OECD/OCDE

2009/09/07

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.

Reference:

OECD (2018), Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070783-en.

©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

亜急性吸入毒性試験：28 日試験

要約

試験ガイドライン 412（TG 412）の改訂版である本試験ガイドラインは、被験物質を所定の期間（28 日間）反復暴露したときの吸入毒性を完全に特徴付けし、定量的な吸入リスク評価データが得られるよう設計されたものである。各群雌雄各 5 例以上のげっ歯類を、1 日 6 時間、28 日間にわたって a)3 段階以上の濃度段階の被験物質、b)フィルターを通した空気（陰性対照）および／または c)溶媒（溶媒対照）に暴露する。1 週間あたりの暴露日数は通常 5 日間であるが、1 週間あたり 7 日間暴露してもよい。本試験ガイドラインでは雌雄双方を必ず用いるが、どちらかの性が被験物質に対して感受性が高いことが知られている場合、雌雄で異なる暴露濃度を選択してもよい。本試験ガイドラインでは、被験物質の毒性の特徴をより良く把握するために、試験責任者がサテライト（回復）群、気管支肺胞洗浄（BAL）または神経学的検査を追加したり、追加の臨床病理検査・病理組織学的検査を実施したりすることが可能である。

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、動物愛護の観点および規制ニーズの変化を踏まえて定期的に見直しされている。亜急性吸入毒性試験の試験ガイドライン 412（TG 412）の初版(1)は 1981 年に採択されたが、科学の進歩を反映し、現在および将来の規制ニーズに対応するよう、このたび改訂が行われた。

2. 本試験ガイドラインでは、被験物質を 28 日間反復吸入暴露させたときの有害作用を特徴付けることが可能である。この 28 日間亜急性吸入毒性試験で得られたデータは、定量的リスク評価に使用することが可能である（引き続いて 90 日間亜慢性吸入毒性試験［TG 413］を実施しない場合に限る）。本試験ガイドラインによって得られたデータはまた、90 日間亜慢性吸入毒性試験などのより長期の試験の濃度選択において、有用な情報となり得る。本試験ガイドラインは、ナノマテリアル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。本試験ガイドライン中で用いる用語の定義はガイダンス文書 No.39 (2)に示している。

最初に考慮すべき事項

3. 試験の質を高めるため、および使用動物数を最小限とするため、試験を実施する前に、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。適切な試験濃度を選択するうえで有用な情報は、被験物質の特定データ、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、急性吸入毒性試験から得られたデータなどである。神経毒性が予測される場合または神経毒性が試験中に観察された場合、試験責任者は機能観察総合評価（FOB）や自発運動の測定などの適切な評価を実施することにしてもよい。試験デザイン上、暴

© 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。

露のタイミングは検査のタイミングより重要であると考えられ、これらの追加評価は本試験ガイドラインの基本的な試験デザインを邪魔しないように実施する。

4. 被験物質が腐食性または刺激性物質の場合、目的に適う程度の毒性（GD 39(2)を参照）がみられる濃度まで被験物質を希釈して試験を実施してもよい。被験物質の目標濃度は重度の疼痛および苦痛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し、可能であれば、適切に設計された濃度設定試験から得た情報（重要な評価項目、刺激閾値および発現時間に関する情報など）に基づいて選択する（段落 11～13 を参照）。濃度選択の妥当性を示すこと。

5. 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屠殺する際の判断基準、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(3)に示している。

試験方法

動物種の選択

6. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟げっ歯類を使用する。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

7. 雌は未経産で非妊娠のものを用いる。無作為化日に 7～9 週齢で、体重が雌雄別平均体重±20%以内である若齢成熟動物を使用する。動物は無作為に選び、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。

動物の飼育

8. 楽に観察ができ、かつ取り違えを避けるために、各動物を個体識別する。可能であれば、皮下に挿入する個体識別用トランスポンダーを用いる。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、雌雄別および暴露濃度別にケージで群飼育とする。1 ケージあたりの動物数は、各動物を明確に観察するのに差し支えがなく、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

9. 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・鼻部暴露を含むものとする）。鼻部暴露は、液体もしくは固体のエアロゾル、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。

