OECD/OCDE

1981/05/12

試験ガイドライン No.413

90 日間（亜慢性）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. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-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-413-1981.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

亜慢性吸入毒性：90 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

ガス、揮発性物質、エアゾール、粒子状物質の毒性の判定および評価について、亜慢性吸入毒性試験は、急性毒性試験によって得られる初期の報告の後に行われる。この試験は、限られた期間の、吸入経路による反復暴露によって起こりがちな健康障害に関する情報をもたらす。吸入物質による障害は、その物質固有の毒性と揮発性および粒子の大きさなどのような物理的要因に影響される。

・定義

亜慢性吸入毒性とは、一生涯の一部分（10%を越えない）の間の吸入による繰り返し暴露による有害な影響である。

・試験法の原則

数群の試験動物に 90 日間、１群１濃度として各段階の濃度の被験物質を毎日暴露する。環境気

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。

中で物質を適当な濃度にするため、溶媒を用いる場合は溶媒対照群をおく。暴露期間中、動物の毒性徴候を毎日観察する。試験中の死亡動物は剖検し、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の濃度にするために必要に応じて適当な溶媒を被験物質に加えることもある。溶媒を用いるときには、溶媒が被験物質の吸収に影響を与えたり、また毒性を発現したりしないことを明らかにしておく。

・試験動物

動物種の選択

各種の哺乳動物が使用されるが、この指針では主にげっ歯類を用いることで述べる。げっ歯類ではラットが望ましい。一般に使用されている系統の、健康な幼若動物を使う。試験開始時の動物の体重変動は平均で±20%以内とする。亜慢性吸入毒性試験が長期試験への予備として実施される場合には、両試験とも同じ種、同じ系統の動物を使用すべきである。

動物数と性

少なくとも 20 匹（雄雌 10 匹）の動物を使用する。雌は未経産で妊娠していない動物を使用する。もし途中で解剖が計画されているならば、最初から試験中に解剖する動物の数だけ増しておく。さらに、20 匹（雌雄 10 匹）のサテライト群を設け、高濃度で 90 日間暴露し、その後、適当な期間、通常 28 日間以上、毒性作用の可逆性・持続性・遅発性について観察してもよい。

亜慢性吸入毒性：90 日試験

飼育および給餌条件（暴露前と暴露後）

動物室内の温度は 22℃（± 3 ℃）、相対湿度は 30～70%にする。人工照明下では 12 時間間隔で明暗を切替える。飼料は一般飼料を用い、水は自由摂取とする。動物は性別に分け、グループごとないし個別飼いとする。 1 ケージあたりの動物数は、個々の動物の十分な観察を妨げない程度とする。

・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。チャンバー内の環境の安定を確保する一般的な方法としては、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、経皮や経口による暴露を避けたいならば、ロー鼻部ないし頭部暴露法をとることができる。

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。チャンバー内をわずかに陰圧に維持すると、室外へ被験物質の漏洩が防止できる。

・試験条件

暴露濃度

対照群と、より適切には溶媒対照群（最高投与量での溶媒濃度に相当する）を含む少なくとも３群を使用する。被験物質を暴露する以外は、対照群の動物も処置群と同じ方法で扱われる。最高濃度群では毒性作用が生ずる必要があるが、意味ある評価を妨げるような死亡が多発してはならない。低濃度群ではいかなる毒性作用も発現してはならない。ヒトの暴露に関して適した推定が得られるときには、最低濃度はこれを越えるものとする。理想的には、中間濃度は最小限の毒性作用がみられるものとする。二つ以上の中間濃度を用いるならば、段階的に毒性作用が発現す

るように間隔をとる。試験結果の意味ある評価を可能にするために、低濃度、中間濃度および対照群における死亡例の発生は低くなければならない。被験物質に爆発の危険が考えられるときは、爆発を起こす濃度を避けるよう配慮する。

暴露時間

毎日の暴露時間は、チャンバー内濃度が一定になった後、6 時間とする。しかし、特別な要求があればこの時間を変えることができる。

観察時間

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取る。

・試験の実施

動物は 90 日間、理想的には週に 7 日間毎日被験物質に暴露される。しかし、主に現実的な理由により週 5 日間の暴露は許容できると考える。処置後の追跡観察に計画したサテライト群の動物は、さらに 28 日間処置せずに毒性作用の可逆性・持続性をみるため飼育する。試験を行うときの温度は 22（±３℃）に維持する。理想的には、相対湿度は 30～70%の間に維持するが、ある場合には（たとえばエアゾールの試験では）実行できないであろう。暴露中は、給餌給水は行わない。

・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) 暴露期間中の被験物質の濃度をできるだけ一定に保つ。

(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。暴露期間中、粒子分布の恒常性を測定するのに必要なだけ何回でも分析を行う。

(d) 温度と湿度は、できるだけ連続的に記録する。

・臨床検査

暴露中および暴露後も動物の観察を行う。観察は系統的に実施し、記録する。記録は、動物ごとに保存する。毒性の徴候の現れた時期、程度、持続期間を記録する。ケージサイドの観察は、少なくとも下記の項目を含む。皮膚、被毛、眼球、粘膜、呼吸器系、循環器系、自律神経系、中枢神経系機態、運動ならびに行動パターンの変化週１回、体重、摂餌量を測定する。動物の共食や、組織の自己融解、あるいは配置の誤りといった原因によって試験動物が失われないことを確保するために定期的な観察が必要である。試験終了時、サテライト群を除いた群で、生存するすべての動物は屠殺する。瀕死の動物は発見しだい隔離し、屠殺する。

