OECD/OCDE

2009/09/07

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 (2009), 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/publications/reports/2024/10/replaced-and-deleted-test-guidelines-2024/TG-403-acute-inhalation-toxicity-2009.pdf

©OECD (2009)

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

2009 年 9 月 7 日採択

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

急性吸入毒性試験

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学的進歩、規制ニーズの変化および動物愛護に関する配慮を踏まえて定期的に見直しされている。急性吸入毒性試験の試験ガイドライン 403（TG 403）の初版が採択されたのは 1981 年である。改訂 TG 403(1)である本試験ガイドラインは、より柔軟な試験を可能とし、使用動物数を減らし、変化した規制ニーズに対応するよう設計されたものである。本試験ガイドラインでは、LC_{50} によって評価する従来法に加えて、濃度とその持続時間の積によって評価する方法（C×t 法）が採用されている。本試験ガイドラインの主な特徴は、生存転帰をとった濃度から死亡転帰をとった濃度までの濃度範囲で濃度反応関係が得られ、半数致死濃度（LC_{50}）、非致死閾値濃度（たとえば 1%致死濃度［LC_{01}］）および濃度反応曲線の傾きが求められること、ならびに感受性の性差を検出可能なことである。C × t 法は、複数の暴露時間での評価が必要な規制ニーズまたは科学的ニーズがある場合、たとえば緊急時対応計画のため（たとえば急性暴露ガイドラインレベル［AEGL］、緊急時対応計画ガイドラインレベル［ERPG］または急性暴露閾値レベル［AETL］を求めるため）や土地利用計画のために、使用する。

2. TG 403 試験の実施および結果の解釈に関するガイダンスは、急性吸入毒性試験に関するガイダンス文書（GD 39）(2)に示している。

3. 本試験ガイドライン中で用いた用語の定義は GD 39(2)に示している。

4. 本試験ガイドラインでは、被験物質の特徴付けおよび定量的リスク評価が可能なうえ、国連（UN）の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）(3)に従って、被験物質をランク付けおよび分類することが可能である。適切な急性吸入毒性試験ガイドラインを選択するためのガイダンスを、GD 39(2)に示している。被験物質の分類および表示に関する情報のみが必要な場合は通常、試験ガイドライン 436（TG 436）(4)が推奨される（GD 39(2)を参照）。本試験ガイドラインは、特殊な化学物質（たとえば溶解性の低い油水等容性もしくは繊維状の物質、またはナノマテリアル製品）の試験でも使用できるよう特に意図として作成されたものではない。

最初に考慮すべき事項

5. 使用動物数を最小限とするため、本試験ガイドラインに従った試験の実施を検討する前に、試験を実施する必要がないことを立証するデータが存在しないかどうか、過去に実施した試験（たとえば TG 436(4)）の情報なども含め、被験物質に関する入手可能なすべての情報を試験実施施設で検討する。最適な動物種、系統、雌雄、暴露法および暴露濃度を選択するうえで役立つ可能性がある情報は、被験物質の特定、化学構造および物理化学的特性、あらゆる *in vitro* または *in vivo* 毒性試験の結果、被験物質の予想用途とヒトへの暴露の可能性、（Q）SAR データおよび構造類似化合物の毒性データなどである（GD 39(2)を参照）。

6. 腐食性または刺激性物質を、重度の疼痛や苦痛を生じさせることが予測される濃度で試験することは、できる限り避ける。被験物質の腐食性／刺激性の有無は、不要な試験の実施を避けるために、ヒトおよび動物への暴露に基づく知見（たとえば、非腐食／非刺激濃度で実施された

© OECD（2009 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

反復投与試験の知見）、過去に実施した試験（例えばTG 430(5)、TG 431(6)、TG 435(7)）から得た *in vitro* データ、pH 値、類似化合物の情報およびその他の適切なデータなどから、専門家が判断して評価すべきである。本試験ガイドラインでは、試験責任者または試験主任者が選択可能な目標濃度に制限を設けているため、規制ニーズがある場合（たとえば緊急時対応計画のため）、腐食性または刺激性物質を動物へ暴露してよい。被験物質の目標濃度は重度の刺激作用／腐食作用を生じさせるものであってはならないが、規制上の目的および科学的目的が達せられる濃度まで濃度反応曲線が得られるものでなくてはならない。目標濃度は、適宜、被験物質ごとに選択すべきであり、選択した濃度についてはその妥当性を示すこと（GD 39(2)を参照）。

試験の概要

7. 改訂 TG 403 である本試験ガイドラインは、被験物質を分類するために被験物質の急性毒性について十分な情報が得られるよう、また定量的リスク評価が必要な場合に雌雄双方または一方で致死濃度データ（たとえば LC_{50}、LC_{01}、濃度反応曲線の傾き）が得られるように設計されている。本試験ガイドラインでは、2 種類の試験方法が採用されている。第 1 の方法は従来法、すなわち所定の暴露時間（通常 4 時間）の間、限界濃度（限度試験）または一連の濃度に段階的に動物群を暴露する試験方法である。規制によっては、その規制特有の目的を満たすために、4 時間以外の他の暴露時間を適用してもよい。第 2 の方法は C × t 法、すなわち複数の暴露時間の間、1 段階の濃度（限界濃度）または一連の濃度段階に動物群を暴露する試験方法である。

8. 瀕死動物や、明らかに痛がったり、強い持続的な苦痛の徴候を示したりしている動物は安楽死させ、試験結果の解釈ではこれらを死亡動物と同じものとして扱う。瀕死動物や非常に苦しんでいる動物を安楽死させる際の判断基準、および予期される死亡や瀕死の見分け方については、人道的エンドポイントに関する OECD ガイダンス文書 No.19 (8)に示している。

試験方法

動物種の選択

9. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。試験の動物種としてはラットが望ましい。他の動物種を用いる場合には、その妥当性を示すこと。

動物の準備

10. 雌は未経産で非妊娠のものを用いる。各個体の週齢は、暴露日に 8～12 週齢とし、体重は先に暴露した同週齢の動物の雌雄別平均体重の ± 20%以内とする。動物を無作為に選び、個体識別ができるように印を付け、試験開始前に飼育ケージで 5 日間以上飼育して飼育室環境に馴化させる。新しい環境に対するストレスを軽減するために、試験開始前の短期間の間、試験装置にも馴化させる。

動物の飼育

11. 動物飼育室の温度は 22 ± 3ºC とする。相対湿度は理想的には 30～70%に維持するが、水を溶媒として使用した場合、30～70%の相対湿度を維持することが不可能な場合がある。暴露前後の飼育は通常、性別および暴露濃度別ごとに群飼育する。1 ケージあたりの動物数は、各個体を

