急性経皮毒性試験

１．序論

・基礎的前提条件

－固体または液体の被験物質
－被験物質の化学的確認
－被験物質の純度（不純物）
－溶解性
－融点／沸点
－pH（適切な場合）

・基準となる文書

適切な国際的基準はない。

２．試験法

A. 緒言、目的、範囲、関連性、適応および限界

化学物質の毒性の判定や評価において急性経皮毒性の測定は、経皮暴露が起こりそうな場合に役立つ。そして、経皮による短期間暴露で生じると考えられる健康障害についての情報を提供する。急性経皮毒性試験のデータは、分類と表示の根拠として役立つであろう。本試験は亜急性およびその他の試験における用量決定の最初の段階であり、また、経皮吸収とその物質の経皮による毒性の作用様式についての情報を提供するであろう。

・定義

急性経皮毒性とは、被験物質を 1 回経皮適用した際に短時間内に生じる有害な影響をいう。

用量とは、適用する被験物質の量のことである。用量は重量（g、mg）、あるいは試験動物の単位体積あたりの被験物質の重量（たとえば mg/kg）として表される。

LD50（半数致死量）経皮とは、皮膚に適用した際、処置動物の 50%が死亡すると期待される統計学的に導かれた物質の 1 回用量である。LD50 は試験動物の単位体重あたりの被験物質の重量（mg/kg）によって表される。

本テストガイドラインを使用するものは、序文の特に3、4、7及び8を熟慮すること。

急性経皮毒性試験

投与量とは、用量およびその頻度と投与の期間に関する一般的用語である。

用量－反応とは、用量との一定の作用を示す母集団の割合との関係をいう。

用量－作用とは、用量と個々あるいは母集団のいずれかに起こる明らかな生物学的作用の大きさとの関係をいう。

・試験法の原則

被験物質は、実験動物の数群に、1 群につき 1 用量として、段階的な用量で皮膚に適用する。ついで、作用と死亡について観察を行う。試験中に死亡した動物は剖検する。試験終了時に生存した動物は屠殺して剖検する。激しい持続的な苦痛の兆候を示す動物は、人道的に屠殺する必要があろう。腐食性または刺激性により著しい苦痛を起こすとわかっている方法での被験物質の投与は、行う必要がない。

B. 試験手順の解説

・準備

健康な若い成熟動物を試験に先立って少なくとも 5 日間、試験環境に馴化させる。試験前に動物を無作為に群分けする。試験のおよそ 24 時間前に、試験動物の軀幹背部の被毛は刈毛あるいは剪毛により取り除く。皮膚を傷つけると透過性が変わるので傷つけぬように注意を払う。

体表面積の少なくとも 10%は被験物質の適用のためにきれいに剪毛する。動物の体重は、剪毛する範囲および被覆する範囲を決めるときに考慮に入れる。

固体を試験するときは、妥当ならば粉末状とし、その被験物質は皮膚とよく接触させるために水あるいは必要に応じて適切な溶媒を用いて十分に湿らせる。溶媒を使用するときは、被験物質の皮膚透過性に対する溶媒の影響について考慮する。液体の被験物質は一般に希釈しないで使用する。

急性経皮毒性試験

・試験動物

動物種の選択

成熟ラット、ウサギあるいはモルモットを用いる。その他の動物種を用いる場合はそれらを使用する正当な理由が必要である。下記の体重範囲は、試験の実施を容易にする大きさの動物を選ぶのに役立つ。ラット　200～300 g、ウサギ　2.0～3.0 kg、モルモット　350～450 g、健康で無傷の皮膚を有する動物を選ぶ。

注記：げっ歯類よりも高等な動物での急性毒性試験では、より少数の動物を使用するよう考慮する。用量は慎重に選択し、中度毒性用量を超えないようにする。このような試験では、被験物質の致死量の投与は避ける。

動物数と性

用量段階ごとに少なくとも 5 匹のげっ歯類を用いる。動物はすべて同性とする。雌は未経産および妊娠していない動物を用いる。より少数の動物の使用でも正当な場合もある。一つの性が顕著に鋭敏であることを実証する情報が得られている場合は、その性の動物に投与する。

飼育および給餌条件

動物は個別にケージに収容する。試験動物室の温度はげっ歯類については 22℃（±3℃）、ウサギについては 20℃（±3℃）、相対湿度は 30～70%にする。照明は人為的に行うときは連続 12 時間ごとに明暗を切替える。給餌に関しては一般実験用飼料を用い飲料水は自由に摂取させる。

・試験条件

用量段階

少なくとも 3 つの、十分な数の用量段階が必要で、試験群がある範囲の毒性作用と死亡を示すように適切な間隔を設ける。データは用量－反応曲線を得るのに十分なものである必要があり、可能な場合は LD50 の決定が行えるものとする。

限度試験

上記の手順を用いた雄 5 匹、雌 5 匹の 1 群において少なくとも 2,000 mg/kg（体重）の 1 用量段階で 1 回の限度試験を行えばよい。化合物に関連した死亡がみられる場合は、全面的な試験を考慮する必要がある。

急性経皮毒性試験

観察期間

観察期間は少なくとも 14 日間とするが、観察の継続時間は厳格に固定すべきではない。それは毒性反応、症状出現の程度および回復期間の長さによって決められるものであり、したがって必要と考えられる場合には延長すべきである。毒性徴候の出現および消失時間、それらの持続と死亡時間は、とくに死亡が遅れて起こる傾向がみられるときは重要である。

