OECD/OCDE

2018/06/25

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 (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(2018)

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

OECD/OCDE 412

2018 年 6 月 25 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

28 日間（亜急性）吸入毒性試験

要約

1. 本改訂版試験ガイドライン 412（TG 412）は、亜急性期間（28 日間）の吸入経路による被験化学物質の毒性を十分に明らかにし、定量的な吸入リスク評価に向け頑健なデータを提供するよう設計されている。本試験ガイドライン改訂の主要な推進力となったのは、ナノ材料に関する試験への対応、ならびに吸入ガス、蒸気およびエアロゾルの試験に関し進歩を遂げている科学の現状反映であった。今回の改訂では、主試験の実際のデザイン、被験化学物質の物理的形状（ガス、蒸気、液体のエアロゾル、または固体のエアロゾル）への依存性、ならびに、用量設定試験またはそれ以外の情報から、被験化学物質が肺に沈着および残留し、局所または全身への悪影響発現を示すか否かについて特に取り上げている。最低でも主試験はげっ歯類の雄 5 匹および雌 5 匹の群からなり、被験化学物質には 3 段階以上の濃度レベルで 28 日間（4 週間）にわたり 6 時間／日、また濾過空気（陰性対照）または溶媒（溶媒対照）に曝露させる。次いで、曝露期間終了後、24 時間以内に動物を屠殺する。動物は一般に 5 日／週曝露させるが、7 日／週の曝露も可能とする。すべての被験化学物質について、気管支肺胞洗浄（BAL）を実施する。これを達成するため、肺を次のとおり分割する。左肺は病理組織検査に用い、右肺は気管支肺胞洗浄液（BALF）の分析に用いる。回復群を計画する場合、回復群も肺の分割による BAL 分析を可能とする。被験化学物質が肺に残留する可能性がある場合、試験責任者は、肺クリアランスに関わる挙動および移動について情報提供可能な肺負荷量測定（後者は、被験化学物質が固体のナノ材料の場合、特に関連する）など、追加の曝露後観察（PEO）期間を検討できる。本試験ガイドラインでは、被験化学物質の全体的な毒性をより詳細に明らかにするため、トキシコキネティクスならびに／または全身毒性評価（例えば、免疫、肝臓、神経および／もしくは心血管への影響の評価）など、任意の追加調査も提案する。追加所見およびその解析に関するさらなるガイダンスは、改訂版ガイダンス文書 39（1）に見出せる。

© OECD, (2018)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

化学物質の評価における「データの相互受け入れ」に関する協議会決定事項補遺 I 改訂のための、権限委譲に関する協議会決定事項[C(2018)49]に従って、本ガイドラインは、OECD の化学物質委員会と化学物質、農薬およびバイオテクノロジーに関する作業部会との合同会議により、書面による手順で 2018 年 6 月 25 日に改訂された。

はじめに

2. OECD ガイドラインは、毒性学的反応の評価における科学的進歩、動物愛護の考慮および規制上のニーズの変化に照らし、定期的に見直される。亜急性吸入試験ガイドライン 412（TG 412）の初版（2）は、1981 年に採択された。本ガイドラインは、科学の現状を反映し、現在および将来の規制上のニーズを満たすため、2009 年に改訂された。今回の最新改訂版の主要な推進力となっているのは、ナノ材料を含んだ粒子エアロゾルの試験への対応である。ナノ粒子と微粒子は連続体として共存し、処理されたナノ粒子の試料は、その発生方法および物理化学的組成に応じ、試験空気中で凝集する傾向があると認められる。今回の最新版で最も注目すべき特徴は、次のとおりである。

- 今回の改訂では、病理組織検査および BAL 分析に向けた肺の分割により、すべての被験化学物質を対象に実施される気管支肺胞洗浄液（BALF）の具体的な測定結果を必要とする。計画された回復群も BALF 分析の対象とする。
- 用量設定試験またはそれ以外の関連情報から、吸入された試験粒子が難溶性で、肺に残留する可能性があると示唆される場合、肺における粒子の肺沈着および残留に関する情報を提供する肺負荷量測定を実施する。曝露終了後 24 時間以内に、すべての被験化学物質を対象に BALF 分析および肺負荷量測定が実施され、1～2 回の追加の曝露後観察（PEO）間隔で行われる。追加の PEO の必要性、曝露後間隔の持続期間、および PEO のタイミングは、試験の目的、ならびに用量設定試験および／またはそれ以外の関連情報の結果に基づき、試験責任者が判断する（例えば、肺内残留の測定には PEO-1；また、クリアランス動態の評価に肺負荷量測定を 3 回要する場合には PEO-1、PEO-2、PEO-3；補遺および GD 39 参照）。
- 主試験の濃度レベル評価のため主に実施される（1 回または複数の）用量設定試験は、BALF 分析も対象とすべきであり、肺負荷量測定も対象にできる。用量設定試験は、肺機能の性別による感受性差、体温などに関する情報を提供するデザインにすることも考えられるが、頑健性を失わないよう慎重に計画とバランスをとるべきである。
- TG 412 の 2009 年版では、微粒子のエアロゾルの空気動力学的質量中央径（MMAD）が 1～3 μm、幾何標準偏差（σg または GSD）が 1.5～3.0 であることを要件とした。ナノ範囲のエアロゾルの試験に適応し肺領域での沈着を増強するため、可能な限り新たな基準である MMAD 2 μm 以下、σg 1～3 を満たすこと。本基準を満たせない場合、粉砕など本基準を満たすため講じられた取り組みに関する記述を含め、その正当性を試験報告書に示す（GD 39 参照）。

3. 亜急性吸入毒性試験は、職業環境における作業員のリスクを評価する場合の規制濃度導出に主に用いられる。この試験は、ヒトの居住、消費者、輸送、環境に関するリスクの同定および評価にも用いられる。本ガイドラインでは、被験化学物質に 1 日 1 回 28 日間反復吸入曝露後の悪影響を明らかにできる。亜急性吸入毒性試験由来データは、定量的リスク評価および慢性試験の濃度選択に使用できる。本試験ガイドラインで用いられる専門用語の定義は、GD 39（1）に見出せる。

© OECD 2018

最初に考慮すべき事項

4. 試験の質を向上させ、動物の使用を最小限にし、試験を繰り返す必要性を回避するため、主試験の実施前に、試験実施施設は被験化学物質に関する入手可能なすべての情報を検討する。適切な試験濃度の選択に役立つことになる情報には、被験化学物質の同一性、化学構造、物理化学的特性、*in vitro* または *in vivo* 毒性試験の結果、予測される用途およびヒト曝露の可能性、構造的に関連する化学物質について入手可能な（Q）SAR データおよび毒性データ、ならびに他の反復曝露試験由来データが含まれると考えられる。固体のエアロゾルを検討する場合、肺におけるその残留および動態に関する情報を得ることが有用である。全身毒性（例えば、免疫毒性、神経毒性、肝毒性、心血管系への影響）が試験の過程で予測または観察される場合、試験責任者は、関連する毒性学的エンドポイントの適切な評価結果を含める選択を行える。特定の検査に関連する曝露のタイミングはきわめて重要であると考えられるが、そうした付加的な活動の実施を、主試験のデザインの妨げとはしないこと。

