OECD/OCDE

2001/12/17

試験ガイドライン No.423

急性経口毒性試験 － 毒性等級法

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 (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071001-en.

©OECD (2002)

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

2001 年 12 月 17 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

急性経口毒性試験 － 毒性等級法

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、科学的進歩や実際の評価法の変化を踏まえて定期的に見直されている。ガイドライン 423 の初版は、試験ガイドライン 401 に記載された従来の急性毒性試験の二番目の代替法として、1996 年 3 月に採択された。その後、数回の専門家委員会からの勧告に基づき、時宜を得て改訂が検討されたが、これは、i）化学物質の分類のための半数致死量（LD_{50}）の統一カットオフ値について国際的な合意がなされ、1996 年版のガイドラインの推奨カットオフ値と相違が生じたこと、また ii）現在では片性（原則として雌）の試験で十分であると考えられていること、によるものであった。

2. 本ガイドラインで提示する毒性等級法(1)は段階的な方法であり、段階ごとに片性の動物を 3 匹使用する。被験物質の急性毒性の判定には、動物の死亡または瀕死状態の有無により、平均 2～4 段階が必要になるであろう。この方法には再現性があり、ごく少数の動物しか使用せず、かつ他の急性毒性試験法（試験ガイドライン 420 および 425）と同様に物質を分類することが可能である。毒性等級法は、固定用量を用いた生物測定学的評価に基づく方法(2)(3)(4)(5)で、これらの用量は等級付けと有害性評価を目的とした物質の分類ができるように適当な間隔で設定されている。1996 年に採択された方法については、国内(6)で、また国際的にも(7)広範な *in vivo* バリデーションが行なわれ、文献から得られた LD_{50} データと比較された。

3. 目的に合った最適な試験方法の選択の仕方は、「急性経口毒性試験のガイダンス文書」(8)に記載されている。また、このガイダンス文書には試験ガイドライン 423 の実施と解釈に関するその他の情報も含まれている。

4. このガイドラインの中で用いる定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

5. 腐食性や高度の刺激作用により顕著な疼痛や苦痛を生じることがわかっている用量で被験物質を投与する必要はない。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と殺する際の判断基準、および予期される死亡や差し迫った死亡の見分け方については、別のガイダンス文書(9)に記載されている。

6. この方法ではあらかじめ定められた投与用量を用いる。その結果は、急性毒性を生じる化学物質の分類に関する世界調和システム(10)に従って物質を分類および等級付けすることを可能にする。

7. この方法は、原則として、正確な LD_{50} が算出できるように意図したものではないが、依然として投与した動物のうち何匹かの死亡を主要評価指標としているため、死亡が予想される特定の暴露範囲を決定することができる。この方法で LD_{50} 値を決定できるのは、少なくとも二つの投与用量で死亡率が 0%より高く、かつ 100%より低かった場合のみである。被験物質に関係なく、あらかじめ定められた中から投与用量を選択し、種々の状態における動物数と明確に結びついた分類法を用いることで、異なる試験施設間の報告の一貫性と再現性を改善できる。

8. 試験の実施前に被験物質に関する入手可能なすべての情報を検討する。その中には物質の特定と化学構造、物理化学的性質、その物質に関する他のすべての *in vitro* および *in vivo* 毒性試験結果、構造関連物質の毒性データ、および予想される物質の使用法が含まれる。これらの情報は、ヒトの健康を守る上でその試験が役立つかどうかの懸念を払拭するのに必要であり、また適切な開始投与用量設定の参考にもなる。

試験の概要

9. 本試験は、一つの段階につき最少の動物数を用いる段階的な方法により、被験物質の等級付けができるような、急性毒性に関する十分な情報を得るものである。試験では、被験物質を定められた投与用量のうちの 1 用量を用いて実験動物群に経口投与する。試験は段階的な方法によって行ない、段階ごとに片性の動物（原則として雌）を 3 匹使用する。一つの段階での被験物質による投与動物の死亡の有無で次の段階、すなわち、
   －それ以上の試験は不要、
   －同じ用量を別の 3 匹に投与、
   －その上、またはその下の用量を別の 3 匹に投与
   のいずれかが決定される。

