OECD/OCDE

1981/05/12

試験ガイドライン No.410

反復投与経皮毒性試験 21 日または28 日試験

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. 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070745-en.

©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

反復投与経皮毒性試験　21 日または 28 日試験

１．序論

・基礎的前提条件

－固体および液体の被験物質
－被験物質の化学的確認
－被験物質の純度（不純物）
－溶解性
－pH（適切な場合）
－安定性（溶媒中での安定性を含む）
－融点／沸点

・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

亜慢性経皮毒性試験は、化学物質の毒性の判定や評価において、急性毒性についての初期情報が得られた後で行われる。亜慢性経皮毒性は、限定された期間中、経皮経路により反復暴露で生じると考えられる健康障害についての情報を与える。

21 日ないし 28 日間の反復投与経皮試験の間には、十分な類似性があり、一つの指針で両試験期間を包括できる。これらの主な相違点は投与期間の違いである（本文に示した）。

・定義

用量とは、皮膚に適用した被験物質の量である。用量は重量（g、mg）あるいは試験動物の単位重量あたりの被験物質の重量（たとえば mg/kg）として表される。

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。

反復投与経皮毒性試験　21 日または 28 日試験

無作用量(No-effect level)／無毒性量(No-toxic-effect level)／無有害作用量(No-adverse-effect level)とは、試験に用いられた用量のうち、有害な影響を生じない最大用量である。これら無影響量(no-effect level)は、実験動物の単位重量あたりの毎日与えられる被験物質の重量（mg/kg）として表示される。

蓄積毒性とは、反復投与によってもたらされる感受組織に対する持続的作用またはその中の被験物質あるいはその代謝物の濃度の増加の結果として生ずる有害な影響をいう。

・試験法の原則

被験物質は 21 日あるいは 28 日間、各群につき 1 用量として、試験動物の数群に段階的な用量で皮膚に毎日適用する。投与期間中、毒性の徴候をみつけるために動物を毎日観察する。試験期間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。試験の直前に動物の軀幹部の被験部位の被毛を刈る。毛を剃ってもよいが試験の 24 時間前に行う。通常、剪毛は 1 週間間隔で行う。剪毛時の注意点としては、試験計画に擦過皮膚を必要とされていないかぎり、物質の透過性が変わるおそれがあるので皮膚を傷つけないことである。被験物質を適用するために体表面の少なくとも 10%を刈る。塗布面積や剪毛する面積を決めるにあたっては体重を考慮する。固体を試験するときに、必要に応じ粉末状にし、皮膚とよく接触させるために水または適当な溶媒で十分に湿らせる。ただし、被験物質の皮膚透過性に対する溶媒の影響を考慮する。液体の被験物質は一般に希釈せずに使用する。

反復投与経皮毒性試験　21 日または 28 日試験

・試験動物

動物種の選択

成熟ラット、ウサギおよびモルモットを使用する。他の動物を使用する場合は、それを使用する理由が必要であろう。

試験の遂行を容易にするために適切と考えられる試験開始時の体重範囲は、ラット：200～300g、ウサギ：２～３kg、モルモット：350～450g である。

反復投与経皮試験を長期試験の予備試験として行うならば、両試験において同一の種・系統の動物を用いるべきである。

動物数と性

用量ごとに、少なくとも 10 匹（雌５匹、雄５匹）の皮膚障害のない動物を用いる。雌は未経産で妊娠していないものとする。もし、途中で剖検の計画があれば、動物数はその分だけ増やす。10 匹（雌５匹、雄５匹）のサテライト群について、21 日あるいは 28 日間高用量で処置し、処置後 14 日間、毒性作用の可逆性、持続性、遅発性について観察する。

飼育および給餌条件（暴露前と暴露後）

動物は個別に飼育する。動物室は、げっ歯類については温度 22℃±３℃、ウサギについては 20℃±３℃、相対湿度 30～70%、人工照明の場合は 12 時間間隔で明暗を切替える。通常、実験用飼料を与え、水は自由に摂取させる。

・試験条件

用量段階

対照と、より適切には溶媒対照のほかに少なくとも３用量を必要とする。対照群の動物は、被験物質処置を除いて、処置群と同様の方法で扱われる。最高用量では中毒作用が生ずる必要があるが、死亡により意味のある評価を妨げてはならない。最低用量では毒性は生じないようにする。

反復投与経皮毒性試験　21 日または 28 日試験

ヒトの暴露について役立つ推定ができるなら、最低用量はこれを越えるものとする。理想的には、中間用量は毒性が最小限生ずるようにし、もし、一つ以上の中間用量を置くならば、その用量は毒性が段階的に生ずるような間隔にする。結果の意味ある評価を可能にするため、低用量、中間用量および対照群での死亡率は低くなくてはならない。

もし、被験物質の適用で重篤な皮膚刺激が生ずるならば、その他の毒性の軽減あるいは消失を生じようともその濃度を下げるべきである。しかし、実験の初期に皮膚がひどい損傷を受けたならば実験を中止し、より低い濃度での新しい試験を始めるのがよい。

限度試験

この試験のために記述された手順を用いて、もし、少なくとも 1,000mg/kg 体重の１用量の試験（しかし、予期されるヒトの暴露からは、より高い用量を必要とするかも知れない）で毒性の徴候を生ぜず、また、構造類似化合物の資料に基づいて毒性発現が予期されないならば、３用量を用いた本格的な試験は必要ないであろう。

観察

注意深い臨床的な症状の観察は少なくとも毎日１回行い、さらに実験における動物の死亡を最小限にするために、毎日、適切な処置を行う。たとえば、死亡が確認されたこれらの動物は剖検または冷蔵保存し、また衰弱あるいは瀕死の動物は隔離や屠殺を行う。

