させた天然着色剤の開発に採用されている。ナノカプセル化とコピグメンテーションを組み合わせることも有効な選択肢の一つと考えられている。

ベタシアニンの研究では、適切な前処理や抽出方法、加工技術の進歩と安定化、幅広い色の利用可能性、オフフレーバーのない顔料の品質向上、他の生理活性物質や栄養成分を含むベタレイン強化製剤の開発の可能性などを追求してきた。

ベタレインのマイクロカプセル化は、安定性を向上させると同時に、加工時の取り扱いを容易にし、バイオアベイラビリティを確保するために成功した戦略であると考えられている。ビートルートの果汁と色素、サボテン梨の果肉とサボテン梨エキス、アマランサスの色素のマイクロカプセル化が研究されてきた。

7-3. Microbial production of carotenoids

微細藻類によるカロテノイドの生産は、多くの利点を有する。微細藻類は、カロテノイド以外にも、他の貴重な化合物（例えば、ビタミン、脂質、タンパク質、多糖類）を生産するために使用することができる生物資源である。耕作不可能な土地のわずかな面積しか必要とせず、労働集約的ではない。高等植物の 5~10 倍の成長率がある。廃水を生育培地として利用できるため、高価な培地に依存する必要がない。微生物の培養は、CO₂ の吸収や排水処理により環境をクリーンにすることができる可能性がある。微細藻類バイオマスは、長期貯蔵や貯蔵されたカロテノイドの潜在的な分解を必要とせず、一年中生産することができる。微細藻類は、広範囲の生育条件や気候に適応することができる。

知覚された利点にもかかわらず、カロテノイドの大規模な微細藻類の生産は、植物ベース

のソースからの化学合成と抽出に対抗するために十分に費用対効果の高いものではないと考えられている、まだ限られています。これらの操作はすべて最適化する必要がある。最初のハードルは、適切な生産時間とバイオマスと顔料の収量を持つ種の選択である。

ヘマトコッカス・アスタキサンチンの生産を高めるために、主に培養系の設計・構成を変更し、培養条件を最適化することにより、多くの研究が行われてきた。カロテノイド濃度を高めるためには、技術の向上に加えて、窒素欠乏、強い光強度、塩ストレス、リン酸欠乏などのストレスを誘発する必要がある。C. zofingiensis は、現在、アスタキサンチン生産のための最良の代替源と考えられている。それは、従属栄養のグルコース給餌培養によって達成することができる高い成長率と高い細胞密度を持っている。

大きな関心のもう一つの分野は、ルテイン源としての微細藻類の可能性である。Fernandez-Sevilla は、微細藻類は、微細藻類技術の向上に頼らなくてもマリーゴールドと競合できると結論付けた。Lin らは、原料としてのマリーゴールドの花と微細藻類からのルテイン含有量とルテイン生産の異なる段階を比較した。微細藻類の方が成長速度が速く、ルテイン生産率は3~6倍高かった。マリーゴールドは、より多くの土地と水を必要としたが、微細藻類よりも少ない栄養素と少ないエネルギーを必要とした。ルテイン産生のために最も研究されている微細藻類の一つは、Muriellopsis sp. Scenedesmus almeriensis と Coccomyxa onubensis も有望なルテイン生産者である。

微小藻類のルテイン生産にはいくつかの技術的な障害がある。ルテイン生産性は、適切な種を選択し、培養条件を最適化し、ルテイン収量の高い変異体を得ることによって改善されなければいけない。ルテイン生産に影響を与える要因としては、藻類の種類、温度、光強度、光周期、pH、栄養分の有無、塩分濃度などが挙げられる。二次的なカロテノイドであるアスタキサンチンや β -カロテンとは異なり、ルテインは光合成における光捕集複合体の構造と機能に必要な一次的なカロテノイドである。ストレス条件下では、アスタキサンチンや β -カロテンの産生が促進されることが繰り返し示されているが、必ずしもルテインの蓄積が促進されるわけではない。

カロテノイドの他に、他の化合物は、同じ微生物バイオマスから抽出され、いくつかのバイオテクノロジー産業でコモディティとして利用され得る。特に、市場性のある微生物製品の持続可能で経済的に実現可能な生産のためのバイオリファイナリー（バイオ燃料と他の高価値副産物の生産）アプローチは、幅広い支持を得ている。

7-4. Health Benefits

カロテノイドは、食品中の健康を促進する生理活性化合物の中で最も研究されているものの一つである。数多くの *in vitro* 細胞および動物実験、疫学研究、ヒト介入研究が行われてきた。ヒトを対象とした研究は複雑で困難であり、実験プロトコルを最適化し標準化するためのあらゆる努力にもかかわらず、いくつかの矛盾した結果が続いている。それにもかかわらず、いくつかのカロテノイドの確立されたプロビタミン A 活性とは別に、ある種の癌、

心血管疾患、白内障、黄斑変性症などの慢性疾患を発症するリスクの低下がカロテノイドと関連している。最近の研究では、認知機能の保護、日光からの皮膚の保護、関節リウマチのリスクの低下、抑うつ症状の有病率の低下、高齢の男女におけるミネラル密度の保護など、カロテノイドの他の役割が明らかにされている。

カロテノイドの疾病に対する作用は、広くその抗酸化作用に起因している。しかし、レチノイド依存性シグナル伝達、発がん性物質代謝の調節、細胞増殖の調節、細胞増殖の抑制、細胞分化の促進、細胞間ギャップ結合の刺激、遺伝子の調節、DNA修復機構の調節、解毒酵素の誘導、ホルモンや免疫系の調節、ブルーライトのフィルタリングなどの非抗酸化作用が報告されるようになってきている。

食品に多く含まれるカロテノイドである β -カロテン、 α -カロテン、リコピン、 β -クリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチンは、健康効果の面で最も研究されてきたカロテノイドである。アスタキサンチンも研究されています。他にもビキシンなどのカロテノイドも研究され始めている。

カロテノイドは、病気に対する作用や効能が異なる。リコピンは、前立腺がんのリスクの低下に関連するカロテノイドである。人間の目の黄斑部に選択的に蓄積されるカロテノイドであるルテインとゼアキサンチンが黄斑変性症や白内障のリスクを低下させるという強い科学的根拠があります。

アントシアニンには、抗酸化作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗増殖作用、抗微生物作用、抗変異原性作用、抗腫瘍作用、微小循環改善作用、末梢毛細血管脆弱化防止作用など、幅広い生物学的活性が報告されている。そのため、アントシアニンは、がん、心血管疾患、糖尿病、肥満、認知機能低下、視覚障害のリスク低下と関連している。しかし、研究は、ほとんどが細胞株や動物モデルに基づいている。有効性を決定的に証明するためには、長期的で適切に設計されたヒト介入試験が必要である。

ベタニンはまた、フリーラジカル/活性酸素種の消去、脂質過酸化およびLDL酸化の抑制、DNA損傷の防止、抗酸化酵素および第二相解毒酵素の誘導、遺伝子調節活性、抗炎症、抗増殖および抗微生物活性など、様々な健康増進活性があるとされている。アントシアニンと同様に、研究のほとんどは細胞や動物モデルで行われており、確認のためにヒトでの研究が必要である。

銅クロロフィリンの薬用利用が報告されており、ここではいくつかの例を紹介する。老人介護施設の患者において、クロロフィリン錠の投与が体臭や便臭の抑制に有用であることが観察された。慢性便秘の緩和、過剰な便秘の軽減に役立った。また、トリメチルアミン尿症患者の遊離尿中トリメチルアミン濃度を低下させ、トリメチルアミンN-オキシドを増加させる効果が認められました。また、アフラトキシンへの曝露とその後の肝細胞癌の発生リスクが高い集団において、抗癌性物質であることが明らかになった。

ヒトでの確認研究は不足していますが、クロロフィリンは、抗変異原性、抗芽細胞原性、抗原毒性、抗発がん性、抗酸化性、その他の生物学的活性を有する可能性があります。読者

は、クロロフィリンの健康促進と薬効の包括的なレビューのために Solymosi と Mysliwa-Kurziel と Tumolo と Lanfer-Marquez を参照。

8. Concluding Remarks

今後数年間は、食品用天然着色料に関する研究が活発に行われることになる。研究テーマには、経済的に実行可能な新しい供給源、効率的でグリーンな抽出、加工の最適化、安定化方法、健康上の利点を評価するためのヒト研究などが含まれる。また、幅広い色スペクトルを持つ高品質の着色料の生産も研究の目的となり、天然の青色着色料の継続的な探索も含まれている。

Safety Assessment Testing Requirements for Food Color Additives

Shim-mo Hayashi^{a)} Robert R. Maronpot^{b)}^{a)} Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences
3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan^{b)} Maronpot Consulting LLC, Raleigh, North Carolina, USA

Summary

Safety assessment of food colorants are fundamentally similar in Japan, Europe, and the United States and involve large amounts of data for new colorants and active monitoring of existing approved colorants. Testing requirements are similar for artificial and natural food colorants and include assays for genetic damage and use of animal toxicity studies as surrogates for human

exposures. All studies are currently conducted in compliance with internationally recognized Good Laboratory Practices (GLP) with study design, conduct and evaluation carried out by trained and certified scientific experts in accordance with country-specific and international published safety assessment guidelines.

FFI Journal, 225(2): 131–136, 2020

<食品着色料における安全性評価試験の要項>

要旨：

日本、欧州および米国における着色料の安全性評価法は基本的に類似しており、新規の着色料に関する大量のデータおよび既存の認可済着色料の積極的な監視を必要とする。合成および天然の着色料の毒性試験要件は同様であり、遺伝毒性に係わるアッセイおよびヒトの代替として動物を用いた毒性試験が含まれる。現在、すべての試験が国際的に認められた優良試験所規範 (GLP) に従って実施されており、試験のデザイン、実施および評価は、各国並びに国際的に公開されている安全性ガイドラインに従い、認定を受けた経験豊富な科学専門家が行っている。

1. Introduction (イントロダクション)

飲料や食品に使われる着色料は、消費者の安全を保障するため厳重に規制されている。米国、欧州、日本における食品着色料の安全性評価は、JECFA が表した国際勧告に沿っている。3国とも、ガイダンスに定義されたリスク評価のための大量のデータと食品着色料に関する特定の必須情報を求めている。安全性試験は一般的に動物毒性試験データに基づくため、以下を含む他の要素が安全性評価において考慮すべき重要なことになる。

- ・着色料の化学組成

- ・不純物の存在
- ・残渣の処理（例：溶媒、重金属等）
- ・安定性と分解産物の情報
- ・ナノマテリアルの存在
- ・着色料の必要性の正当化（EU）
- ・着色料の有効性の証明（EU）
- ・着色料の利益の特徴づけ（EU）
- ・消費者を誤解させないためのステップ（EU）
- ・製造工程
- ・技術的正当化
- ・アレルギー性

動物毒性試験の範囲は、ヒト暴露、分子構造、着色料の性質に影響される。特筆すべきは、毒性試験は人工的に生成された着色料と同様に天然物に対しても求められることだ。ヨーロッパでは、毒物動態学研究、亜慢性毒性、生殖毒性と発達毒性、遺伝毒性の最小必要要件で安全性評価を行うための段階的アプローチが存在する。毒性や遺伝毒性や吸収に関するいかなる証拠は、追加試験を要し、また、特異的な環境下では 3 次試験を要する場合もある。米国のシステムは基本的に、化学構造とヒト暴露に基づく懸念度によって決定される安全性試験の量の分類と同様である。より懸念度が高くなればなるほど、より多くの毒性試験が要される。日本では、1995 年より前から使われていた着色料を含む天然由来の添加物は使用限度無しで食品着色料としての使用が認可されている。1995 年以降に導入されたいかなる着色料は、使用目的や応用の安全性を確証づけるための安全性評価試験を全面的に要している。しかし、日本の着色料における安全性評価の要項は、同様に他国のヒト暴露や安全性評価のデータであることが知られる JECFA の試験データに影響されている。

2. Safety Assessment Testing Guidance（安全性評価試験ガイダンス）

米国、EU、日本の規制当局は消費者の変更を保護するため安全性評価試験の範囲を修正することがあるが、新しい着色料を市場に出すため、認可前に一連の完全な動物試験と同様に一連の完全な *in vitro* と *in vivo* の動物遺伝毒性試験を要する場合がある。特定の管轄権下で求められる試験の範囲は、他の国や管轄区域からの容認可能な安全性評価試験により軽減することがある。絶対確実に現存の GLP 対応の試験は不要な動物試験の削減を認めるべきである。薬品の安全性評価試験とは対照的に、消費者の安全を保障するためのより厳しい着色食品添加物の安全性評価の必要性は損なわれることはない。この程度の警戒度は、栄養的な利点や食品保存料や味覚成分としての利点がなく、全年齢かつ人生を通して食品中にて消費される着色添加物としては必要である。食品着色料の規制と安全性評価について発表された情報は、科学論文で閲覧可能である。

3. Genotoxicity Assessment (遺伝毒性試験)

遺伝毒性評価の目的は、食品着色料が直接的または間接的に生殖細胞や体細胞中のDNAの配列もしくは構造を変えてしまう可能性を決定することである。生殖細胞内の変化は、遺伝性の生殖細胞損傷につながり、体細胞内のDNAの変化は癌につながり得る。または、DNA構造の変化は細胞死を引き起こす可能性がある。被験物質やその代謝産物がDNAに相互作用する場合は直接的な影響も起こり得る。被験物質が有糸分裂紡錘体のような細胞高分子を変化させる場合、間接的効果が起こることがある。遺伝的損傷のタイプには突然変異や染色体の破損、染色体異常が含まれる。遺伝毒性試験へのアプローチには、有害であることがわかっている化学構造の警告に基づく予測スクリーニングと、GLPに準拠した一連のin vitro試験と、GLP対応の発がん性in vivo試験とそれに続くであろうin vivo試験を含むことがある。遺伝子毒性試験を実施するための具体的な試験ガイドラインが文書化されており、医薬品についてはICH（医薬品規制調和国際会議）が世界に許容される米国、欧州、日本における安全性評価のアプローチを提供している。ICHのガイドラインは、食品着色料を含む食品添加物の安全性評価に適用される。加えて、EFSA（欧州食品安全委員会）は食品添加物に適用される遺伝子試験方針について科学的な見解を提供しており、USFDA（米国食品医薬品局）は、FDA Redbookで遺伝毒性試験を含む試験ガイドラインを提供している。OECDガイドライン471、473、475、483、487は欧州の試験パラメーターを規定している。日本の安全性試験ガイドラインの英訳が公開されている。

代表的な遺伝子アッセイには以下のものがある。

- ・予測スクリーニング法として、細菌性生物のDNA損傷を検出するための微生物復帰突然変異試験
- ・培養細胞を用いた染色体切断または染色体再配列を検出するためのin vitro染色体異常試験（Ames）、または骨髄細胞を用いて行われるin vivo試験
- ・リンパ球などの培養細胞を用いた、正常な娘細胞に分離されていない全染色体または染色体断片を検出するためのin vitro小核試験
- ・ラットやマウスに被験物質を投与した後の骨髄および末梢血細胞中の染色体断片を検出するためのin vivo小核試験
- ・ラットやマウスを用いた胃や肝臓などの哺乳類組織細胞におけるDNA鎖切断を検出するためのin vivoコメット試験