明確に観察するのに差し支えなく、かつ喰殺および闘争行動による供試動物の損失が最小限となるような動物数とする。鼻部暴露を予定している場合、固定チューブに供試動物を馴化させる必要が生じる場合がある。固定チューブは過度の物理的ストレス、熱ストレスまたは運動抑制ストレスを供試動物に強いるものであってはならない。供試動物を固定すると、体温（体温上昇）や分時換気量などの生理学的評価項目に影響がみられる可能性がある。固定しても測定できるほどの変化が生じないことを示す一般的データが得られる場合、供試動物を事前に固定チューブに馴化させる必要はない。エアロゾルを全身に暴露させる場合、暴露中は供試動物を個別に収容する。これは、ケージ内同居動物の体毛によってエアロゾルが取り除かれるのを防ぐためである。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲料水は、被験物質の暴露時を除き、水道水を自由に摂取させる。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。

吸入チャンバー

12. 吸入チャンバーの選択にあたっては、被験物質の性質と試験の目的を考慮する。暴露方法としては、鼻部暴露が望ましい（鼻部暴露には頭部暴露、鼻部暴露または口・鼻部暴露を含むこととする）。鼻部暴露は、液体もしくは固体のエアロゾルの試験、または凝縮してエアロゾルとなる蒸気の試験で一般的に望ましいとされる暴露方法である。試験の目的によっては、その目的を遂げるために全身暴露の方が望ましい場合がある。そのような場合、全身暴露を採用した妥当性を試験報告書に示すこと。全身チャンバーを使用する場合、チャンバー内の環境を安定化させるため、供試動物の総容積はチャンバー容積の 5%以下とする。鼻部暴露法および全身暴露法の原則、ならびにそれらの暴露法の長所と短所は GD 39(2)に示している。

暴露条件

各濃度での暴露

13. ラットに鼻部暴露を実施する場合、暴露時間は最長 6 時間までとする。マウスに鼻部暴露を実施する場合、暴露時間は通常 4 時間以下とする。暴露時間がこれらより長くなる場合、その妥当性を示すこと（GD 39(2)を参照）。全身チャンバーを用いてエアロゾルを暴露させる場合、供試動物は個別に収容する。これは、ケージ内同居動物の体毛によって被験物質が取り除かれるのを防ぐためである。暴露中は、飼料は与えてはならない。飲料水は、全身暴露中は与えてもよい。

14. 被験物質はガス、蒸気、エアロゾルまたはそれらの混合物として供試動物に暴露する。被験物質をどのような物理的状態で暴露させるかは、被験物質の物理化学的特性、選択した暴露濃度、あるいは取扱い中や使用中に最もよくみられるであろう被験物質の物理的形態によって決定する。吸湿性または化学的反応性が高い被験物質の場合、乾燥環境下で試験を行うこと。爆発濃度にならないよう、注意する。

粒径分布

15. すべてのエアロゾルおよび凝縮してエアロゾルとなる可能性がある蒸気では、粒径測定を行う。関連する気道領域すべてが暴露されるよう、エアロゾルの空気動力学的粒径（MMAD）は 1～4 µm、幾何標準偏差（σg）は 1.5～3.0 であることが望ましい(2)(9)(10)。この基準を満たすべく合理的な努力を重ねたにもかかわらず、基準が達成されなかった場合、専門家の見解を示すこ

© OCDE（2009 年）

と。たとえば金属フュームではこの基準より低く、荷電粒子、繊維および吸湿性物質（気道中の水分により粒径が増加する）ではこの基準より高くなる可能性がある。

溶媒を用いた被験物質の調製

16. 試験空気中の被験物質の粒径および濃度を適切なものとするために、溶媒を使用してもよい。使用溶媒は原則として水が望ましい。粒子状物質が被験物質の場合、要求される粒径分布を満たすために機械的処理が必要となる場合もあるが、被験物質が分解したり変化したりしないよう注意する。機械処理（たとえば、過度の粉砕による極高温の摩擦熱）によって被験物質の組成が変化したと考えられる場合、被験物質の組成を分析によって確認する。被験物質が汚染されないよう、適切な注意を払うこと。吸入不可能となるように意図的に処方された難破砕性の顆粒状物質は、吸入毒性試験を行う必要はない。顆粒状物質については、摩耗試験を実施して、吸入性粒子[訳注：肺胞到達性粒子]が生じていないことを立証する。摩耗試験によって吸入可能な粒子が生じることが明らかになった場合、吸入毒性試験を実施する。

対照動物

17. 同時陰性対照（空気）群は不要である。適切な試験空気を調製するために水以外の溶媒を使用した場合、吸入毒性に関する背景データがない場合に限って溶媒対照群を設定する。被験物質と溶媒の混合物について毒性試験を別途実施した結果、当該混合物に毒性がないことが明らかになった場合、当該溶媒は検討した濃度で非毒性であるとみなすことが可能である。したがって、溶媒対照群は不要である。

暴露条件のモニタリング

チャンバー内の空気流量

18. チャンバー内の空気流量は注意深く制御し、連続的にモニタリングする。その結果は、各暴露中少なくとも 1 時間おきに記録する。試験空気中の被験物質濃度（すなわち試験空気の安定性）のモニタリングはすべての動力学的パラメータの積分測定であり、これによって、関連するすべての動力学的試験空気調製パラメータを非直接的に管理することが可能である。暴露システム内の気流の流れが試験空気の気流の流れとして適していない場合、鼻部暴露チャンバー内で呼気の再呼吸が起きないよう特別な配慮を払うこと。任意の運転条件下で呼気の再呼吸が発生してないことを立証するためには、所定の方法論を使用することができる(2)(11)。酸素濃度は 19%以上、二酸化炭素濃度は 1%以下とする。これらの基準が満たされていないと考えられる理由がある場合、酸素濃度および二酸化炭素濃度を測定する。

チャンバー内の温度および相対湿度

19. チャンバー内の温度は 22 ± 3ºC に維持する。鼻部暴露および全身暴露のいずれにおいても、供試動物の呼吸区域の相対湿度をモニタリングし、暴露時間が 4 時間以下の場合は暴露時間中に 3 回以上、暴露時間がより短時間の場合は 1 時間おきに相対湿度を記録する。相対湿度は理想的には 30～70%に維持するが、この相対湿度が実現不可能な場合（たとえば、水性調製品を試験する場合）や測定不能な場合（たとえば、被験物質が試験方法に干渉する場合）もある。