5. 被験化学物質が（単一または複数の）難溶性物質のエアロゾルとして生成される場合、溶解度の測定を含む次元、形態、および物理化学的特性評価を可能な限り実施する。ナノ材料の特性評価については、試験責任者は、「製造されたナノ材料の適用性に関する OECD 試験ガイドラインの予備審査」（3）ならびに「試料調製および粒子量測定に関するガイダンス文書」（4）を参照する。

6. 緩徐に除去される難溶性粒子の呼吸可能な（または肺胞の）分画は、各連続曝露期間に蓄積する可能性がある。肺内残留の程度は、肺負荷量測定により評価できる。これらの粒子の一部は、生体内に広く移動し分布する可能性がある。肺関連リンパ節（LALN）の負荷量測定は移動を示すことができ、標的器官の負荷量測定によりさらに実証できる。移動の影響は、全身毒性作用を考慮することにより評価できる。肺負荷量データは、ヒトリスク評価用の実験動物において、毒性所見の妥当性を排除するのに用いることはできない。さらなるガイダンスは GD 39（1）に提示されている。

7. 腐食性または刺激性の被験化学物質の希釈は、望ましい毒性の程度となる濃度で検討できる。動物をこれらの被験化学物質に曝露させる場合、目標濃度は、顕著な疼痛および苦痛を生じない十分な低濃度とするが、その濃度反応曲線は、規制上および科学上の試験の目的に達するレベルを示すのに十分であること。その濃度については、望ましくは、きわめて重要なエンドポイント、刺激の閾値、および発現時期に関する情報を提供する、適切にデザインされた用量設定試験に基づいてその都度選択する（段落 14～16 参照）。濃度選択の正当性について示すこと。

8. 疼痛で明らかに瀕死の動物、あるいは重度の持続的な苦痛の徴候を示す動物は、人道的に屠殺する。瀕死動物は、試験中に死亡した動物と同様にみなされる。瀕死動物または重度の苦しみを示す動物を屠殺する判断基準、および予測可能な死亡か差し迫った死亡かの認識に関するガイダンスは、「人道的エンドポイントとしての臨床徴候の認識、評価、使用に関する OECD ガイダンス文書 19」（GD 19）（5）のテーマとなっている。

© OECD 2018

試験方法

動物種の選択

9. 一般に用いられている実験室系統の健康な若齢成熟げっ歯類を使用する。望ましい動物種はラットである。他の動物種を用いる場合には、その正当性を示すこと。

動物の準備

10. 雌は未経産で非妊娠のものとする。無作為化日の動物は、7〜9 週齢の若齢成体とする。体重は、性別ごとの平均体重の±20%以内とする。動物を無作為に選択し、個体識別ができるようにマークを付け、試験開始前に 5 日間以上ケージで飼育し実験室の条件に馴化可能にする。

動物の飼育

11. 観察を容易にし混乱を避けるため、望ましくは皮下トランスポンダーにより、動物を個体識別する。実験での動物飼育室の温度は 22 ± 3°C とする。相対湿度は、理想的には 30〜70%の範囲に維持する。曝露前および曝露後、動物は通常性別および濃度別にケージで群飼するが、1 ケージ当たりの動物数は、各動物の明確な観察の妨げにせず、喰殺および闘争による損失を最小限に抑える。鼻部のみの曝露を用いる場合、拘束チューブにより動物に過度の物理的、熱的、運動抑制ストレスを課さないこと。実験室データにより、これらのストレスが懸念されないことが立証されている場合を除き、動物を拘束チューブに馴化させる。エアロゾルを全身チャンバーで曝露させる動物は、曝露中個別に収容することで、ケージ内同居動物の被毛を介した被験エアロゾルの濾過を回避できる。曝露中を除き、従来の認証された実験室用飼料を使用できると共に、市中の飲料水を無制限に供給する。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。

吸入チャンバー

12. 亜急性吸入毒性試験は、常に動的吸入チャンバーにおいて実施される。気流のない静的吸入チャンバーの使用は認められない。吸入チャンバーを選択する場合、被験化学物質の性質および試験の目的を考慮する。液体または固体のエアロゾル、および凝縮してエアロゾルを形成可能な蒸気の試験では、望ましい曝露様式は鼻部のみ（この用語は、頭部のみ、鼻部のみ、または吻部のみを包含する）である。特別な目的の試験であれば、動的全身曝露様式を用いることでより優れた結果を獲得可能であるが、そのことを試験報告書で正当化すること。全身チャンバーを用いる場合、環境の安定性を確保するため、被験動物の総体積はチャンバーの体積の 5%を超えないこと。鼻部のみおよび全身の曝露法の原則とその特有の利点および欠点は、GD 39（1）で検討されている。

© OECD 2018

毒性試験

限界濃度

13. 検討する最大濃度については、1）達成可能な最大濃度、2）十分な酸素供給を維持する必要性、および／または 3）動物愛護に関する検討事項を考慮する。データに基づく限度がない場合、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亜急性試験の限度を使用できる（すなわち、最大濃度の限度はエアロゾル 5 mg/L、蒸気 20 mg/L、ガス 20,000 ppm）。ガスまたは高揮発性の被験化学物質（冷却剤など）を検討する場合、この限度を超える必要があれば、その正当性を示すこと。粒子の場合、2 mg/L 超でのエアロゾルの試験は、呼吸可能粒子径を維持／達成可能な場合にのみ試みる（GD 39 参照）。

用量設定試験

14. 主試験のデザインは、用量設定試験の間に得られた情報に大いに左右される。頑健な主試験の実施に十分な情報が既に存在する場合を除き、用量設定試験を実施する。用量設定試験の主要な目的は、主試験の濃度レベル選択に関する情報提供にあるが、頑健な主試験を保証可能な追加情報も提供できる。このことは、難溶性の固体のエアロゾルを検討する場合、特に当てはまる。用量設定試験では、例えば、分析方法、粒径分布、全身毒性、トキシコキネティクス、肺における被験化学物質の溶解度、粒子の移動、毒性機序の発見、臨床病理検査（すなわち、血液学的検査／血液生化学的検査）、病理組織検査、肺損傷のバイオマーカー、性別による感受性差、BALF データ、ならびに主試験における無毒性濃度（NOAEC）、最小毒性濃度（LOAEC）、最大許容濃度（MTC）および／またはベンチマーク濃度（BMC）の推定値に関する情報を提供できる。試験責任者は、用量設定試験を用いて、動物への過度のストレスなしに許容される上限濃度、および被験化学物質の毒性を最も適切に特徴付けることになるパラメータを特定する。BAL は用量設定試験の曝露終了時に実施し、曝露後期間中は定期的に実施できる。固体のエアロゾルを検討する場合、被験化学物質の溶解度および曝露後の肺負荷量の評価を実施すると、主試験の曝露後期間の持続期間、および曝露後観察（PEO）時点の間隔を判断する情報を得ることができる。また、LALN の負荷量測定により、移動に関する情報を得ることができる。