トランスジェニック齧歯動物の体細胞および生殖細胞の遺伝子変異試験と他の特異的な試験はDNA付加物測定とDNA修復／組換えの評価を含み、遺伝子毒性試験の結果によっては、鎖切断を要求される場合がある。

4. Toxicity Assessment (毒性試験)

米国、欧州、日本の規制当局が要求する可能性のあるin vivo動物安全性評価試験は、公表されている文献や規制文書に記載されている。米国では、特定の食品添加物の特性に応じ

て、より具体的な追加要求事項を規定したうえで、最低限の要求事項を定義している。米国では、添加物の化学構造と予想されるヒトへの暴露に基づいた懸念レベルを用いた分類システムを利用している（図1）。懸念度が低いと予想される食品添加物については、遺伝子毒性試験や免疫毒性試験や神経毒性のスクリーニングを含む短期齧歯動物毒性試験が必要となる。懸念レベルが高い食品添加物については、齧歯類発がん性試験や生殖・発達毒性試験など、より広範な毒性試験が必要となる。

EUでは、安全性試験には段階的なアプローチを採用しており、毒物動態試験、亜急性毒性試験、生殖・発達毒性試験、生体内遺伝子毒性試験を含む最低限の試験を実施している。第二段階への移行は、吸収性や毒性や遺伝毒性の証拠があった、というようにケースバイケースで次の段階が必要であると決定され発生する。

代表的な *in vivo* 毒性試験として必要なものは以下のものがある。

- ・最初の安全性評価として 28 日間の齧歯動物毒性試験を実施し、長期試験のための試験パラメーターおよび用量レベルを確立する。規制要件を満たすためには通常、齧歯動物（ラットとマウスの両方もしくは一方）試験が用いられるが、現在の日本のガイドラインに齧歯動物試験に加えて非齧歯類での試験も可能であることが示されている。

- ・90 日間の齧歯動物毒性試験は、毒性の標的臓器を特定するための最も一般的な亜慢性毒性試験である。これは被験物質の反復暴露に基づいて標的臓器を特性するために使用され、その後のより長期の毒性試験と生殖試験パラメーターの設計に重要な情報をもたらすことがある。

- ・一年間の齧歯動物毒性試験は、食品着色料への慢性暴露による影響を示す決定的な長期毒性試験である。この試験は単独で実施してもよいし、2 年間の発がん性試験と組み合わせて行ってもよい。試験デザインと用量レベルは 90 日間の毒性試験に基づいており、胎内暴露を含むこともある。

- ・生殖毒性を評価する試験は、通常、公表されている試験ガイドラインに従って齧歯類を用いて行われる。現在は、交尾前に雌雄両方の親を暴露し、その後子孫の広範な評価を行う一世帯繁殖拡大試験が推奨されている。

- ・発達毒性（催奇形性）試験は、齧歯動物とウサギの両方もしくは一方を用いて行われる。この試験では、ラットやウサギを妊娠中に被験物質に暴露し、子孫の骨格や軟部組織の発達変化を調べる。

- ・齧歯動物発がん性試験は、被験物質が発がんを引き起こすかを判定するために用いられる。ラットとマウスの両方もしくは一方を被験物質に最長 2 年間暴露し、組織を評価して前がん病変部と腫瘍病変部の証拠を得る。この試験は、1 年間の齧歯動物慢性毒性試験と組み合わせてもよい。

- ・アレルギー反応（アレルギー性）試験の例としては、モルモットのマキシマイゼーション試験とマウスの局所リンパ節試験がある。

- ・毒物動態試験は、特に食品着色料については重要である。被験物質の吸収、組織分布、代

謝および排泄を評価するための研究は、放射性標識された被験物質を用いて実施されることが多く、組織分布は、毒性試験で見られる標的組織の病理に関連していることがある。

・いずれかの動物毒性試験の臨床所見に基づき、特定の試験プロトコルを用いた行動毒性試験と神経毒性試験が推奨されることがある。

5. Global Safety Assessment Guidelines (世界安全性評価ガイドライン)

環境暴露、化学物質や薬物の暴露、食品に添加された物質の摂取からヒトの対する潜在的な危険性を判断するための現代的なアプローチは、動物を代わりに用いて懸念物質を試験することを含め何十年も前にさかのぼる。典型的な研究では、実験用ラットやマウスを高用量の懸念物質に暴露した後、組織毒性を評価するための慎重な肉眼・顕微鏡試験を行った。犬やヒト以外の霊長類を含む他の動物種を用いて、追加毒性試験を行う必要があることがある。現在、*in silico* の非動物試験代案が研究されているにも関わらず、動物試験による毒性評価はヒトへの使用が許可される前に食品着色料の安全性を判断するための金字塔であり続けています。

食品添加物は世界的に販売されているため、実験動物を用いた適切な安全性評価試験の設計と評価は、生理学、薬理学、病理学の分野で国際的に認められた資格と特定の訓練を受けた毒物及び毒物病理学の専門家によって行われている。これらの専門科学者のトレーニングと資格の要項は、年次会合での継続的な教育コースを後援する専門の毒物及び病理学協会と、科学雑誌での発表によって管理されている。毒性試験の所見の評価には専門的な判断が必要であり、病理診断は有害な所見であるか否かの主観的な評価になりがちなため、通常、規制当局に試験結果を提出する前に正式な相互評価が行われる。毒性病理学的病変の命名法を世界的に標準化するための取り組みとして、齧歯動物の病理組織学に関する一連の図解付き出版物が欧州、米国、日本の毒性病理学者によって完成し、現在、非齧歯動物についても同様の出版物の作成に取り組んでいる。

米国と EU の両方の規制当局にとって、食品また飲料用着色料の承認に必要な毒性データの量は、ヒト暴露の大きさと着色料の分子構造に影響される。すべての場合において、動物毒性試験で決定された無有害影響レベル (NOAEL) に安全係数を適用したうえで、一日の許容摂取量 (ADI) が計算される。他国の規制とは対照的に、日本では 1995 年以前に使用されていた着色料を含む天然由来の食品添加物は、使用レベルの制限なしに許可されている。1995 年以降に導入された食品添加物については、日本の規制当局が必要とする新規着色料の毒性データの量は、一般的に米国や欧州よりも多いが、他国で既に承認されている着色料や JECFA の専門家の支持を得ている着色料については、多少の配慮がなされている可能性がある。

食品着色料を含む食品添加物の安全性に関連するすべての国内および国際的な管轄区域は、人間の食品への使用を承認する前に動物を用いた初期の安全性評価試験に依存している。一部の医薬品の開発手順とは対照的に、新規の食品添加物の承認には、通常、より標準

的な毒性試験に加えて、生殖・発達毒性試験および発がん性試験が必要である。動物試験は、臨床試験実施基準（Good Laboratory Practice）に準拠して行わなければならない。

Interesting Aspects of Color Additive Regulation in the U.S.

John H. Cox

International Association of Color Manufacturers (IACM)
1101 17th Street NW, Suite 700, Washington, DC 20036, USA

Summary

Color additives are an important ingredient in a wide range of food, beverage and consumer products. Surveys consistently show that consumers select and enjoy products because of their color. Color is often the first characteristic that influences the purchasing decision.

This article examines several interesting and unique aspects of color additive regulation in the United States. Understanding these requirements and procedures is important for companies that want to supply the U.S. market. This article will explore the process of synthetic color additive certification which is managed by the U.S. Food and Drug Administration, the provisional status of color additive lakes, and unique labeling restrictions for colors made from natural raw materials. The article will also address persistent questions about synthetic colors and the suggested connection to attention deficit hyperactivity

disorder in children. Finally, there will be an examination of gaps in the characterization and standardization of colors from natural raw materials. Unfortunately, color additive characterization and regulation are not harmonized among the major industrial markets. Several developed countries have approved more color additives than the U.S. The current process for requesting approval of new color additives in the U.S. is very expensive for the manufacturers. Because different countries have different lists of approved color additives, companies are forced to create unique product formulations for different markets, resulting in higher research, development and production costs. The challenges related to color additive use are significant and in the United States the regulations and procedures are challenging.

FFI Journal, 225(2): 137-143, 2020

<米国における色素添加物規制の興味深い一面>

要旨：

着色料はあらゆる食品、飲料、消費者向け製品における重要な要素である。調査によると、消費者は製品の色で選ぶ喜びを享受しているという一貫した結果が示されている。色は製品の購入判断をする最初の特性であることが多い。

本稿では米国の着色料の規制において特有の興味深い側面をいくつか紹介する。米国での上市を希望する企業にとって、着色料規制の義務と手続きを理解することは重要である。本稿では、米国FDAが所管する合成着色料の認可プロセス、レーキ着色料の現況、また天然原料由来の着色料に特有の表示規制について記す。また、合成着色料と子供の注意欠陥多動性障害との関連性について継続的な示唆があることについて、その疑問点を取り上げる。最後に天然原料由来の着色料の規格化と標準化における課題を紹介する。

残念ながら、世界の主な市場において着色料の規格と規制は整合性を欠いている。先進国の一部では米国よりも多くの着色料が認可されている。米国で新たに着色料の認可を申請する際、現在のプロセスは製造業者にとって費用負担が大きい。認可済みの着色料リストは国ごとに異なるため、企業は様々な市場に対して個別に製品開発を余儀なくされ、結果的に研究開発および製造にかかる費用がより高額となる。着色料の使用に関する課題は重要であり、米国での認可に向けた規制対応と手続きはとても難しい。

1. Introduction

この論文では、米国における着色料添加物規制のより興味深い側面のいくつかを検討する。米国における着色料規制の興味深い側面の1つは、食品医薬品局（FDA）による特定の添加物の市場導入前認証を取得するための義務である。この記事では、これを行うためのプロセスと義務について説明する。また、FDAの認証を免除されている色材添加物についても触れている。消費者は現在、認識可能な原材料から作られた添加物に対してより好意的な態度を持っており、そのため、色材添加物業界はこれらの成分を特定し、特性を特定するために取り組んでいる。この論文では、合成着色料と子供の注意欠陥多動性障害（ADHD）についての継続的な疑問にも触れている。

色材添加物は、消費者製品の多くのカテゴリで重要な成分である。新しい色添加物や既存の添加物の新しい用途を含むイノベーションは、調和のとれていない規制義務によって制限されている。色彩産業は、すべての色彩添加剤の安全な使用を促進するために一丸となって活動しており、これらの取り組みは以下に記載されている。

2. The Color Certification Process

2-1. Certified Color Additives

米国の着色料規制の中で最も興味深くユニークな点の一つは、合成着色料の販売前認証義務である。米国では、FDAが食品、医薬品、化粧品、医療機器に使用される色素添加物を監督する規制機関である。連邦規則法典（CFR）は、米国の色素添加物規制の情報源となっている。CFRは、連邦政府の恒久的な規則を成文化したもので、執行部局や機関が連邦登録簿に掲載している。色素添加物に影響を与える規定は、タイトル21に記載されている。このセクションには、販売のために市場に出す前に認証を受けなければならない色の基準と一緒に、承認された色添加物のリストが含まれている。これらの規則は、CFRのタイトル21、パート70-82に記載されている。

原材料の出所に関係なく、色素添加物はそれらを使用することができる前に米国の規制の下で特別に承認されている必要がある。「一般的に安全と認められている」GRASであることを承認することができる他の食品添加物とは異なり、着色料添加物のためのそのような規定はない。

21 CFR 第73部、第74部、第82部の規制では、化学的規格、用途及び制約、表示義務、認証

のための義務に沿って、各承認された色素添加物を明らかにしている。

現在、米国内の食品での使用のためにFDAによって承認された9つの認証された着色料添加物がある。オレンジBとシトラスレッドNo.2のみが制限されている。

FD&C Blue No. 1

菓子、飲料、シリアル、冷凍乳製品、アイスクリーム、フロスティング、アイシング

FD&C Blue No. 2

焼き菓子、シリアル、スナック菓子、アイスクリーム、菓子、ヨーグルト

FD&C Green No. 3

シリアル、アイスクリーム、シャーベット、ドリンクミキサー、焼き菓子

Orange B

フランクフルトやソーセージのケーシングへの使用のみが承認されている

Citrus Red No. 2

オレンジの皮の着色にのみ使用可能

FD&C Red No. 3

菓子、飲料、シリアル、アイスクリームコーン、冷凍乳製品デザート、アイスクャンディー、フロスティング、アイシング

FD&C Red No. 40

シリアル、飲料、ゼラチン、プリン、乳製品、菓子

FD&C Yellow No. 5

菓子、シリアル、スナック菓子、飲料、調味料、焼き菓子、ヨーグルト

FD&C Yellow No. 6

シリアル、スナック菓子、焼き菓子、ゼラチン、飲料 デザートパウダー、クラッカー、ソース

FDAによって記載されていることが必要な色添加剤は、2つのカテゴリに分かれている。添加剤は、FDAの認証を受けるか、認証を免除されるかのどちらかである。バッチ認証の対象となる色添加剤は、上記の合成有機染料、湖または顔料である。

21CFRパート80での規制は、次のカテゴリーの認証要件に関する詳細が含まれている。

料金 - 認証サービスの料金は、認証される色材添加剤のバッチのサイズによって異なる。製造業者が100ポンド以下を認証する場合は、1ポンドあたり0.35ドルを支払わなければならない。これらの手数料は、100ポンド以上を保証するときに削減され、さらに1000ポンド以上でさらに削減される。認証プロセスで発生した手数料は、FDA内の着色料認証部の運営費に充てられている。FDAの着色料認証部は、バッチサンプルの市場前分析を行う。製造業者は、これらの支払いを管理するために認証部署に口座を開設する必要がある。

サンプル - 規則では、評価のためにサンプルをFDAに送る方法が規定されている。サンプルサイズは、ストレートカラーの場合は4オンス、リパックや混合物の場合は2オンスであることが要求されている。

認証申請 - 21CFRセクション80.21の規定では、製造バッチサイズや詳細に関して提供しなければならない詳細を含め、認証申請を行うための詳細な要件が記載されている。

FDA認証を保留している色添加剤のバッチは、特定の方法で取り扱われなければならない。これらの要件は21CFRセクション80.37に記載されており、FDA認証証明書の発行までの間、バッチを保管し、ラベルを貼ることを要求している。認証に先立ち、バッチは食品、医薬品、化粧品、医療機器製品に使用することはできず、既に認証されたバッチとは別に保管しなければならない。

少なくとも10回の分析がFDA認証試験所でサンプルに対して行われ、その結果が着色添加物規則の同一性と仕様に準拠しているかどうか審査される。サンプルが仕様を満たしている場合、FDAは、各バッチの固有のロット番号と一緒に、証明書を発行する。

認証可能な色添加剤は、その前の起源のためにコールタール色と呼ばれることがあるが、今日では石油から得られる原料から合成されている。

米国FDAによって認証された合成着色料添加剤の量は四半期ごとに報告されている。この統計は公開されている。

合成着色料添加物の販売前認証は、独自の規制義務である。手続きを行い、許容される遅延を計画しているメーカーにとっては、プロセスは過度に負担になるものではない。色材添加剤の認証を受けることで、製造者と顧客に大きな信頼感を与えることも事実である。