被験物質：設定濃度

20. チャンバー内の暴露設定濃度を、その濃度が実現可能かどうかにかかわらず算出し、記録する。設定濃度とは、試験空気調製のために使用した被験物質の総量を、チャンバー内を通過した総空気量で除した値である。設定濃度は暴露結果の特徴付けには使用しない。ただし、設定濃度と実測濃度を比較することによって試験系の試験空気調製能がわかるため、設定濃度と実測濃度の比較値を試験空気調製上の問題を検出するために使用してもよい。

被験物質：実測濃度

21. 実測濃度とは、吸入チャンバー内の供試動物の呼吸区域における被験物質の濃度である。実測濃度は、被験物質に特異的方法（たとえば、試料を直接採取し、吸着または化学反応による反応後に分析評価を行うなどの方法）または非特異的方法（たとえばフィルターを用いた重量分析）で求めることが可能である。重量分析は、単一成分の粉末のエアロゾルまたは低揮発性液体のエアロゾルに限って使用してよいが、被験物質に特異的な適切な評価を事前に実施して裏付けを得ること。多成分の粉末のエアロゾルも重量分析によって実測濃度を求めることが可能であるが、これには空気中に漂うエアロゾルの組成がエアロゾル調製前の出発原料の組成と同じであることを立証する分析データが必要である。この情報が得られない場合、試験中定期的に被験物質（理想的には、空気中に漂うエアロゾルの状態のもの）を再分析する必要があるであろう。蒸発または昇華する被験物質のエアロゾルについては、選択した方法によってすべての物理的形態の被験物質が捕集されたことを示すこと。目標濃度、設定濃度および実測濃度を試験報告書に記載するが、致死濃度を算出する統計解析に使用するのは実測濃度のみである。

22. 被験物質は、可能な限り同一ロットのものを用いる。被験物質はその純度、均一性および安定性が維持される条件下で保存する。試験開始前に、被験物質の純度に加え、技術的に実現可能な場合、被験物質の特定および構造既知の汚染物質／不純物の定量などの評価を実施する。これらの評価は次に示すようなデータを用いて行うことが可能である：保持時間、相対ピーク面積、質量分析またはガスクロマトグラフィー分析による分子量、その他の推定値など（ただしこれらに限定されるものではない）。被験物質の特定は試験実施施設の責務ではないが、試験委託者による結果を限られた方法（色、物理的性状など）ででも確認した方が賢明である。

23. 暴露空気は可能な限り一定に維持する。暴露空気は、分析方法に合わせて連続的または間欠的にモニタリングする。間欠的に試料を採取する場合、チャンバー内の空気試料を 4 時間に 2 回以上採取する。空気流量が少ない、または濃度が低いなどの理由によって複数回の試料採取が実現不可能な場合、暴露時間全体を通じて試料採取を 1 回としてもよい。試料間で顕著な変動がみられた場合、次回の濃度測定時、暴露時間中の試料採取回数を 4 回とする。個々のチャンバー内実測濃度は、ガスおよび蒸気のエアロゾルの場合で平均実測濃度の ± 10%以内、液体または固体のエアロゾルの場合で平均実測濃度の ± 20%以内とする。チャンバー内が平衡に達するまでの時間（t_{95}）を算出して記録し、暴露時間には、被験物質から試験空気を調製している時間を含む。暴露時間にはまた、チャンバー内が平衡に達するのに必要な時間（t_{95}）も考慮に入れる。t_{95} の推定に関するガイダンスは GD 39(2)に示している。

24. ガス／蒸気およびエアロゾルから成る非常に複雑な混合物（被験物質が燃焼空気である場合、または使用のたびに最終製品／装置から噴射されるものである場合）は、各物理的形態（ガス／蒸気およびエアロゾル）が吸入チャンバー内で異なる挙動を示す可能性があるため、物理的形態ごとに少なくとも 1 つの指標物質（測定対象物質）を選択する。指標物質には通常、被験物質成分中の主要有効成分を選択する。被験物質が混合物（たとえば製剤）である場合、有効成分

© OCDE（2009 年）

または指標物質（測定対象物質）の濃度だけでなく、製剤全体としての濃度も報告する。実測濃度に関するその他の情報はGD 39(2)に示している。

被験物質：粒径分布

25. エアロゾルの粒径分布を、カスケードインパクターまたは空気動力学的粒径測定装置などのその他の装置を用いて、4 時間の暴露時間中に 2 回以上測定する。カスケードインパクターで得られた結果とその他の装置で得られた結果が同等であることが立証された場合、それ以降の粒径分布測定ではその他の装置を使用してもよい。主装置の捕集能を確認するため、重量分析用フィルターまたはインピンジャー／ガスバブラーなどの第 2 の装置を主装置と並行して使用する。粒径分析によって求めた質量濃度は、フィルター分析によって求めた質量濃度の合理的な限界値の範囲内に収まるものとする（GD 39(2)を参照）。試験の初期段階で同等性が立証された場合、それ以降、この確認測定を省略してもよい。動物愛護の理由から、暴露のやり直しに至る可能性がある非確定的なデータが極力得られないよう対策を講じること。被験物質が蒸気の場合でも、蒸気が凝縮してエアロゾルが発生する可能性がある場合、または蒸気中に粒子が検出されたことから混合相の可能性がある場合には、粒径測定を実施する（段落 15 を参照）。

試験手順

26. 2 種類の試験法（従来法および C × t 法）の試験手順を以降に示す。従来法は予備試験、主試験または限度試験、C × t 法では限界濃度での試験から構成される。感受性に性差があることが知られている場合、試験責任者は感受性が高い性のみを用いて試験を実施することにしてもよい。ラット以外のげっ歯類を用いて鼻部暴露を行う場合、種特異的な苦痛を最小限とするために、最長暴露時間を調整してもよい。使用動物数を最小限とするため、入手可能なすべての情報を試験実施前に検討する。たとえば、TG 436(4)から得られたデータがある場合、予備試験を省略することが可能なうえ、感受性に性差があるかどうかも立証することが可能である（GD 39(2)を参照）。

従来法:

全般的な考慮事項：従来法

27. 従来法では、鼻部暴露チャンバーまたは全身暴露チャンバーのいずれかを用いて、所定の時間（通常 4 時間）の間、被験物質に動物群を暴露する。従来法では、限界濃度に動物群を暴露する限度試験、または 3 段階以上の濃度段階に段階的に動物群を暴露する主試験のいずれかを行う。被験物質に関する情報（たとえば TG 436 試験のデータ）がない場合、主試験に先立って予備試験を実施してもよい（GD 39(2)を参照）。