10. 試験手順の詳細を補遺 2 に示す。この方法により、一定の LD_{50} のカットオフ値に基づく一連の毒性等級のいずれに被験物質を分類するかの判断が可能になる。

試験方法

動物種の選択

11. 試験の動物種としてはラットが望ましいが、他のげっ歯類動物を用いてもよい。原則として、雌を用いる(9)。これは、従来の LD_{50} 試験に関する文献調査から、感受性にはほとんど性差がないものの、性差が認められる場合には、雌の方が一般的にやや感受性が高いことが示されているためである(11)。ただし、構造関連物質の毒性学的性質やトキシコキネティクスに関する知見から、雄の方が感受性が高いと判断される場合には雄を用いる。雄で試験を実施する場合には、その妥当性を示す。

12. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を試験に使用する。雌は未経産で非妊娠のものを用いる。各動物は投与開始時において 8～12 週齢とし、体重は先に投与された動物の平均体重の± 20%以内とする。

飼育および給餌条件

13. 動物飼育室の温度は 22±3℃とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。動物は投与用量ごとに群飼してよいが、1 ケージ当たりの動物数は各個体をしっかり観察できるような数とする。

動物の準備

14. 動物を無作為に選び、個体識別ができるように印を付け、投与前に飼育ケージで 5 日間以上飼育して試験環境に馴化させる。

投与の準備

15. 一般には投与液の濃度を変えることにより、試験する全投与用量で被験物質を一定容量で投与する。ただし、液体の最終製品またはその混合物を試験する際には、被験物質を希釈せずに（一定濃度で）用いる方が、その物質のその後のリスク評価にとってより適切な場合があり、また一部の規制当局で要求している方法でもある。なお、いずれの場合も最大投与容量を超えないこと。一回に投与可能な液体の最大容量は試験動物の大きさによって異なる。げっ歯類の場合、その容量は原則として体重 100 g 当たり 1 mL を超えないようにするが、水溶液については体重 100 g 当たり 2 mL まで考慮できる。投与液の調製に関しては、可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液／水性乳剤の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液／乳剤を、その後に他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性がわかっていなければならない。投与液の使用期間中の安定性が既知で、許容範囲内であることが示されていない限り、調製は投与直前に行なう必要がある。

手順

投与

16. 被験物質を胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて単回強制経口投与する。一回で投与できないような例外的な場合には、24 時間以内に少量ずつ分割投与する。

17. 投与前に動物を絶食させる（ラットでは一晩、マウスでは 3～4 時間、飼料を与えない。ただし、いずれも水は与える）。絶食期間後に体重を測定し、被験物質を投与する。投与後、ラットでは更に 3～4 時間、マウスでは 1～2 時間、飼料を与えない場合もある。なお、一定時間内に分割投与する場合は、投与に要する時間により、給餌・給水を行なう必要があるかもしれない。

動物数および投与用量

18. 各段階には 3 匹の動物を使用する。4 つの固定用量 5、50、300 および 2000 mg/kg 体重のうちから一つを開始投与用量として選択する。開始投与用量は、投与動物の何匹かが死亡する可能性の最も高い用量とする。各開始投与用量後に従うべき手順を補遺 2 のフローチャートに示す。

19. 入手可能な情報から、最も高い開始投与用量（2000 mg/kg 体重）でも死亡が生じないであろうことが示唆される場合には、限度試験を行なう。試験する物質についての情報がない場合には、動物愛護のため、開始投与用量を 300 mg/kg 体重とすることが推奨される。

20. 各群の投与間隔は、毒性徴候の発現の有無、持続性、および程度によって決定する。先の投与動物の生存が確実になるまでは、次の用量の投与は行なわない。

21. 例外として、かつ特定の規制上の必要性から正当であると認められる場合に限り、より高い固定用量である 5000 mg/kg 体重の追加を検討することがある（補遺 3）。しかし、動物愛護の観点から、GHS 区分 5 の範囲（2000～5000 mg/kg）での動物試験は勧められず、そのような試験は、その結果がヒトや動物の健康、または環境の保護に直接関係している可能性が非常に高い場合にのみ検討されるべきである。