2-2. Exempt Color Additives

認証を免除される色材添加物は、一般的に植物又は鉱物由来のものである。

一般的な免除される着色料添加物の例と、タイトル21のその規制セクションは以下の通りである。

Turmeric (ターメリック) 73.600

Turmeric oleoresin (ターメリックオレオジン) 73.615

Riboflavin (リボフラビン) 73.450

Cochineal extract; carmine (コチニール抽出物; 洋紅色) 73.100

Caramel (カラメル) 73.85

b-Carotene (b-カロテン) 73.95

Paprika (パプリカ) 73.340

Paprika oleoresin (パプリカオレオジン) 73.345

Annatto-bixin (アナトー-ビキシン) 73.30

Annatto-norbixin (アナトー-ノルビキシン) 73.30

Lycopene (リコペン) 73.585

Canthaxanthin (カンタキサンチン)	73.75
Beet red (ビートレッド)	73.40
Grape color extract (ブドウ色素抽出物)	73.169
Fruit juice (フルーツジュース)	73.250
Vegetable juice (野菜ジュース)	73.260
Grape skin extract (ブドウ果皮抽出物)	73.170
Saffron (サフラン)	73.500
Titanium dioxide (二酸化チタン)	73.575
Iron oxides (酸化鉄)	73.200
Spirulina blue (スピルリナブルー)	73.530

3. Color Additive Lakes

食用色素には、食用色素とレーキ色素の2種類がある。染料とレーキ色素の違いは、溶解性である。染料は水溶性。レーキは、染料と塩を組み合わせて不溶性の化合物を得ることで作られる。レーキ食用色素は、単に「レーキ」と呼ばれることが一般的だ。

レーキの色は食品染料よりも安定しているため、油脂を含む食品や、染料を溶解するのに十分な水分が不足している他の製品を着色するのに最適である。レーキは通常、コーティングされた錠剤、ハードキャンディ、チューインガム、口紅、石鹸、シャンプーなどを作るために使用される。

21CFRパート82の下、規制ではレーキがどのように製造され、ラベル付けされてもよいか記述されており、この規制には、食品に使用されるレーキの製造に使用される可能性のある色素添加物のリストが含まれている。すべてのレーキは、上述の販売前認証プロセスの対象となる。

米国におけるレーキの規制状況は暫定的なものであり、これは1960年の色素添加物改正以来、これらの物質の最終的な承認が保留されていることを意味する。米国のFDAは、早ければ2020年のいつかにこれらの添加物の状況を最終的に決定する意向を表明しているが、本稿を掲載している時点ではその案は公表されていない。色素添加物レーキの暫定的なステータスは、規制上奇妙なものだが、これらの広く使用されている添加物の合法的かつ安全な使用を妨げるものではない。

4. Labeling Requirements & Standards for Color Additives from Natural Sources

消費者は多くの食品、飲料、菓子製品に鮮やかな色を求めており、「天然」のものを求める傾向が強まっている。消費者は特に、ビーツや果物や野菜ジュースなど、認知度の高い天然物質を原料とした原材料に興味を持っている。ブランドのケーススタディでは、消費者は「自然」な製品にはより多くのお金を払いたいと考えていることが実証されている。その結果、現在、メーカーは合成着色料を天然由来のものに置き換えようとしている。天然由来の色を使用

すると、表示、特性評価、サプライチェーン管理に関連する課題が発生する。

米国の表示規制では、天然由来の色添加剤を含むこれらの製品の表示に課題が生じている。なぜなら、「天然」という用語の使用は、色を付与するために製品に添加された着色料の説明に禁止されているためである。認証を免除されている色は、植物、鉱物、昆虫から作られていることが多く、それらは一般的に "天然" であると呼ばれているが、メーカーは、これらの色を天然のものとして表示することは許可されていない。色の出所にかかわらず、FDAの規制では、イチゴアイスクリームにイチゴジュースを入れて着色するなど、食品そのものに自然な色でない限り、添加された色は天然色とはみなされない。

免除された色は、米国では認証の対象ではないため、これらの成分の特性評価と標準化は常に一貫していない。天然の原材料から作られた色の標準化を進めるケースは、2017年の論文「Unique Challenges Associated with Natural Colors (天然色に関連するユニークな課題)」で発表されている。この論文では、広く受け入れられている基準や着色料の特性評価がないことが、消費者の間に潜在的な信頼の危機を生み出していると述べている。天然由来の着色料に関するあらゆる疑問は、製品カテゴリー全体を弱体化させる可能性がある。この記事では、以下の分野で追加の基準と特性評価が必要であるとしている。

- 溶剤の残留
- 重金属
- 農薬
- 微生物汚染

自然色に関連したユニークな課題は、自然の色の標準化をさらに確立するためのフレームワークを提供した。このフレームワークは、AOACインターナショナルに所属する専門家のコミュニティによって使用されている。AOACインターナショナルは、世界中の公衆衛生に影響を与える食品やその他の製品の安全性と完全性を保証する標準的な分析方法を確立するために、政府、産業界、学界を結集した専門家団体である。着色料の製造と使用に携わるそれらのメンバーは、本稿で特定された溝を埋めるための標準化と特性評価の確立に取り組んでいる。これは複雑で時間のかかる作業だが、明確で一貫性のある製品基準を重視する業界にとっては、正しい方向への一歩である。

米国の着色料業界はまた、天然原料から作られた着色料の持続可能性についての質問を予想している。消費者が着色料の持続可能性について質問をする際には、これらの添加物の製造に関わる生産と輸送方法に関する追加情報が必要となるだろう。

5. Synthetic Food Colors and Questions about Hyperactivity

食品メーカーは、合成着色料とADHDの消費との間の可能性のある関連についての問い合わせを受け続けている。現在の議題は、それがサウサンプトン大学で実施されたという事実のために、一般的にサウサンプトン研究と呼ばれる2007年の研究から来ており、より正確な参照はMcCannらにある。

McCannらは、設計特性とコントロールの欠如について強く批判されてきており、その後の研究の結果を再現しようとする試みは失敗に終わっている。欧州食品安全局（EFSA）を含め、McCannの研究結果について多くの未解決の疑問があるにもかかわらず、欧州議会はこれを受けて規制措置をとった。一部の擁護派はサウサンプトンの後に合成着色料の禁止を求めたが、欧州議会は警告表示に落ち着いた。

必要とされる警告表示には次のように記載しなければならない。「警告：Allura Red AC E129 [または他の5色のうちの1色]は、子供の活動や注意力に悪影響を及ぼす可能性があります。」

その結果、多くの製品製造業者はこれら6色の添加物の使用を避けようとしているが、そのうち米国での使用が承認されているのは3色のみである。

2008年にEFSAで始まって、米国FDAを含む、著者たちの多数のグループによる多くのレビューは、具体的に着色料の消費を関連付けると称して臨床的証拠を評価しているADHDの子供と一般的な集団での神経行動学的影響を、すべての関係を結論づけている。

2011年には、米国FDAは、利用可能な関連データが食品中の合成着色料の子供の消費とその行動に及ぼす悪影響との間の関連を示すかどうかを検討するために、その食品諮問委員会（FAC）を招集した。FACは、合成着色料の子供の消費と行動的影響の間の因果関係が確立されていなかったと結論付けた。しかし、FACは、これらの添加物への暴露から子供の潜在的な神経毒性行動を調査するためのさらなる研究を推奨している。

米国カリフォルニア州では、環境衛生ハザード評価局（OEHHA）が、合成着色料の子供への潜在的な影響のリスク評価に関連して、2018年後半にデータの募集を行った。リスク評価は、合成食品着色料と神経行動やその他の神経学的影響との間の潜在的な関連性を調査することを目的としている。この動きに関連して、OEHHAは2019年9月に科学シンポジウムを開催し、2020年末までに知見を公表する予定だが、合成着色料の新しい表示義務などのリスク管理の提案は、カリフォルニア州の立法府から出されなければならないだろう。カリフォルニア州の製品市場は非常に大きいため、カリフォルニア州のリスク管理義務は、着色料のサプライチェーンに大きな影響を与える可能性がある。

カリフォルニア州の活動に対応して、米国の色材添加剤業界はサウサンプトンの研究発表後に実施された追加調査を検討した。これらの最近の調査結果は、これらの添加物の安全性を確認している。以下、最近の研究の一部を紹介する。

2011年のFAC以来、FDAは、食品中に存在するレベルに基づいて、7つの連邦食品、医薬品、化粧品法（FD&C）着色料添加物すべてについて包括的な暴露評価を実施し、公表している。小児を含むこれらの着色料の暴露推定値は、FDAが定めた1日の許容摂取量を大きく下回っている。

9つのFDA認定食品着色料の7つの詳細なリスク評価は、マッキャンらの研究の発表以来、EFSAと食品添加物に関する合同FAO/WHO専門家委員会（JECFA）によって実施されている。

米国FDAは、この問題を検討し、最近発表された研究を監視し続けている。FDAのウェブサイトに記載されている彼らの現在の見解は次のとおりである。

FDAは見直しを行い、子供の行動に色の添加物の影響を検討していく。科学的証拠の総体は、ほとんどの子供たちが着色料を含む食品を消費する際に悪影響を持っていないことを示しているが、いくつかの証拠は、特定の子供たちがそれらに敏感である可能性があることを示唆している。FDAは、使用が承認された着色料の安全性を確保するために、新たな科学を評価していく。子供の食事の着色料の量を制限したい親は、ラベルの食品成分リストを確認することができる。また、親は家庭医に懸念事項を相談するべきでしょう。

2019年、FDAは、合成着色料がADHDと関連しているかどうかという疑問について、最新の情報を見直すよう科学委員会に求めた。この論文の著者は、この会議で着色料業界を代表して、最新の科学が合成着色料とADHDとの関連性を確立していないことを確認する研究文献を発表した。

ADHDと着色料の消費に関連する臨床試験文献のレビューは、ADHDを含む、着色料の摂取と望ましくない神経行動症状との間に一貫性のある、または強力な関連性を見出さなかった。しかし、着色料業界は、この問題の継続的な検討のために準備しておくべきである。

6. The Future of Color Innovation in the US

米国における色材添加剤の使用の将来を予測することは困難である。消費者は「天然」の着色料に興味を持っているが、天然由来の新しい添加剤の規制当局による承認を得るには、費用がかかり、時間がかかる。大規模な国や地域間の調和が取れていないため、製造業者が複数の市場で使用できる着色料を選択することは困難である。国際色材工業会（IACM）のリーダーシップの下、着色料業界は可能な限りの調和を達成するために努めている。

食品添加物規制の調和は、食品、飲料、食品添加物の世界的な取引に関心を持つ多くの国にとって優先事項となっている。食品成分の世界的な規制における支配的な傾向は、食品に安全に添加してもよい物質の公開されたポジティブリストの開発である。この傾向は、1958年のFD&C食品添加物改正案が可決されて以来、米国における食品添加物規制の基礎となってきた市販前承認規制と一致している。

IACMは、規制の世界的な調和を提唱し、貿易を促進し、世界の食品供給に対する消費者の信頼を高めるために、規制の一貫性と国際的な調和を構築するための協力と協力を支援している。

IACMはコーデックスの非政府オブザーバー（NGO）として参加し、食品添加物に関するコーデックス委員会（CCFA）に積極的に参加している。また、各国が新しい食品規制を開発する際には、コーデックス規格の採用を奨励している。しかし、米国で使用が承認されているいくつかの色は、安全性への懸念からではなく、コーデックスのゆっくりとした慎重なプロセス

のために、まだ食品添加物の一般規格（GSFA）に採用されていない。

食品着色料添加物の世界的な規制の将来は、JECFAとコーデックス委員会の密接に関連した活動に大きく依存している。その名が示すように、JECFAは、毒性学、病理学、統計学、食品科学を含む様々な科学分野の安全性評価の専門家で構成されています。JECFAのメンバーは、FAOやWHOの活動に参加している国から選ばれており、各国の規制機関の政府職員や学界の専門家も含まれています。JECFAの会員は年ごとに変わる。

1956年以来、JECFAはその公表された基準を用いて、着色料を含む食品添加物の安全性評価を行ってきた。その評価のため、JECFAは、着色料などの食品成分の1日の許容摂取量の制限を推奨してきた。これらの決定は、JECFAによって定期的に公表されている。JECFAは独立したFAO/WHO専門家委員会であり、コーデックス委員会の一部ではないが、JECFAは、着色料、香料、その他の食品添加物に関連する安全性の問題に関するコーデックスの科学的諮問機関としての役割を果たしている。JECFAの勧告は、規制プログラムに含めるために各国が採用することも可能である。

色材添加物の承認、規格、表示要件の調和が取れていないことは、食品・飲料業界の課題であるが、色材添加物メーカーは、規制当局と協力して常に状況を改善しようと努力している。米国の着色料添加物業界は、米国および国際的な機関と強い関係を持っている。これらの機関は、国際的な色の安全性と使用問題に関する信頼できる専門家として、IACMと当社のスタッフを尊重している。

米国への食品添加物の使用許可申請の経験者からの 聞き取り調査結果 概要 (その1)

申請経験者	1名（日本の食品添加物企業での勤務経験者）
聞き取り担当	窪崎敦隆、他1名（国立医薬品食品衛生研究所）
研究課題	米国への使用許可申請の経験に関して
場所	国立医薬品食品衛生研究所 会議室

米国への使用許可申請の経験について教えてください（窪崎）。

Generally Recognized as Safe (GRAS) や着色料の申請に携わったことがある。米国の申請先である Food and Drug Administration (FDA) では、正式な申請前に面談をして必要書類をチェックしてもらえ。また、申請予定物質について説明をする機会が与えられるが、その場には FDA 側の関連分野の専門家が多数参加する。面談を済ませると登録番号と議事録が付与される。着色料の申請は、GRAS ではなく、Color Additive Petition (CAP ; 着色添加物申請) になる。日本の着色料の「色価」という考えは世界にはないので注意が必要である。米国は移民の国であるので、審査官が米国出身以外であることもあり、そのことが申請の障壁になることがあるので、留意が必要である（経験者）。

コンサルタントの存在が重要との情報がありますが、FDA への申請の際にコンサルタントは、どのような役割を担うのでしょうか（窪崎）。

コンサルタントの存在は、専門によっては、かなり力になる場合がある。FDA が求めていることをわかっている人がいることが望ましい。ただ、会議を設定するだけで高額な費用を要求するコンサルタントもいるので注意が必要である。これまでに依頼したコンサルタント会社には、現役の大学教授等が所属しており、申請全体の準備をしてもらった（経験者）。

申請資料に必要な毒性試験は、米国で行う必要がありますか（窪崎）。

米国に限らず、現在は多くの国で、毒性試験において Good Laboratory Practice (GLP) への適合が求められている。日本の試験施設の中には、GLP に適合した試験を米国よりも安価で行うところがいくらでもあると思うが、試験結果の英語の言い回し等のことを考えると日本で試験を行う選択肢はないと思う。診断基準等が日本と米国で異なっている点があり、日本の試験結果が米国で信用されない可能性がある。また、日本語と英語で所見の表現が異なるものがあり、日本語から英語に翻訳すると誤記が生じると思う（経験者）。