毒性試験

限界濃度

10. 急性毒性試験と異なり、28 日間亜急性吸入毒性試験では限界濃度が規定されていない。本試験の最高濃度は 1) 達成可能な最高濃度、2) ヒトで想定される"最悪の事態"における暴露濃度、3) 適切な酸素濃度を維持する必要性、および／または 4) 動物愛護の問題を考慮して選択する。このように、データに基づく限界濃度が存在しない場合、国連の化学品の分類および表示に関する世界調和システムの急性毒性試験の限界濃度（エアロゾルで 5 mg/L、蒸気で 20 mg/L、ガスで 20000 ppm）を使用してもよい（GD 39(2)を参照）[訳注：”エアロゾル”は、GHS では“ミスト”と表記されている]。被験物質がガスまたは揮発性が高い物質（冷却剤など）で、これらの濃度以上で試験を実施する必要がある場合、その妥当性を示すこと。限界濃度では、過度のストレスを動物に与えることなくまたは動物の寿命に影響を与えることなく、明白な毒性が観察されるものとする(3)。

濃度設定試験

11. 主試験を実施する前に、濃度設定試験を実施する必要がある場合がある。濃度設定試験から得られる情報は濃度設定に関するものだけではないため、濃度設定試験は予備試験より包括的な試験である。したがって、濃度設定試験から知見を得ることによって、主試験を成功に導くことが可能である。濃度設定試験からは、たとえば、分析法に関する技術的な情報、粒径測定、毒性機序の発見、臨床病理学的および病理組織学的データ、ならびに主試験の推定無毒性濃度（NOAEL）および推定最大許容濃度（MTC）が得られる可能性がある。試験責任者は、気道刺激性の閾値（たとえば気道の病理組織学的検査、肺機能検査または気管支肺胞洗浄による気道刺激性の閾値）、供試動物が過度のストレスを感じることなく忍容可能な最高濃度、被験物質の毒性を特徴付けるのに最も適したパラメータなどを特定するために濃度設定試験を実施することにしてもよい。

12. 濃度設定試験は、1 段階以上の濃度段階で実施してもよい。各濃度段階の動物数は、雌雄各 3 例以下とする。濃度設定試験の試験日数は少なくとも 5 日以上、通常 14 日以下とする。主試験の濃度選択の理論的根拠を、試験報告書に示すこと。主試験の目的は、最も感度が高いと予想される評価項目に基づいて濃度反応関係を立証することである。理想的には、無毒性濃度に相当する低濃度段階から、過度のストレスを動物に与えることなくまたは動物の寿命に影響を与えることなく明白な毒性が観察される高濃度段階(3)までの濃度範囲で、濃度反応関係を立証する。

13. 濃度設定試験の濃度は、構造活性相関および構造類似化合物のデータなど入手可能なすべての情報を検討して選択する（段落 3 を参照）。濃度設定試験では、機序に基づく最も感度の高

© OCDE（2009 年）

い評価項目が何であるか（たとえば被験物質が有機リン酸塩の場合はコリンエステラーゼ阻害、赤血球障害性物質の場合はメトヘモグロビンの生成、甲状腺毒性物質の場合は甲状腺ホルモン［T_3、T_4］、無毒の難溶性粒子または肺刺激性エアロゾルの場合は気管支肺胞洗浄液中のタンパク質、乳酸脱水素酵素［LDH］または好中球など）を検証することが可能であり、また逆に、それらが機序に基づく最も感度の高い評価項目ではないことを証明することも可能である。

主試験

14. 亜急性毒性試験の主試験は通常、3 段階以上の濃度段階で実施する。必要に応じて、同時陰性対照（空気）群および溶媒対照群の双方または一方を設定する（段落 17 を参照）。主試験の濃度段階は、適切な暴露濃度を選択するのに役立つと考えられる入手可能なあらゆるデータ、たとえば全身毒性試験の結果や、代謝および体内動態に関する情報などを利用して選択する（体内動態プロセスを飽和させるような高濃度は避けるよう、特に注意する）。各濃度群あたり 10 例（雌雄各 5 例）以上のげっ歯類を、1 週間あたりの暴露日数を 5 日間として 1 日 6 時間、4 週間（全試験期間は 28 日間）にわたって被験物質に暴露する。1 週間あたりの暴露日数は 7 日間としてもよい（たとえば吸入剤の試験の場合）。どちらかの性が被験物質に対して感受性が高いことが知られている場合、適切な濃度反応関係を得るために雌雄で異なる暴露濃度を選択してもよい（段落 15 を参照）。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。1 日あたりの暴露時間を 6 時間未満とした場合、または 1 日あたりの暴露時間が 6 時間を超える（たとえば 22 時間）全身暴露試験が必要となった場合（GD 39(2)を参照）、その理論的根拠を示すこと。1 日あたりの暴露時間が 6 時間以下の場合、暴露中に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。

