OECD/OCDE

1981/05/12

試験ガイドライン No.403

急性吸入毒性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (1981), Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-403-1981.pdf

©OECD (1981)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の 試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

急性吸入毒性試験

１．序論

・基礎的前提条件

－ガス、揮発性物質またはエアゾール（粒子状物質）
－被験物質の化学的確認
－被験物質の純度（不純物）
－液体；蒸気圧、沸点
－エアゾール／粒子状物質；粒径、粒子形と密度分布
－引火点
－爆発点

・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

ガス、揮発性物質またはエアゾール（粒子状物質）などの吸入可能な物質の毒性の判定および評価に際して、急性吸入試験の実施は最初のステップである。それによって、吸入経路による短期間暴露から生ずるおそれのある健康障害に関する情報が得られる。急性毒性試験の成績は分類および表示のための基礎として役立つであろう。その成績は亜急性およびその他の試験における用量決定の第１段階であり、被験物質の毒性作用様式に関する追加情報を与えるであろう。

・定義

急性吸入毒性とは、吸入可能な物質に１回、短時間（24時間またはそれ以下）にわたり連続吸入暴露することにより生ずる好ましくない影響のすべてである。

LC50（半数致死濃度）とは、特定の期間暴露した動物の 50%が暴露中または暴露後一定期間内に死亡すると期待される物質の濃度を統計学的に算出したものである。LC50 値は一定の空気容量あたりの被験物質の重量（mg/l）または ppm で表示する。

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。

403

急性吸入毒性試験

・試験法の原則

１群１濃度とし、数群の動物に被験物質を各段階の濃度で一定期間暴露する。暴露環境中において適切な濃度にするために溶媒を使用する場合は、溶媒暴露群の試験を行うべきである。その後に各種の影響や死亡の観察を行う。また試験中に死亡した動物は剖検し、試験終了時まで生存した動物は屠殺して剖検する。

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。試験環境中の被験物質を一定濃度にするため、必要に応じて適当な溶媒を被験物質に加えることもある。

・試験動物

動物種の選択

数種の哺乳動物が使用されるが、好ましい種はラットである。一般に使用されている系統を使用する。試験に使用する動物の個体間または群間の体重の変動は平均体重の±20%以内とする。

動物数と性

各濃度群について少なくとも 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹）とし、雌の動物は未経産で非妊娠動物を用いる。

飼育および給餌条件（暴露前と暴露後）

試験動物室内の温度は 22℃±3℃、相対湿度は 30～70%とし、人工照明の場合には 12 時間間隔で明暗を切替える。

急性吸入毒性試験

飼料は一般飼料を使用し、水は自由摂取とする。動物は性別ごとに群飼いするが、1ケージあたりの動物数は個々の動物が十分に観察できる匹数とする。

・装置

適切な19%の酸素濃度と均一分布した暴露環境を確保し、1時間あたり12～15回の換気を維持できるようにデザインした吸入装置で動物試験を行う。チャンバーを使用する場合は、試験動物の密集を最小限にし、かつ被験動物への暴露が最大になるようにデザインする。チャンバー内の環境の安定性を確実にする一般的な方法としては使用動物の総容積をチャンバー容積の 5%以内にするとよい。他の方法として口・鼻部暴露、頭部暴露、全身個別チャンバー暴露法等を使用することができる。

適切な濃度分析管理装置を備えた吸入装置を用いる。装置内全体の条件が本質的に同一であるように空気流量を調整する。チャンバー内をわずかに陰圧に維持することで、周囲への被験物質の漏洩が防止できる。

・試験条件

暴露濃度

濃度段階は十分な数とし、少なくとも3段階、また実験群に毒性作用がみられる範囲で濃度－死亡曲線が描けるよう、さらにLC50の算出が可能なように設定する。被験物質の爆発の可能性がある場合には、爆発濃度にならないように注意する。適切な暴露濃度を確立するために予備試験が勧められる。

限度試験

吸引可能な物質の実際濃度が5 mg/lで4時間暴露、あるいはこれが被験物質の物理的あるいは化学的性状のために不可能な場合には得られる最高濃度を用いて記述した方法による試験を行い、

403

急性吸入毒性試験

化合物に関連性のある死亡が生じない場合にはそれ以上の 3 用量段階を使用する本試験を行う必要はないであろう。

揮発性物質については吸入障害試験（付属書参照）を考慮する。

暴露時間

暴露時間は、チャンバー内濃度が平衡に達した後少なくとも 4 時間とする。特別な要求に合わせて時間を変えることも必要であろう。

観察期間

観察期間は少なくとも 14 日間とするが、厳格に固定すべきではない。それは毒性反応と症状出現頻度や回復期間の長さなどにより決定されるべきで、必要ならば延長してもよい。毒性徴候がみられた時間と死亡時間は重要であり、とくに死亡発現が遅れる傾向がある場合には重要である。