15. 用量設定試験は、1 つまたは複数の被験化学物質濃度レベルと対照群から構成できる。選択したエンドポイントに応じ、通常、雄 5 匹以下および雌 5 匹以下に濃度レベルごとに曝露させる。用量設定試験は最短で 5 日間、通常は 14 日間以内で継続し、曝露後期間を含めることができ、それに応じて動物数を調整する。難溶性粒子を検討する場合、被験化学物質の溶解度および肺負荷量の頑健な評価を可能にするため、用量設定試験を 14 日間より延長する必要が生じうる。主試験の濃度選択の根拠を、試験報告書に示すこと。用量設定に関するさらなるガイダンスについては、GD 39（1）を参照のこと。

主試験

16. 主試験は、3 段階以上の被験化学物質濃度レベル、および同時陰性（空気）対照または溶媒対照からなる（段落 30 参照）。補遺に示すとおり、本ガイドラインでは、被験化学物質の性質に応じ 2 つの試験デザインに区分する。通常、

© OECD 2018

（ガス、蒸気、エアロゾル、またはその混合物として）被験化学物質に用いるオプション A に加え、オプション B は、肺内残留の可能性がある化学物質を検討する場合に用いる。補遺に示すオプション A および B は典型的な試験デザインを明らかにした模式図であるが、実際の試験デザインは試験責任者の裁量に委ねられる。用量設定試験の情報およびそれ以外のすべての入手可能な関連データを用い、試験デザインおよび適切な曝露レベルの選択を行うこと（段落 14 参照）。

17. 各群は、最低雄 5 匹および雌 5 匹のげっ歯類からなり、1 日 6 時間、週 5 日の基準で 4 週間（合計試験期間 28 日以上）被験化学物質に曝露させる。動物には週 7 日の曝露もできる。肺内残留の可能性がある化学物質を検討する場合（補遺：オプション B）、濃度ごとに雄 5 匹からなるサテライト群（すなわち、20 匹以上）を主試験の群と同時に曝露させ、曝露終了時の肺負荷量測定について PEO-1 で評価し、残留する用量に関する情報を提供する。用量設定試験により、いずれかの性で被験化学物質に対する感受性がより高いことを示す場合、段落 20 記載のとおり、濃度-反応を最適化するため雌雄異なる濃度レベルで曝露できる。

18. ラット以外の種のげっ歯類を鼻部のみに曝露させる場合、種特異的な苦痛を最小限に抑えるため、最大曝露期間を調整できる。6 時間／日未満の曝露時間を用いる場合、または長時間（例えば、22 時間／日）の全身曝露試験を実施する必要がある場合、その根拠を示すこと。

19. 曝露が 6 時間を超えない場合、曝露時間中の給餌は控える。水は、全身曝露の全期間を通じ供給できる。

20. 選択する目標濃度は、標的器官の同定を可能にし、次の明確な濃度-反応を示すこと。

- 高濃度レベルは明確な毒性レベルとなるが、致死をもたらすことはなく、また、致死に至るか、結果の意味のある評価を妨げると考えられる持続的な徴候ももたらさない。エアロゾルを検討する場合、高濃度は、粒径分布の基準を満たしながら到達できる最大達成可能レベルと考えられる（段落 39 参照）。
- 中濃度レベルは、低濃度と高濃度との間の毒性作用に 1 段階を設けるため配置する。
- 低濃度レベルは、理想的には NOAEC に当たると考えられ、毒性の証拠をほとんどまたは全くもたらさない。

中間屠殺

21. 主試験での曝露期間中に中間屠殺を計画する場合、各曝露レベルでの動物数を試験完了前の屠殺数だけ増加させる。中間屠殺を用いる根拠を示し、統計解析により中間屠殺について適切に説明する。

サテライト群

22. 適切な長さの投与後期間に、毒性の回復、持続、遅発性発現、または肺負荷量を評価するため、付加的なサテライト群を主試験に追加できる。サテライト

© OECD 2018

群を設けた主試験の例を補遺に示す。試験責任者は、最も頑健なデータを獲得するため、被験化学物質の物理化学的な特性および動態に基づき、試験デザインを改変できることが認められる。すべてのサテライト群は、主試験の実験動物と同一の濃度レベルで同時に曝露させ、必要に応じ同時空気対照または溶媒対照を置くべきである（段落 29 参照）。サテライト群のスケジュールおよびデザインは、被験化学物質が固体のエアロゾルか否かに左右され、補遺の肺負荷量判定フローチャートを受け、肺内残留となる可能性がある。被験化学物質が肺内残留となる可能性がある場合、オプション B 記載の主試験を実施し、そうでない場合、オプション A 記載の主試験を実施する。オプション A では、サテライト群を回復の評価に組み入れることができ、オプション B では、サテライト群を回復の評価および／または肺負荷量測定に提供する。

23. PEO-2 におけるサテライト回復群は、オプション A およびオプション B の濃度ごとに雄 5 匹および雌 5 匹からなる。これらの回復群は、主試験の実験動物と同一の濃度レベルで同時に曝露させ、必要に応じ同時空気対照または溶媒対照を置くべきである（段落 29 参照）。

24. 肺内残留の可能性がある難溶性の固体のエアロゾルを検討する場合（補遺：オプション B）、曝露後の様々な時点での肺負荷量測定のため、1 濃度当たり雄 5 匹からなる 1 つまたは 2 つの付加的なサテライト群を追加できる。こうした付加的な肺負荷量測定（すなわち、PEO-2 および／または PEO-3）を試験デザインに追加できるのは、試験責任者が被験物質曝露後のクリアランス動態の解明を望む場合である。クリアランス動態に関する情報提供には通常 3 つの時点を必要とするため、肺負荷量測定を、曝露終了後 24 時間以内（PEO-1）および付加的な 2 回の PEO（PEO-2、PEO-3）において実施する。ただし、クリアランスがきわめて緩徐か否か同定することを主要目的とする場合など、一部の状況下では、2 時点を用いて十分な情報を提供できる。肺負荷量測定は、雄の分時換気量が雌よりも高いため、肺負荷量がより大となりうる雄で実施するのが望ましい。

25. 用量設定試験の結果およびそれ以外の入手可能な関連情報に基づき、試験責任者は、曝露後期間の持続期間に加え、回復群での PEO-2 のタイミング、またオプション B の場合、肺負荷量サテライト群での PEO-3 のタイミングを定める（補遺参照）。オプション B の PEO-2 および PEO-3 のスケジュールは、肺クリアランスの予測速度および曝露後回復期間の持続期間に左右されることになる。以下に、それ以外に可能なオプションを示す。

- より適切と判断される場合、試験責任者は、回復群（PEO-2）（含まれる場合）の前に PEO-3 の計画を選択できる。
- 2 回の曝露後時点の使用で十分と判断される場合、回復および肺クリアランスの評価のタイミングを相互に調整可能であれば、肺負荷量測定を PEO-1（主試験）および PEO-2（回復群）のみで実施できる。その後、PEO-3 でのサテライト群を試験から除外できる。
- 試験責任者は、PEO-1（主試験）および PEO-3（サテライト群）での肺負荷量測定の実施、および、BALF 分析での回復群（PEO-2）の雌雄両方の使用を選択できる。