米国及び海外への申請のために、収集・整理をした方がいい英語の資料はありますか（窪崎）。

米国の申請についてまとめた論文等はインパクトファクターのない論文を含めてもあまり多くはないのではないかと。もし整理するならば、Environmental health criteria 240 (EHC240)が2020年に改定されたので整理することは有用だと思う。その中でも特に遺伝毒性の部分の部分は重要だと思う（経験者）。

ありがとうございました（窪崎）。

米国への食品添加物の使用許可申請の経験者等からの 聞き取り調査結果 概要 (その2)

申請経験者等	3名（日本の食品添加物企業に勤務）
聞き取り担当	窪崎敦隆、他1名（国立医薬品食品衛生研究所）
研究課題	米国への使用許可申請の経験に関して
場所（ツール）	Cisco Webex

米国への使用許可申請の経験について教えてください（窪崎）。

着色料の申請に携わったことがある（経験者）。

コンサルタントの存在が重要との情報がありますが、FDA への申請の際にコンサルタントは、どのような役割を担うのでしょうか（窪崎）。

申請を進めるうえで FDA との協議を行うが、日本国内には、申請事業に精通したコンサルタントがないこともあり、現地のコンサルタントの仲介は必須だと思う。コンサルタントにも得手不得手があるので、毒性評価のコンサルタント、申請資料の取りまとめのコンサルタントというように複数のコンサルタントが必要かもしれない（経験者）。

今後、日本の企業が海外での使用許可申請を進めるにあたり、国（行政）に求めることは何でしょうか（窪崎）。

国立医薬品食品衛生研究所等で取得した毒性試験が Good Laboratory Practice (GLP) に対応しておらず、データが使用できない点は課題だと思う。

申請資料を揃えるにあたり、日本国内で FDA Redbook に対応した機関が少なく、優秀な開発業務受託機関（Contract Research Organization : CRO）を選ばないといけないことから、これまでは海外の機関を利用してきた。

海外で試験を行うと費用も割高になってしまう。FDA 指定 GLP 対応の CRO を国管轄で国内に設置してはどうか。今のままでは、多額の日本のお金を海外検査

機関に投入することになってしまう。

海外への使用許可申請は、コンサルタントや毒性試験などの事業者費用負担がとて大きい。

厚生労働省など国が、国内添加物規格と海外の規格の違いを理解している公共の相談窓口を設置して、FDA とコネクションを持って支援してもらえれば、申請自体がスムーズになると思う（経験者）。

ありがとうございました（窪崎）。

米国への食品添加物の使用許可申請の経験者からの 聞き取り調査結果 概要 (その3)

申請経験者等	1名（日本の食品添加物業界団体に所属）
聞き取り担当	窪崎敦隆、他1名（国立医薬品食品衛生研究所）
研究課題	米国への使用許可申請の経験に関して
場所（ツール）	Cisco Webex

米国への使用許可申請の経験について教えてください（窪崎）。

過去に Generally Recognized as Safe (GRAS) の申請2件に携わったことがある。GRAS については、実績のある安全性評価のための専門家パネルに毒性について評価してもらおう。昔は、過去の食経験があれば大丈夫であったが、今は科学的データでの判断が必須になっている。パネルに評価してもらおうと「自己認証による GRAS (セルフ GRAS、Self-affirmed GRAS)」となる。さらに FDA にこのことを報告して FDA から『no question』をもらおうと「届出による GRAS (GRAS notification)」が成立する。食品添加物を使う（買う）側は、FDA が出しているステータスで判断するので、「セルフ GRAS」では、なかなか使ってもらえないようだ（経験者）。

コンサルタントの存在が重要との情報がありますが、FDA への申請の際にコンサルタントは、どのような役割を担うのでしょうか（窪崎）。

GRAS 申請について、まず、いいコンサルタントを探すことから始めないといけない。いいコンサルタントとは、「もともとは評価する側の人（元 FDA 職員など）」である。そういう人を選ばないと申請が進まない。コンサルタントへの相談料は時給計算で支払うが、ちゃんとした人は時給がとても高いので、料金は、いい判断基準になるかもしれない（経験者）。

今後、日本の企業が海外での使用許可申請を進めるにあたり、国（行政）に求めることは何でしょうか（窪崎）。

新規で食品添加物の申請をする場合、安全性試験が必要となるが、この費用が非常に高いため中小企業では捻出できないことが多い。この費用を国が多く支援することで輸出促進につながるのではないかと（経験者）。

ありがとうございました（窪崎）。

毒性病理学者を取り巻く現況

日本毒性病理学会国際委員長
東京農工大学客員教授
林 新茂

【はじめに】

わが国における毒性病理学者を取り巻く環境は非常に厳しい。とくに発がん性試験や生殖発生毒性試験をはじめとした長期試験の病理検査を経験できる場が大幅に縮小している。この課題に対して日本毒性病理学会では教育委員会を中心に対応している。一方、毒性病理学専門家の認定制度を有する日本毒性病理学会はアジア地域において毒性病理診断の質的向上を指導する立場にある。

日本毒性病理学会の主目的は継続的な会員の教育である。本学会は学術研究、情報交換の促進を基本として、わが国における生命科学研究の発展、新医薬品、農薬、食品添加物の開発に寄与することを使命としている。国内外のリスク評価機関において、これらの化学物質や環境化学物質に係るリスク評価の意思決定に貢献することは科学分野の進展のみならず産業育成にとっても社会的に意義深い。

加えて世界の毒性病理学者や各国／地域学会との積極的な国際協力の推進は将来的にも重要案件のひとつである。わが国には獣医科大学が 17 校（国立 10、公立 1、私立 6）、医科大学が 81 校あり、主に獣医科大学から新たな毒性病理学者が輩出される。しかし、毒性病理学に特化したアカデミアの教育機関はない。

【日本毒性病理学会の沿革】

日本毒性病理学会の母体である日本毒性病理研究会は 1984 年、西山保一先生（北里大学）を会長として 8 名の発起人；石川榮世（東京慈恵会医科大学）、板倉智敏（鳥取大学）、伊東信行（名古屋市立大学）、榎本眞（食品医農薬安全性評価センター）、小西陽一（奈良医科大学）、林裕造（国立衛生研究所）、藤原公策（東京大学）により設立された。翌 1985 年から総会および学術集会を開催し、1988 年には日本毒性病理学会と改称した¹⁻²⁾。1992 年には毒性病理学の専門家認定制度を設け（Grandfather 認定）、1994 年から同認定試験を実施している。2000 年には初めての教科書『新毒性病理組織学』を出版した³⁾。2006 年からは INHAND（International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic

Criteria) 事業に参画し、毒性病理用語・診断基準の国際統一計画の推進に努めている⁴⁾。2017年には最新の知見を集約した教科書『新毒性病理組織学』全813ページを編纂し⁵⁾、専門家の認定試験に活用している。

【日本毒性病理学会の活動】

日本毒性病理学会は総務委員会、会員委員会、国際委員会、資格認定委員会、教育委員会、編集委員会、広報委員会および国際用語委員会の8つの委員会から構成されている。総会および学術集会は毎年1～2月に開催され、学術論文として機関誌 *Journal of Toxicologic Pathology* 誌を年4巻英文で発刊している。*Journal of Toxicologic Pathology* 誌の2年間のインパクトファクターは1.476であり、米国・英国・欧州毒性病理学会の機関誌 *Toxicologic Pathology* 誌のインパクトファクター1.485と拮抗している。

毒性病理学専門家の認定制度は本学会の特筆すべき活動である。医薬品医療機器総合機構 (PMDA: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) は安全性試験施設の優良試験所規範 (GLP: Good Laboratory Practice) 調査資料に認定毒性病理学専門家を記載するよう求めている。認定毒性病理学専門家の受験資格は学会員歴が継続または通算して5年以上、かつ *Journal of Toxicologic Pathology* 誌に少なくとも1編の論文 (共著可) 掲載が必須である。加えて、年次学術集会への参加、毒性病理学の論文投稿、本学会の教育活動に参加し、評点基準による合計点が80点以上あることが求められている (資料1)。認定試験は日本語または英語で受験することができる。試験項目は毒性病理学に関する筆記試験、マクロおよびミクロ試験である。個人会員901名中379名が認定されている。

新規および既存の毒性病理学専門家に対し教育委員会は継続的な教育活動、すなわちスライドカンファレンス (1989年～)、教育セミナー (2000年～)、ミクロ問題の詳細解説 (2017年～) および病理組織研修ウェビナー (2020年～) を開催している。

また、国際協力の成果物として、げっ歯類 (15編+ Apoptosis / Necrosis) と非げっ歯類 (5種+Ocular Toxicity) の INHAND 論文を *Journal of Toxicologic Pathology* 誌と *Toxicologic Pathology* 誌から均等に出版している。現在、INHAND 実行委員会では各器官系横断的な病理用語の国際統一に向けた活動を加速している。

.....

INHAND 論文

げっ歯類の INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) 論文

Journal of Toxicologic Pathology 誌

- Soft Tissue, Skeletal Muscle and Mesothelium, 2013 年
- Integument, 2013 年
- Female Reproductive System, 2014 年
- Digestive System, 2016 年
- Cardiovascular System, 2016 年
- Skeletal System, 2016 年
- Endocrine System, 2018 年
- Special Senses, 2018 年

Toxicologic Pathology 誌

- Respiratory System, 2009 年
- Hepatobiliary System, 2010 年
- Urinary System, 2012 年
- Central and Peripheral Nervous Systems, 2012 年
- Mammary, Zymbal's, Preputial, and Clitoral Glands, 2012 年
- Male Reproductive System, 2012 年
- Apoptosis and Necrosis, 2016 年
- Hematolymphoid System, 2019 年

非げっ歯類の INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) 論文

Journal of Toxicologic Pathology 誌

- Non-Human Primate, 準備中
- Rabbit, 準備中
- Fish, 準備中

Toxicologic Pathology 誌

- Dog, 2021 年
- Minipig, 2021 年
- Non-Rodent Ocular Toxicity 準備中

.....

【日本毒性病理学会の課題】

日本毒性病理学会の会員数は発足時から 2000 年頃まで順調に伸びたが、その後 900～1000 名で推移している。この頃から国内外における製薬／化学会社の再編が繰り返され、外国籍企業の国内研究所閉鎖は毒性試験の受託研究機関へのアウトソーシングを加速させた。さらに 3R (Replacement、Reduction、Refinement) に向けた動物実験の制限は、動物試験実施の縮小に拍車を掛けた。これに伴い毒性病理専門家が実務を行う機会が減少し、専門家の育成や技術の継承が難しくなっている。

近年の病理顕微鏡像のデジタル化技術の進展は海外／遠隔地からの病理組織学的検査および病理ピアレビューを可能にしている⁶⁻⁷⁾。また、AI 技術を加味した病理検査の自動化処理は一次スクリーニング作業の軽減に貢献し始めている。日米英欧の毒性病理学会では GLP 遵守のためデジタル画像の恣意的な改ざん防止法の確立に取り組んでいる。

一方、毒性病理学に携わる人員数の低下は、将来の日本毒性病理学会の活動低下に繋がる憂慮すべき事態である。本学会は発足以来、法人格をもたない任意団体であったが、現在、一般社団法人への移行を目指している。社団法人化と並行してアジア地域からの会員増を目論見、学術団体としての体力増強に繋がりたいと考えている。

【世界の毒性病理学会】

2018 年 4 月ブラジル サンパウロ大学において世界各国／地域から毒性病理学会の代表者が集い世界毒性病理学会総会 (WTPC: World Toxicologic Pathology Congress) が開催された。各学会の代表は教育プログラムや毒性病理専門家認定制度についての活動状況を紹介した⁸⁻⁹⁾。

.....

北米毒性病理学会 (STP: Society of Toxicologic Pathology)¹⁰⁾

STP は 1971 年に設立され、世界 28 カ国から 1,325 名の会員を擁する。その中には 1,000 名の正会員と 150 名以上の学生会員が含まれる。会員委員会の推薦に基づく執行委員会の過半数の票を得て STP 会員権が与えられる。STP の年次シンポジウムは毎年 6 月に開催される。STP は無料ウェビナーや講演会を主催、定期的に American College of Veterinary Pathologists との合同年次集会を開

催している。STP は奨学生アウトリーチ賞を設け、姉妹学会への旅費を支援している。また米国毒性学会および姉妹毒性病理学会との共同支援によるウェビナーを開催している。Toxicologic Pathology 誌は英国毒性病理学会 (BSTP)、欧州毒性病理学会 (ESTP) および STP の機関誌である。STP の役割は医薬品、化学品および医療機器業界に共通した、あるいは新たな毒性病理学の課題における科学リーダーを輩出することである。また、STP は毒性病理学におけるベストプラクティスやグローバル教育について積極的に取り組んでおり、STP ウェブサイト上で無料公開している。

STP は毒性病理学の認定制度を設けておらず、かつ毒性病理学者の国際認定を承認していない。STP の会員は、獣医病理学者、医学病理学者、毒性学者、その他の専門家から構成されている。多くの STP 会員が ACVP (American College of Veterinary Pathologists)、ECVP (European College of Veterinary Pathologists) または日本毒性病理学会による認定を受けている。米国には今後の毒性病理学者の輩出が見込める獣医科大学が 30 校、医科大学が 179 校ある。

.....

英国毒性病理学会 (BSTP: British Society of Toxicologic Pathology) ¹¹⁾

BSTP は、1985 年に設立され、毎年 11 月に学術集会を開催している。会員数は 228 名であり、毒性学あるいは実験病理学分野に興味がある研究者であれば誰でも入会できる。

BSTP は継続的な教育シンポジウムに重点をおいており、探索毒性や動物モデルを扱う臨床病理学者、毒性学者ならびに非臨床レギュラトリーサイエンティストに高品質な専門訓練の機会を提供している。当該シンポジウムは特定の器官系に重点を置いて開催される。BSTP は STP との共催により毎年 5 回のウェビナーを開催している。BSTP は毒性病理画像のデジタルアーカイブを維持しており、経験豊富な病理学者が研修生や若手の専門家に 1 対 1 で対応できるメンター制度を立ち上げている。BSTP は STP および ESTP と Toxicologic Pathology 誌を分担している。

BSTP に毒性病理学専門家の認定制度はない。英国内には獣医科大学が 8 校あり、ここから新たな毒性病理学者が送り出される。

.....

欧州毒性病理学会 (ESTP: European Society of Toxicologic Pathology) ¹²⁾

ESTP はドイツ、イタリアおよび北欧諸国の学会により 2002 年に設立された。

欧州には ESTP に参加しつつ自国の毒性病理学会を維持するフランスやオランダなどと ESTP に参加しているが独立した毒性病理学会をもたないハンガリー毒性学会がある。ESTP は毎年 9 月に学術集会を開催し、3 年毎に European College of Veterinary Pathologists や European Society of Veterinary Pathologists と合同の年次学術集会、ときに欧州催奇形性学会との合同会議も開催している。ESTP の会員数は 25 カ国から 300 余名であり、毒性病理学分野における研究者であれば誰でも会員になれる。

年次学術会議は、招待講演者の基調講演と口頭発表、ポスター発表、症例報告から構成される。ESTP は最新のトピックに関して国際的な専門家によるワークショップを毎年後援している。ESTP 会員は毒性病理学トピックの定期的なウェビナーを利用できる。ESTP のウェブサイトでは毒性病理学研究で関心の高い症例を会員向けに提供している。若手毒性病理学者を支援するため ESTP は毎年論文賞を設けている。受賞者には賞金が贈られると共に 1 年間の会費が無料となる。ESTP は国際的な作業部会に積極的に参加しており、他の毒性病理学会と密に連携している。ESTP、STP、BSTP は Toxicologic Pathology 誌を分担しており、各学会の会員は同誌の論文を無料で利用できる。

毒性病理学分野の若手病理学者の関心を高めるため、ESTP は欧州の製薬企業、農薬／化学企業、受託研究機関と連携して学生および大学院生向けのプログラムを開始した。このプログラムを通して、学生は様々な環境にある毒性病理学者の日常業務に触れることができる。ESTP には毒性病理学専門家の認定制度はない。欧州には 90 以上の獣医科大学があり、ここから新たな毒性病理学者の輩出が見込まれる。

.....

