OECD/OCDE

1981/05/12

試験ガイドライン No.412

28 日間（亜急性）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. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, 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-412-1981.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

反復投与吸入毒性 28 日または 14 日試験

１．序論

・基礎的前提条件

－ガス、揮発性物質、エアゾール、粒子状物質などの被験物質
－被験物質の化学的確認
－被験物質の純度（不純物）
－液体被験物質：蒸気圧、沸点
－エアゾール、粒子状被験物質：粒子径、粒子形と密度分布
－引火点
－爆発性

・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

反復暴露による吸入毒性は、ガス、揮発性物質、エアゾール（粒子状物質）のような吸入可能な物質の毒性の判定および評価について、急性毒性試験によって初期情報が得られた後に行われる。この試験はある限定された期間中、吸入経路による反復暴露で生ずる健康障害の情報を提供する。吸入物質の危険性は、その物質本来の毒性や、揮発性および粒子の大きさといった物理的因子により影響される。

28 日間あるいは 14 日間の反復吸入試験の遂行にあたって考慮すべき諸要因の間には、これら二つの試験を一つの指針で包括しうるに足る十分な類似性がある。主な違いは（テキストに示すように）投与期間とより短期の試験期間にとって適切であると考えられる臨床的および病理学的検査の範囲とにある。

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。

反復投与吸入毒性 28 日または 14 日試験

・試験法の原則

数群の試験動物に 28 ないし 14 日間、１群１濃度とし、各段階の濃度の被験物質を毎日暴露する。環境気中での被験物質の適切な濃度を得るために溶媒を使用した場合には、溶媒対照群を加える。投与期間中動物の一般症状を毎日観察する。試験期間中に死亡した動物は剖検し、試験終了時の生存動物は屠殺し、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。環境気中の被験物質を一定な濃度にするため、必要に応じて適切な溶媒を被験物質に加えることもある。もし溶媒を使用するときは、それが被験物質の吸収に影響したり、毒性を発現したりしないことを示す。

・試験動物

動物種の選択

種々の動物種が使用される。この指針はげっ歯類の使用を主眼としている。げっ歯類１種を使用する場合にはラットが望ましい。一般に、使用する動物は健康な幼若動物とする。試験開始時の使用する動物の体重のバラツキは平均±20%をこえてはならない。反復投与吸入毒性試験が長期試験の予備として実施される場合には、両方の試験で同一種および同系統の動物を使用すべきである。

動物数と性

少なくとも 10 匹の動物（雄５匹，雌５匹）を各群に使用する。雌は未経産で妊娠していないものを使用する。もし途中で屠殺する場合は、動物数をその分増しておかなければならない。さら

にサテライト群を１群 10 匹（雌雄各５匹）の高濃度レベルで 28 日か 14 日間暴露し、その後 14 日間にわたって毒性の可逆性、持続性および遅発性を観察する。

飼育および給餌条件（暴露前と暴露後）

試験動物室内温度は 22℃（±３℃)、相対湿度 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。飼料は一般飼料を使用し、水は自由摂取とする。動物は性別ごとあるいは個別飼いとするが、１ケージあたりの動物数は個々の動物が十分観察できる匹数にする。

・装置

19%の適切な酸素濃度と均一分布の暴露環境を確保し、１時間あたり 12～15 回の換気を維持するようにデザインした吸入装置で試験する。チャンバーを使用する場合には、実験動物の詰込みを最小限にし、かつ被験物質への暴露が最大になるようにデザインする。チャンバー内を軽度の陰圧に維持すれば周囲への被験物質の漏洩が防げるであろう。チャンバー内の環境の安定性を確実にする一般的方法としては、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。もし経口や皮膚から暴露を避けたいときはロー鼻部または頭部のみの暴露法を使用する。

適切な濃度分析装置をもった吸入装置を使用する。空気の流量は、装置全体の状態が本質的に同一であるように調節する。

・試験条件

暴露濃度

対照と、より適切には溶媒対照（最高暴露レベルでの溶媒濃度に対応する）を含む少なくとも３群を使用する。被験物質の暴露以外の対照群の動物は処置群と同じ方法で扱わなければならない。最高濃度群では毒性が認められる必要があるが、意味ある評価を妨げる程の死亡を生じてはいけない。低濃度群はいかなる毒性作用も発現しないようにする。ヒトの暴露に関し役立つ推定

ができる場合には、最低濃度はこれをこえるものとする。理想的には、中間濃度は最小限の毒性発現量でなければならない。もし二つ以上の中間濃度を使用する場合には、段階的に毒性が出現するように間隔をとる。低および中間濃度群、および対照群の死亡例は、その結果の意味ある評価を可能にする程度に低いものとする。被験物質に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を払う。

暴露時間

暴露時間は、チャンバー内濃度が一定になった後、１日に６時間とするが、特別な要求に合わせるために期間を変えることも必要であろう。

観察

毎日１回は注意深く臨床的観察を行う。試験動物の損失を最小限にするためには、さらに毎日観察し、たとえば、死亡動物は発見しだい剖検、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。

・試験の実施

動物は 28 ないし 14 日間の間、１週間に７回被験物質に暴露をするのが理想的である。しかし主に現実的な理由により、週に５日間の暴露が許容できると考える。追跡観察に予定したサテライト群の動物は処置せずに、さらに 14 日間毒性作用の回復、持続性をみるため飼育する。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)、この条件は実際的ではないであろう。給餌、給水は、暴露中は行わない。

