OECD/OCDE

1981/05/12

試験ガイドライン No.411

亜慢性経皮毒性 90 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. 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070769-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

亜慢性経皮毒性 90 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（溶媒を用いる場合は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

化学物質の毒性の判定および評価において、亜慢性経皮毒性試験は、急性試験によって毒性に関する初期の情報が得られた後に行われる。亜慢性経皮毒性によって、限られた期間にわたる皮膚経路での反復暴露より起こりうる健康障害についての情報が与えられる。

・定義

亜慢性経皮毒性とは、試験動物の全生涯のある期間（10%を越えない）、化学物質を反復して毎日経皮適用した結果として生ずる有害な作用である。

用量とは、経皮試験で皮膚に適用される（亜慢性試験で毎日適用される）被験物質の量である。用量は重量（g、mg）として、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。

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。

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。

411

亜慢性経皮毒性 90 日試験

蓄積毒性とは、反復投与により投与物質あるいはその代謝物の感受性組織での濃度の増加および持続した作用の結果として生じる有害な作用である。

・試験法の原則

被験物質は 90 日間、試験動物の数群に、1 群あたり 1 用量として段階的な用量で毎日皮膚に適用される。投与期間中、動物は毒性の徴候をみつけるために毎日観察する。試験期間中に死亡した動物は剖検し、試験の最終時点で生存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。試験の直前に、試験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、試験のおよそ 24 時間前に行う。剃毛や剪毛の反復は通常およそ 1 週間ごとの間隔で行う必要がある。剪毛あるいは剃毛のとき、擦過皮膚が試験計画に必要とされていない限り、物質の透過性を変えるような傷をつけないように注意を払わなければならない。体表面積の少なくとも 10%は被験物質の適用のために除毛しなければならない。毛を刈るべき面積および塗布面積を決定するとき、動物の体重を考慮する。固体を試験するときには、必要に応じ粉末状にし、皮膚とよく接触させるために、その被験物質を水あるいは適当な溶媒で十分に湿らせる。溶媒を用いるときは、被験物質の皮膚の浸透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される。

亜慢性経皮毒性 90 日試験

・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が用いられる。他の動物種を用いても差し支えないが、その場合はその理由付けが必要であろう。

試験の遂行を容易にするために適切な大きさ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：2.0～3.0kg、モルモット：350～450g である。

亜慢性経皮試験が長期試験のための予備試験として行われる場合には、両試験ともに同一種、同系統の動物を用いるべきである。

動物数と性

健全な皮膚をもった少なくとも 20 匹（雌 10 匹、雄 10 匹）の動物を各用量段階で用いる。雌は未経産で妊娠していないものとする。途中での剖検の計画があれば、動物数はその試験の完了の前に解剖する動物数だけ追加しておく。20 匹（性別に各 10 匹）からなるサテライト群を 20 日間高用量段階で処置し、通常、28 日以上の適当な長さの処置後の期間、毒性の可逆性、持続性あるいは発現の遅延について観察する。

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。動物室の温度は、げっ歯類では 22℃（± 3 ℃）、またウサギでは 20℃（± 3 ℃）、相対湿度 30～70%にする。人工照明の場合、12 時間間隔で明暗を切替える。給餌は、一般の実験用飼料を用い飲水は自由に摂取させる。

・試験条件

用量段階

対照群と、より適切には溶媒対照群のほかに少なくとも 3 用量段階を用いる。対照群の動物は

亜慢性経皮毒性 90 日試験

被験物質による処置を別として、試験群と全く同じ方法で扱う。最高用量では毒性作用が惹起される必要があるが、意味のある評価を妨げる死亡を起こすべきではない。最低用量では毒性が現われてはならない。ヒトへの暴露について役立つ推定があるならば、これをこえて最低用量を決める。理想的には、中間用量は最小限の毒性を生ずるようにする。もし、一つ以上の中間用量が用いられるならば、その用量段階は中毒作用が段階的に生ずるような間隔にする。結果の意味のある評価を可能にするため、低用量および中間用量群および対照群での死亡率は低くなければならない。

被験物質の適用で、重篤な皮膚刺激が生じるときにはその濃度を減らすべきで、そうすると高用量段階における他の中毒作用が軽減するかあるいは消失することがある。しかし、試験の初期に皮膚がひどい損傷を受けたならばその試験を中止し、低濃度での新しい試験を始めるのがよい。

限度試験

この試験について記述された手順を用いて、少なくとも 1,000mg/kg 体重の１用量の試験（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）で毒性作用が観察されず、また、構造類似化合物の資料に基づいて毒性が予期されないならば、３用量を用いた完全な試験は必要としない。

観察

少なくとも毎日１回は注意して臨床的観察を行う。さらに試験での動物の死亡を最少にするために、毎日、適切な処置を行う。たとえば死亡を確認した動物の剖検あるいは冷蔵保存、および衰弱あるいは瀕死の動物は隔離あるいは屠殺する。

・試験の実施

動物は、理想的には少なくとも１日あたり６時間、１週間に７日間、90 日の期間被験物質で処置する。しかし、実際的な見地から１週間に５日間の適用は受け入れられると考える。追跡観察のために用いるサテライト群の動物は、少なくともさらに 28 日間以上処置しないで、毒性作用の回復あるいは持続をみるために飼育する。