15. 標的器官を特定でき、明確な濃度反応関係が得られる濃度を目標濃度とする。

- 毒性作用が発現するが、有意な評価を妨げるような持続的な毒性徴候や死亡が生じない濃度を高濃度段階とする。

- 中間濃度段階は、低濃度段階から高濃度段階にかけて毒性作用が段階的に推移するような濃度間隔で設定する。

- 毒性の徴候がほとんどまたは全くみられない濃度を低濃度段階とする。

サテライト（回復性）試験

16. サテライト（回復性）試験を実施して、14 日間以上の適切な長さの暴露後期間において、毒性の可逆性、持続性または遅発性を観察してもよい。サテライト（回復）群の動物数は雌雄各 5 例とし、サテライト（回復）群の動物は主試験の動物と同時に暴露を行う。サテライト（回復）群の動物には、最も高い濃度段階で被験物質を暴露する。必要に応じて同時陰性対照（空気）群および溶媒対照群の双方または一方を設定する（段落 17 を参照）。

対照動物

17. 同時陰性対照（空気）群は、被験物質ではなくフィルターを通した空気を暴露するといった点を除いて、試験群と全く同様に取り扱う。試験空気を調製するために水などの溶媒を使用した場合、同時陰性対照（空気）群ではなく溶媒対照群を設定する。溶媒としては可能な限り、水を使用する。水を溶媒として使用した場合、対照群には試験群と同じ相対湿度の空気を暴露する。溶媒として何が適当かは、本試験の前に別途実施した適切な試験データまたは背景データに基づいて選択する。溶媒の毒性が不明の場合、極力避けるべきであるが、試験責任者は陰性対照（空

気）群および溶媒対照群の両方を使用することにしてもよい。背景データから溶媒が非毒性であることが明らかになった場合、陰性対照（空気）群を設定する必要はなく、溶媒対照群のみを使用する。被験物質と溶媒の混合物について本試験の前に適切な試験を別途実施して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、この溶媒を用いて、溶媒対照群を設定する。

暴露条件

各濃度での暴露

18. 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、取扱い中および／または使用中に最もみられる可能性が高い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。爆発濃度にならないよう、注意する。被験物質が粒子状物質の場合、粒径を低下させるために機械的処理を行ってもよい。詳細なガイダンスは、GD 39(2)に示している。

粒径分布

19. 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に、エアロゾルの空気動力学的粒径（MMAD）は 1～3 µm、幾何標準偏差（σg）は 1.5～3.0 であることが望ましい(4)。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と。たとえば金属フューム粒子ではこの基準より低く、荷電粒子および繊維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

20. 理想的には、被験物質は溶媒を用いずに試験する。被験物質の濃度および粒径を適切なものとするために溶媒を使用する必要がある場合、使用溶媒は原則として水が望ましい。被験物質を溶媒に溶解した場合は必ず、その溶液の安定性を立証する。

暴露条件のモニタリング

チャンバー内の空気流量

21. 暴露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のリアルタイムモニタリング（すなわち試験空気の経時的安定性）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吸入パラメータを非直接的に管理することが可能である。濃度をリアルタイムでモニタリングする場合、空気流量の測定頻度を各暴露あたり 1 日 1 回に減らしてもよい。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。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。暴露初日の測定で酸素濃度及び二酸化炭素濃度が適切であることが示された場合、それ以降の測定は不要である。

© OCDE（2009 年）

チャンバー内の温度および相対湿度

22. 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連続的にモニタリングし、可能であれば暴露を実施するたびに1時間おきに相対湿度を記録する。相対湿度は可能であれば30～70%に維持し、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

23. チャンバー内の暴露設定濃度を、その暴露設定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、吸入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