限度試験

22. 限度試験は、主として、被験物質に毒性がない（規制上の限界用量を超える用量でしか毒性を発現しない）可能性が高いことを示す情報がある場合に用いられる。被験物質の毒性に関する情報は、既に試験された類似物質や混合物または製品に関する知見に加えて、既知の毒性学的に重要な成分の有無やその割合を考慮することで得られる。毒性に関する情報がほとんど、または全くない場合、また被験物質に毒性があることが予測される場合には、主試験を行なう。

23. 限度試験は 2000 mg/kg 体重の 1 用量で、6 匹の動物（段階ごとに 3 匹）を用いて行なう。例外として、限度試験を 5000 mg/kg 体重の 1 用量で 3 匹の動物を用いて行なう場合もある（補遺 3 参照）。被験物質による死亡がみられたときには、その下の用量でさらに試験を行なわなければならない場合がある。

観察

24. 各動物について、投与後 30 分間以内に少なくとも 1 回、24 時間以内は定期的に（最初の 4 時間は特に注意深く）、およびその後は毎日 1 回、合計 14 日間観察を行なう（動物愛護のためその個体を試験から除いて安楽死させる必要がある場合、または死亡して発見された場合を除く）。ただし、観察期間は厳格に固定せずに毒性反応やその発現時期、また回復期間の長さに基づいて決め、必要と考えられる場合には延長する。毒性徴候の発現時期と消失時期は、特に毒性徴候が遅れて発現する傾向にある場合に重要である(12)。各動物についての個別の記録を残すとともに、すべての観察結果を体系的に記録する。

25. 動物が毒性徴候を示し続ける場合には、追加観察が必要となる。観察には、皮膚と被毛、眼および粘膜、ならびに呼吸器系、循環器系、自律神経系および中枢神経系、ならびに身体運動および行動様式の変化を含める。また、振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠、および昏睡について特に注意を払う。「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(9)にまとめられている原則および基準を考慮し、瀕死状態で発見された動物や、高度の疼痛または強い持続性の苦痛の徴候を示している動物は安楽死させる。人道的理由により動物を安楽死させたり、死亡した状態で発見した場合には、その時間を可能な限り正確に記録する。

体重

26. 各動物の体重を、被験物質投与直前および投与後は少なくとも週 1 回測定する。また、体重変化を計算し、記録する。試験終了時に生存動物の体重を測定し、安楽死させる。

病理学的検査

27. すべての試験動物（試験中の死亡動物および動物愛護のため試験から除いた動物を含む）について剖検を行ない、すべての肉眼病理学的変化を動物ごとに記録する。24 時間以上生存した動物の器官で肉眼病理学的変化の認められたものについては、有用な情報が得られる場合があるため、病理組織学的検査を検討してもよい。

データおよび報告

データ

28. 動物の個体ごとのデータを示す。また、すべてのデータを総括表にし、各試験群について使用動物数、毒性徴候発現動物数、試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽死させた動物数、各動物の死亡時期、毒性影響の内容と経過および可逆性、ならびに剖検所見を示す。

試験報告書

29. 試験報告書には、必要に応じて、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 物理的性質、純度、また必要に応じて物理化学的特性（異性化を含む）
- 特定データ（CAS 番号を含む）

溶媒（必要に応じて）
- 水以外の場合は、溶媒選択の妥当性

供試動物
- 使用した動物種／系統
- 動物の微生物学的状態（わかっている場合）
- 動物数、週齢、性（必要であれば、雌ではなく雄を用いた理由を含む）
- 供給元、飼育条件、飼料など

試験条件
- 被験物質溶液の詳細（投与物質の物理的形状の詳細を含む）
- 被験物質投与の詳細（投与容量および投与時間を含む）
- 飼料および水の質の詳細（飼料の種類／供給元および水の供給元を含む）
- 開始投与用量設定根拠

結果

- 各動物の反応データおよび投与用量を示す表（生死を含め、毒性徴候を示した動物、またみられた影響の性質、程度、および持続性）
- 体重および体重変化の表
- 投与日、その後 1 週間ごと、および死亡または屠殺時の個体ごとの体重
- 計画屠殺前の死亡の場合は、その試験日および時間
- 各動物における毒性徴候の発現経過およびその可逆性
- 各動物における剖検所見、および必要に応じて病理組織学的所見