亜慢性経皮毒性 90 日試験

被験動物は総体表面積の約 10%の面積に均一に適用する。毒性の強い物質では塗布面積を少なめにし、塗布面積はできるだけうすく、かつ均一に塗布する。

被験物質の塗布期間中は、多孔性のガーゼと無刺激性のテープを用い被験物質と皮膚との接触を保持する。被験部位は被験物質とガーゼを保持するためにさらに適当な方法で被覆して、動物が被験物質を摂取できないようにする。被験物質の摂取を防ぐため固定器を用いてもよいが、完全な固定は推奨される方法ではない。

毒性の徴候については、発見時間、程度および持続期間などを観察された通りに記録する。観察は少なくとも皮膚および体毛、眼および粘膜の変化のほかに呼吸系、循環器系、自律神経および中枢神経、運動性および行動パターンなどを含める。摂餌量および体重の測定は毎週行う。動物の定期的観察は、共食い、組織の自己融解あるいは動物の配置の誤りのような原因によって動物が失われないことを確かめるために必要である。試験の最終時点でサテライト群を除いた処置群のすべての生存動物は屠殺する。瀕死の動物を認めたときは発見しだい隔離し屠殺する。

・臨床検査

下記の検査を行う。

(a) 眼の検査：被験物質に対する暴露前と試験終了時にはすべての動物に、あるいは少なくとも高用量群と対照群について、ルーペあるいは同等の適当な器具を用いて眼科学的検査をする。眼に変化がみられたならば、すべての動物を検査する。

(b) 試験終了時に、ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、赤血球数、総白血球数、白血球百分比および凝血時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間あるいは血小板数のような血液凝固機能の測定を含む血液学的検査をする。

(c) 血液についての臨床生化学的検査は試験の最終時期に行う。すべての試験に適切と考えられる試験の範囲は電解質平衡、炭水化物代謝、肝および腎機能検査である。特殊な試験の選択はその物質の作用様式についての観察により左右される。推奨された検査は、カルシウム、リン、クロール、ナトリウム、カリウム、空腹時グルコース（動物種に対して適当な絶食時間で)、血清 GPT*、血清 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、総ビリルビンおよび血清総蛋白の測定である。

(d) 尿検査は日常的には必要ではないが、予期された毒性あるいは観察された毒性に基づいた徴候が生じたときには行う。

過去のバックグランドの基礎データが不十分であるならば、投与開始前に実施する血液学的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

すべての動物について体表面、すべての開口部、頭蓋、胸腔、および腹腔ならびにそれらの内部器官の検査を含む完全な肉眼的剖検を行う。肝、腎、脾、副腎および精巣は乾燥を避け、解剖後できるだけ速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の中に保存する。

---

* 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

すべての肉眼的病変部、脳－延髄／橋、小脳皮質および大脳皮質の切片を含む、下垂体、甲状腺／副甲状腺、胸腺、(気管)、肺、心、大動脈、唾液腺、肝、脾、腎、副腎、膵、性殖腺、副性殖器、胆のう（もし存在すれば)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、代表的なリンパ節、(雌の乳腺)、(大腿筋)、末梢神経、(眼球)、(骨髄を含む胸骨)、(大腿骨－関節面を含む)、(背髄の三部位－頸部，胸中間部および腰部）および（眼窩外涙腺）（カッコ内に記載された組織は、徴候が認められるか、あるいは標的器官と考えられた場合にのみ検査する）

病理組織学

(a) 対照群および高用量群のすべての動物の正常および処置した皮膚ならびに器官および組織について、完全な病理組織学的検査を行う。

(b) すべての肉眼的変化

(c) 他の用量群での標的器官

(d) 低用量群および中間用量群の動物の肺は、感染の証拠のために病理組織学的検査の対象とし、これによりその動物の健康状態についての便宜的な評価が得られる。それ以上の病理組織学的検査は、これらの群の動物にルーチン的には必要ないだろう。しかし、高用量群で病変が確認された器官については常に行うべきである。

(e) サテライト群について病理組織学的検査を行うときは、他の処置群で影響がみられた組織および器官について実施する。

３．データおよび報告

・結果の処理

成績は、各試験群について、試験開始時の動物数、病変がみられた動物数、病変のタイプおよび各タイプの病変を示している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は、適切な統計学的手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どんな方法でもよい。統計学的手法はその研究の計画の段階で選択されるべきである。

亜慢性経皮毒性 90 日試験

・結果の評価

亜慢性経皮毒性試験での所見は先に行った試験の所見とともに評価され、観察された毒性作用および剖検と病理組織学的所見によって考察される。その評価には、被験物質の量と、行動的および臨床的異常を含めて種々の異常の有無、その頻度と程度の関係、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。適切に行われた亜慢性試験は、無作用量について満足な推定を与える。

・試験報告書

試験報告には以下の情報が含まなければならない。

－使用した動物種／系統

－性別および用量ごとの毒性反応成績

－途中死亡の時期あるいは動物が試験終了時まで生存したか否か

－中毒作用およびその他の作用

－異常徴候が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

－すべての病理組織学的所見の詳細な記述

－結果の統計学的処理

・結果の解釈

亜慢性経皮試験はある被験物質の反復皮膚暴露の影響に関する情報を与えるであろう。試験結果のヒトへの外挿は限ら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、無作用量およびヒトでの許容し得る暴露に関する有用な情報を与えることができる。

４．参考文献

1. WHO Publications: Environmental Health Criteria No. 6, *Principles and Methods for Evaluating the T oxicity 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 T oxicity of Household S ubstances*, Washington, 1977.
3. Draize, J.H., *T he Appraisal of Chemicals in Food, 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 S afety 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.