フランス毒性病理学会 (SFPT: French Society of Toxicologic Pathology) ¹³⁾

SFPT は 2003 年 3 月に設立された。フランスのほかカナダ、ベルギー、スイス、英国を拠点とする約 90 名が加入している。母体はフランス毒性解剖病理学会 (SFAT: the French Society of Toxicologic Anatomic Pathologists、1981 年設立) とフランス実験動物協会 (AAEOCESHHAPAL: the French Association of the Organizers and Fellows of the Program in Histology, Hematology, and Anatomic Pathology of Lab Animals、1978 年設立) である。フランス毒性病理学会の会員は獣医病理学者であり、医薬品、化学品、農薬などのリスク評価および環境リスクアセスメントにあたる専門家である。フ

フランス毒性病理学会の目的は、若手病理学者の研修支援や継続教育プログラム、他国の姉妹学会との交流、欧州毒性病理学会の活動支援によりフランスでの毒性病理学の発展を促進することにある。会員間の連携や科学的なテーマを議論するため毎年会議を開催している。

フランス毒性病理学会は、フランスでの獣医解剖病理学における3年間の大学院教育トレーニング (DESV: Diplôme d' Études Spécialisées Vétérinaires en Anatomie Pathologique Vétérinaire、1987年設立) を積極的に支援している。1987年に設立されたこの大学院教育プログラムは、フランスの獣医科大学4校 (リヨン、メゾン-アルフォール、ナント、トゥールーズ) の病理学部と共同で開催されている。DESVの学生は3つの学外研修に登録しなければならない、その研修は形態学の基礎 (2カ月) と毒性病理学 (2カ月) に関するもの、および医薬、農薬、化粧品業界、生物医学系研究または獣医学診断のいずれかに係る研究プログラムに参加 (7カ月間) することを目的としている。DESV修了者は、最終的に獣医病理学と臨床病理学のあらゆるスキルを有し、総合的な評価ができる研究者として期待される。DESV資格者はフランスのみならず欧州や北米の国々において、製薬企業や農薬企業、獣医病理学の研究機関、獣医科大学の病理部門、生物医学系研究所で高い職位を得ている。3年間の研修プログラムの終了時には、ECVP試験の準備のために6カ月間の集中研修へ進む。

.....

オランダ毒性病理学会 (NLSTP: Netherlands Society of Toxicologic Pathology)

1988年、実験動物病理学者/毒性病理学者のためのオランダ登録委員会 (CRP/TP: Commissie Registratie Proefdierpathologen/Toxicologische Pathologen) が設立された。本委員会は、オランダ獣医病理学会 (NVVP: Nederlandse Vereniging voor Pathologie) および王立オランダ獣医学会 (KNMvD: Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde) により支援され、実験動物病理学者と毒性病理学者の登録、5年毎の再登録、および志願者の研修について責任を担っている。毒性病理学者の研修は、獣医病理学者と毒性病理学者の合同で行われる。CRP/TP認定実験動物/毒性病理学者は19名である。NVVPとオランダ毒性学会 (NVT: Nederlandse Vereniging voor Toxicologie) の毒性及び獣医病理学部門にも非CRP/TPの会員がいる。NLSTPの

年次学術集会は 6 月に NVT と共同開催される。学生会員には割引があり、ポスター賞が授与される。NLSTP は少なくとも年 1 回、ヒトと動物の症例セミナーを開催している。

毒性病理学において、高度な学位と少なくとも 4 年間の実績を持つ個人に対する厳しい認定制度 (CRP/TP) があり、口頭試験と筆記試験を実施している。志願者は通常、実績のある登録毒性病理学者の指導の下で 4 年間の実地研修を行う。この研修期間は必須であり、個々に適したプログラムを終えなければならない。このためオランダでは認定毒性病理学者の需要は低い。獣医科大学は 1 校である。

.....

ラテンアメリカ毒性実験病理学会 (LASTEP: Latin American Society of Toxicologic and Experimental Pathology)

LASTEP は 2005 年に設立された。ラテンアメリカ毒性病理学会 (LASTP: Latin American Society of Toxicologic Pathology) を母体とし、実験動物学者の関心を高めるため 2014 年に LASTEP に改称された。会員は 100 余名、ブラジルに本部を置き、アルゼンチン、チリ、コロンビア、ペルー、ベネズエラからの会員が加入している。LASTEP は隔年の 4 月に学術集会を開催している。

南米では認定毒性病理学者の需要が低いため、毒性病理学の研修プログラムはない。ラテンアメリカでは多くの獣医科大学 (たとえばブラジルでは 407 校) から毒性病理学者の輩出が見込まれる。

.....

韓国毒性病理学会 (KSTP: Korean Society of Toxicologic Pathology) ¹⁴⁾

KSTP は 2002 年に設立された。毒性試験の評価に積極的に関わってきた 23 名の医学あるいは獣医病理学者が設立メンバーとなった。会員は 150 名であり、学術集会を年 2 回開催している。KSTP は韓国獣医学会との合同会議を含め、地域の学術会議を後援している。2008 年、KSTP は毒性病理学の専門家認定を開始した。現在 KSTP に認定された毒性病理学者は 42 名である。

毒性病理学専門家の認定基準には医学または獣医学の博士号、病理学または実験病理学の修士号取得後 3 年以上の実務経験が含まれる。受験資格には 5 編以上の病理学論文または病理報告書、および毒性病理学者 2 名の推薦状が求められる。認定試験は筆記試験と INHAND 論文の病理写真に基づく実技試験である。毒性病理学者の認定期間は 6 年間であり、認定を維持するためには毒性病理力

ンファレンスやワークショップ、年次学術集会への出席や発表、毒性病理の論文発表などが求められる。

.....

インド毒性病理学会 (STP-I: Society of Toxicologic Pathology-India) ¹⁵⁾

STP-I は 2004 年に設立され、会員数 259 名、病理学の学位と毒性病理学における積極的な活動が求められる。病理学、薬学あるいは毒性学の学位取得者であっても毒性病理学について積極的に活動していない研究者は会員になれない。年会およびワークショップを開催し、IATP ウェビナーを後援している。

The Indian Board of Toxicologic Pathology (IBTP) は STP-I の関連団体として 2011 年に設立され、筆記試験と実技試験により毒性病理学専門家を認定している。志願者は 5 年以上の実務経験と最低教育要件として獣医師または医師の資格が求められる。インドにおける認定毒性病理学専門家の地域的需要は高く、12 の獣医科大学が毒性病理学者を輩出している。2018 年 12 月現在、IBTP 認定毒性病理学専門家は 44 名である。

.....

中国毒性病理学研究会

中国毒性病理学研究会は 2015 年に中国薬学会の中に設立された。政府機関や受託研究機関、大学、製薬会社の研究者 240 名が加入している。学術集会は上海、広州、成都、北京の各支部で開催されている。

中国では毒性病理学専門家の認定制度はない。このためわが国の毒性病理学認定試験の受験を推奨している。

.....

国際毒性病理学専門家協会 (IATP: International Academy of Toxicologic Pathology) ¹⁶⁾

IATP は毒性病理学の教育、訓練、実践における世界基準の確立、専門的アドバイスの提供、学術集会における学生会員の表彰と教育講演を支援することを目的に 1999 年に設立された。その母体となった国際毒性病理学連盟 (IFSTP: The International Federation of Societies of Toxicologic Pathologists) は 1989 年から日米欧、インド、ラテンアメリカの各毒性病理学会が協同機構体として活動していたが欧米の毒性病理学会が離脱したことにより IATP がこれに替わった。

IATP は高度に熟達した毒性病理学専門家を IATP フェローとして認定してい

る。IATP フェローは経験と科学的貢献に基づいた世界最位の能力認定である。認定基準は IATP ウェブサイト上で公開されている（資料 2）。現在の会員数は 115 名である。IATP フェロー申請書は 9 名の IATP フェローから構成される国際認定委員会で審査される。たとえば新医薬品等の米国 FDA 電子申請に際し、IATP フェローによる病理ピアレビューは毒性試験の質を担保する上で極めて重要である。日本毒性病理学会は認定毒性病理学専門家の IATP フェロー認定を推奨している。

.....

【日本毒性病理学会の将来展望】

以上、国内外の現況を鑑み、日本毒性病理学会と会員には従来からの研究や教育活動に加えて更なる活躍が期待される；

(1) 日米英欧の主要学会と共に INHAND 事業を含む毒性病理学の基盤整備と発展に貢献すること、

(2) 毒性病理学専門家制度を有する信頼性の高い学会として発展し続けるために法人化を目指すこと、

(3) 国際機関、すなわち FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) や FAO/WHO 合同残留農薬専門家委員会 (JMPR: Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)、国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer)、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development)、日米欧の医薬品規制に関する国際調和会議 (ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) においてレギュレーションに係る専門分野の代表として積極的に関与すること、

(4) 日米欧の毒性学会、アジア毒性学会 (Asia TOX)、国際毒性学連合 (IUTOX: International Union of Toxicology) などの学際的な関連領域と密に交流すること、

(5) 中国毒性病理研究会や東南アジアにおける毒性病理学の発展に寄与すること。

【参考文献・ウェブサイト】

- 1) 日本毒性病理学会 <www.japantopath.org/en/>
- 2) Yoichi Konishi, Makoto Enomoto, and Yuzo Hayashi. Foundation and Progress of Japanese Society of Toxicologic Pathology. J Toxicol Pathol 24: 1-7, 2011.
- 3) 新毒性病理組織学、西村書店、2000年
- 4) 大石裕司. 毒性病理学およびその診断基準と用語の国際統一化 その歴史と進捗. FFI ジャーナル 224: 257-269, 2019.
- 5) 新毒性病理組織学、西村書店、2017年
- 6) Gabriel Siegel, Dan Regelman, Robert Maronpot, Moti Rosenstock, Shim-mo Hayashi, Abraham Nyska. Utilizing novel telepathology system in preclinical studies and peer review. Journal of Toxicologic Pathology 31: 315-319, 2018.
- 7) Robert R. Maronpot, Cheryl A. Hobbs, Shim-mo Hayashi. Role of pathology peer review in interpretation of the comet assay. Journal of Toxicologic Pathology 31: 155-161, 2018.
- 8) Robert R. Maronpot and Maria L.Z. Dagli. Contemporary Activities of Toxicologic Pathology Societies. Journal of Toxicologic Pathology 33: 57-63, 2020.
- 9) Robert R. Maronpot and Maria L.Z. Dagli. Contemporary Activities of Toxicologic Pathology Societies. Toxicologic Pathology 48: 295-301, 2020.
- 10) 北米毒性病理学会 <www.toxpath.org>
- 11) 英国毒性病理学会 <www.bstp.org.uk>
- 12) 欧州毒性病理学会 <www.eurotoxpath.org>
- 13) フランス毒性病理学会 <<https://toxpathfrance.org>>
- 14) 韓国毒性病理学会 <<https://www.ksotp.or.kr>>
- 15) インド毒性病理学会 <www.toxpathindia.com>
- 16) 国際毒性病理学専門家協会 <www.iatpfellow.org>

【資料】

- 1) 日本毒性病理学会認定毒性病理学専門家受験要件
- 2) 国際毒性病理学専門家協会フェロー認定基準

資料 1. 日本毒性病理学会認定毒性病理学専門家受験要件

種 別	評 点 項 目	参 加	発 表	資 料
論文発表	JTP 誌 掲載	/	20 (10) ^{注1}	別刷または写し ^{注6}
	TP、ETP または他誌への毒性病理学関連論文 掲載		5 (2) ^{注1,2}	
学会活動	JSTP 学会 参加	10	/	学会参加証の写し ^{注3} , 講演要旨集の当該部分の写し ^{注4}
	STP、ESTP または他の毒性病理関連学会 参加	5		
	JSTP 学会 発表	10 (3) ^{注1}		
	STP、ESTP、他の毒性病理関連学会 発表	5 (2) ^{注1,2}		
研修会	JSTP スライドカンファレンス, JSTP 教育セミナー 及び JSTP ミクロ問題解説-詳細版-への参加	5	/	参加証明書 ^{注5} , 認定証 ^{注5} , 受講証明書 ^{注5} 等
	実験動物病理標本交見会, JCVP 獣医病理研修会及び IATP 教育セミナーへの参加	3		
	JCVP スライドセミナーへの参加	2		

JTP : Journal of Toxicologic Pathology; TP : Toxicologic Pathology; ETP : Experimental and Toxicologic Pathology; STP : Society of Toxicologic Pathology; ESTP : European Society of Toxicologic Pathology; JCVP : 日本獣医病理学専門家協会, IATP : International Academy of Toxicologic Pathology

注 1 : 発表における括弧内数字は筆頭者でない共著者/共同発表者の点数を示す。

注 2 : 言語は問わないが、英語要旨が含まれているものに限る。

注 3 : 参加証は、必ず氏名の部分もコピーして下さい。JSTP 参加証明書自体には氏名の記入箇所がございませんので、ネームカードの部分もあわせてご提出下さい。(本人が参加したことを確認するために必要となります)

注 4 : 講演要旨集の写しは、発表年度が分かるようにして下さい。

注 5 : コピー (写し) でも可。第 1 回～第 3 回ミクロ問題解説-詳細版-については、参加証明書はありませんので、参加した旨を記載した文書を提出してください (様式は問いません)。事務局で確認致します。

注 6 : 日本語もしくは英語以外で書かれた論文の別刷を資料として添付する場合は、日本語もしくは英語の title, summary を併記すること。

日本毒性病理学会認定毒性病理学専門家 ー受験資格点自己評価用紙ー

種別	評点項目	件数	添付 資料 番号	自己申告点		資格認定委員会 判定	
				申告点	小 計		
論文発表	JTP雑誌 掲載 (筆頭：20点/件，共著：10点/件)	筆： 件					
		共： 件					
	TP, ETP, 他誌への毒性病理学関連論文 (筆頭：5点/件，共著：2点/件)	筆： 件					
		共： 件					
学会活動	JSTP学会 参加 (10点/件)	件					
	STP, ESTP, 他誌への毒性病理学関連学 会 参加 (5点/件)	件					
	JSTP学会 発表 (筆頭：10点/件，共同：3点/件)	筆： 件					
		共： 件					
STP, ESTP, 他の毒性病理学関連学会 発表 (筆頭：5点/件，共同：2点/件)	筆： 件						
	共： 件						
研修会	JSTPスライドカンファランス，JSTP教 育セミナー及びJSTPマイクロ問題解説-詳 細版-への参加 (5点/件)	件					

実験動物病理標本交見会, JCVF獣医病理 研修会及びIATP教育セミナーへの参加 (3点/件)	件				
JCVFスライドセミナーへの参加 (2点/ 件)	件				
合 計					

ESTP, European Society of Toxicologic Pathology; JTP, Journal of Toxicologic Pathology; TP, Toxicologic Pathology; ETP, Experimental and Toxicologic Pathology

資料 2. 国際毒性病理学専門家協会フェロー認定基準

APPLICATION & ASSESSOR SCORE SHEET

Applicant' s Name:

Section A - Qualifications

Veterinary or Medical Degree(s) (7 points)

List your Veterinary or Medical Degrees (DVM, MD, BVSc or equivalent), institution, and year completed

Scoring Guidance: Candidates with a DVM, MD, BVSc (or equivalent) degree should be awarded 7 points. A maximum of 7 points available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Research Degree/Training (6 points)

List your research degrees and state discipline, research area, institution and number of years. For non-degree research, please list the mentor' s name and position, the institution, the number of years and the area of research.