次の検査を行う。

(a) 眼科学的検査を、被験物質暴露を行う前と試験終了時に、できる限りすべての動物に、また、少なくとも最高用量群と対照群について、検眼鏡ないしは同様な適切な装置を用いて行う。もし眼に変化が発見されたならば、すべての動物を検査する。

(b) ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、赤血球数とその百分比、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、血小板数などの凝固関連因子を含む血液検査を試験終了時に行う。

(c) 血液生化学検査を、実験終了時に行う。すべての実験に適当と考えられる検査範囲は、電解質平衡、炭水化物代謝、肝および腎機能である。検査項目の選択は、その物質の作用形態により異なる。そして、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な他の検査項目は、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があげられる。観察された毒性作用の検査をさらに進めるために必要な場合には、追加の臨床生化学的検査を行う。

(d) 尿検査は、ルーチンとしては必要でないが、毒性が予想されるか、あるいは観察されたならば行う。

バックグランドとなる基礎データが不十分ならば、投与開始前に血液学的検査・臨床生化学的検査の項目の決定について考慮する。

・病理

剖検

試験に用いたすべての動物は、体表すべての開口部、頭蓋、胸腔、腹腔と内部器官の観察を含む剖検を行う。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。以下の器官や組織は、その後の病理組織学的検査のために、適切な媒質の中に保存する。すべての肉眼的病変部、肺－無傷でとり出し、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（固定液で潅流することは効果的と考えられる)、鼻咽頭組織、脳－延髄／橋、小脳

* 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

皮質および大脳皮質の切片を含む、下垂体、甲状腺／上皮小体、胸腺、気管、心、大動脈、唾液腺、肝、脾、腎、副腎、膵、性腺、子宮、(副生殖器)、(皮膚)、胆のう（ある場合に)、食道、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)、(脊髄の三部位－頸部, 胸部中間部, 腰部)、および（眼窩外涙腺）（上記カッコ内の組織は、毒性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必要がある）

病理組織学

(a) 呼吸器系や他の器官、組織につき対照と高濃度群のすべてで十分な病理組織学的検査を行う。

(b) すべての肉眼的病変部

(c) その他の群の標的器官

(d) 低および中間用量投与群の動物の肺は、主に感染の証拠をみるため病理組織学的検査を行う。これは動物の健康状態の判定に便利である。さらに、高用量群の障害がみられた器官については病理組織学的検査を常に行うべきであるが、これらの群の動物についてはルーチン的に行う必要はない。

(e) 衛星群を設けた場合には、他の投与群で影響を示すことが明らかにされた組織および器官の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、各種障害を発生した動物数の百分率を表の形にまとめる。

定量的ならびに偶発的なすべての観察結果は、適切な統計処理で評価する。一般的に受け入れられている統計方法を使用し、その方法は試験の計画の段階で選択しておく。

亜慢性吸入毒性：90 日試験

・結果の評価

亜慢性吸入毒性試験の所見は、先に行われた諸試験の所見と関連づけて評価し、また観察された毒性作用、剖検所見や病理組織所見によって考慮する。評価には、被験物質の濃度、暴露期間、行動および臨床的異常を含めたすべての異常の有無や頻度および重篤度、肉眼的変化、明らかにされた標的臓器、体重の変化、死亡率の影響やその他の一般的、あるいは特異的毒性評価との関係を含めて考える。適切に管理された 90 日間の試験で、無作用量の満足すべき評価が期待できる。

・試験報告書

試験報告には次の情報を含む。

(a) 試験条件

暴露装置に関する記録として、デザイン、タイプ、寸法、空気源、粒子およびエアゾール発生系、空気調整の方法、排気の処理法、そしてこのチャンバーを使用したときその中での動物の飼育方法を含む。

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

これらは表示され、平均値と変動値（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（例えば気体力学的な粒子径平均値と標準偏差）

(c) 動物に関する成績

－使用した動物種と系
－性別と濃度ごとの毒性反応
－試験中の死亡時期と動物終了時の生存動物
－毒毒性や他の影響
－それぞれの異常反応の観察時期と、その後の経過
－摂餌量と体重の成績
－血液検査項目と適当な基礎成績
－臨床生化学検査項目と適当な基礎成績
－剖検所見
－詳細に記述した、すべての病理組織学的所見
－可能な限り、結果の統計処理

・結果の解釈

亜慢性吸入試験は、ある化学物質の反復吸入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様式とその毒性、無作用量ならびにヒトへの暴露許容量に関して有効な情報を提供する。

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.
3. Casarett, L. J. and Doull, J.: Toxicology:Basic Science of Poisons, Chapter 9, Macmillan Publishing Co. Inc., New York, 1975.
4. McFarland, H. N.: “Respiratory Toxicology”, in Essays in Toxicology, Vol. 7, pp. 121~154, ed. Hayes, W. J., Academic Press, New York, 1976.
5. Cage, J. C.: “Experimental Inhalation Toxicology”, in Methods in Toxicology, pp. 258~277, ed. Paget, G. E., Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.