24. 実測濃度とは、吸入チャンバー内の供試動物の呼吸区域で採取された試料中の被験物質濃度である。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）のいずれか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。

25. 被験物質は、試験期間全体を通して、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。

26. 暴露空気は実施可能な限り一定に維持する。暴露条件の安定性を立証する際には、リアルタイムモニタリング装置（たとえばエアロゾルではエアロゾル光度計、蒸気では全炭化水素計など）を使用してもよい。いずれの濃度段階でも、チャンバー内の実測濃度を暴露日 1 日あたり 3 回以上測定する。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、暴露時間あたりの試料採取を 1 回としてもよい。その場合、暴露時間全体を通じて試料採取することが理想的である。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}）を算出して記録する。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ものとする。暴露時間にはまた、チャンバー内が平衡に達し、減衰するのに必要な時間も考慮に入れる。t_{95}の推定に関するガイダンスはGD 39(2)に示している。

27. 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。そのため、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

28. 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（APS）などのその他の装置を用いて、いずれの濃度段階でも少なくとも週 1 回測定する。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。

29. 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、すべての濃度段階において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。動物福祉上の理由から、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。

30. 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では、粒径測定を実施する。

観察

31. 各暴露前、各暴露中および各暴露後に、一般状態を観察する。暴露中の供試動物の反応に応じて、より頻繁に観察を行ってもよい。固定チューブが観察に邪魔であったり、全身チャンバー内の照度が不十分であったり、試験空気が不透明であったりなどの理由で観察が困難な場合、暴露後の観察を注意深く行う。翌日の暴露前の観察では、毒性作用の可逆性または悪化について評価することが可能である。

32. 観察事項はすべて、個体別に管理している個々の記録に記録する。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。

33. 症状観察では皮膚、被毛、眼、粘膜、呼吸器系、循環器系、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。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。追加評価として体内動態、バイオモニタリング、肺機能、肺組織に蓄積する難溶性物質の残留、行動の変化などの評価を試験実施計画書に含めてもよい。

© OCDE（2009 年）

体重

34. 各個体の体重を、初回暴露日（Day 0）の暴露直前に 1 回記録し、それ以降は週 2 回記録する（たとえば、暴露を実施しなかった週末における回復を立証するために金曜日および月曜日に体重を記録したり、全身毒性が評価可能な測定間隔で週 2 回体重を記録したりする）。死亡時または安楽死時にもまた、各個体の体重を記録する。暴露開始から 2 週間にわたって毒性作用が何も認められない場合、それ以降は体重の測定回数を週 1 回としてもよい。サテライト（回復）群を使用した場合、その体重を、回復期間を通じて週 1 回測定する。偏りのない器官重量体重比が算出できるよう、試験終了時には全例で体重を測定する。

摂餌量および摂水量

35. 摂餌量は週 1 回測定する。摂水量も測定してもかまわない。

臨床病理検査

36. 対照群およびサテライト（回復）群を含む全例で、安楽死時に臨床病理検査を実施する。速やかに復元するような評価項目については特に、暴露終了から採血までに要した時間を記録する。血漿中半減期が短いパラメータ（たとえば一酸化炭素ヘモグロビン［COHb］、コリンエステラーゼ［CHE］、メトヘモグロビン［MetHb］など）は、暴露終了時に試料を採取する。

37. あらゆる毒性試験で通常要求される臨床病理学的パラメータを表 1 に列記する。尿検査は通常は要求されないが、予測される毒性または観察された毒性から尿検査が有用であると考えられる場合、実施してもよい。試験責任者は、被験物質の毒性をより良く特徴付けるために、表 1 以外のパラメータ（たとえばコリンエステラーゼ、脂質、ホルモン、酸／塩基バランス、メトヘモグロビン、ハインツ小体、クレアチンキナーゼ、顆粒球系細胞／赤芽球系細胞比、トロポニン、動脈血ガス、乳酸デヒドロゲナーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼなど）を追加してもよい。