Scoring Guidelines: Candidates with a PhD or a PhD & Masters, related to pathology and/or toxicology can be awarded 6 points, in other biomedical areas award up to 5 points. Candidates with a Masters (no PhD) can be awarded 3 points. Candidates with research training, but with no advanced degree can be awarded 2 points. If research is not in the biomedical field, award 0 points. A total of 6 points maximum is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Pathology/Toxicologic Pathology Training: Residency and On-the Job Training (9 points)

List residency in pathology, if applicable, and on-the-job training. For residency, list institution and years of training. For on-the-job training, provide the name of your mentor and their institution, as well as the type of training (one-on-one, courses, workshops) and the number of years.

Scoring Guidelines: Candidates with a formal residency in veterinary or human pathology can be awarded 5 points. Instead of or in addition to formal residency, candidates may be awarded up to 4 points for on the job training depending on the type of training. A total of 9 points maximum is available in this section. Enter your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Board Certification (5 points)

List your Board certifications. Indicate if Boards are in toxicologic pathology or pathology (or a related field such as toxicology), indicate if the Boards were given by written or oral examination and the year attained. Fellow recognition(s), (e.g. ATS and other peer-reviewed recognitions) should be listed in the Awards section of the application.

Scoring Guidelines: Candidates with Board Certification in toxicologic pathology or pathology given by written examination should be awarded 5 points (the document listing qualifying Boards in each country should be considered for

awarding the points). Candidates with Boards given by oral examination or in a related field (such as toxicology) may be awarded up to 2 of the 5 points available in this section.

Enter Your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Continuing Education (5 points)

List continuing education activities related to toxicologic pathology. List number of hours or days up to 40 hours over the last 5 years. Continuing education can include workplace, university, professional society-sponsored (STPs, ACVP, ECVF, SOT, ACT, etc.) meetings, courses or other training (e.g. webinars) related to toxicologic pathology.

Scoring Guidelines: Candidates can be awarded 1 point for each day or 8 hours of continuing education. A total of 5 points maximum is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Section B - Professional Experience

Peer Reviewed Articles (8 points)

Enter the total number of peer-reviewed published articles related to toxicologic pathology that you have authored either as a sole author, primary author, or contributing author during the last 10 years (0 points, information only).

There is no minimum number required for peer-reviewed published articles, this information is being requested as supplemental information.

List your 4 most impactful peer-reviewed non-review scientific articles in toxicologic pathology and indicate your contribution to each article (8 points).

Scoring Guidelines: Points in this section are awarded at the discretion of the assessor A total of 8 points maximum is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a "0")

Unpublished Author Reports (8 points)

Enter the number of reports (research reports and other internal reports) related to toxicologic pathology that you have authored either as a sole author, primary author, or contributing author. Published papers are excluded from this section

In the section below, provide information on unpublished reports and other documents that you have authored. Study reports or pathology sections of study reports should be categorized as acute toxicity, chronic toxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity or special toxicity study reports. Indicate if you were the primary author of the report or contributor (e.g. pathology section). Other prepared documents should be categorized as

appropriate (e.g. preparation of IND/NDA documents; prepared responses to regulatory concerns or “White Papers” that were prepared to summarize toxicity issues for internal use within a company). For experimental work, most notably academic experimental studies, preparation of progress reports and final reports to granting agencies or other funding sources should be categorized as to type of report. It is very important your role and contribution for each category of report be identified (e.g. sole author, primary author, or contributing author). You should categorize the types of reports and your contribution but should not list individual reports since this could breach institutional confidentiality

Scoring Guidance: Authorship of 30 reports of at least average degree of complexity is required for the Candidate to receive full credit of 8 points in this section. If the Candidate has less than 30 reports, weighting for the Candidate’s role in the report writing (primary author vs. contributor) and complexity of report (e.g. carcinogenicity vs. acute study) should be considered for point allocation. A maximum of 8 points is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Reviews and Books Chapters (7 points)

List up to 10 published reviews and book chapters relevant to toxicologic pathology. Provide full authorship list and indicate your role in each contribution. Include the publisher for any books listed.

Scoring Guidelines: Points awarded in this section are at the discretion of the

assessor. The Candidate's role in manuscript preparation (primary author vs. contributor), manuscript impact, and the quality of the journal and/or book should be considered for point allocation. A maximum of 7 points is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a "0")

Section C - Recognition of Scientific Judgement

Editorial Responsibilities (5 points)

List your editorial responsibilities for journals relevant to toxicologic pathology. Include the name of the journal and the number of years served in each position. Editors receive 2.5 points per year, Associate or Section Editors receive 1 point per year and Editorial Board members receive 0.5 points per year. If you have less than 5 points in this section, also list the number of manuscripts you have reviewed and the journals that you have reviewed for over the last 5 years if relevant to toxicology/toxicologic pathology.

Scoring Guidelines: Candidates will be awarded points based on their roles (see above): Candidates can be awarded up to 2 points for serving as a manuscript reviewer. Total of 5 points maximum is available in this section.

Enter your Score Below (if no score you must enter a "0")

Invited Scientific Presentations (9 points)

List up to 9 invited scientific presentations such as keystone invitations or plenary presentation) relevant to toxicologic pathology as well as forum (meeting and location) for presentation. Briefly describe content as well as your contribution if multiple authors are listed.

Scoring Guidelines: Candidates should be awarded points in this section based on the relevance of the topic to toxicologic pathology, the forum and their contribution. As general guidance, a single relevant item presented at a national or international forum (meeting, symposium) where the Candidate was the primary or sole contributor should be awarded 3 points. If the Candidate was a contributor but not the primary, they should receive between 1.5 and 2 points.. A maximum of 9 points available in this section.

Enter Your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Scientific Leadership (12 points)

List up to 6 leadership activities relevant to toxicologic pathology such as committee chair, society leadership (e.g. officer/councillor); scientific panels for government agencies; and/or participation in working groups that impact regulatory issues. If less than 6 activities, committee membership can be listed.

Scoring Guidance: Candidates with society leadership positions can be awarded up to 6 points. Candidates with service on a scientific panel and/or working group impacting regulatory issues can be awarded up to 6 points. Candidates with membership on scientific or society committees can be awarded up to 3 points. A maximum of 12 points available in this section

Enter Your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Awards (5 points)

List major awards and other recognitions relevant to toxicologic pathology, toxicology or pathology and the year attained. Do NOT list any training or local awards or those NOT relevant to toxicologic pathology. List recognition(s) given by fellow status or peer review (e.g. Academy of Toxicological Sciences, etc.) and the year attained.

Scoring Guidance: Points in this section are awarded at the assessor’s discretion. Points should be awarded based on the type of awards and their relevance to toxicologic pathology, toxicology or pathology. A maximum of 5 points is available in this section.

Enter Your Score Below (if no score you must enter a “0”)

Mentorship (5 points)

For the purpose of this section, mentoring is defined as a professional relationship in which an experienced person (the mentor) assists another (the mentee) in developing specific skills and knowledge that will enhance the mentee's professional growth in toxicologic pathology.

List and provide specifics of primary mentorship in toxicologic pathology of less experienced pathologists (formal and informal), residents and students (veterinary students, PhD students). Include name of mentee, position when mentored, and year(s) of mentoring. .

Scoring Guidance: Candidates can be awarded 1 point for each mentee in toxicologic pathology per year. If the Candidate has less than 5 mentees, they will be awarded up to 0.25 points for each student mentee for 3 months or less. A maximum of 5 points available in this section.

Enter Your Score Below (if no score you must enter a "0")

Self-Assessment of Contributions to Toxicologic Pathology and Society (9 points)

List up to three major professional achievements and their impact on advancing the field of toxicologic pathology, science as a whole, and/or society (limited to 500 words). Do NOT repeat information provided in the application above.

Include innovative fields of toxicologic pathology if applicable. Examples:

- Description of a new type of drug-induced pathology, including potential mechanistic studies with appropriate references.
- Leadership of special professional STP committee (like INHAND, Regulatory affairs, annual meetings, etc.).
- Use of expertise in toxicologic pathology to impact other scientific areas or society in general.

Scoring Guidance: Scoring in this section is at the discretion of the assessor.
A maximum of 9 points available in this section.

Enter Your Score Below (if no score you must enter a "0")

Assessor' s Name:

Total Raw Score:

第 4.5 章
遺伝毒性

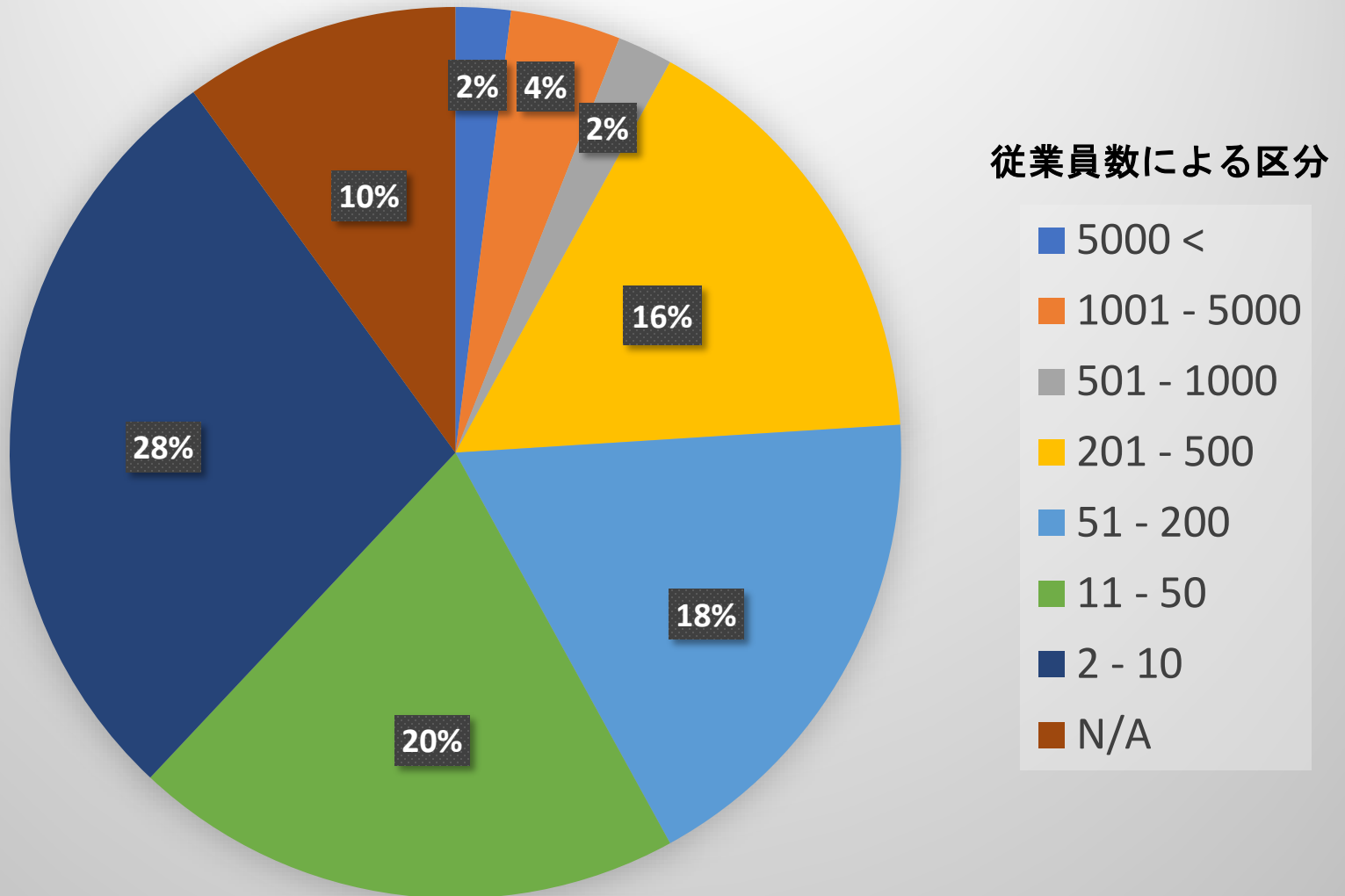
第二版
(2020 年)

内容

略語一覧	4-3
寄稿者一覧	4-6
4.5 遺伝毒性	4-8
4.5.1 はじめに	4-8
4.5.1.1 リスク分析の文脈と問題の定式化	4-10
4.5.1.2 食品中に見出される可能性のある物質の変異原性を 評価するための決定木	4-12
4.5.2 遺伝毒性試験	4-19
4.5.2.1 細菌変異原性	4-23
4.5.2.2 in vitro 哺乳類細胞変異原性	4-23
(a) Tk 遺伝子を用いた前進遺伝子突然変異 試験	4-24
(b) Hprt および Xprt 遺伝子を用いた前進遺伝子 突然変異試験	4-24
4.5.2.3 in vivo 哺乳類細胞変異原性	4-25
(A) 体細胞アッセイ	4-25
(b) 生殖細胞試験	4-26
4.5.2.4 in vitro 染色体損傷試験	4-27
(a) 染色体異常試験	4-27
(b) 小核 (MN) 試験	4-28
(c) 哺乳類細胞の TK 測定	4-28
4.5.2.5 In vivo 染色体損傷試験	4-29
(a) 染色体異常試験	4-29
(b) 小核 (MN) 試験	4-29
4.5.2.6 in vitro DNA 損傷/修復試験	4-30
4.5.2.7 in vivo DNA 損傷/修復試験	4-30
(a) コメット (単細胞ゲル電気泳動) アッセイ	4-30
(b) DNA 付加物アッセイ	4-32
(c) 哺乳類肝臓における不定期 DNA 合成 (UDS) 試験	4-32
4.5.3 妥当な試験の特定	4-33