予備試験：従来法

28. 予備試験を実施する目的は、被験物質の吸入毒性を推定すること、感受性に性差があるかどうか確認すること、および主試験／限度試験の暴露濃度を選択するのに役立つ情報を得ることである。予備試験の暴露濃度は、入手可能なあらゆる情報（［Q］SAR データおよび構造類似化合物のデータなど）を検討して選択する。各濃度段階あたりの動物数は、雌雄各 3 例以下とする（性差の存在を立証するためには、各濃度あたり雌雄各 3 例が必要となる場合がある）。予備試験で検討する濃度段階は 1 段階でもよいが、必要に応じて複数の濃度段階で予備試験を行っても

よい。ただし、主試験に匹敵するほどの動物数および濃度段階数で予備試験を行うべきではない。過去に実施した TG 436 試験(4)を予備試験として使用してもよい（GD 39(2)を参照）。

限度試験：従来法

29. 事実上非毒性である（すなわち、規制で要求される限界濃度を超えた濃度でしか毒性反応が発現しない）ことが知られている、または予測される被験物質では、限度試験を実施する。限度試験では、雌雄各 3 例からなる 1 群に対し、被験物質を限界濃度で暴露する。被験物質の毒性に関する情報は、過去に試験が行われた類似化合物、類似混合物または類似製品の知見から得ることが可能であるが、毒性学的に重要であることが知られている成分の特定し、その含有率を考慮する。毒性についてほとんど情報がない被験物質または毒性であると予測される被験物質では、主試験を実施する。

30. 限界濃度は通常、規制要件に従って選択する。GHS の分類システムを使用する場合、ガス、蒸気およびエアロゾルの限界濃度はそれぞれ 20000 ppm、20 mg/L および 5 mg/L である（または達成可能な最大濃度である）(3)[訳注：”エアロゾル”は、GHS では“ミスト”と表記されている]。被験物質によっては、特に被験物質が蒸気およびエアロゾルの場合、限界濃度に調製するのが技術的に困難な場合がある。そのような場合、エアロゾルでは、呼吸性粒子の粒径（MMAD で 1～4 μm）を達成することを優先する。この粒径は、ほとんどの被験物質において 2 mg/L の濃度で達成可能である。エアロゾルでは、呼吸性粒子の粒径を達成している場合のみ、2 mg/L を超える濃度での試験を検討する（GD 39(2)を参照）。GHS は動物愛護の理由から、限界濃度を超える濃度での試験は実施しないよう勧告している(3)。限界濃度での試験は、その試験の結果とヒトの健康保護との間に直接的な関連がある可能性が非常に高い場合にのみ検討し(3)、その妥当性を試験報告書に示すこと。爆発の可能性がある被験物質の場合、爆発しやすい状態にならないよう注意する。不要な動物の使用を避けるために、限度試験の実施前に供試動物抜きで試運転を実施し、チャンバー内が限度試験の試験空気となっているかどうか確認する。

31. 限界濃度で死亡または瀕死が観察された場合、この限度試験の結果は、他の濃度で実施する今後の試験の予備試験として利用することができる（主試験を参照）。被験物質の物理的または化学的特性から限界濃度を達成するのが不可能な場合、達成可能な最高濃度で試験を実施する。達成可能な最高濃度で致死率が 50%未満であった場合、これ以上の試験は不要である。限界濃度に調製できなかった場合、その説明とそれを裏付けるデータを試験報告書に示すこと。被験物質が蒸気の場合、蒸気で達成可能な最高濃度で毒性反応がみられないときには、液体エアロゾルとして調製したうえで試験を実施する必要があるであろう。

主試験：従来法

32. 主試験は通常、3 段階以上の濃度で、各濃度あたり雌雄各 5 例（または、性差があることが明らかとなっている場合、感受性の高い性のみで各濃度 5 例）で実施する。頑健な統計解析ができるよう、十分な濃度段階数で試験を実施する。次濃度群への暴露を開始するまでの時間間隔は、毒性徴候の発現時期、その持続時間および重症度によって決定する。次濃度群への暴露は、現濃度での生存についてしかるべき確信が得られるまで実施すべきではない。この間に、試験責任者は次濃度群の目標濃度を変更してもよい。これは非常に複雑な技術によって左右されるため、吸入試験において常に現実的であるとは限らない。そのため、次濃度群への暴露はこれまでに得られた所見と科学的判断に基づいて実施する。被験物質が混合物の場合、GD 39(2)を参照のこと。

© OCDE（2009 年）

濃度とその持続時間の積による方法（C × t 法）

全般的な考慮事項：C×t 法

33. 吸入毒性の評価では、段階的な C×t 法を従来法の代わりに使用することを検討してもよい(12)(13)(14)。C × t 法では、複数の暴露時間および複数の濃度段階において被験物質を供試動物に暴露する。C×t 法はすべて、鼻部暴露で実施する（全身暴露は、C×t 法では現実的ではない）。本法のフローチャートを補遺 1 に示す。従来法と C×t 法ではいずれも頑健な LC_{50} が得られるが、頑健な LC_{01} および LC_{10} を得るには C × t 法の方が通常適しているということがシミュレーション解析から示されている(15)。

34. 動物数については、4 段階の濃度段階で 5 種類の暴露時間で主試験を実施する場合、各 C×t 群あたり 2 例（雌雄各 1 例または感受性の高い性 2 例）が一般的に適切であることがシミュレーション解析から立証されている。状況によっては、試験責任者は各 C × t 群あたり雌雄各 2 例を使用してもよい(15)。各 C×t 群あたり雌雄各 2 例を使用すると、推定値の変動およびバイアスを減らし、推定の成功率を上昇させ、より狭い信頼区間を得ることが可能である。ただし、動物数が各 C × t 群あたり 2 例（雌雄各 1 例または感受性の高い性 2 例）でも、データが十分に当てはまらない場合に追加暴露（すなわち 5 種類目の濃度での試験）を行うことで十分な推定が得られる場合がある。C × t 法の動物数および濃度段階数に関するガイダンスは GD 39(2)に示している。