考察および解釈

結論

参考文献

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2000) Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

(9) 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.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

補遺1

定義

急性経口毒性とは、物質の経口による単回投与、または24時間以内の複数回投与によって生じる有害な影響をいう。

遅発性の死亡とは、動物が48時間以内に死亡または瀕死状態にならず、その後の14日間の観察期間中に死亡することをいう。

用量（投与用量）とは、投与される被験物質の量をいう。試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kgなど）で表わす。

GHS：化学物質および混合物の分類に関する世界調和システム。OECD（健康または環境有害性）、国連危険物輸送専門委員会（物理化学的危険性）、および国際労働機関（ILO、危険有害性周知）の共同作業による。化学物質の適正管理のための国際機関間プログラム（IOMC）が調整。

瀕死：次の観察予定時間前に瀕死状態になるか、死亡することが予測されるとき。げっ歯類でこの状態を示す徴候としては、痙攣、側臥位、横臥、振戦などが挙げられる（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(9)を参照のこと）。

LD_{50}（経口半数致死量）とは、単回の経口投与により50%の動物が死亡すると予測される物質の量で統計学的に求められる。試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kg）で表わす。

限界用量とは、試験の上限の投与用量（2000または5000 mg/kg）をいう。

瀕死状態：死につつあるか、たとえ治療しても生存できない状態をいう（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(9)を参照のこと）。

予期される死亡：この先のある時期（試験終了予定前）の死亡を示唆する症状が認められる状態。水や飼料に到達できないなど（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(9)を参照のこと）。