4.5.4	試験結果の解釈	4-34
4.5.4.1	結果の表示と分類	4-35
	(a) アッセイの結果が遺伝毒性に関して陽性、陰性または曖昧であるかどうかの評価	4-37
	(b) データ品質の評価	4-38
4.5.4.2	結果の重み付けと統合	4-46
4.5.4.3	遺伝毒性データベースの妥当性	4-49
4.5.4.4	変異原性作用機序と有害事象	4-50
4.5.4.5	発がん性と変異原性の統合	4-53
4.5.5	データの乏しい物質の評価方法	4-56
4.5.5.1	in silico アプローチ	4-56
	(a) 利用可能な変異原性ツール (QSAR、SAR/構造アラート)	4-57
	(b) アプローチの信頼性	4-57
	(c) 変異原性評価	4-63
4.5.5.2	毒性学的懸念の閾値 (TTC)	4-65
4.5.5.3	グループ化とリードアクロス法	4-68
4.5.6	特定の化合物に関する考察	4-71
4.5.6.1	混合物	4-71
4.5.6.2	香料	4-73
4.5.6.3	農作物/食品生産動物の代謝物、分解生成物および不純物	4-75
4.5.6.4	酵素製剤中の二次代謝産物	4-79
4.5.7	最近の動向と今後の方向性	4-81
4.5.7.1	新しい in vivo による遺伝毒性評価法	4-82
4.5.7.2	新しい in vitro による遺伝毒性評価法	4-82
4.5.7.3	変異原性の有害転帰経路	4-90
4.5.7.4	安全評価のための定量的アプローチ	4-92
4.5.8	References	4-93

米国食品添加物許可申請支援コンサルティング会社
50社の規模別の比率



令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究年度（繰越）終了報告書

輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の安全性評価の加速のための研究

研究代表者 窪崎 敦隆 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

日本で生産された農林水産物や加工食品の輸出の促進を図るため、輸出に取り組む事業者の支援等を行うことにより、農林水産業・食品産業の持続的な発展に寄与することを目指して、「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」（令和元年法律第57号）が令和2年4月1日に施行された。日本の加工食品は、諸外国で人気が高く輸出量の拡大が見込まれる分野であるが、日本と輸出先国で食品添加物の規制が異なることから、日本で使用が認められている食品添加物を含む加工食品が、輸出先国で食品添加物の使用が認められていないことを理由に輸出できないという問題が生じている。海外に輸出する加工食品に用いられる食品添加物の安全性については、輸出先国としても関心が高く、相手国・地域における食品添加物にかかる評価への対応が輸出促進の課題の一つとなっている。令和2年度（本研究1年目）において、米国の規格基準や安全性審査について調査研究を行ったが、米国への使用許可申請の経験がある日本の食品添加物企業等の関係者から使用許可申請の際のコンサルタントの役割の重要性が指摘されており、米国の食品添加物使用申請の問題点を解決する道筋を示すために、米国の規制に詳しい関係者や使用許可申請に携わっているコンサルタント会社等から更なる情報収集及び整理を行うこととした。

具体的には、「米国の毒性病理学分野の専門家からの意見聴収」「GRAS届出の実績のある米国コンサルタント会社に関する調査」「米国コンサルタント会社へのインタビュー調査」を行い、「日本から米国への食品添加物使用許可等の申請の際の安全性評価作成対応への提言」「コンサルティング会社選択の為の米国FDAのGRAS Notices Inventoryの有効な活用方法」「コンサルティング会社の相談費用等に関する参考情報」等の結果を得ることが出来た。

以上の調査研究の成果により、米国の規制に詳しい関係者や使用許可申請に携わっているコンサルタント会社等から更なる情報収集及び整理を行うことができ、米国の食品添加物使用申請の問題点を解決する道筋を示すことができたと考えられた。

研究協力者 林新茂（東京農工大学 客員教授、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 客員研究員）

A. 研究目的

「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」（令和元年法律第 57 号）が令和 2 年 4 月 1 日に施行されたことから、国として日本で生産された農林水産物や加工食品の輸出の促進を図るため、輸出に取り組む事業者の支援等を行うことになったが、現在、日本で使用が認められている食品添加物を含む加工食品が、輸出先国で食品添加物の使用が認められていないことを理由に輸出できないという問題が生じている。そこで、本研究では、食品添加物、特に天然由来の添加物の規格基準や安全性に関して輸出先国がどのような点に着目して評価しているか等について情報を収集し整理することで、輸出拡大のための相手国・地域の規制等への対応に関する問題の解決につながる道筋を示すことを目的にしている。令和 2 年度（本研究 1 年目）において、米国の規格基準や安全性審査について調査研究を行ったが、米国の食品添加物使用申請の問題点を解決する道筋を示すために、米国の規制に詳しい関係者や使用許可申請に携わっているコンサルタント会社等から更なる情報収集を行い、整理することとした。

B. 研究方法

本研究期間（令和 3 年度）において、米国の規制に詳しい関係者や使用許可申請に携わっているコンサルタント会社等から更なる情報の収集を以下の方法で行った。

B-1. 米国の毒性病理学分野の専門家からの意見聴取

米国から見た日本の毒性病理試験等に関する問題点等について指摘してもらうことを目的に、日本の実情に詳しい米国の毒性病理学分野の専門家 2 名から意見を聴取した。

B-2. 米国コンサルタント会社に関する調査

令和 2 年度に行った「米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調査」の情報を補強する目的で、これまでに米国の「Generally Recognized as Safe（GRAS、一般的に安全と認められる）」物質への届出を実際に行ったことがあるコンサルティング会社等の情報を米国 FDA が公表している「GRAS Notices」のデータベースから収集することで整理を行った。さらに、令和 2 年度に整理したコンサルティング会社と本年度（令和 3 年度）に収集した GRAS 届出の経験のある支援企業等へインタビュー調査を行うことで、費用などデスクトップ調査では入手できない情報を収集して整理した。

C. 結果

C-1. 米国の毒性病理学分野の専門家からの意見聴取

現在、米国の国立研究機関に所属する毒性病理学及び獣医科学を専門とする研究者1名（以下、D博士という。）と米国にある安全性試験等のコンサルタント会社の代表1名（以下、M博士という。）の合計2名の専門家に連絡を取り、日本における毒性病理試験等について意見を求めた。D博士は1987年より当国立研究機関に所属している著名な研究者であると同時に米国の規制当局担当者に対する指導的役割を担っている人物であること、M博士は2007年からコンサルタント会社の代表を務めるとともに300報を超える査読（ピアレビュー）論文を発表している毒性病理学分野の専門家であること、さらに両氏とも日本の毒性病理学分野の実情及び世界的な動向に明るいことから意見を求めるには適任と考えた。

聴取の結果、以下の指摘や提言があった。

- ・ 使用許可等の申請のための安全性評価一式に関するピアレビューは非常に重要であるが、日本国外からの個人的印象として、日本におけるピアレビューは公正性に欠けると感じることがある。
- ・ 日本で実施された試験をピアレビューしたことがある日本人以外の病理学者と日本人が行う診断の変更の検

討について話したことがあるが、彼らは日本人の試験病理学者が、適切な変更または外部のピアレビュー病理学者からの提案を受けた際の診断変更を検討する際に、柔軟性に多少欠けることがあると指摘しており、私も同じ意見である。

- ・ 私自身は、日本で実施された試験をレビューしたことがあるが、日本人の毒性病理学者は、重大な変化の解釈に重点を置くよりも、診断することに多大な時間を費やしている。
- ・ 日本人の若い病理学者は、年配の「先生」である病理学者に常に同意することを求められているようで、それは年配の病理学者である上司の意見が完全に正しくはない場合でも同様であるように感じる。
- ・ 日本からの諸外国への、少なくとも米国への、使用許可等の申請の際に国際的に通用する資格を有する安全性評価の専門家が参画するようにすることは、承認の為の有効な方法と考える。国際的に通用する資格として、Diplomate Japanese Society of Toxicologic Pathology (DJSTP、日本毒性病理学会毒性病理学専門家認定資格) は、そのうちの1つであろう。

C-2. 米国コンサルタント会社に関する調査

C-2-1. GRAS 届出の実績のある米国コン

サルタント会社に関する調査

令和2年度に「米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調査」として、デスクトップ調査により、企業ウェブサイト、Euromonitor、LinkedIn の公開情報等から米国における食品添加物許可申請を支援する企業として50社を抽出して情報を整理した。本年度は、これらの情報を補強する目的で、実際に米国の食品添加物使用許可申請の支援を行った実態の情報を追加できないかと考え、米国FDAが公表している「GRAS Notices」の開示情報に着目することにした。GRASとは、名前が示す通り、一般使用の経験又は科学的手順を通じて意図した使用下で一般的に安全と認められた物質のことである。これは、米国特有の制度であり、企業が独自にGRASパネルを集めてGRASを取得する「Self-affirmed GRAS」や企業独自に取得したGRASのデータをFDAへ告知して内容の確認を求める「FDA Notified GRAS」など複数の種類が存在する。

米国FDAのホームページには「GRAS Notices Inventory」のページが準備されている。

<https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices>

「GRAS Notices Inventory」には、1998年5月以降にFDAへ提出されたGRAS届出についてのデータが収載されており、「GRN No.」が付されて管理されている。

各届出の開示情報を確認したところ「届出品名」「届出品の使用目的」「届出者」「届出者の住所」「GRAS Notice」「FDAの確認終了日」等に加え、FDAの確認結果である「FDA's Letter」が含まれていた。「FDA's Letter」に示されていた結論として、FDAが届出内容に疑問がない場合には「FDA has no questions」と表示されるが、届出者が届出を取り下げた「At the notifier's request, FDA ceased to evaluate this notice.」や提出情報が不十分とする「Notice does not provide a basis for a GRAS determination.」などの表示もあり、本研究対象である1017件中には、それぞれ164件と16件が含まれていた。さらに、「GRAS Notice」にはカバーレターを含む開示可能な範囲の届出書類一式が、「FDA's Letter」にはFDAの確認結果の回答の詳細が、PDFファイルのリンク等の方法で容易に入手できるように開示されていた。

そこで本研究では、まず、1998年に届出されたGRN No.1から調査時点で入手可能であった届出分までの合計1017件を調査対象として、「GRAS Notice」から入手可能な詳細情報を全て入手した。次に、届出書のカバーレターに書かれていた差出人である「GRAS 提出者」と「Notifier」である食品添加物の製造会社等の届出者で差異が見られる届出に着目して抽出してみたところ、1017件中593件(58.3%)を見つけることが出来た。GRAS提出者と届出者が異なるということは、これら593件

の GRAS 提出者はコンサルタント会社等の届出代理企業であると考えられた。593 件の GRAS 提出者は複数の GRAS 届出の届出に関わっていることから、重複を取り除いたところ、94 の企業又は個人に集約することができた。さらに、今回の調査対象が 1998 年からと 20 年以上前の届出も含まれていることから現時点でも存在する FDA 申請等を支援するコンサルティング会社であることを確認するために、デスクトップ調査により企業ウェブサイト公開情報を検索して、カバーレターに書かれた「所在地」「電話番号」「住所」等と照合したうえで、「吸収合併されている」「現存していることを示す情報がない」「HP が無い」「HP 上に FDA 申請業務支援の記載がない」「会社ではなく個人による申請代行と判断される」「明らかに申請を支援する会社ではない」と判断された 42 件の企業等を除外した。その結果、コンサルティング業務の実態が確認できた企業 52 社を残した。94 社中 52 社(55.3%)が対応した届出件数は 515 件あり、1017 件の届出の 86.8%に対応していることが明らかになった。52 社中 19 社は 1 件の届出のみに携わった記録になっていた一方、1 社で 110 件の代理提出を行った支援企業も存在していた(資料 1)。さらに、52 社の詳細情報を知るために、「設立年」「資本金」「従業員数」「相談参考費用」「オフィス所在地(対応可能州)」等の情報を整理したところ、これらの中に法律事務所

も含まれていた。「従業員数」については、65%にあたる 34 社が情報を開示していなかったが、25%にあたる 13 社が従業員数 200 名を超える比較的大きな企業であった(資料 2)。

C-2-2.米国コンサルタント会社へのインタビュー調査

令和 2 年度に行った「米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調査」でのデスクトップ調査では、相談費用等の実際の対応については公開情報として開示していない企業が多かったことから、それらの情報を入手するためには、各企業へ直接インタビュー調査を行う必要があった。

そこで、令和 2 年度に収集した「食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社 50 社」と令和 3 年度に収集した「GRAS 届出代行実績のある企業 52 社」で重複企業を除外した 94 社に加え、「日本企業の FDA 申請実績があり、かつ米国に拠点がある企業」7 社を追加した合計 101 社にインタビュー調査の打診を試みた。その結果、企業 5 社から受諾の回答を得られたことから、インタビュー調査を依頼して実施した。

その結果の要約を資料 3 に示したが、インタビュー調査に応じた企業は、本調査が日本からの依頼であったこともあり、5 社とも過去に「日本企業から FDA へ食品添加物の申請サポートを経験したこと

がある」と回答していた。5社のうち3社は「GRAS 届出代行実績のある企業 52社」のみで選ばれた企業、1社は「食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社 50社」と「GRAS 届出代行実績のある企業 52社」で重複していた企業、残り1社は「日本企業のFDA申請実績があり、かつ米国に拠点がある企業」であった。今回は具体的な申請品を提示せずに行った調査であったため、回答は参考情報ではあるが、時間単位の相談費用が100～600ドル、総額の費用が4万～20万ドルという情報は、デスクトップ調査では入手できない貴重な情報であった。

D. 考察

米国の食品添加物の新規承認手続きに関しては、CFRやFDAガイダンスで規定されている。例えば、着色料等の申請についてGuidanceが出されているが、「Safety invitations (安全性評価)」については、「Not covered by these recommendations (推奨事項対象外)」と書かれていたことから、令和2年度の本研究において、「米国の食品添加物の申請においては、安全性評価も含めて、コンサルタントを仲介して作業を進めることが想定されている可能性が高く、米国におけるコンサルタントに関する更なる情報の整理が必要」と考察していた。さらに、米国申請への使用許可申請の経験者からの意見で、米国の食品添加物の申請に対応できる優秀なコンサル

タントを探すことの難しさも指摘されていた。そこで、本年度の研究では、令和2年度に行った米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社の調査結果を補強する目的で、米国FDAが公表している「GRAS Notices」の開示情報に着目して調査研究を行った。その結果、「GRAS Notices Inventory」から入手できる資料には、実際の届出の際に提出された資料が含まれており、デスクトップ調査で得られる情報よりも実態に即した極めて有効な情報を効率よく収集できることを明確に示すことが出来た。本研究では、入手可能な1017件すべての情報を用いて解析を行ったが、希望に沿った優秀なコンサルタント企業を抽出する目的のために、「日本企業が届出者となっている届出」「届出品の目的が類似している届出」「直近数年間の届出」等に限定して情報の抽出を行う方法も有効であると考えた。実際、「GRAS Notices Inventory」は月1回程度の更新が行われることが明記されており、毎月5件程度新規届出が追加されているようであることから、最近の届出支援企業の傾向を注視しておくことは重要であろう。

これまでに収集した結果から、米国における食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社は、大きく2つに分けることができると考えられた。

①安全性試験などの専門性の高い分野は外部パートナーに委託しつつ、FDA申請

に必要な書類申請代行支援を専門的に行う会社

②自社で研究施設を持ち、FDA 申請に必要な安全性試験・検査などの専門性の高い分野も含めて総合的に支援する企業

GRAS 届出代行件数の多いコンサルティング企業に限ってみると、自社で研究施設を持ち、検査・試験が行える②の企業が多い傾向が見て取れ、届出予定者は総合的な支援に期待して依頼先を決めている可能性があると考えられた。GRAS 届出代行実績のある企業 52 社には、従業員数を開示していない企業が半数を越えており、企業規模の比率は正確には分からなかったが、②の企業が多く含まれていることから、従業員数 200 名を超えるような比較的大きな企業が多いのではないかと推測された。