© OECD 2018

26. PEO の選択およびタイミングに留意し、反復試験が不要なことを確保しなければならない。試験責任者は、PEO の選択およびタイミングを正当化し、これらの点に明確に対処しなければならない。

27. 曝露終了時（PEO-1）および付加的な PEO 実施時（計画されている場合）、BALF 分析が必要である。肺負荷量を測定する場合（オプション B）、回復群の BALF 分析（PEO-2）は雌でのみ実施する（オプション B の群の雄は、肺負荷量測定に用いるため。段落 24 参照）。

28. オプション B では、付加的な群が肺負荷量測定（PEO-1 での主試験、PEO-2 および PEO-3 でのサテライト群）にのみ計画されるが、これらの動物では、被験化学物質のトキシコキネティクスおよび毒性（回復を含む）の理解に役立ちうる追加パラメータについて検討できる（GD 39 参照）。これらの追加パラメータは、補遺では未定（TBD）と称されている。PEO-1 で得られた知見を用いて PEO-3 で検討する追加パラメータを選択でき、例えば、PEO-1 と PEO-3 との間の持続期間からそうした検討を行える場合が挙げられる。例えば、PEO-3 では、左肺またはそれ以外の器官について、追加の病理組織検査を実施できる。

対照動物

29. 同時陰性（空気）対照動物は、被験化学物質ではなく濾過空気に曝露させることを除き、被験群の動物と同一の方法で取り扱う。試験空気生成の補助に水以外の溶媒を用いる場合、陰性（空気）対照群ではなく溶媒対照群を用いる。可能な限り、水を溶媒として用いる。水を溶媒として用いる場合、対照群は曝露群と同じ相対湿度の空気に曝露させる。適した溶媒の選択は、適切に実施された事前試験または過去のデータに基づく。溶媒の毒性が既知でない場合を除き、陰性対照と溶媒対照の併用は奨励されない。過去のデータから溶媒が無毒性であると認められた場合、陰性（空気）対照群は不要で、溶媒対照のみ用いる。溶媒中で調製された被験化学物質の事前試験から、無毒性であることが認められた場合、本溶媒は検討した濃度で無毒性ということになり、この溶媒対照を用いる。

曝露条件

投与濃度

30. ガス、蒸気、エアロゾル、またはそれらの混合物としての被験化学物質に、動物を曝露させる。検討される物理的状態は、被験化学物質の物理化学的性質、選択した濃度、および／または被験化学物質の取り扱い中および使用中に存在する可能性が最も高い物理的形状に左右される。吸湿性で化学反応性が高い被験化学物質は、乾燥空気条件下で検討する。爆発濃度にならないよう留意する。段落 39～42 記載の基準に従って、固体の物質は、粒径を縮小する機械的処理を受けることができる。機械的処理（粉砕）に関するさらなるガイダンスは GD 39（1）に提示されている。

溶媒を用いた被験化学物質の調製

31. 理想的には、被験化学物質は溶媒なしで検討し、固体のエアロゾルは乾燥させる。被験化学物質の適切な濃度および粒径を得るため、溶媒を用いる必要が

© OECD 2018

ある場合、可能な限り水を用いる。被験化学物質を溶媒に溶解する場合、その溶媒の安定性を立証する。

曝露条件のモニタリング

チャンバー内の気流

32. 曝露チャンバーを通る気流を慎重に制御し、継続的にモニターし、各曝露中少なくとも 1 時間に 1 回記録する。試験空気中の濃度（または経時的安定性）のリアルタイムモニタリングは、すべての動的パラメータに不可欠な測定であり、関連するすべての動的吸入パラメータを管理する間接的な手段となる。濃度をリアルタイムでモニターする場合、気流の測定頻度を、1 日当たり曝露ごとに 1 回の測定に減少できる。鼻部のみのチャンバーでの再呼吸を回避するよう、特に配慮する。酸素濃度は 19%以上、二酸化炭素濃度は 1%以下とする。この基準を満たせないと考える理由がある場合、酸素濃度および二酸化炭素濃度を測定する。曝露初日の測定で、これらのガスが適切なレベルにあると示された場合、さらなる測定は不要である。

チャンバーの温度および相対湿度

33. チャンバーの温度は 22 ± 3°C に維持する。鼻部のみと全身の曝露の両方について、被験動物の呼吸域の相対湿度を継続的にモニターし、可能であれば各曝露中 1 時間に 1 回記録する。相対湿度は、望ましくは 30～70%の範囲に維持すべきであるが、被験化学物質が試験方法の妨げになるため、これを達成できない（例えば、水ベースの製剤を検討する場合）か、測定できないかのいずれかが考えられる。

被験化学物質：名目濃度

34. 名目濃度は、生成した被験化学物質の質量を、吸入チャンバーシステムを通過する空気の総体積で除した値である。実行可能な場合はいつでも、曝露チャンバーの名目濃度を算出し記録する。名目濃度は、動物の曝露の特性評価には用いないが、名目濃度と分析濃度の比較は試験系の生成効率の指標となるため、生成に関する問題の発見に使用できる。

被験化学物質：分析濃度

35. 分析濃度は、吸入チャンバー内の動物の呼吸域で採取された被験化学物質の濃度である。分析濃度は、特異的方法（例えば、直接採取後、吸着または化学反応による方法を用い、その後の分析により特性評価）か、非特異的方法（例えば、フィルターを用いた重量分析）のいずれかにより入手できる。重量分析の使用は、単一成分の固体のエアロゾルか低揮発性液体のエアロゾルの場合のみ容認でき、事前試験での適切な被験化学物質特異的な特性評価により裏付ける。多成分の固体のエアロゾル濃度も重量分析により測定できるが、それには、この浮遊物質の組成が出発物質と類似していることを立証する分析データが必要である。この情報を入手できない場合、試験経過中に一定間隔で（理想的には浮遊状態において）被験化学物質の再分析を要することがある。蒸発または昇華しうるエアロゾル物質の場合、すべての相が選択された方法により捕集されたことを示す。

© OECD 2018

36. 可能であれば、1バッチ分の被験化学物質を試験期間全体を通じて用い、被験試料はその純度、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、被験化学物質の純度に加え、技術的に実行可能であれば、その同一性、ならびに同定された混入物質および不純物の量など、被験化学物質の特性評価を行う。このことは、保持時間および相対ピーク面積、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、あるいはそれ以外の推定値からなるデータにより立証できるが、これらに限定されるものではない。被験試料の同一性は試験実施施設の責務ではないが、試験実施施設では、試験依頼者の特性評価を少なくとも限られた方法（例えば、色、物理的性質など）で確認することが賢明であると考えられる。

37. 曝露空気は、実行可能な限り一定に保つ。リアルタイムモニタリング装置（エアロゾルにはエアロゾル光度計、また蒸気には全炭化水素分析計など）を用い、曝露条件の安定性を立証できる。チャンバーの分析濃度は、曝露レベルごとに各曝露日に3回以上測定する。限定的な気流速度または低濃度のため実行できない場合、曝露期間ごとに1試料の採取を容認できる。理想的には、この試料は、その後曝露期間全体にわたり捕集すべきである。個々のチャンバー濃度試料のチャンバー濃度平均値からの逸脱は、ガスおよび蒸気では±10%以内、液体または固体のエアロゾルでは±20%以内とする。チャンバーの平衡到達時間（t95）を算出し報告する。曝露期間は、被験化学物質生成時間を含む。曝露期間については、チャンバーの平衡到達（t95）および減衰到達に要する時間を考慮する。t95の推定に関するガイダンスは、GD 39（1）に見出せる。