予備試験：C×t 法

35. 予備試験を実施する目的は、被験物質の吸入毒性を推定すること、および主試験／限度試験の暴露濃度を選択するのに役立つ情報を得ることである。予備試験の動物数は、主試験の開始暴露濃度を適切に選択できるように、かつ使用動物数を最小限とするために、各濃度あたり雌雄各 3 例までとする（GD 39(2)の付録 III を参照）。性差の存在を立証する場合には、各濃度あたり雌雄各 3 例が必要な場合がある。予備試験の暴露時間は 1 種類とし、通常 240 分とする。供試動物抜きで技術的な試運転を実施し、適切な試験空気を調製することができるかどうか評価する。TG 436 試験(4)から死亡データが得られる場合、通常、予備試験を実施する必要はない。TG 403 試験の開始濃度を選択する際には、試験責任者は TG 436 試験(4)で観察された死亡の傾向を雌雄双方および全濃度において検討する（GD 39(2)を参照）。

開始濃度：C×t 法

36. 開始濃度（暴露セッション I）（補遺 1）は、限界濃度または試験責任者が予備試験に基づいて決定した濃度のいずれかとする。複数の暴露時間（たとえば 15、30、60、120、240 分）群について 1 群あたり雌雄各 1 例として、開始濃度で暴露を行う。使用動物数は計 10 例である（これを暴露セッション I と呼ぶ）（補遺 1）。

37. 限界濃度は通常、規制要件に従って選択する。GHS の分類システムを使用する場合、ガス、蒸気およびエアロゾルの限界濃度はそれぞれ 20000 ppm、20 mg/L および 5 mg/L である（または達成可能な最大濃度である）(3)。被験物質によっては、特に被験物質が蒸気およびエアロゾルの場合、限界濃度に調整するのが技術的に困難な場合がある。そのような場合、エアロゾルでは、2 mg/L の濃度で呼吸性粒子の粒径（MMAD で 1～4 μm）を達成することを優先する。これは、ほとんどの被験物質において達成可能である。エアロゾルでは、呼吸性粒子の粒径を達成してい

る場合のみ、2 mg/L を超える濃度での試験を検討する（GD 39(2)を参照）。GHS は動物愛護の理由から、限界濃度を超える濃度での試験は実施しないよう勧告している(3)。限界濃度を超える濃度での試験は、その試験の結果とヒトの健康保護との間に直接的な関連がある可能性が高い場合にのみ検討し(3)、その妥当性を試験報告書に示すこと。爆発の可能性がある被験物質の場合、爆発しやすい状態にならないよう注意する。不要な動物の使用を避けるために、開始濃度での試験の実施前に供試動物抜きで試運転を実施し、チャンバー内が開始濃度の試験空気となっているかどうか確認する。

38. 開始濃度で死亡または瀕死が観察された場合、当該濃度の結果は、他の濃度で実施する今後の試験の出発点として利用することが可能である（主試験を参照）。被験物質の物理的または化学的特性から限界濃度を達成するのが不可能な場合、達成可能な最高濃度で試験を実施する。達成可能な最高濃度で致死率が 50%未満であった場合、これ以上の試験は不要である。限界濃度に調製できなかった場合、その説明とそれを裏付けるデータを試験報告書に示すこと。被験物質が蒸気の場合、蒸気で達成可能な最高濃度で毒性反応がみられないときには、液体エアロゾルとして調製したうえで試験を実施する必要があるであろう。

主試験：C × t 法

39. 主試験の開始濃度（暴露セッション I）（補遺 1）は、限界濃度または試験責任者が予備試験に基づいて決定した濃度のいずれかとする。暴露セッション I の間またはその終了後に死亡が観察された場合、死亡が観察された最低暴露量（C × t）に基づいて、暴露セッション II の暴露濃度および暴露時間を設定する。このように、各暴露セッションは、前暴露セッションの結果を受けて実施する（補遺 1 を参照）。

40. ほとんどの場合、開始濃度で得られた結果に加え、暴露時間の間隔がより短い（中心となる暴露時間から等比間隔［通常、√2］で暴露時間を設定する）追加暴露セッション 3 回の結果から、C × t と死亡との間に十分な関係性(16)が得られるが、追加暴露（すなわち 5 種類目の濃度での試験）を行うことで、より優れた推定が得られる場合もある（補遺 1 および GD 39(2)を参照）。C × t 法の結果の数学的処理については、補遺 1 を参照のこと。

観察

41. 暴露中は、一般状態の観察を頻繁に実施する。暴露後は、暴露当日は 1 日 2 回以上（供試動物の反応に応じて、より頻回に）、それ以降は 1 日 1 回以上、一般状態の観察を行う。観察期間は少なくとも 14 日間とするが、観察期間の長さは厳密に限定すべきではない。観察期間の長さは、毒性徴候の性質およびその発現時期、ならびに回復期間の長さによって決定する。毒性徴候の発現時期および消失時期は、特に遅発性の傾向がある場合、重要である。観察事項はすべて、個体別に管理している個々の記録に系統的に記録する。瀕死動物や、明らかに痛がったり、強い持続的な苦痛の徴候を示したりしている動物は、動物愛護の理由から安楽死させる。一般状態の観察では、暴露手技によって生じた暴露初期の軽度な所見および一過性の呼吸の変化などの毒性徴候を、観察期間中に安楽死が必要になるであろう被験物質に関連した毒性と間違えないよう注意する。人道的エンドポイントに関するガイダンス文書（GD 19）(8)に要約された原則および基

© OCDE（2009 年）

準を考慮する。人道的理由により安楽死させた個体または死亡した状態で発見した個体については、可能な限り正確に死亡時期を記録する。

42. 症状観察では皮膚、被毛、眼、粘膜、呼吸器系、循環器系、自律神経系、中枢神経系、体性運動および行動パターンに変化がみられないか観察する。可能な場合、局所反応なのか全身反応なのか鑑別し、その結果を示すこと。振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠および昏睡がみられないかどうか特に注意して観察する。直腸温測定によって、反射性呼吸抑制や体温低下／体温上昇が処置または拘束に関連したものであるかどうかの裏付けが得られる可能性がある。

体重

43. 各個体の体重を馴化期間中に 1 回、暴露当日（Day 0）の暴露直前に 1 回、少なくとも Day 1、3 および 7 にそれぞれ 1 回（それ以降は週 1 回）および死亡時／安楽死時（Day 1 を超えて生存している場合）に記録する。体重は毒性の重要な指標であるため、試験前の体重と比較して 20%以上の体重減少が持続的にみられる個体は、綿密にモニタリングする。試験終了時に生存している個体は、体重を測定した後に安楽死させる。

病理学的検査

44. 肉眼的剖検を、試験中の死亡例や動物愛護の理由から安楽死させて試験から除外した例を含め、全例で行う。死亡発見例は、直ちに剖検を行うことができない場合、自己融解が最小限となる十分に低い温度で冷蔵する（冷凍ではない）。剖検は可能な限り速やかに実施し、通常、一両日中に実施する。気道に何らかの変化がみられないか特に注意を払いながら、個体ごとにすべての肉眼的病理変化を記録する。