・物理的測定

以下について測定または監視を行う。

(a) 流量は連続的に監視されるのが望ましい。

(b) 暴露期間中の濃度はほぼ一定に保たなければならない。

(c) 発生器の調整中にエアゾール濃度の安定性を確保するために粒子の大きさの分析を実施する。暴露中、粒子分布の恒常性を測定するために、何回でも必要なだけ分析を行う。

(d) 温度と湿度は連続的に監視する。

・臨床検査

動物は暴露期間中および暴露後も観察する。観察は系統的に実施し、記録をする。個々の記録を動物ごとに保存する。すべての動物は毎日観察し、毒性の徴候はその発現した時期、程度、持続した期間を記録する。ケージサイドの観察には、皮膚や被毛、眼球、粘膜の変化に限定することなく、呼吸系、循環系、自律神経系、中枢神経系、および一般状態、および行動パターンを含める。週１回、体重、摂餌量を測定する。動物の共食いや、組織の自己融解あるいは配置のあやまりといった原因によって試験から動物が失われないことを確かめるために、定期的な観察が必要である。試験終了時、サテライト群を除く群で生存しているすべての動物は屠殺する。罹患した動物は発見しだい隔離し、屠殺する。

次の検査を行う。

(a) ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数、白血球数とその百分比や凝固時間、プロトロンビン時間、トロンボプラスチン時間、血小板数などの凝固関連因子などの凝固能を含む血液検査を試験終了時に行う。

(b) 血液臨床生化学的検査は試験終了時に行う。検査項目の選択は、その物質の作用様式に関する観察によって変わる。カルシウム、リン、クロール、ナトリウム、カリウム、空腹時のグルコース（種に応じた絶食時間で)、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、総血清蛋白質量の測定が含まれる。適切な毒性評価のために必要とされる他の検査項目としては、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の測定などがあげられる。観察された毒性作用の研究をいっそう進めるために、必要に応じ追加の臨床生化学的検査を行う。

(c) 尿分析は、ルーチンとしては必要ではないが、毒性が予想されるか、あるいは観察されたならば行う。

もし今までのバックグランドとなる基礎データが不十分ならば、投与開始前に血清学的検査、臨床生化学的検査の項目の決定について考慮しなければならない。

・病理

剖検

試験に用いた全動物は、体表、すべての開口部、頭蓋、胸腔および腹腔とそれらの内部器官の観察を含むすべての剖検を行う。肝、腎、脾、副腎、精巣は、摘出後乾燥を避けるためにできるだけ早く湿重量を測定する。次の器官や組織は後の病理組織学的検査のため適切な媒質中に保存する：肺－無傷のままとり出し、重量を測り、肺の構造が維持できる適切な固定処置を行う（固定のための潅流は効果的な方法と考えられる)、肝、腎、脾、副腎、心、肉眼的病変や大きさの変化を示す標的器官。

---

* 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

病理組織学

組織検査は高用量群と対照群の障害器官、組織について行う。もし高濃度群で観察された変化を検討する必要があると考えた場合には、他の濃度群の動物にも広げて実施する。サテライト群の動物では、他の処置群でみられた組織変化についてとくに重点的に病理組織学的検査を行う。

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、病変を示した動物数、障害の型、それらの発生百分率を表の形にまとめる。

すべての観察結果は、定量的および偶発的なものを含め適切な統計処理で評価する。一般的に受入れられている統計方法を使用し、その方法は実験の計画の段階で選択しておくべきである。

・結果の評価

反復投与吸入試験の所見は、毒性作用、剖検、組織所見などの点から考慮する。評価は、被験物質の濃度と、暴露期間、行動および臨床的異常を含めての異常の有無やそれらの頻度および重篤度、肉眼的変化、標的臓器の同定、体重の変化、死亡率への影響や、その他の一般的あるいは特異的毒性影響との関係について行う。適切に管理された 28 日あるいは 14 日間の試験により、繰り返し暴露の影響についての情報を提供するはずである。そしてさらに長期試験の必要性を示すことができる。また長期試験の濃度選択についての情報を提供することができる。

・試験報告書

試験報告には次の情報を含む。

反復投与吸入毒性 28 日または 14 日試験

(a) 試験条件

デザイン、型、寸法、空気源、粒子およびエアゾール発生系、そして空気混合の方法、排気処理法、そしてこれを使用したときのチャンバー内での動物の飼育方法などを含む暴露装置の記述をする。

温度、湿度、およびエアゾール粒子の濃度と大きさを測定する装置につて記述する。

(b) 暴露データ

これらは表示し、平均値とその変動値（たとえば標準偏差）を明記し、下記の項目を含む。

－吸入装置内の空気流量
－空気の温度、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容量で割った値）
－呼吸区域での実測濃度
－粒子の大きさの分布状態（たとえば、気体動力学的な粒子の直径の平均値と標準偏差）

(c) 動物に関する成績

－使用した動物種／系統
－性別、濃度ごとの毒性反応成績
－試験中の死亡時期と動物終了時の生存動物
－毒性、他の影響
－各異常反応の観察時期とその後の経過
－摂餌量、体重
－血液検査項目と適切な基礎成績
－臨床生化学検査項目と適切な基礎成績
－剖検所見

－詳細な病理組織学的所見の記述

－可能ならば結果の統計処理

・結果の解釈

反復投与吸入試験は、物質の繰り返し暴露の影響についての情報をもたらす。試験結果のヒトへの外挿には限界がある。しかし、吸入経路による物質の作用形態とその毒性に関する有用な情報を提供する。

４．参考文献

1. WHO Publications: 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.