38. ガス／蒸気およびエアロゾルからなるきわめて複雑な混合物（例えば、目的主導で最終的に用いる製品／装置から噴射される燃焼空気および被験化学物質）では、各相が吸入チャンバー内で異なる挙動を示す可能性がある。したがって、各相（ガス／蒸気およびエアロゾル）の指標物質（分析対象：通常は検討する製剤中の主要活性物質）を少なくとも1つ選択する。被験化学物質が混合物（例えば製剤）である場合、有効成分またはその構成要素（分析対象）だけでなく、製剤全体の分析濃度を報告する。分析濃度に関するさらなる情報は、GD 39（1）に見出せる。

被験化学物質：エアロゾルの粒径分布

39. 下気道の十分な曝露を確保するため、エアロゾルは可能な限り以下の基準を満たすこと。ラットの空気動力学的質量中央径（MMAD）は2 µm以下、幾何標準偏差（σgまたはGSD）は1〜3とする（GD 39参照）。この基準を満たすため合理的に取り組むべきであるが、実質的に達成できない場合、専門家の判断を用いるべきである。エアロゾルを凝縮し形成可能な蒸気については、粒径測定を実施する。沈着モデルを用い、エアロゾルが気道の特定の部分にどの程度あるいはどの部分に到達しているか推定できる。これにより、単回曝露後の肺負荷量データの裏付けもできる（GD 39参照）。ラット以外の種を検討する場合、下気道の十分な曝露をもたらす粒径分布のエアロゾルの使用要件について同様に考慮し、このことに基づき、選択した粒径の範囲を正当化する。MMADの基準を満たせない場合、その正当性を試験報告書に提示する。

40. 微細なエアロゾルの粒径分布は、カスケードインパクターか（熱力学的相

© OECD 2018

当径または光学を用いた）粒径測定装置などの代替機器の使用により、各濃度レベルについて望ましくは週 1 回測定する。カスケードインパクターと代替機器により得られた結果の同等性を示せた場合、試験全体を通じ代替機器を使用できる。

41. エアロゾル曝露粒子数と粒径分布のいずれについても、非繊維性および等尺性のナノ材料には、走査型移動度粒径測定装置、示差移動度分析器、または空気動力学的粒径測定装置が選好される。マイクロオリフィスを用いた均一沈着インパクターは、繊維性物質を含むすべての材料に用いられ、質量および粒径分布の観点から曝露濃度を測定できる。定量的に粒子曝露を測定する 2 種類以上の方法（すなわち、粒子数、粒径分布または粒子質量）を用いる。ナノ材料を用いて製造されるエアロゾルは、通常、凝集粒子からなるため、ミクロサイズとナノサイズの両粒子を含む粒径分布となりうる。したがって、上述の方法の組み合わせを用いて、このエアロゾルを特徴付ける必要があると考えられる。加えて、ナノ材料だけでなく、すべての微粒子の粒径および形状のモニタリングおよび定性的確認に向け、走査型および／または透過型電子顕微鏡を常に定期的に（例えば月 1 回）用いる。粒子表面積などそれ以外の尺度は、有用な補強になりうる。

42. 主要な装置の捕集効率を確認するため、主要な装置と並行して、重力分析フィルターまたはインピンジャー／ガスバブラーなど第 2 の定量装置を用いる。粒径分析により得られる質量濃度は、フィルター分析により得られる質量濃度の合理的な限界値の範囲内とする（GD 39（1）参照）。試験の初期相において、検討されたすべての濃度で同等性を立証可能な場合、さらなる確認用の測定を省略できる。動物愛護のため、試験の繰り返しとなりうる不確定なデータを最小限に抑える対策を講じる。

観察

43. 各曝露期間の前、曝露中、曝露後、また曝露後期間中、動物の臨床所見を得る。曝露中の動物の反応に応じ、より頻回の観察が必要となりうる。動物拘束チューブの使用、全身チャンバーの照明不良、あるいは不透明なチャンバー空気により動物の観察が妨げられる場合、曝露後の動物を慎重に観察する。翌日の曝露前の観察では、毒性作用の可逆性または悪化について評価できる。試験実施計画書に曝露後期間が含まれている場合、その期間中、動物を少なくとも 1 日 1 回観察する。

44. 各動物の個体別記録を残すと共に、すべての観察結果を記録する。動物が人道的な理由で屠殺された場合、または死亡した状態で発見された場合には、死亡時刻を可能な限り精密に記録する。

45. ケージ脇での観察には皮膚および被毛、眼、および粘膜の変化；呼吸器系および循環器系の変化；神経系の変化；ならびに体性運動活動および行動パターンの変化を含める。振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠、昏睡の観察に注意を向ける。直腸温の測定により、被験化学物質投与や拘束に関連する反射性の呼吸緩徐、Paintal（C 線維刺激）反射、または体温低下／体温上昇の根拠の裏付けとなる証拠を提供できる。試験実施計画書には、バイオモニタリング（尿／便の採取）、肺機能評価、行動の変化など追加評価を含めることができる。

© OECD 2018

体重

46. 動物の個体別体重を、初回曝露日（Day 0）の直前、その後週 2 回（例えば、曝露のない週末での回復を立証するため金曜日および月曜日、あるいは、全身毒性の評価を可能にする時間間隔）、ならびに死亡または安楽死の時点で記録する。最初の 2 週間に体重への顕著な影響がない場合、残りの試験期間の体重測定を週 1 回にできる。曝露後期間がある場合、動物の体重を週 1 回測定する。試験終了時、屠殺直前にすべての動物の体重を測定することで、バイアスのない器官重量体重比の算出を可能にする。

摂餌量および摂水量

47. 摂餌量は週 1 回測定する。摂水量も測定できる。試験実施計画書に曝露後期間が含まれている場合、この測定を継続する。

臨床病理検査

48. 少なくとも投与期間および回復期間の終了時には、曝露期間中および曝露後期間中、ならびに動物屠殺時の曝露動物および対照動物すべてを対象に、臨床病理検査の評価を実施する。肺負荷量測定に用いるサテライト群では臨床病理検査の評価は不要であるが、毒性（回復を含む）の理解に役立つとみなされる場合、選択されたパラメータについて PEO-2 および PEO-3 で評価できる（段落 29 参照）。曝露終了から採血までの時間間隔を記録する。血漿中半減期が短いパラメータ（例えば、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］）は、曝露終了後の試料採取が必要とされる。

49. すべての毒性試験に通常要求される臨床病理検査パラメータを、表 1 に示す。尿検査はルーチンベースでは要求されないが、予測または観察される毒性に基づき有用とみなされる場合、実施できる。試験責任者は、被験化学物質の毒性をより正確に特徴付けるため、追加パラメータ（コリンエステラーゼ、脂質、ホルモン、酸／塩基平衡、メトヘモグロビンまたはハインツ小体、クレアチンキナーゼ、骨髄細胞診、トロポニン、乳酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、およびγグルタミルトランスペプチダーゼなど）の評価を選択できる。