・試験の実施

暴露直前に動物の体重を測定し、その後指定した装置で試験濃度に 4 時間暴露する。試験を行う温度は 22±2℃に維持する。理想的には、相対湿度は 30～70%に維持するが、ある場合には（たとえばエアゾールの試験）この条件は実行できないであろう。給餌は、暴露中は行わない。給水も、場合によっては行わない。

・物理的測定項目

次の事項について測定またはモニタリングを行う。

(a) 流量（できれば連続的）

(b) 暴露中被験物質の実濃度をできるだけ一定に保つ。

(c) 発生装置の開発にあたっては、エアゾール濃度の安定性を確認するための粒子サイズの分析を実施する。暴露中、粒度分布の恒常性を測定する目的で必要に応じ繰り返し分析を行う。

(d) 温度と湿度（できれば連続的）

・臨床観察

暴露中および暴露後の観察を行い、系統的に記録する。それぞれの動物について個別に記録をとる。毎日１回以上、注意深い臨床的観察を行う。試験動物の損失を最小限にするためには、さらに毎日注意して観察する。たとえば、死亡動物を発見しだい剖検もしくは冷蔵し、衰弱ないし瀕死の動物の隔離または屠殺などの適切な処置をとる。ケージサイドの観察はとくに限定しないが下記の項目を含むべきである。皮膚、眼、粘膜、呼吸系、循環系、自律神経ならびに中枢神経系、および全身運動と行動パターンの変化、振せん、けいれん、流涎、下痢、嗜眠、睡眠ならびに昏睡の観察にはとくに注意する。死亡時間はできる限り正確に記録する。動物の個別体重は暴露後週１回と死亡時に測定する。体重変化は１日以上生存した場合には計算し、記録する。試験終了時に生存している動物は体重測定を行い、屠殺する。

・病理

動物の剖検では、とくに気道にどのような変化を起こしたか特別の注意をもって行うことを考慮する。他の臓器が関与している可能性を示す毒性徴候がある場合は、これらの臓器も調べ、かつすべての肉眼的病理変化を記録する。有益な情報が得られるため、標的器官の顕微鏡的検査を考慮する。

３．データおよび報告

・結果の処理

成績は群ごとに、試験開始時の動物数、個別動物の死亡時間、毒性徴候を示した動物数、毒性変化ならびに剖検所見を表の形にまとめる。

LC50（半数致死濃度）は容認されている方法、たとえば、Bliss 5)、 Litchfield and Wilcoxon 4)、 Finney 6)、 Weil 7)、 Thompson 8)、 Miller and Tainter 9)らの方法で求めることができる。

・結果の評価

LC50 は観察した毒性作用および剖検所見と関連させて考慮する。LC50 値は比較的大まかな測定値で、吸入した被験物質の分類や表示の目的での参考値としてのみ有用であり、また吸入により致死効果が現れる危険を示すのに役立つ。LC50 値を得た実験動物種の成績を常に参考にすべきである。評価には、認められたすべての異常、たとえば一般行動や臨床的な異常、肉眼的障害、体重変化、致死作用、ならびに他の毒性作用などの発生頻度および程度と被験物質の動物への暴露との関連性を含むべきである。

・試験報告書

試験報告には下記の情報を含む。

試験条件

デザイン、タイプ、大きさ、空気源、エアゾールおよび粒子発生系、環境空気調整の方法、排気の処理、さらにこれを使用したときのチャンバー内への動物の収容の方法を含めた暴露装置の記録。

温度、湿度、エアゾール粒子の濃度とサイズを測定する装置について記述する。

急性吸入毒性試験

暴露成績

下記の項目を含め、これらを表示し、平均値と変動値（たとえば標準偏差）を明記する。

－吸入装置の空気流動率（Air flow rates）

－空気の温度と湿度

－理論濃度（吸入装置内に投与した被験物質の総量を空気量で割った値）

－呼吸区域での実測濃度

－粒子サイズ中央値

動物に関するデータ

－動物種と系

－性と群別の反応データ表（すなわち死亡動物数、毒性徴候を示した動物の数、暴露動物数）

－暴露中または暴露後の死亡時間

－観察期間終了時の性別ごとの LC50（用いた計算方法）

－LC50 の 95%信頼限界

－用量－死亡曲線と勾配（計算方法により可能な場合）

－観察された障害と異常の記録を含む剖検所見と組織学的所見

・結果の解釈

LC50 の測定によって吸入した物質の相対的な毒性の推定が可能と考えられる。実験動物による LC50 値と急性毒性試験の結果をヒトに外挿することは非常に限定された場合にのみ妥当である。