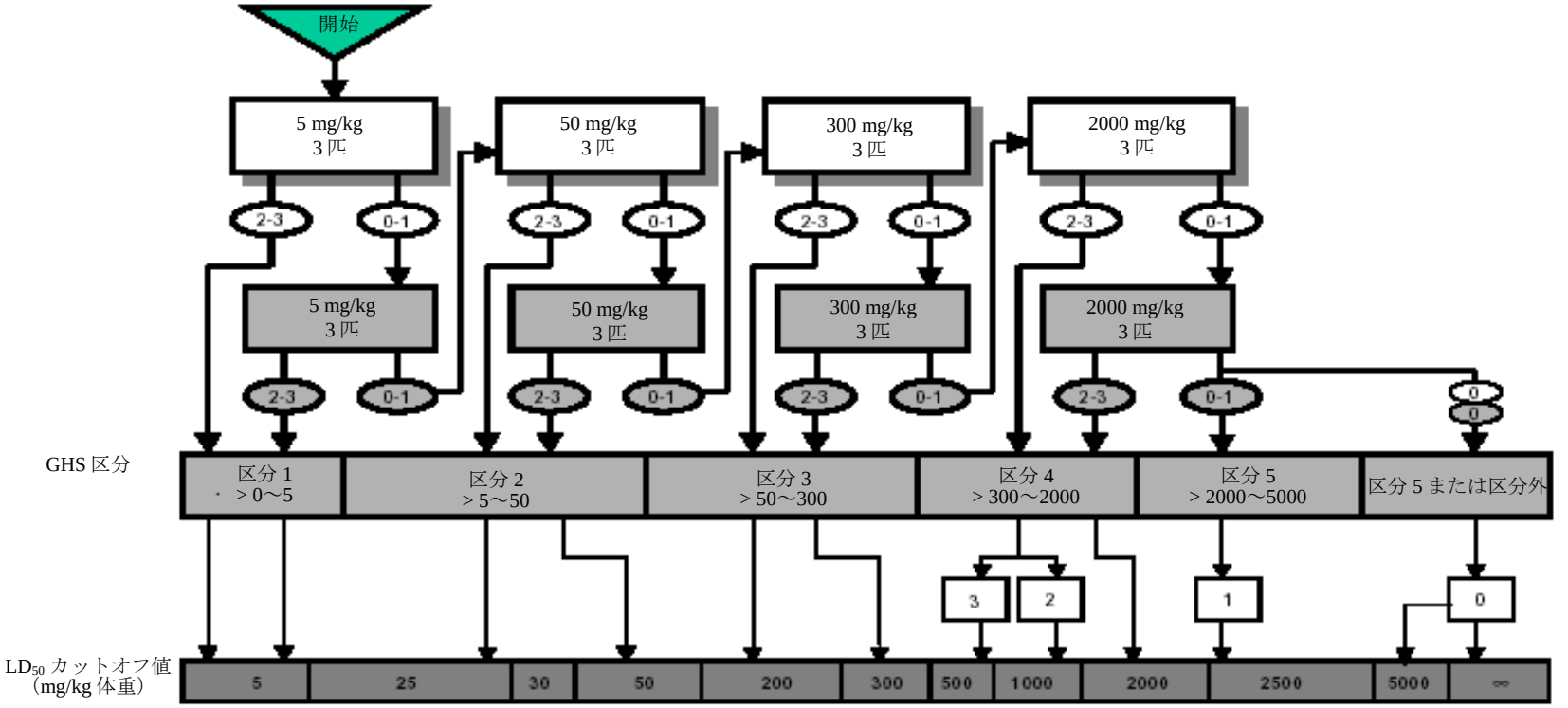
補遺2
各開始投与用量後の手順

総論

1. この補遺中の各試験計画は、それぞれの開始投与用量について従うべき手順の概略を示すものである。
   - 補遺2a：開始投与用量5 mg/kg体重
   - 補遺2b：開始投与用量50 mg/kg体重
   - 補遺2c：開始投与用量300 mg/kg体重
   - 補遺2d：開始投与用量2000 mg/kg体重