© OECD 2018

表 1. 標準的な臨床病理検査パラメータ

血液学的検査	
赤血球数 ヘマトクリット ヘモグロビン濃度 平均赤血球ヘモグロビン量 平均赤血球容積 平均赤血球ヘモグロビン濃度 網状赤血球	総白血球数 白血球分画 血小板数 凝固能（以下から 1 つ選択）： 　プロトロンビン時間 　凝固時間 　部分トロンボプラスチン時間
血液生化学的検査	
血糖* 総コレステロール トリグリセリド 血中尿素窒素 総ビリルビン クレアチニン 総蛋白 アルブミン グロブリン	アラニンアミノトランスフェラーゼ アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ アルカリホスファターゼ カリウム ナトリウム カルシウム リン 塩化物
尿検査（任意）	
外観（色度および濁度） 尿量 比重または浸透圧 pH	総蛋白 尿糖 血液／血球

* 絶食期間が長いと、投与群と対照群のグルコース測定値にバイアスを生じうるため、試験責任者は、被験動物の絶食が適切か否か判断する。絶食期間を用いる場合、用いる種に適した期間とすべきで、ラットの絶食期間は 16 時間（一晩絶食）と考えられる。空腹時血糖値の測定は、最終曝露週での一晩絶食後、または、剖検前の一晩絶食後に実施できる（後者の場合、それ以外のすべての血液学的検査／血液生化学的検査パラメータと共に実施）。

気管支肺胞洗浄

50. 気管支肺胞洗浄（BAL）は、PEO-1（曝露終了時から 24 時間以内）および曝露後 1 間隔目（PEO-2）で実施する（補遺：オプション A 参照）。難溶性のエアロゾルを検討する場合（補遺：オプション B 参照）、回復群を計画していれば、PEO-1（曝露終了後 24 時間以内）で雌雄両方、PEO-2 で雌の BAL を実施する。洗浄には、通常右肺が選好される。曝露後期間の持続期間および PEO のタイミングは、用量設定試験の結果およびそれ以外に入手可能な関連情報に基づき、試験責任者が決定する。GD 39 では、任意の BAL パラメータと BALF 分析実施方

© OECD 2018

法に関する具体的なガイダンスを提示している（1）。必須の BALF 分析には、以下パラメータが含まれる。

- 乳酸脱水素酵素（LDH）
- 総蛋白またはアルブミン
- 肺胞のマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球の数および分画

肺負荷量

51. 難溶性の固体のエアロゾルを検討する場合、肺負荷量測定により、残留する用量を明確に提示できる。肺負荷量測定を実施するのは、用量設定試験またはそれ以外の関連情報から、被験化学物質が肺内に残留しているかその可能性があると示唆される場合で、かつ入手可能な適切な分析方法がある場合とする。雄の分時換気量は雌より高いため、肺負荷量がより大となりうることから、雄を用いる。補遺（オプション B）に示すとおり、曝露終了時点での必須の肺負荷量測定（PEO-1）に向け、濃度ごとに雄 5 匹からなる群を主試験に追加する。沈着した被験化学物質は、粘液線毛輸送を介し誘導気道から迅速に除去可能となるため、PEO-1 を曝露終了から約 24 時間後に計画することになる。試験責任者には、PEO-2 および PEO-3 において、サテライト回復群の肺負荷量測定を行う選択肢がある（段落 17、23、24 参照）。肺クリアランス動態に関する明確な情報を得るため、同じ肺（右肺が推奨される）の肺負荷量測定を曝露後すべての時点で行う。曝露後期間の持続期間および PEO の間隔は、用量設定試験の結果およびそれ以外の関連情報に基づき、試験責任者が決定する。肺負荷量測定および評価に関するさらなるガイダンスは、GD 39 に見出せる（段落 24 も参照）。

眼科検査

52. 検眼鏡または同等の装置を用い、被験化学物質投与前のすべての動物を対象に、また、主試験終了時のすべての高濃度群および対照群を対象に、眼底、屈折透光体、虹彩、および結膜の眼科検査を実施する。眼の変化が検出された場合、サテライト群を含むそれ以外の群の動物すべてを検査する。

肉眼所見および器官重量

53. すべての被験動物（試験中死亡した動物または人道的理由で本試験から除外された動物を含む）について、完全な放血（実行可能な場合）および肉眼的剖検を行う。各動物の最終曝露終了から屠殺までの時間を記録する。死亡動物の発見直後に剖検を実施できない場合、動物を自己融解の最小化に十分な低温で冷蔵する（凍結しない）。剖検は、通常 1 日か 2 日以内に可能な限り早急に実施する。各動物について、気道の変化に特に留意しながら、すべての肉眼所見の変化を記録する。病理組織検査に向けた肉眼的剖検中、適切な媒体に保存すべき器官および組織を表 2 に示す。

© OECD 2018

表 2. 肉眼的剖検中に保存すべき器官および組織

副腎	食道
骨髄（および／または新鮮吸引骨髄）	嗅球
脳（大脳、小脳、延髄／脳橋の切片を含む）	**卵巣**
［眼（網膜、視神経）および眼瞼］	精嚢
心臓	脊髄（頸髄、胸髄、腰髄）
腎臓	**脾臓**
喉頭（喉頭蓋基部を含む 3 レベル）	胃
肝臓	**精巣**
肺（通常、主気管支および胸膜を含む左肺とするが、右肺の使用は可能。後述の考察を参照）	**胸腺**
	甲状腺*
肺門リンパ節（特に、難溶性微粒子の被験化学物質の場合）。免疫学的病巣のより詳細な検査および／または試験では、追加の流入領域リンパ節（例えば、後縦隔、内頸、傍胸腺、後頸部、耳介、および／または頸部／顎下領域のリンパ節）を検討できる。	気管（気管分岐部を通じた 1 縦断面と 1 横断面を含む 2 レベル以上）
	膀胱
	子宮
リンパ節（侵入門戸から遠位）	すべての肉眼的病変
鼻咽頭組織（4 レベル以上；1 レベルには鼻咽頭管および鼻関連リンパ系組織（NALT）を含む）	

注：角括弧［］内の器官および組織、ならびにそれ以外の器官および組織は、試験責任者の裁量で保存する。太字の器官は、乾燥を回避するため、切開後可能な限り迅速に除去し湿重量を測定する。剖検を実施したら直ちに、組織および器官を 10%緩衝ホルマリンまたは別の適切な固定液で固定し、用いる固定液に応じトリミングの 24～48 時間以上前に固定する。

* TG 407 参照。

54. 左肺を病理組織学的評価用に保存し、右肺を BAL に用いるが、左肺と右肺を逆にしてもよい。左肺を無傷のまま除去し重量を測定し、肺構造の維持を確保するため適切な固定液を水圧 20～30 cm で注入する（6）。試験デザインに肺負荷量測定用のサテライト群の使用が含まれている場合、サテライト群では両肺の重量を測定できる。