本調査研究によって、インタビュー調査によりデスクトップ調査では得ることのできなかつた相談費用等の情報を入手することが出来た。同一の企業であっても担当者によって単価が変わることや申請品によって異なるという回答であることから正確な総額までは分からなかったが、単価の相場や相談が時間単位で行われることなどは、貴重な情報である。今回のインタビュー調査では、毒性試験などの費用に関する情報は入手できなかったが、日本で毒性試験を行うよりも米国で行う方が高額になるという情報がある。もし、日本で毒性試験を行う場合であっ

ても、本研究で米国の専門家から提言があったように、国際的に通用する資格を有する安全性評価の専門家を申請に参画してもらうことは解決策の一つになると考えられる。

令和 2 年度に収集した「食品添加物使用許可申請支援コンサルティング会社 50 社」と令和 3 年度に収集した「GRAS 届出代行実績のある企業 52 社」で重複企業が 8 社だけであったことは驚きであった。原因は複数考えられるが、少なくともデスクトップ調査結果は単独で用いるのではなく、他の情報と組合せて補助的に活用する方が効果的であると考えられる。実際、本研究においても「GRAS 提出者である 94 の企業又は個人」から 52 社へ絞り込みを行う場面で情報を活用した。

以上の結果から、本研究において、米国の規制に詳しい関係者や使用許可申請に携わっているコンサルタント会社等から更なる情報収集及び整理を行うことで、米国の食品添加物使用申請の問題点を解決する道筋を示すことができたと考えられた。

E. 健康危険情報

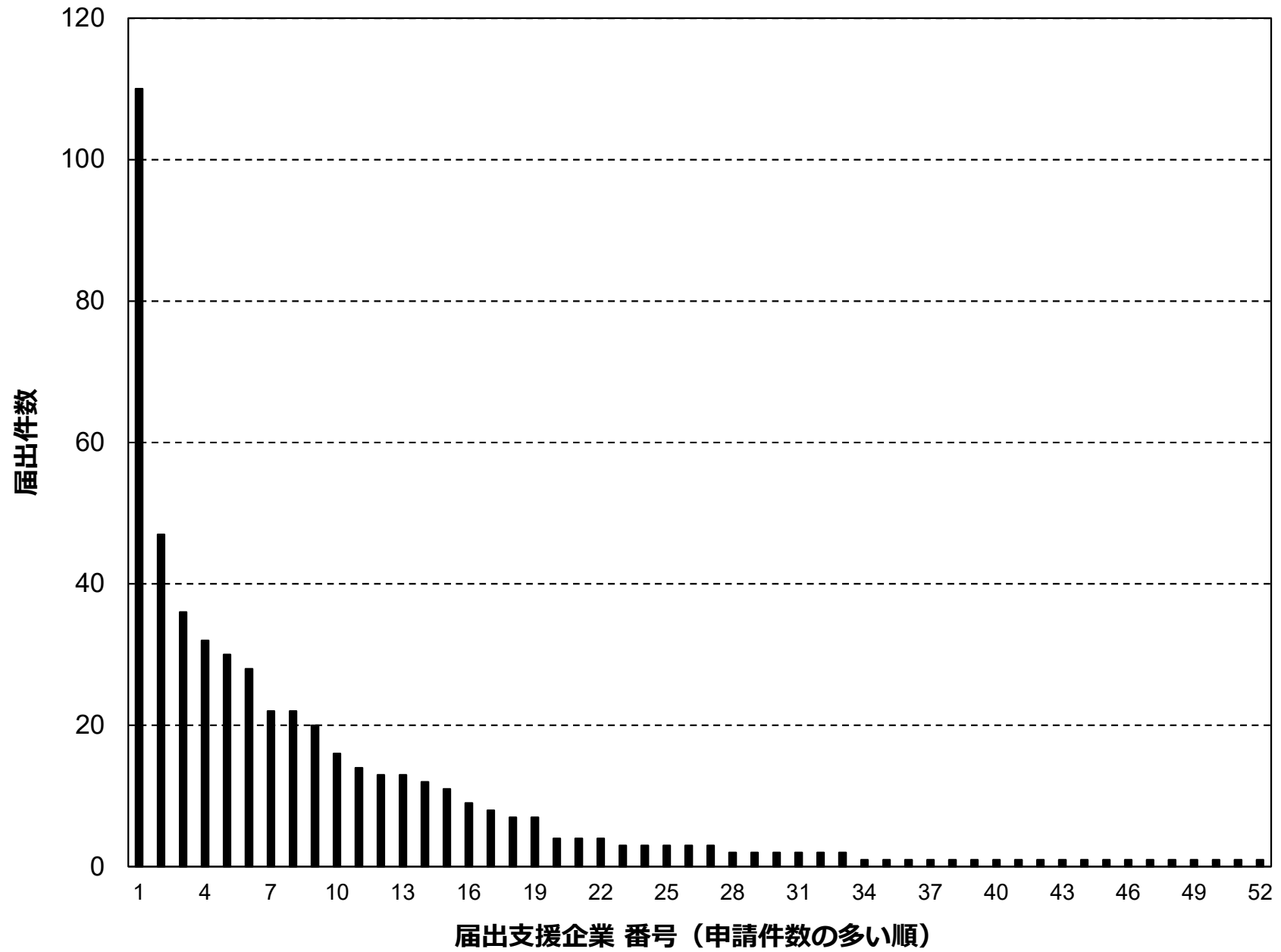
該当なし

F. 研究発表

該当なし

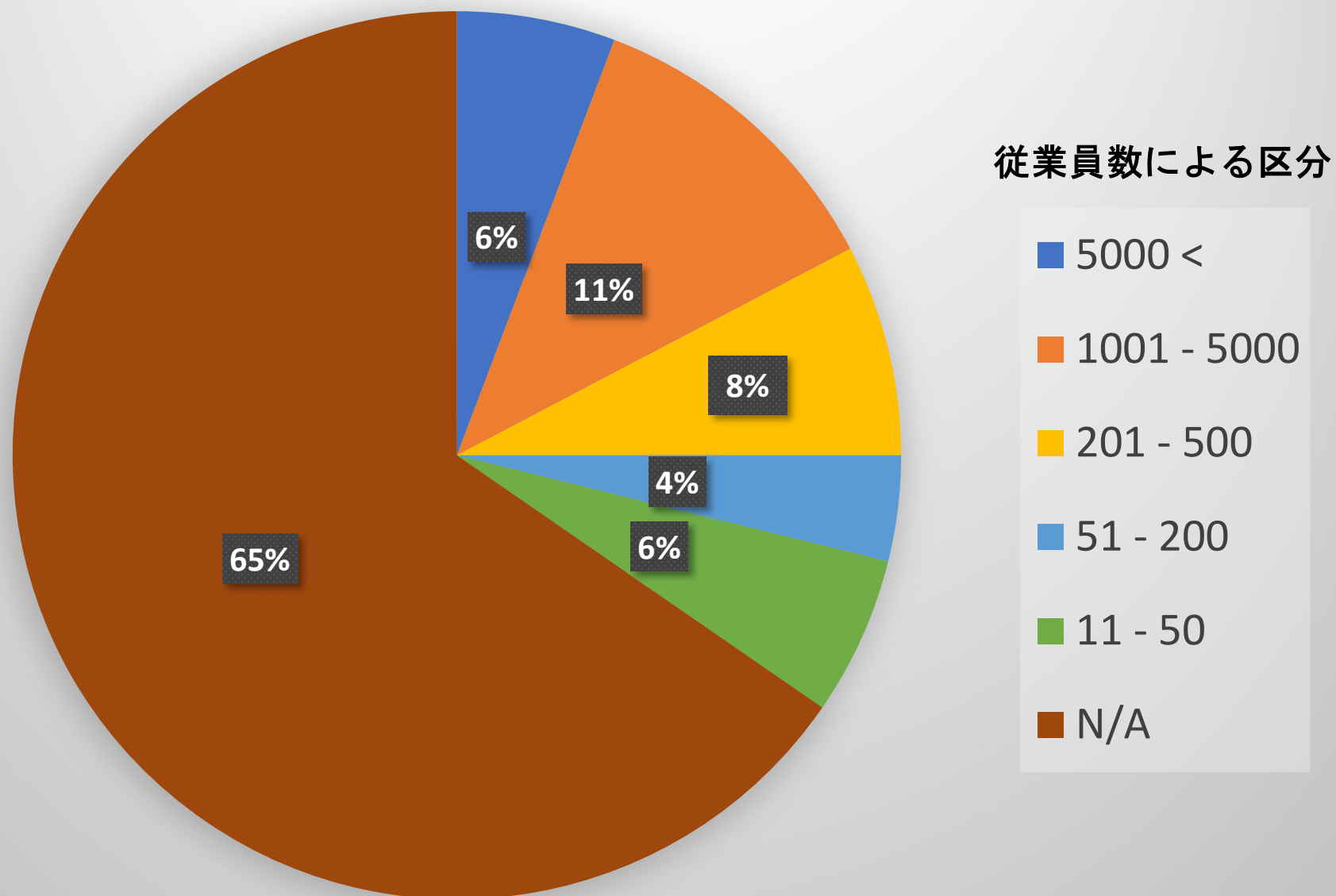
G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



FDAのGRAS届出代行の実績のある企業

52社の規模別の比率



NO	質問	会社①	会社②	会社③	会社④	会社⑤
1	これまでFDA（食品添加物の）申請に関するサポート件数はどれくらいあるか？	正確には計算していないが、40件以上は支援実績あり。	歴史のある会社でFDA関係も長い。件数は数えた事はないが、百単位かもしれない。	FDA申請に関しての支援は100件以上だが、動物が主。食品添加物については数件。	沢山あるが件数は分からない。	これまで、50件ほど支援はしてきた。ラベル作成、施設登録、米国代理人は多く行っている（件数は約50件。）食品添加物の申請は外部の専門家に委託する。その場合、弊社の支援としては日本の会社の窓口として目的達成のためにクライアントと密に連絡を取りながら作業を進める。日本語で必要資料や経過状況など詳細に渡りメールやオンラインなどでクライアントに説明を行い進める。
2	日本企業からのFDA（食品添加物の）申請サポートした経験はあるか？ -ある場合は、何件ほどあるか？ -ない場合は、どの国からのお問い合わせが多いか？	ある。 日本企業の支援実績は1件。	ある。 日本に事務所もある。 想像だが添加物関係は40件くらいではないか。	ある。 食品添加物関係では数件。 その他のFDA関係を含めると約30件。	世界中で行っているため日本からもあるはずだが、何件かは分からない。 これまで150カ国以上へのサービス提供をしている。	ある。 日本企業への支援が中心で50件ほど支援は行ってきた。
3	相談費用はいくらか（時間当たり、1件当たりなど）？ 過去実績からFDAに関して、平均サポート費用／期間はどれくらいか？	600ドル/時間が目安。 約7.5万ドルから20万ドル（毒性試験などの試験は除く）。	担当によって費用は違うが、100ドルから300ドル/時間。どんな商品、成分とどの申請をするかによって異なる。 添加物や成分関係はケースにより異なるが、フィーザピリティで約1万ドルから1.5万ドルで期間は6から10週間くらいではないか。 食品添加物申請書、新成分の通知、GRAS評価などの調査書類は4万ドルから10万ドルかかると思う。	270ドル/時間。 期間はGRASの場合その商品、成分による。又メーカー側がどれだけ知識があるか、FDAのウェブサイト中の似たような物質の事を調べているかなどもよるが、短くて通常2、3カ月はかかる。費用は内容によって違う。	コンサルは時間単位だが内容によって変わるので商品を具体的に知る必要がある。課題に応じて、担当を紹介・見積を提出する。 具体的にどんな製品か分からないのでいくらかと言えないが通常10万ドル以上はかかる。	初期の相談は無料。 契約後のサポート費用は申請内容によるので見積もりを提出する。 申請するものによって違う。 打ち合わせの後、専門家の料金の見積もりと弊社の代理人窓口料金の見積もりを提出する。
4	FDAとの面談の仲介をしてもらえるか？	やっている。	必要と思えば行う。可能。	やっている。	可能。	FDA、日本の顧客会社、弊社の三者間通話になる。通訳も行う。
5	各種申請資料の作成を支援してもらえるか？	行っている。 資料を作成するためには知識を持った人が必要になる。クライアントでそのような科学者がいない場合は時間と費用が増す。	行える。	行っている。	可能。	行う。
6	色料を含む天然物の食品添加物の申請を支援実績はあるか？ -ある場合は、どのような支援を行ったか？ -ない場合は、支援は可能か？	ある。 GRAS関係の支援を行った。	ある。 添加物や毒物試験を行う。 科学試験の施設もある。	色料や食品添加物などの分析は外部の毒物学分析所などの安全分析会社が行う。 弊社ではその後の申請を手伝う。	ある。 北米、南米、ヨーロッパ、中国などに研究所を保有しており、詳細は担当でなければ答えられない。	ない。 添加物の場合、米国には専門家会社が多数あり、その目的により弊社がクライアントと共に専門家を選出し、窓口としての日本語での支援を行う。
7	申請に必要な安全性試験（毒性試験）のデザイン等について支援実績はあるか？ -ある場合は、どのような支援を行ったか？ -ない場合は、支援は可能か、または支援できる会社の紹介は可能か？	アドバイスはするが毒性試験は外部のラボで行う。外部ラボの選定・紹介は可能。	ある。 クライアントと連絡を取りながら進める。	ここでは行っていない。 弊社はその後の申請を手伝う。外部の会社の紹介は出来る。	ラボが社内にあるので支援可能。	毒性試験の実績はない。 専門家に依頼する必要があり、その場合お客様の窓口となって支援を行う。
8	FDA運営のGRAS通知プログラム申請のサポート経験があるか？	ある。	ある。	ある。 食品添加物関係では数件。 その他のFDA関係を含めると約30件。	別の部署になるので調べないと言えない。	GRAS申請の依頼は弊社では今までに無い。専門家会社が必要となり、依頼があればそのサポートは行う。
9	具体的な相談を貴社へ依頼する際に必要な情報は何か？	なんの製品でどのような工場で製造するかの情報が必要。 クライアントへのヒアリングを通し、必要な情報は随時確認していく。	こちらから必要となるものを精査して、必要書類を用意してもらう。	最初は毒性関係などの分析ラボに依頼することが必要。その後の申請サポートになる。	こちらから指定する情報。	添加物関係の場合、こちらから依頼する必要書類を提出してもらうが、複雑なケースもありメールやオンライン会議などで細かに進める必要がある。
10	日本からの申請で注意すべき点はあるか？	日本もアメリカも同じ。	日本だからとかの違いはない。	日本だからとかは関係ない。	特にない。	日本とかどの国という事は無い。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の安全性評価の加速のための研究 (20KA2003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 第四室長
(氏名・フリガナ) 窪崎 敦隆 (クボサキ アツタカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 輸出に向けて加工食品に用いられる食品添加物の安全性評価の加速のための研究 (20KA2003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 第四室長
(氏名・フリガナ) 窪崎 敦隆 (クボサキ アツタカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。