   安楽死または死亡動物数によって、矢印に示す試験手順に従う。

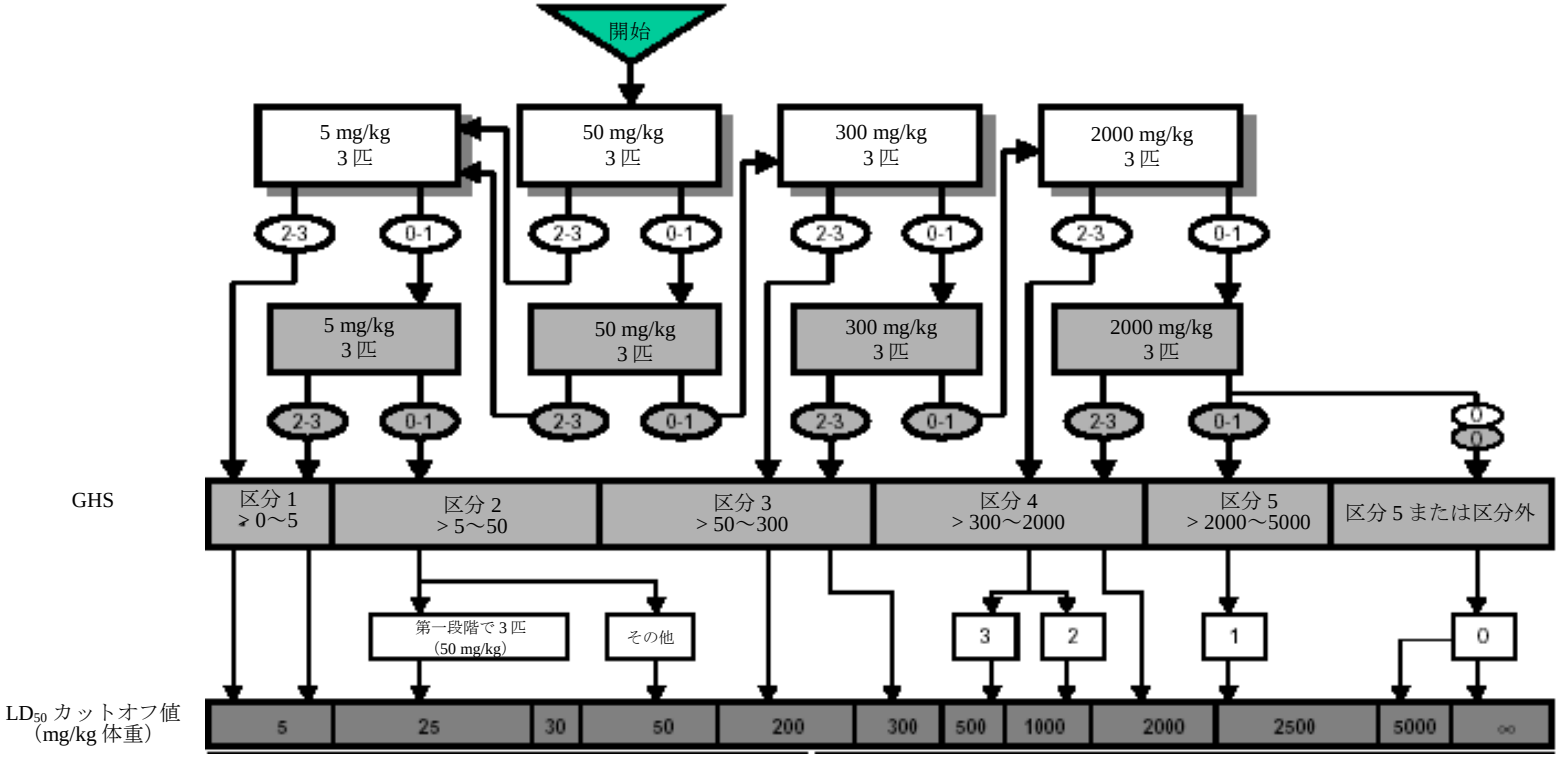
補遺 2a：開始投与用量 5 mg/kg 体重の場合の試験手順



- 段階ごとに片性の動物（原則として雌）を 3 匹使用
- 0、1、2、3：各段階の瀕死または死亡動物数
- GHS：分類に関する世界調和システム（mg/kg 体重）