55. 4 レベル以上の鼻咽頭組織を検査し、その 1 つには、扁平上皮、移行上皮（非線毛気道上皮）、呼吸上皮（線毛気道上皮）、および嗅上皮の適切な検査を可能にする鼻咽頭管（7）（8）（9）（10）（11）、ならびに鼻咽頭の流入領域リンパ組織（NALT）（12）（13）を含むこと。3 レベルの喉頭を検査し、そのレベルの 1 つには喉頭蓋基部を含める（14）。肺外気管支の分枝である気管分岐部を通じた 1 縦断面と 1 横断面を含む、2 レベル以上の気管を検査する。3 レベル以上の左肺（または右肺）を検査し、そのレベルは肺葉の種々領域を示すこと。さらなるガイダンスは、GD 125（7）に見出せる。

© OECD 2018

56. 被験化学物質の移動を評価する必要がある場合、保存されている病理組織学的組織標本について、関連器官の粒子負荷量を測定できる。したがって、広範な分析方法を適用可能にするには、適切な保存方法の検討が重要である。保存されている標本とは無関係に、難溶性粒子を検討する場合、LALN における粒子の沈着を移動の指標として常に判定する。

病理組織検査

57. 対照群および高濃度群、ならびに試験中に死亡または屠殺したすべての動物について、表 2 に示したすべての器官および組織の病理組織学的評価を実施する。試験責任者は、明確な濃度反応を立証するため、追加の濃度群に関する組織病理学的評価の実施を選択できる。高曝露群において、データの有意性を損なう過度の早期死亡またはそれ以外の問題が認められた場合、次の低濃度での病理組織検査を検討する。気道、標的器官、肉眼的病変に特に留意する。高濃度群で病変を認めた器官および組織については、すべての群の検査を行う。回復群を用いる場合、投与群で影響を示すと同定されたすべての組織および器官について、病理組織学的評価を実施する。段落 28 に示すとおり、肺負荷量測定に用いるサテライト群については、病理組織検査を検討できる。病理組織学的評価には左肺の使用が推奨される。肉眼所見と顕微鏡所見との相関に取り組む。

肺機能

58. 試験責任者が、用量設定試験でげっ歯類の反射性の呼吸緩徐または Paintal 反射の証拠を見出した場合、あるいは、それ以外の情報（例えば体温低下）により、こうした反射を発現する可能性が示された場合、その反射の程度について、主試験での肺機能および体温の定期的な測定により定量化する。こうした反射および肺機能検査の実施方法に関するさらなる情報は、GD 39 に見出せる。

データおよび報告

データ

59. 体重、摂餌量、臨床病理検査、BALF 分析、肉眼所見、器官重量、肺負荷量（評価した場合）および病理組織検査に関する動物の個体別データを、用量設定試験と主試験の両方について示す。臨床所見データを表形式に要約し、被験群ごとに、使用動物数、毒性の具体的徴候を示した動物数、試験中に死亡して発見されたか人道的理由のため屠殺された動物数、動物の個体別死亡時間、毒性作用および可逆性の記述および時間的経過、ならびに剖検所見を示す。一般に認められている統計手法を使用できるが、用いる統計手法は試験デザイン中に選択する。

試験報告書

60. 試験報告書は、必要に応じ以下の情報を含む。

© OECD 2018

被験動物および飼育条件

- 飼育条件に関する記述：1 ケージ当たりの動物数（または数の変化）、床敷材、環境温度および相対湿度、証明間隔および飼料の特定など。
- 用いた動物種／系統、およびラット以外の種を用いた場合にはその正当性。類似の曝露、飼育、絶食条件下で曝露させた動物の場合であれば、情報源および過去データの提示でも可。
- 動物数、週齢、性別。
- 無作為化の方法。
- 飼料、検疫、眼科検査および疾患の治療など、試験前の条件付けまたはスクリーニングに関する記述。
- 被験化学物質
- 物理的性質、純度、および関連する場合は物理化学的特性（異性化または放射標識を含む）。微粒子、特にナノ材料に関連する追加の特性評価情報には、形状、表面積／比表面積、界面化学、コーティングおよび表面修飾を含む組成、表面電荷、粒子の溶解度、ならびに凝集／凝集状態が挙げられる。
- 既知の場合、識別データおよび CAS（Chemical Abstracts Service）登録番号。
- 溶媒
- 溶媒使用の正当性および溶媒選択の正当性（水以外の場合）。
- 溶媒が試験結果の妨げにならないことを立証する過去データまたは同時データ。
- 吸入チャンバー
- 体積を含む吸入チャンバーに関する詳細な記述。
- 動物への曝露および空気生成に用いた装置の供給元および記述。
- 温度、湿度、粒径、分析濃度の測定装置。
- 空調用の空気源およびシステム。
- 均質な試験空気を確保するため、装置の較正に用いられた方法。
- 圧力差（陽圧または陰圧）。
- チャンバー当たりの曝露ポート数（鼻部のみ）、チャンバー内の動物の位置（全身）。
- 試験空気の安定性。

© OECD 2018

- チャンバー内の温度および湿度センサーの位置、ならびに試験空気の試料採取法。
- 給気／排気の処理法。
- 気流速度、気流速度／曝露ポート（鼻部のみ）、または動物の荷重／チャンバー（全身）。
- 吸入チャンバーの平衡到達時間（t95）。
- 1 時間当たりの換気回数。
- 計量装置（該当する場合）。

曝露データ

- 主試験における目標濃度選択の根拠。
- 名目濃度（吸入チャンバー中に生成した被験化学物質の総質量を、チャンバーを通過する空気の体積で除した値）。
- 動物の呼吸域から採取した分析用の被験化学物質濃度。異質の物理的形態（ガス、蒸気、エアロゾル）を生じる被験混合物の場合、形態ごとに別々に分析できる。
- 空気中の濃度はすべて、体積単位（ppm、ppb など）ではなく、質量単位（mg/L、mg/m^3 など）で報告する。
- 粒径分布、空気動力学的質量中央径（MMAD）、幾何標準偏差（σg）およびその算出方法。個々の粒径分析について報告する。100 nm 未満の粒子を含むエアロゾルの試験空気の場合、熱力学的相当径（計数または質量中央径）も報告する。
- エアロゾル中のナノ粒子（NP）凝集度の解析。
- 試験条件
- 固体の材料の粒径縮小や、被験化学物質の溶液調製に用いる手順の詳細など、被験化学物質調製の詳細。
- 試験空気を生成し、この試験空気に動物を曝露させるため用いた装置の説明（図を含めるのが望ましい）。
- チャンバーの温度、湿度およびチャンバーの気流のモニター（すなわち、検量線の作成）に用いた装置の詳細。
- チャンバー濃度および粒径分布測定用の試料採取に用いた装置の詳細。
- 用いた化学分析法、および（サンプリング媒体からの被験化学物質の回収効率など）方法のバリデーションの詳細。
- 被験群および対照群への動物の割り付けに関する無作為化の方法。
- （飼料の種類／供給元、水の供給元など）食餌および水の質の詳細。