・試験の実施

動物は理想的には、少なくとも１日６時間、週７日間、21 あるいは 28 日間、被験物質で処置される。しかし、実際的な見地から週５日間の適用は受け入れられると考えられる。サテライト群では毒性の持続性あるいは回復をみるため、さらに 14 日間処置を行わず飼育する。

反復投与経皮毒性試験　21 日または 28 日試験

被験動物は総体表面のおよそ 10%の範囲に均一に塗布する。毒性の強いものは塗布範囲を少なめにし、可能なかぎり薄く均一にする。

被験物質の塗布期間中は、多孔質性ガーゼと非刺激性テープを用い皮膚に被験物質を接触させておく。塗布部位は、被験物質やガーゼを保持するためにさらに適当な方法でカバーし、動物が被験物質を摂取できないようにする。また、被験物質の摂取を防ぐため固定器を用いてもよいが、完全な固定は推奨できる方法ではない。

毒性の徴候は発現時間、程度および持続期間などを記録する。観察には少なくとも呼吸器系、循環系、自律および中枢神経系、運動性および行動パターンとともに皮膚、毛、眼、粘膜の変化を含める。摂餌量や体重は毎週測定する。動物の定期的な観察は、共食い、組織の自己融解あるいは動物の配置の誤りなどの原因によって動物が失われないことを確保するために必要である。試験終了時、サテライト群を除いた処置群の動物は屠殺する。瀕死の動物は発見しだい屠殺する。

・臨床検査

下記の検査をすべての動物について行う。

(a) 試験終了時にヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数および血球百分比、さらに凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数などの血液凝固機能の測定を含む血液学的検査をする。

(b) 血液の臨床生化学検査は試験期の終りに実施する。肝・腎機能検査に血液を用いて検討を加えることも良く、どの項目を選ぶかは、被験物質の生体作用様式についての観察に基づいて決める。推奨されている試験項目として、カルシウム、リン、クロール、ナトリウム、カリ

ウム、空腹時血糖（絶食時間は試験動物種に適切なものを選ぶ)、血清 GPT*、GOT**、オルニチン脱炭酸酵素、γ－GTP、尿素窒素、アルブミン、血液クレアチニン、総ビリルビン、血清総蛋白などの測定が含まれる。毒性評価の上で必要なその他の測定項目には、脂質、ホルモン、酸－塩基平衡、メトヘモグロビン、コリンエステラーゼ活性などの定量が含まれる。認められた作用をさらに検討するために、必要に応じ、臨床生化学検査を追加して実施すべきであろう。

(c) 尿検査は日常的には必要とされないが、毒性が観察されるときや徴候が予見されるときは行う。

もし、過去のバックグランドの基礎データが不十分ならば、投与開始前に実施する血液および臨床生化学的パラメータの決定を検討する。

・病理

剖検

全動物について、体表、すべての開口部、頭蓋、胸腔、腹腔およびそれらの内部器官を含め肉眼的剖検を行う。肝、腎、副腎および精巣は乾燥を避け、解剖後すみやかに湿重量を測定する。下記の器官および組織は病理組織学的検査のために適当な媒質中に保存する。正常および処置した皮膚、肝、腎および肉眼的病変や大きさに変化の見られた標的器官など。

病理組織学

病理学検査は、高用量群と対照群の保存された器官と組織について実施する。高用量群で変化の観察されたものについては、その他の群の動物でも検索を考慮する。衛星群の動物では、他の

*　血清アラニンアミノトランスフェラーゼ

**　血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

処置群で影響がみられた器官および組織についてとくに検査を行う。

３．データおよび報告

・結果の処理

成績は試験開始時の動物数、障害を示した動物数、各障害の型と、それぞれの障害を示した動物の百分率を表に要約する。

すべての観察された定量的および偶発的な結果を適切な統計方法によって評価する。通常、容認されている統計学的手法ならばどんな方法でもよい。その統計方法は試験の計画の段階で選択されるべきである。

・結果の評価

反復投与経皮毒性試験の所見は、観察された毒性作用、剖検および病理組織所見に基づき考察される。その評価には、被験物質の量と、行動や臨床上の異常を含む種々の異常の有無、その頻度と程度、肉眼的病変、明らかにされた標的器官、体重変化、死亡率に対する影響およびその他の一般的あるいは特異的な毒性作用との関係が含まれる。

適切に管理された 21 日あるいは 28 日間の試験は、被験物質を繰り返して経皮適用した場合の毒性情報を与え、より長期試験の必要性を示唆することができる。また長期試験の用量決定に情報を与えることもできる。

・試験報告書

試験報告には以下の情報を含んでいなければならない。

－使用した動物種／系統

－性別と用量ごとの毒性反応データ

－途中死亡の時期と試験終了時の生存動物

－中毒作用およびその他の作用

－異常徴候の観察された時期とその後の経過

－摂餌量と体重の成績

－用いた血液学的検査および関連基礎成績と結果

－用いた臨床生化学的検査および関連基礎成績と結果

－剖検所見

－すべての病理組織所見の詳細な記述

－結果の推計学的処理

・結果の解釈

反復投与経皮試験は、ある被験物質への反復皮膚暴露により生じる影響についての情報を与えるであろう。試験結果のヒトへの外挿は限定された範囲でのみ妥当である。しかし、物質の経皮吸収の程度について有用な情報を与えることができる。

４．参考文献

1. WHO Publication: Environmental Health Criteria No. 6, Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Part I, Geneva, 1978.
2. United States 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. Draize, J.H.: The Appraisal of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics, 26-30. Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas, 1959.
4. Hagan, E.G.: Appraisal of the Safety of Chemicals. Appraisal of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics, 17-25. Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas, 1965.