４．参考文献

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

５．付属書

吸入障害試験

１．序論

・基本的前提条件

－揮発性の液体または昇華しやすい固体の被験物質
－被験物質の化学的同定
－被験物質の純度（不純物）
－蒸気圧、沸点
－引火点
－爆発性

・基準となる文書

適切な国際的基準はない。

急性吸入毒性試験

２．試験法

A. 緒言、目的、範囲、関連性、適応および限界

揮発性物質を取り扱うときの危険性はその毒性ばかりでなく、揮発性（例、液体の場合の沸点）にもよる。危険性の評価として、LC50 値をもとにした毒性だけでは十分でなく、その物質の揮発性も常に考慮する。このように、強い毒性を持ち揮発性の低い物質も、弱い毒性を持ち揮発性の高い物質も等しい吸入障害を示すであろう。

十分に検討した急性吸入試験や LC50 の測定と比較すると、この試験はより簡単である。非常に長い期間の暴露（7 時間）や吸気中の最高に近い濃度によっても、動物が変化を示さない場合は、危険性の評価に際して大きな安全域があることを示している。動物が死んだ場合には、さらに実験を行うことを考慮する必要がある。

吸入障害試験を行う決定を下す場合には、揮発性物質による障害のみを試験することができるものとして、ヒトに起こると思われる暴露の条件について考慮する。吸入障害試験は、人間が暴露される条件下で揮発性の物質に利用されるであろう。

吸入障害試験は経験的な方法だといえる。したがって、その結果は、実験デザインの詳細さに依存する。とくに空気の流れ、発生装置内の被験物質の総量または暴露室の大きさが重視される。

・定義

急性吸入毒性とは、吸入可能な物質に１回短時間（24 時間またはそれ以下）にわたり連続吸入暴露することにより生ずる好ましくない影響のすべてである。

LC50（半数致死濃度）とは、ある物質を特定の時間暴露した動物の 50%が、暴露中または暴露後一定時間内に死亡すると期待される物質の濃度を統計学的に算出したものである。LC50 値は、一定容量の空気に対する被験物質の重さ（mg/l）または ppm で示される。

急性吸入毒性試験

・試験法の原則

被験物質に空気を通過させると、その物質の蒸気圧またはその他の性質により変化はあるが、揮発または昇華によってその気中濃度は大となる。混合気中の物質の濃度を測定する。動物はこの混合気内に一定時間暴露し、その動物を 14 日間観察する。暴露中（またはその後）に死亡を起こさずにその混合物を吸入できる期間が評価に関係する。

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。飼料と水は暴露前に制限しない。

・試験動物

動物種の選択

数種の動物が使用できるが、他の急性毒性試験成績と比較するのにはラットが一番適切な種である。通常用いられている系の健康な若い成熟ラットを使用し、試験動物集団の体重幅は±20%以内とする。

動物数と性

少なくとも 10 匹（雄 5 匹，雌 5 匹）を各々の暴露時間に割りあてる。雌は未経産で非妊娠動物とする。

飼育と給餌条件

動物室の温度は 22℃（±3℃）として相対湿度は 30～70%にする。人工照明の場合には 12 時間間隔で明暗を切替える。給餌は通常の飼料を用い水とともに自由に与える。

急性吸入毒性試験

・装置

全身暴露系を使用する。暴露室の容積を明確にし、20L をこえないようにする。

・試験条件

暴露濃度と時間

各試験条件下で最大限の濃度とする。

第 1 段階として、また最大時間として 7 時間暴露を行う。暴露中または観察期間中に死亡動物がみられた場合には、暴露時間を減じながら（たとえば 1 時間、10 分間）死亡がみられなくなるまで繰り返す。

観察

観察期間は少なくとも 14 日間とする。しかし、観察期間は厳格に限定するべきではない。それは毒性作用、その発現の割合と回復期間の長さによって決定するべきで、必要に応じて延長する。毒性の発現と消失時間と死亡時間は重要であり、死亡遅延がみられる場合にはとくに重要である。

綿密な臨床観察を 1 日 1 回以上行い、さらに試験動物の損失を防ぐために死亡動物の冷蔵保存や、衰弱あるいは瀕死状態の動物を隔離または屠殺するなど適切な処置が取れるよう毎日観察を行う。