© OECD 2018

- BALF 分析および肺負荷量測定に用いた方法の詳細。
- 結果
- チャンバーの温度、湿度および気流の表。
- チャンバーの目標濃度、分析濃度、名目濃度のデータを示した表。
- MMAD が 1 μm 超（すなわち微粒子）のエアロゾル空気では、空気動力学的質量中央径（MMAD）および関連する幾何標準偏差（σg）と共に、空気動力学的粒径分布に関する情報が必要である。主に 100 nm 未満のエアロゾルでは、粒子数中央径（CMD）および関連する幾何標準偏差（σg）と共に、熱力学的相当径の分布に関する情報が必要である。ナノサイズの範囲とより大きなサイズの両方の重要な成分を有するエアロゾルでは、エアロゾルの特性を十分に評価するには、こうしたエアロゾルの場合、100 nm 未満の粒子の割合に関する情報も提供すべきであることから、上記データを組み合わせる必要があると考えられる。
- 各動物（すなわち、死亡、性質、重症度、発現時期、影響期間を含む毒性徴候を示した動物）の反応データおよび濃度レベルの表。
- 動物の個体別体重の表。
- 摂餌量の表。
- 臨床病理検査データの表。
- 気管支肺胞洗浄液（BALF）データの表。
- 測定した場合、肺負荷量の表。
- 測定した場合、肺機能データおよび体温の表。
- 入手可能な場合、各動物の器官重量、肉眼所見および病理組織学的所見。
- 全身毒性（例えば、免疫毒性、神経毒性、肝毒性、心血管への影響）に関する任意の健康評価から得られた報告所見。

結果の考察および解釈

- 本試験ガイドラインの基準を満たすために用いた方法の記述に重点を置く。
- 全体的な結果の観点から、エアロゾル粒子の呼吸の可能性に注意を向ける（特に MMAD の基準を満たせなかった場合）。
- 分析濃度および名目濃度の測定に用いた方法の一貫性、ならびに分析濃度と名目濃度との関係を、試験の全体評価に含める。
- 考えられる死因および主な作用機序（全身性と局所性との対比）に注意を向ける。

© OECD 2018

- 「人道的エンドポイントに関する OECD ガイダンス文書」（5）の基準に基づき、疼痛または重度の持続的な苦痛の徴候を示す動物の人道的屠殺を要した場合、その説明を示す。
- 標的器官を特定する。
- BMC または NOAEC および LOAEC を判定する。
- 試験結果に影響を及ぼしたと考えられる、主試験で発生した合併症の記述。
- 該当する場合、観察後の肺負荷量測定の包含、デザインおよび方法の詳細な正当化。

参考文献

1) 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.

2) OECD (1981), Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

3) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, OECD, Paris.

4) OECD (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 36, OECD, Paris. OECD, Paris

5) 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.

6) 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.

7) OECD (2010). Guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies supporting TG 412 (subacute inhalation toxicity: 28 day study) and TG 413 (subchronic inhalation toxicity: 90-day study). Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 125. ENV/JM/MONO(2010)16, OECD, Paris.

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

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

10) 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.

11) 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.

12) 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.

© OECD 2018

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

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

© OECD 2018

補遺：TG 412 における試験の模式図

TG 412：オプション A—ガス、蒸気、液体のエアロゾル、可溶性の固体のエアロゾル

PEO-1 での主試験および PEO-2 でのサテライト群における検査：

- 臨床所見
- 体重測定
- 摂餌量／摂水量
- 臨床病理検査
- 肉眼所見／器官重量
- 肺重量—左肺
- 病理組織検査—左肺
- BALF—右肺

曝露群	主試験	サテライト群	総動物数
	PEO-1	PEO-2	
0	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	
C_1	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	
C_2	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	
C_3	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	
	∑ = 40	∑ = 40	∑ = 80

略語：

0	= control group	= 対照群	f	= female	= 雌
C_x	= exposure concentration	= 曝露濃度	m	= male	= 雄
BAL	= bronchoalveolar lavage	= 気管支肺胞洗浄	PEO	= post-exposure observations	= 曝露後観察
HP	= histopathology	= 病理組織検査	PEO-1	= within one day after the last exposure day	= 最終曝露日から 1 日以内
LB	= lung burden	= 肺負荷量	PEO-2	= within x weeks after the last exposure day	= 最終曝露日から x 週間以内
LL	= left lung	= 左肺	PEO-3	= within y weeks after the last exposure day (PEO-3 can be before or after PEO-2)	= 最終曝露日から y 週間以内（PEO-3 は PEO-2 の前か後にできる）
RL	= right lung	= 右肺	TBD	= to be determined	= 未定

注：主試験の成功は、用量設定試験または過去の試験から得られた情報に左右される。被験化学物質にはすべてオプション A を用いるが、例外として、難溶性の固体のエアロゾルにはオプション B を用いる。GD 39 では、被験化学物質のハザードの評価を最適化するため、試験責任者がこれら 2 つの選択肢をいかにしてカスタマイズ可能か記載している。

© OECD 2018

TG 412：オプション B—難溶性の固体のエアロゾル

主試験における検査：

PEO-1（雌雄）：
- 臨床所見
- 体重測定
- 摂餌量／摂水量
- 臨床病理検査
- 肉眼所見／器官重量
- 肺重量—左肺（雌雄）
- 病理組織検査—左肺（雌雄）
- BALF—右肺（雌雄）

PEO-1（サテライト群、雄のみ）：
- 肺負荷量—右肺
- その他、試験責任者により未定（TBD）とされたパラメータ

曝露群	主試験 PEO-1		総動物数
0	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_1	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_2	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_3	HP (LL) + BAL (RL) f 5/m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
	∑ = 40	∑ = 20	∑ = 60

赤 = 実施すべき
緑 = 任意

PEO-2 および／または PEO-3 でのサテライト群における検査*：

PEO-2（雌雄）：
- 肺重量—左肺（雌雄）
- 病理組織検査—左肺（雌雄）
- BALF—右肺（雌のみ）
- 肺負荷量—右肺（雄のみ）

PEO-3（雄のみ）：
- 肺負荷量（右肺）
- その他、試験責任者により未定（TBD）とされたパラメータ

曝露群	サテライト群 [3] PEO-2		サテライト群 [3] PEO-3	総動物数
0	HP (LL) + BAL (RL) f 5	HP (LL) + LB (RL) m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_1	HP (LL) + BAL (RL) f 5	HP (LL) + LB (RL) m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_2	HP (LL) + BAL (RL) f 5	HP (LL) + LB (RL) m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
C_3	HP (LL) + BAL (RL) f 5	HP (LL) + LB (RL) m 5	LB (RL) (+ TBD) m 5	
	∑ = 40		∑ = 20	∑ = 60

注：* PEO-2 および／または PEO-3 における追加のサテライト群の必要性、曝露後間隔の持続期間、ならびに PEO のタイミングは、試験の目的ならびに用量設定試験および／またはそれ以外の関連情報の結果に基づき、試験責任者が決定する。例えば、クリアランス動態の評価に複数の肺負荷量測定が必要な場合、PEO-1、PEO-2 および／または PEO-3 が用いられる（GD 39 参照）。

© OECD 2018