- ∞：分類せず
- 5000 mg/kg 体重：補遺 3 参照

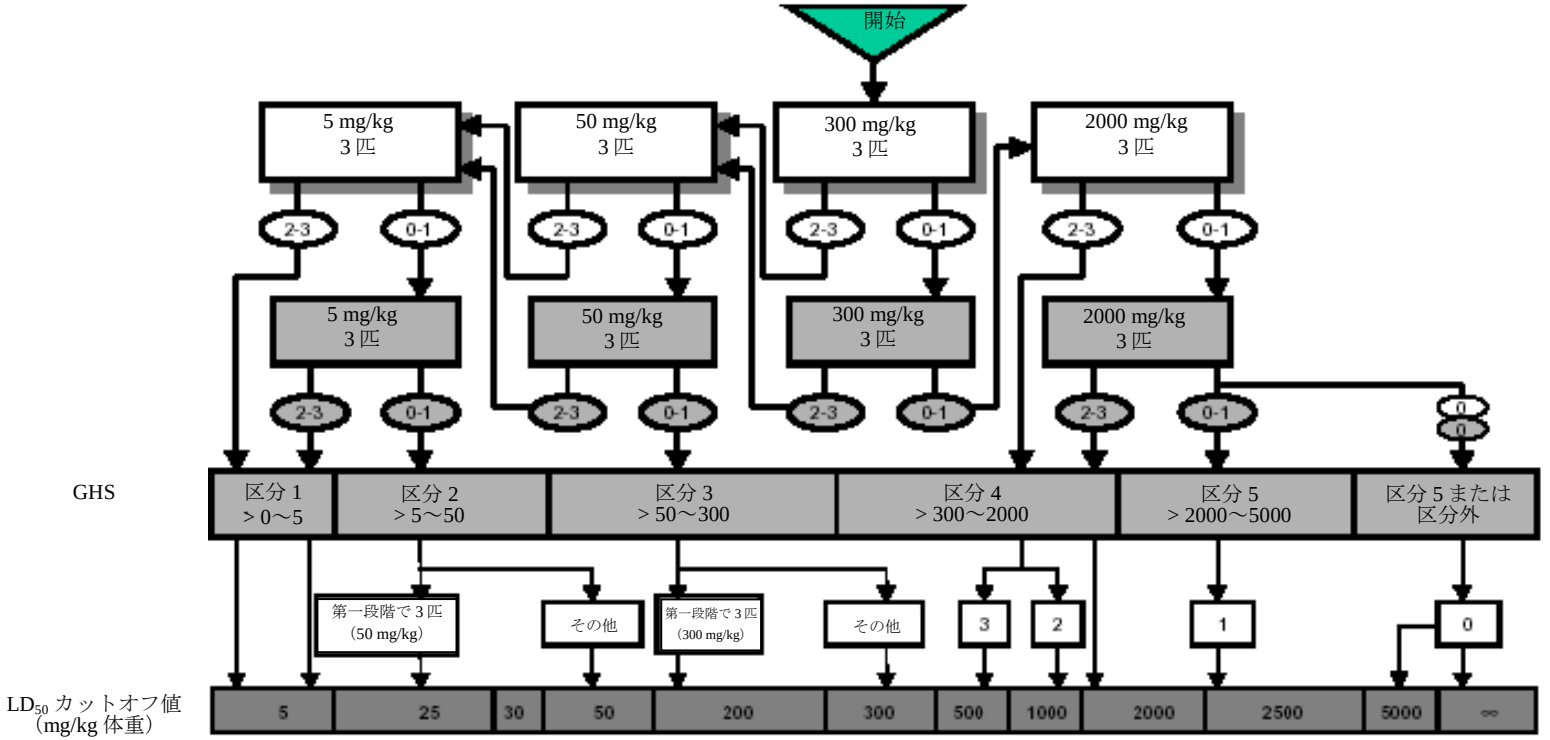
補遺 2b：開始投与用量 50 mg/kg 体重の場合の試験手順



- 段階ごとに片性の動物（原則として雌）を 3 匹使用
- 0、1、2、3：各段階の瀕死または死亡動物数
- GHS：分類に関する世界調和システム（mg/kg 体重）