表 1：標準的な臨床病理学的パラメータ

	血液学的検査
赤血球数	総白血球数
ヘマトクリット	白血球分画
ヘモグロビン濃度	血小板数
平均赤血球ヘモグロビン	凝固能（以下のうち 1 種類を選択すること）
平均赤血球容積	プロトロンビン時間
平均赤血球ヘモグロビン濃度	凝固時間
網状赤血球	部分トロンボプラスチン時間
	血液生化学検査
血糖*	アラニンアミノトランスフェラーゼ
総コレステロール	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
トリグリセリド	アルカリホスファターゼ
血中尿素窒素	カリウム
総ビリルビン	ナトリウム
クレアチニン	カルシウム
総蛋白	リン
アルブミン	クロール
グロブリン	

尿検査（任意）

外観（色および濁度）	総蛋白
尿量	尿糖
比重または重量モル濃度	血液／血球
pH	

*絶食期間が長いと、暴露群と対照群の血糖測定値に偏りが出る可能性があるため、試験責任者は供試動物を絶食させるのが適切かどうか検討する。絶食期間を設定する場合、動物種に応じて絶食期間を選択する。たとえば、ラットの絶食期間は 16 時間（一晩絶食）とすることが可能である。空腹時血糖の測定は、最終暴露週で一晩絶食させた後に、または剖検前に一晩絶食させた後に実施することが可能である（剖検前に一晩絶食させてから空腹時血糖を測定する場合、他の臨床病理学的パラメータも同時に測定することが可能である）。

38. 下気道（すなわち肺胞）が主な蓄積・残留部位であるという根拠がある場合、肺胞炎、肺炎およびリン脂質症に焦点を当てて気管支肺胞洗浄（BAL）を実施し、仮説に基づく用量作用パラメータを定量的に分析してもよい。これによって、肺胞損傷の用量反応関係および時間推移を適切に立証することが可能である。BAL 液中の総白血球数、白血球分画、総蛋白、乳酸デヒドロゲナーゼを分析してもよい。その他にもリソソーム損傷、リン脂質症、線維症、刺激による炎症／アレルギー性炎症などを示唆するパラメータの測定（炎症誘発性のサイトカイン／ケモカインの測定も含む）を検討してもよい。BAL の測定結果は、通常、病理組織学的検査の結果を補完するものではあるが、病理組織学的検査の結果に取って替わるものではない。肺洗浄検査の実施方法に関するガイダンスは GD 39(2)に示している。

剖検および器官重量

39. 試験中の死亡例や動物福祉上の理由から安楽死させて試験から除外した例を含めた全例について、放血死させ（可能な場合）、肉眼的剖検を実施する。最終暴露から安楽死までの時間を個体ごとに記録する。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。

40. 病理組織学的検査に備えて、表 2 に示す器官および組織を適切な媒質を用いて剖検中に保存する。［］内の器官および組織、ならびにその他のすべての器官および組織の保存は、試験責任者の裁量によって実施する。**太字**で示した器官は摘出し、乾燥を防ぐために摘出後可能な限り速やかに湿重量を測定する。甲状腺および精巣上体は、摘出行為によって病理組織学的検査の結果に影響が出る可能性があるため、必要な場合のみ重量を測定する。組織および器官は、10%緩衝ホルマリンまたはその他の適切な固定液で剖検実施後速やかに固定し、使用する固定液に応じて、切り出しの 24～48 時間前までに固定する。

© OCDE（2009 年）

表 2. 剖検中に保存すべき器官および組織

副腎
骨髄（および新鮮な骨髄穿刺液の双方または一方）
脳（大脳、小脳および延髄／脳橋部位を含む）
［眼（網膜、視神経）および眼瞼］

心臓
腎臓
喉頭（3 切断面。1 面は喉頭蓋起始部を含むこと）
肝臓
肺（すべての肺葉から 1 切断面ずつ。主気管支を含むこと）
肺門リンパ節（特に被験物質が難溶性粒子の場合）。免疫学的な面に焦点を当てた、より詳細な検査または試験のために、縦隔リンパ節、頚部／下顎リンパ節および耳介リンパ節などのその他のリンパ節の保存を検討してもよい。
鼻咽頭組織（少なくとも 4 切断面を保存。1 面は鼻咽頭管および鼻咽頭関連リンパ組織［NALT］を含むこと）
食道
［嗅球］
卵巣
精嚢
脊髄（頚部、胸部中部および腰部）
脾臓
胃
精巣
胸腺
甲状腺
気管（2 切断面以上。横断面 1 面および気管カリナを含む縦断面 1 面を含むこと）
［膀胱］
子宮
すべての肉眼的病変