45. 生存例の肺重量測定、気道の顕微鏡検査による刺激徴候の確認などの追加検査を試験デザイン設計時に事前に設定しておくと、本試験の解釈の価値が増すと考えられる。24 時間以上生存した個体で肉眼的病理変化がみられた器官や、影響がみられることが知られている、または推測される器官についても病理学的検査を実施してよい。水と反応しやすい被験物質（たとえば酸および吸湿性物質）については、気道全体を顕微鏡検査することで有用な情報が得られる可能性がある。

データおよび報告

データ

46. 体重および剖検所見は、動物の個体ごとのデータを示すこと。一般状態の観察に関するデータは表に要約し、各試験群について使用動物数、毒性徴候を示した動物数、試験中に死亡した状態で発見した、または人道的理由から安楽死させた動物数、個々の動物の死亡または安楽死の時期、観察された毒性作用の内容、経過および可逆性、ならびに剖検所見を示すこと。

試験報告書

47. 試験報告書には、必要に応じて、以下の情報を含む。

供試動物および飼育条件

- 飼育条件の説明（1 ケージあたりの動物数［または 1 ケージあたりの動物数の変化］、床敷、動物飼育室の温度および相対湿度、照明間隔、飼料の特定など）
- 使用した動物種／系統、ラット以外の場合はその選択の妥当性
- 動物数、週齢、性
- 無作為化の方法
- 飼料および水の質の詳細（飼料の種類および供給元、水の供給元など）
- 試験前期間の説明（飼料、検疫、疾患の治療など）

被験物質

- 物理的性状、純度、必要に応じて物理化学的特性（異性化など）
- 特定データおよび CAS 番号（既知の場合）

溶媒

- 溶媒使用の妥当性、水以外の溶媒を使用した場合はその選択の妥当性
- 選択した溶媒が試験の結果に影響を与えないことを示すデータ（背景データまたは同時に試験を行った溶媒対照群のデータ）

吸入チャンバー

- 吸入チャンバーの説明（寸法および容積）
- 動物への暴露や試験空気の調製に使用した装置の説明および供給元
- 温度、湿度、粒径および実測濃度の測定に使用した装置
- 空気源、吸気／排気の処理法、空気の調温調湿に使用したシステム
- 試験空気の均一性を保証するための装置の較正方法
- 圧力差（陰圧または陽圧）
- チャンバーあたりの暴露ポート数（鼻部暴露チャンバー）、システム内における動物の収容位置（全身暴露チャンバー）
- 試験空気の時間的均一性／安定性
- 温度センサーおよび湿度センサーの位置、チャンバー内の試験空気試料の採取位置
- 空気流量、暴露ポートあたりの空気流量（鼻部暴露チャンバー）、チャンバーあたりの収容動物数（全身暴露チャンバー）
- 酸素濃度および二酸化炭素濃度の測定に使用した装置の情報（該当する場合）
- 吸入チャンバー内が平衡に達するまでの時間（t_{95}）
- 1 時間あたりの換気回数
- 計量装置（該当する場合）

© OCDE（2009 年）

暴露データ

- 主試験で選択した目標濃度の理論的根拠
- 設定濃度（吸入チャンバー内に投入した被験物質の総量を、チャンバー内を通過した空気量で除した値）
- 供試動物の呼吸区域から採取した試験空気中の被験物質の実測濃度（被験物質が複数の物理的形態［ガス、蒸気、エアロゾル］からなる混合物の場合、物理的形態ごとに分析してもよい）
- 空気中の被験物質濃度はすべて重量濃度（たとえば mg/L、mg/m^3）で報告する。体積濃度（たとえば ppm、ppb）を併記してもよい
- 粒径分布、空気動力学的粒径（MMAD）および幾何標準偏差（σg）をその計算方法とともに示すこと。個々の粒径分析を報告する

試験条件

- 被験物質調製物の詳細（固形物質の粒径を小さくするため、または被験物質を溶液に調整するために使用した手順の詳細など）。機械的処理によって被験物質の組成が変化する可能性がある場合、被験物質の組成を確認するために行った分析の結果を示すこと
- 試験空気の調製に使用した装置および試験空気を動物に暴露するのに使用した装置の説明（図で示すことが望ましい）
- 使用した化学分析法およびそのバリデーションの詳細（試料採取媒体からの被験物質の回収率を含む）
- 試験条件選択の理論的根拠

結果

- チャンバー内の温度、湿度および空気流量を示す表
- チャンバー内の設定濃度データおよび実測濃度データを示す表
- 粒径データの表（MMAD および σg の計算、粒径分布、分析試料採取データを含む）
- 各個体の反応データおよび濃度段階を示す表（死亡を含め毒性徴候を示した動物、毒性徴候の性質、重症度、発現時期、持続期間など）
- 各個体の試験中の体重、観察期間中に死亡した場合はその死亡日時、各個体における毒性徴候の発現経過およびその可逆性
- 各個体の剖検所見、必要に応じて病理組織学的所見
- 算出した致死濃度（たとえば LC_{50}、LC_{01}）およびその 95%信頼限界、濃度反応曲線の傾き（使用した評価方法によって得られた場合のみ）
- 統計関係（$C \times t$ 法の指数 n の推定など）。使用した統計ソフトウェア名を示すこと

結果の考察および解釈

- 本試験ガイドラインの基準（限界濃度または粒径など）を満たすために何らかの方法を使用した場合、その方法の説明を特に強調して示すこと
- 全所見から判断して粒子が呼吸性粒子であると考えられるかどうか示すこと（特に本ガイドラインの粒径基準に適合していない場合）
- 痛がったり、強い持続的な苦痛の徴候を示したりしている動物を、人道的エンドポイントに関する OECD ガイダンス文書(8)に基づいて安楽死させる必要があった場合、その説明を示すこと
- TG 403 の方が好ましいとして、TG 436(4)の試験を中断した場合、その妥当性を示すこと
- 設定濃度および実測濃度の算出方法の整合性、ならびに実測濃度と設定濃度の関係性を本試験の総合評価に含めること
- 考えられる死因および主な作用様式（全身または局所）を示すこと

© OCDE（2009 年）

参考文献

1. OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3. UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

4. OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 436, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

5. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion – Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

6. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion – Human Skin Model Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OECD (2005), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18, 321-327.

10. Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

11. Pauluhn, J. and Thiel, A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27, 160-167.

12. Zwart, J.H.E., Arts, J.M., ten Berge, W.F. and Appelman, L.M. (1992), Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15, 278-290.