・試験の実施

被験物質は総体表面積の約 10%の範囲に均一に適用する。高い毒性を有する被験物質を塗布するような場合には塗布面積はより小さくしてもよいが、塗布部全体をできるだけうすく均一なフィルムで被う。

被験物質は 24 時間の暴露時間を通して多孔性のガーゼで覆い、さらに非刺激性のテープを用いて被験物質と皮膚との接触を保持する。適用部位はガーゼ包帯と被験物質とを保持するために適当な方法でさらに覆い、動物が被験物質を摂取できないようにする。固定器は被験物質の摂取を防ぐために用いられるが、完全な不動固定は勧められる方法ではない。

暴露期間の終了時には、残存した被験物質は水や適当な溶媒を用いてできる限り取り除く。

・臨床観察

観察事項は、実施した際に系統的に記録する。各動物について個別の記録をとる。被験物質を適用した動物は初日に頻繁に観察し、次いで、少なくとも毎日 1 回注意深い臨床観察を行うべきである。試験における動物の損失を最小限にするための適切な処置を取りつつ、毎日追加の観察を行う。たとえば死亡確認動物の剖検または冷蔵、衰弱あるいは瀕死動物の隔離または虐殺であ

る。ケージサイドでは、体毛、眼および眼粘膜、呼吸系、循環系、自律ならびに中枢神経系および全身の運動性、行動パターンの変化を観察する。振せん、けいれん、流涎、下痢、嗜眠、睡眠および昏眠の観察には特別な注意を払う。死亡時間はできるだけ正確に記録されねばならない。

動物の個別の体重は被験物質適用直前、その後は週 1 回および死亡時に測定する。1 日以上生存している場合は、体重変化を計算し、記録する。実験終了時に、生存動物は体重を測定した後に屠殺する。

・病理

剖検はすべての動物について実施し、すべての肉眼的病理変化を記録する。24 時間以上生存した動物で、明らかな肉眼的病変を示した器官についての顕微鏡検査は有用な情報を与えてくれるかも知れないので、これを考慮すべきである。

・他の性における毒性評価

一つの性での試験を完了したのち、他の性の 5 匹の動物からなる少なくとも一つの群に投与して、この性の動物が被験物質に対して顕著に鋭敏ではないことを確認する。個々の状況では、より少数の動物の使用で十分であろう。試験した性の動物が顕著に鋭敏であることを実証するにたる適切な情報が得られた場合は、他の性の動物の試験は行わなくてよい。

３．データおよび報告

・結果の処理

データは、開始時における各試験群の動物数、各用量段階における個々の動物の死亡時間、毒性徴候を示した動物数、毒性作用および剖検所見を表に要約して示す。

化合物に関連した苦痛のため人道的に屠殺した動物については、化合物関連の死亡と記録する。

LD50 値はなんらかの容認されている方法、たとえば、Bliss 4)、 Litchfield and Wilcoxon 3）、 Finney 5）、 Weil 6）、 Thompson 7）、 Miller and Tainter 8）らの方法を用いて求めることができる。

・結果の評価

LD50 値は、常に、観察された毒性作用や剖検所見と関連して考慮すべきである。LD50 値は比較的おおまかな測定値であり、分類や表示のための参考値としてのみ有用である。また、被験物質の皮膚暴露による致死作用の一つの表現である。

LD50 値が得られた実験動物種を常に参考にする。評価には、異常が認められた場合、被験物質の動物への暴露とすべての異常の頻度や程度との関連性評価を含め、その異常には行動、臨床的異常、肉眼的病変、体重変化、致死作用および他のすべての毒性作用を含む。

・試験報告書

試験報告書には下記の情報を含むものとする。

－使用動物種／系統／入手先、環境的条件
－投与した動物の性
－用量段階別の反応データの表（すなわち、試験中に死亡または屠殺した動物の数、毒性徴候を示した動物の数、暴露動物の数）
－投与の時間と投与後の死亡時間
－14 日時点での投与した性（無傷皮膚）の LD50 値とその決定方法
－LD50 値の 95%信頼限界（求められる場合）
－用量－死亡曲線と勾配（測定方法によって可能な場合）
－病理所見
－他の性での試験があればその結果

・結果の解釈

皮膚（経皮）経路による急性毒性試験と経皮 LD50 の測定は、皮膚暴露経路による物質の相対的毒性の推定評価を可能とする。

急性経皮毒性試験

動物における急性経皮毒性試験の結果と経皮 LD50 値をヒトに外挿することは限られた範囲でのみ妥当である。急性経皮毒性試験の結果は、他の経路による急性毒性試験のデータと関連づけて考慮すべきである。

４．文献

1. WHO Publication: Environmental Health Criteria 6, Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Part I, Geneva, 1978.
2. National Academy of Sciences, Committee for the Revision of NAS Publication 1138, Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances, Washington, 1977.
3. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., J. Pharmacol., Exp. Ther., 96, 99~113, 1949.
4. Bliss, C. I., Quart. J. Pharm. Pharmacol., 11, 192~216, 1938.
5. Finney, D. G., Probit Analysis. (3rd Ed.) London, Cambridge University Press 1971.
6. Weil, C. S., Biometrics, 8, 249~263, 1952.
7. Thompson, W., Bact. Rev., 11, 115~141, 1947.
8. Miller, L. C. and Tainter, M. L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. NY, 57, 261~264, 1944.

7