41. 肺は無傷のまま取りだし、重量を測定し、肺の構造が維持される適切な固定液を 20～30 cm 水柱の圧で注入する(5)。主気管支を含む断面の切片をすべての肺葉から 1 枚ずつ採取する。肺洗浄検査を実施した場合、洗浄していない肺葉の切片を 3 枚採取する（連続切片としないこと）。

42. 鼻咽頭組織は少なくとも 4 切断面で検査する。このうち 1 面には鼻咽頭管(5,6,7,8,9)（扁平上皮、移行上皮［気道の無線毛上皮］、気道上皮［気道の線毛上皮］、嗅上皮を適切に評価するため）および鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）(10,11)を含むこと。喉頭は 3 切断面で検査し、このうち 1 面には喉頭蓋起始部を含むこと(12)。気管は、横断面 1 面および肺外気管支の分岐部である気管カリナを含む縦断面 1 面を含む少なくとも 2 面で検査する。

病理組織学的検査

43. 対照群および高濃度群、ならびに試験中に死亡したまたは人道的理由から安楽死させたすべての個体において、表 2 に示した器官および組織の病理組織学的検査を実施する。気道、標的器官および肉眼的病変に特に注意を払うこと。高濃度群で病変が観察された器官および組織については、全群で病理組織学的検査を実施する。試験責任者は、明確な濃度反応関係を立証するため、上記に示した以外の群でも病理組織学的検査を実施することにしてもよい。サテライト（回復）群を使用した場合、暴露群で影響がみられたすべての組織および器官についてサテライト（回復）群でも病理組織学的検査を実施する。高濃度群で試験中に多数が死亡した場合または高濃度

群でデータの有意性を損なうようなその他の問題がみられた場合、その群より濃度段階が 1 段階下の群で病理組織学的検査を実施する。肉眼的剖検所見と病理組織学的検査所見の間に関連がみられるかどうか検討する。

データおよび報告

データ

44. 体重、摂餌量、臨床病理検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査について、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、観察された毒性徴候の内容、経過および可逆性、ならびに剖検所見を示す。定量的な結果および偶発的な結果などのすべての結果を、適切な統計方法によって解析する。一般的に認められているあらゆる統計方法を使用してよい。統計方法は試験計画の段階で選択する。

試験報告書

45. 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。同様の暴露条件、飼育条件および絶食条件下で暴露を行ったことが報告されている動物種については、その文献と背景データを示してもよい
- 動物数、週齢、性
- 無作為化の方法
- 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）

© OCDE（2009 年）

吸入チャンバー

- 吸入チャンバーの詳細な説明（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
- 空気源および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
- 吸気／排気の処理法、
- 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）
- 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）

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、体積濃度（たとえば ppm、ppb）ではなく、重量濃度（たとえば mg/L、mg/m3）で報告する
- 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）
- 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）
- チャンバー内の温度、湿度および空気流量のモニタリング（すなわち、検量線の作成）に使用した装置の詳細
- チャンバー内の濃度測定用試料および粒径分布測定用試料の採取に使用した装置の詳細

- 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）
- 試験群および対照群への無作為割付け法
- 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）
- 各個体の体重を示す表
- 摂餌量を示す表
- 臨床病理検査データを示す表
- 各個体の剖検所見、必要に応じて病理組織学的所見
- その他の測定パラメータの表

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）
- 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
- 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
- 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(3)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
- 標的器官を特定する
- NOAEL および最小毒性量（LOAEL）を決定する

© OCDE（2009 年）

参考文献

1) OECD (1981), *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) 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, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan, J.E. and Redden, J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth, D.L., Tyler, W.S., and Plopper, C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material* , Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6) Young J.T. (1981) Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1, 309-312.

7) Harkema J.R. (1990) Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85, 231-238.

8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A. van, Slootweg P.J. and Feron V.J. (1994) Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M. and Morgan K.T. (1994) Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22, 353-372.

10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C. and Sminia T. (1992) The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13, 219-224.

11) Kuper C.F., Arts J.H.E. and Feron V.J. (2003) Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141, 281-285.

12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3). 419-428.