13. Zwart, J.H.E., Arts, J.M., Klokman-Houweling, E.D. and Schoen, E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol*. 2, 105-117.

14. Ten Berge, W.F. and Zwart, A. (1989), More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21, 65-71.

15. OECD (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16. Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

© OCDE（2009 年）

補遺 1

C × t 法

1. 吸入毒性の評価では、段階的な C×t 法を従来法の代わりに使用することを検討してもよい(12)(13)(14)。C × t 法は、複数の暴露時間での評価が必要な規制ニーズまたは科学的ニーズがある場合、たとえば緊急時対応計画のためや土地利用計画のために、特別に使用する。本法では通常、限界濃度（暴露セッション I）で、5 種類の暴露時間（たとえば 15、30、60、120 または 240 分）で試験を開始し、暴露セッションごとに複数の暴露時間のデータが得られる（図 1 を参照）。GHS の分類システムを使用する場合、ガス、蒸気およびエアロゾルの限界濃度はそれぞれ 20000 ppm、20 mg/L および 5 mg/L である。これらの限界濃度を超える濃度での試験は、そのような試験を必要とする規制ニーズまたは科学的ニーズがある場合に限り実施することができる（TG 403 本文の段落 37 を参照）。

2. 被験物質の毒性に関する情報がほとんど、または全くない場合、予備試験を実施する。予備試験では、試験責任者が選択した複数の目標濃度に、各濃度あたり雌雄各 3 例以下の動物を通常 240 分間暴露する。

3. 暴露セッション I において限界濃度で試験した結果、致死率が 50%未満であった場合、これ以上の試験は不要である。ただし、濃度時間反応関係を所定の限界濃度より高い濃度段階で確立する規制ニーズまたは科学的ニーズがある場合、次回の暴露濃度を限界濃度より高く、たとえば限界濃度の 2 倍（図 1 の 2L）などに設定する。

4. 限界濃度で毒性が観察された場合、追加試験（主試験）が必要である。追加試験の暴露は、限界濃度より低い濃度（図 1 の暴露セッション II、III、IV'）または暴露時間を短くした限界濃度より高い濃度（図 1 の暴露セッション IV）のいずれかで実施する。追加試験の各暴露時間の間隔は、限界濃度での試験の間隔より狭くなるように調整する。

5. 試験は（開始濃度および追加濃度のいずれでも）、各 C×t 群あたり雌雄各 1 例または感受性の高い性 2 例で実施する。状況によっては、試験責任者は各 C × t 群あたり雌雄各 2 例（または感受性の高い性 4 例）を使用してもよい(15)。各 C×t 群あたり雌雄各 2 例を使用すると、通常、各 C × t 群あたり雌雄各 1 例（または感受性の高い性 2 例）に比べて推定値の変動およびバイアスが減少し、推定の成功率が上昇し、より狭い信頼区間が得られる。詳細については GD 39(2)に示している。

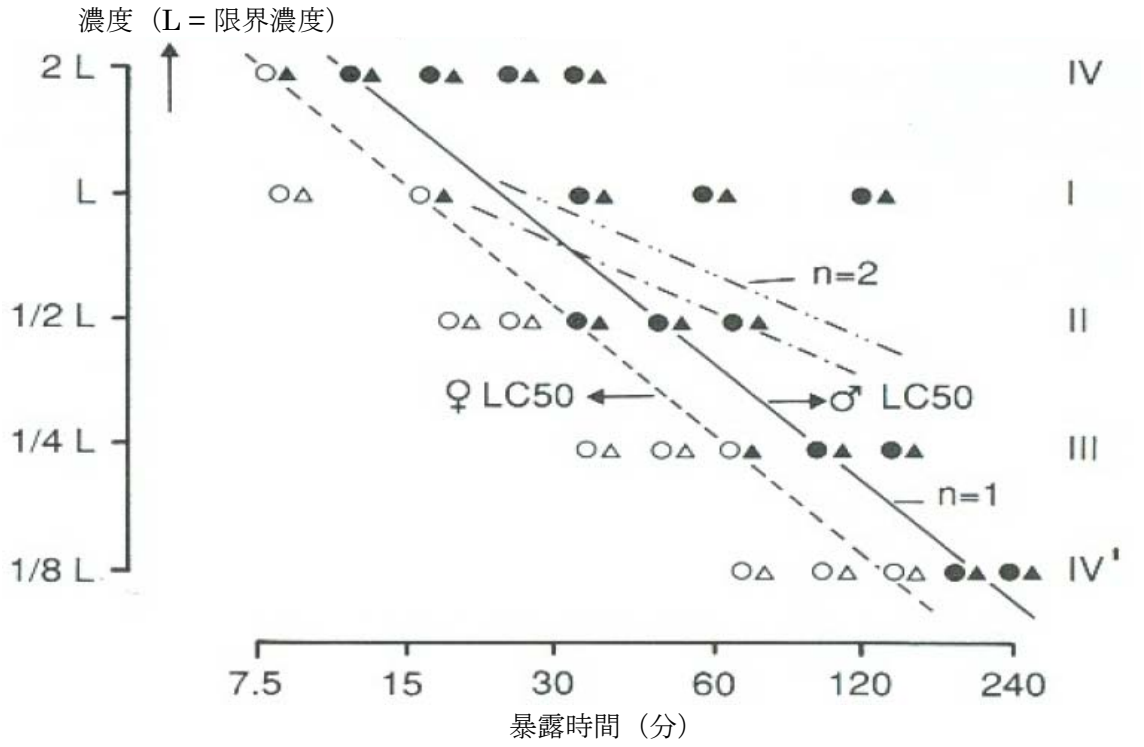
6. 理想としては、各暴露セッションは 1 日で完了させる。これによって、生死がほぼ確定するまで次濃度での暴露を遅らせることが可能であり、試験責任者は次回の暴露セッションの目標濃度および暴露時間を調整することが可能である。各暴露セッションでは、暴露時間が最も長い群から試験を開始し、順次暴露時間の長い順に試験を行うよう注意する（たとえば 240 分群から試験を開始し、その次に 120 分群の試験を行い、以降は順次暴露時間の長い順に試験を行う）。たとえば 240 分群の試験で、暴露開始後 90 分に死亡または重度の毒性徴候（呼吸困難などの呼吸パターンの極端な変化）がみられた場合、120 分群の試験はほぼ確実に死亡がみられると考え