・試験の実施

暴露前の除餌は必要としない。暴露直前に体重を測定し、その後一定時間、被験物質と空気との混合物に動物を暴露する。暴露中、飼料と水は与えない。ケージサイドの観察項目は、皮膚、毛、眼、粘膜、呼吸、循環、自律神経、中枢神経、全身運動、そして一般行動の変化を含む。

急性吸入毒性試験

振せん、けいれん、流涎、下痢、嗜眠、睡眠および昏睡に特別な注意を払う。麻酔や気道および粘膜刺激作用の徴候がとくに暴露中にみられるときは重要である。死亡時間はできる限り正確に記録し、動物の体重は1週間間隔で測定する。実験終了時には、動物の体重を測定し、屠殺する。

被験物質の混合気中濃度を把握しておく。

動物は 20℃で蒸発した物質を多量に含む空気を吸入する。この目的のために1時間あたり600Lの空気をフリットガラス製D1（孔径90～150 μm）を通して、深さ50 mm（12 0ml相当）まで被験物質を入れた上部のガラスビンに送る。フリットガラスの直径は、空気ができる限り均一に、全体を通してあわ立つように寸法を決める。ガラスビンはサーモスタットで 20±1℃にセットされた温浴槽中に置く。

より少ない量の被験物質と空気を使用して試験を行うこともあるが、その際にも同比率で行うべきである（例、1時間あたり200 Lの空気と約40 mlの被験物質)。フリットの直径は被験物質の深さが50 mmに止まるように選ぶ。

空気と被験物質の混合物を暴露系へ導く。暴露開始30分後、ガラスビンは被験物質を満たした新しいビンと交換し、残りの実験中使用する。

もし揮発性が高く30分以内に使いきってしまう場合､少なくとも最初の1時間は一貫した被験物質と空気の混合が行われるようにたびたび新しい物質を加える。

・病理

試験中に死亡または試験の終りに屠殺した際に、明らかな毒性作用の徴候がみられた動物の肉眼的所見には考慮を払う。剖検所見をとる場合、腸管や肝、腎、心、脳、そして脾などの主要臓器の病理変化を記録する。気道系は注意深く観察を行う。肝、腎、呼吸器系、ならびに12時間またはそれ以上生存した動物で肉眼的所見がみられた臓器については、有益な情報が提供されるかもしれないので、顕微鏡的検査を考慮する。

急性吸入毒性試験

３．試験成績と報告

・結果の処理

次の項目について報告する。

－使用した動物種と系
－被験物質の濃度
－暴露時間ごとの動物の個別死亡時間
－その他の毒性徴候を呈した動物の数
－毒性の知見
－病理所見

各群の生存動物数と暴露時間中死亡した動物数を比較する。

・結果の評価

記録された死亡は、体重変化や剖検所見を含む他の毒性作用とともに考察する。

吸入障害試験は、通常の暴露条件下で被験物質を取り扱う際に発生することがある障害を示す実験とみなされる。これはある物質の吸入時の毒性を性格づけるものではない。もし、吸入障害試験で死亡または激しい症状を示した場合は、LC50 の算出を含めてさらに吸入毒性の検討を考慮する。吸入障害試験では長時間暴露と最大限の濃度近くの物質が用いられるので、危険性評価にあたってヒトで起こり得る状況を考慮しなければならない。

・試験報告

試験報告には下記項目を含む。

－性別、期間／濃度別の反応成績の表
－暴露中または暴露後の死亡時間
－暴露ごとの暴露動物数に対する死亡動物数
－剖検所見

・結果の解釈

結果は、揮発性物質暴露の際の１回の吸入時の障害だけを示すものである。7 時間暴露で死亡がみられない場合、その通常の暴露条件下での吸入障害はおよそないと推定できるであろう。7 時間暴露中または暴露後に死亡が起こり、１時間暴露では死亡がみられない場合、吸入障害が起こる可能性がある。もし１時間暴露の間あるいはその後に死亡が起こり、10 分間暴露で死亡がみられない場合には吸入障害があると考えられる。10 分間暴露で死亡がみられた場合には激しい吸入障害がある。どのような障害の証拠でも得られた場合には、LC50 値算定を含む十分な急性吸入毒性試験を行う（ガイドライン 403 参照）。

４．参考文献

1. H.F. Smyth, C.P. Carpenter and C.S. Weil, *Am. Ind. Hyg. A ssoc. J.*, *23*, 95, 1962.