られるため実施しないほうが賢明である。試験責任者は、当該濃度では、より短い暴露時間（たとえば 90、65、45、33 および 25 分間）を選択する。

7. 各暴露時間について時間加重平均濃度を求めるため、チャンバー内の濃度を定期的に測定する。統計解析では、可能な場合は必ず、（暴露時間ではなく）各個体の死亡時間を使用する。

8. 最初に実施した 4 回の暴露セッションの結果を用いて、濃度時間曲線のデータギャップを確認する（図 1 を参照）。あてはまり具合が不十分の場合、追加暴露（5 種類目の濃度での試験）を実施してもよい。この 5 回目の暴露の濃度および暴露時間は、データギャップを埋めるような濃度および暴露時間から選択する。

9. すべての暴露セッション（暴露セッション I を含む）の結果を用いて、統計解析(16)によって濃度時間反応関係を求める。統計解析では、可能な場合、各 C × t 群について時間加重平均濃度および死亡に至った暴露時間（暴露中に死亡した場合）を使用する。



<u>図 1：</u>ラットの濃度時間死亡関係の模式図

白丸および白三角：生存例、黒丸および黒三角：死亡例
三角：雌、丸：雄
実線：雄（n = 1）の LC_{50}（7.5～240 分）
破線：雌（n = 1）の LC_{50}（7.5～240 分）
点線：雄および雌（それぞれ n = 2）の推定 LC_{50}(12)

© OCDE（2009 年）

10. この段階的手法の例を以下に示す。

暴露セッションⅠ：限界濃度での試験（図 1 を参照）

- 各群あたり雌雄各 1 例；計 10 例[a]
- 目標濃度[b] = 限界濃度
- 供試動物を 15、30、60、120 および 240 分群の 5 群に分け、目標濃度に暴露する

↓

暴露セッション II[c]：主試験

- 各群あたり雌雄各 1 例；計 10 例
- 供試動物を前セッションより若干長めの暴露時間群 5 群に分け（√2 を係数とした等比間隔で暴露時間を設定する）、前セッションより低い濃度[d]（1/2L）に暴露する（図 1 を参照）

↓

暴露セッション III：主試験

- 各群あたり雌雄各 1 例；計 10 例
- 供試動物を前セッションより若干長めの暴露時間群 5 群に分け（√2 を係数とした等比間隔で暴露時間を設定する）、前セッションより低い濃度[d]（1/4L）に暴露する（図 1 を参照）

↓

暴露セッション IV'：主試験

- 各群あたり雌雄各 1 例；計 10 例
- 供試動物を前セッションより若干長めの暴露時間群 5 群に分け（√2 を係数とした等比間隔で暴露時間を設定する）、前セッションより低い濃度[d]（1/8L）に暴露する（図 1 を参照）

↓または

暴露セッション IV：主試験

- 各群あたり雌雄各 1 例；計 10 例
- 供試動物を若干短めの暴露時間群 5 群に分け（√2 を係数とした等比間隔で暴露時間を設定する）、高い濃度[e]（2L）に暴露する（図 1 を参照）

[a] 感受性に性差があるかどうかについて情報がない場合、雌雄双方を使用し、各群あたり雌雄各 1 例とする。性差の情報が既にある場合、または暴露セッション中にどちらかの性で感受性が高いことが明らかになった場合、次セッション以降では感受性の高い性のみ（各群 2 例、計 10 例）を使用する。

[b] GHS の分類システムを使用する場合、ガス、蒸気およびエアロゾルの限界濃度はそれぞれ 20000 ppm、20 mg/L および 5 mg/L である。毒性が予測される場合、または予備試験の結果がある場合、限界濃度より低い濃度を開始濃度として選択すべきである。規制ニーズまたは科学的ニーズがある場合、限界濃度より高い濃度を選択してもよい。

[c] 理想的には、次セッションへの暴露は、現セッションの生存についてしかるべき確信が得られるまで実施すべきではない。この間に、試験責任者は次セッションの目標濃度および

暴露時間を適宜変更してもよい。

[d] 開始濃度での試験（初回の暴露セッション）で死亡が観察された最低暴露量（C × t）に基づいて、次セッションの暴露濃度および暴露時間の組み合わせを設定する。通常は、次セッションの濃度を 2 分の 1（1/2L）に減らし、暴露セッション I の最低死亡暴露量（C × t）に基づいて中心となる暴露時間を決定し、その前後に 1.4（√2。参考文献 12 を参照）を係数とする等比間隔で暴露時間を設定することで、より間隔の狭い新規の暴露時間範囲を設定する。たとえば図 1 では、暴露セッション I で初めて死亡が観察されたのが 15 分であることから、暴露セッション II の暴露時間は 30 分を中心に設定することとなり、暴露セッション II の暴露時間は 15、21、30、42 および 60 分となる。1 回目および 2 回目の暴露セッション終了後、図 1 のような図を作成して得られたデータをプロットし、濃度時間関係の角度が 45 度（n = 1）になっているか、または濃度時間反応関係の角度がより緩やか（n = 2）もしくはより急（n = 0.8）になっているか確認することを強く忠告する。濃度時間反応関係の角度がより急になっている場合、次の濃度および暴露時間を適宜調整することを強く忠告する。

[e] 状況によっては、濃度を（2L に）増加した試験を実施してもよい。その場合、初回の暴露セッションの最低死亡暴露量（C × t）に基づいて中心となる暴露時間を決定し、その前後に 1.4（√2）を係数とする等比間隔で暴露時間を設定することで、より間隔の狭い新規の暴露時間範囲を設定する。ただし最短暴露時間は可能であれば 5 分を超えるべきであり、最長暴露時間は 8 時間未満とすべきである。

C × t 法の結果の数学的処理

11. 4 段階または 5 段階の暴露濃度で 5 種類の暴露時間で C × t 法を実施した場合、それぞれ 20 点または 25 点のデータ点が得られる。以下の統計解析(16)を用いて、これらのデータ点から濃度時間関係を求めることが可能である。

$$Probit\ (P) = b_0 + b_1\ ln\ C + b_2\ ln\ t \qquad \text{式 1}$$

C = 濃度、t = 暴露時間　または

$$Response = f(C^n\ t) \qquad \text{式 2}$$

$$n = b_1/b_2$$

所定の暴露時間（たとえば 4 時間、1 時間、30 分など、試験で検討した暴露時間範囲内のあらゆる時間）の LC_{50} は、式 1 で P = 5（50%反応）として算出することが可能である。ハーバー規則は、n = 1 の場合にのみ適用される点に注意すること。LC_{01} は P = 2.67 として算出することが可能である。

© OCDE（2009 年）