- ∞：分類せず
- 5000 mg/kg 体重：補遺 3 参照

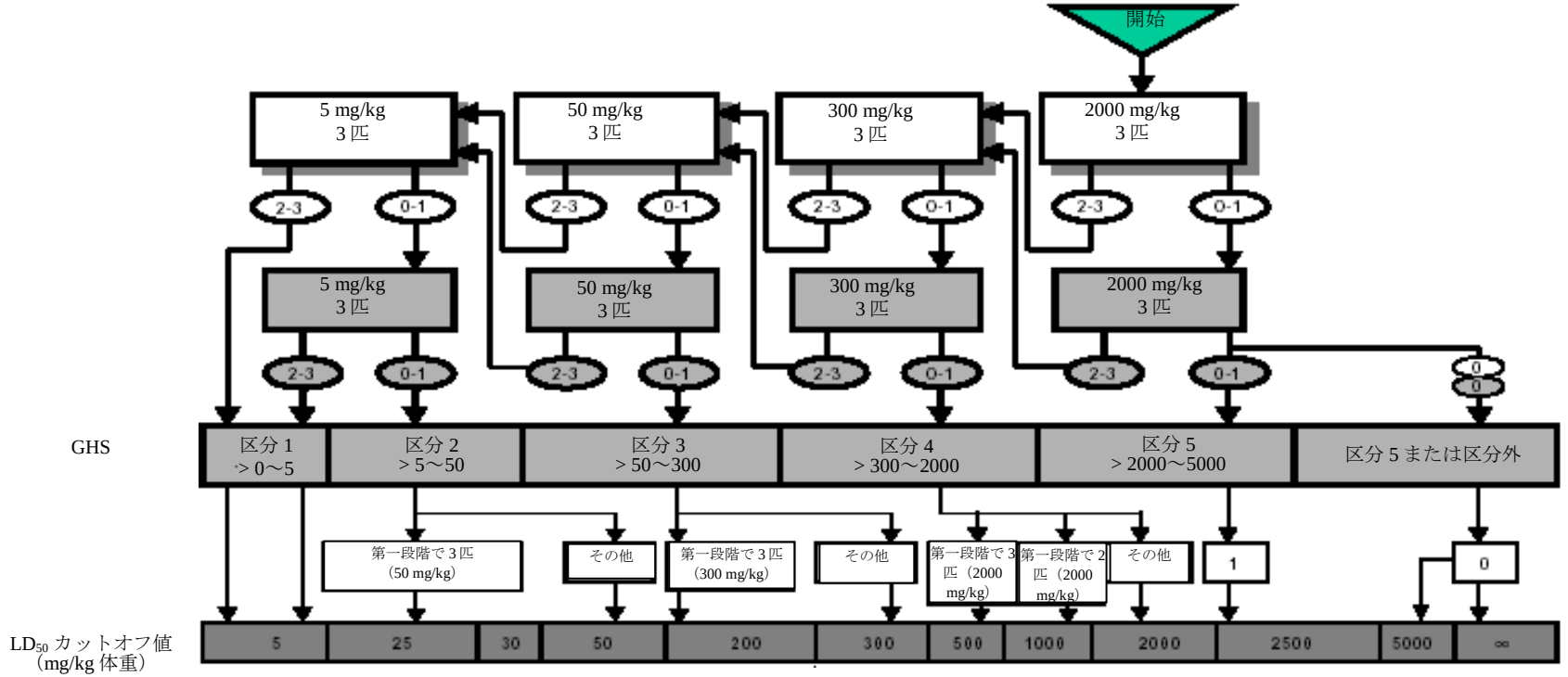
補遺 2c：開始投与用量 300 mg/kg 体重の場合の試験手順



- 段階ごとに片性の動物（原則として雌）を 3 匹使用
- 0、1、2、3：各段階の瀕死または死亡動物数
- GHS：分類に関する世界調和システム（mg/kg 体重）

- ∞：分類せず
- 5000 mg/kg 体重：補遺 3 参照

補遺 2d：開始投与用量 2000 mg/kg 体重の場合の試験手順



- 段階ごとに片性の動物（原則として雌）を 3 匹使用
- 0、1、2、3：各段階の瀕死または死亡動物数
- GHS：分類に関する世界調和システム（mg/kg 体重）

- ∞：分類せず
- 5000 mg/kg 体重：補遺 3 参照

補遺3

試験を必要とせずに被験物質を推定LD_{50}値2000 mg/kg超と分類するための基準

1. 有害性区分5の判定基準は、急性毒性の有害性は比較的低いが、ある状況下では高感受性集団に対して危険を及ぼすような物質を識別できるようにすることを目的としている。こうした物質は、経口または経皮LD_{50}値が2000～5000 mg/kg、また他の経路でも同程度の投与量であると推定されている。被験物質は以下のような場合に、「2000 mg/kg < LD_{50} < 5000 mg/kg」と定義される有害性区分（GHS区分5）に分類される。

   a） この区分に該当することが補遺2a～2dに示す試験計画のいずれかで死亡率から示された場合
   b） LD_{50}が区分5の範囲内にあることを示す信頼できる証拠が既に得られている場合、またその他の動物試験やヒトにおける毒性影響から、ヒトの健康に対する急性的な懸念が示唆される場合
   c) データの外挿、推定または測定から、より有害性の高い区分へ分類されないことが確かで、かつ、

      - ヒトにおける意味のある毒性影響を示唆する信頼できる情報が得られている場合、または
      - 経口により区分4の数値に至るまで試験したときに1匹でも死亡が認められた場合、または
      - 区分4の数値に至るまで試験したとき、専門家の判断により意味のある毒性症状（下痢、立毛、不十分な毛づくろいは除く）が確認された場合、または
      - 専門家の判断により、その他の動物試験から意味のある急性作用の可能性を示す信頼できる情報があると確認された場合。

2000 mg/kg超の投与用量での試験

2. 動物愛護の必要性を考慮すると、区分 5（5000 mg/kg）の範囲での動物試験は勧められず、そのような試験は、その結果がヒトや動物の健康の保護に直接関係している可能性が非常に高い場合にのみ検討されるべきである(10)。また、これより高い投与用量での追加試験は行なわない。

3. 5000 mg/kg での試験が必要な場合、要求されるのは 1 段階（3 匹）のみである。最初の投与動物が死亡したならば、補遺 2 のフローチャートに従って 2000 mg/kg 体重での投与を行なう。最初の動物が生存したならば、残りの 2 匹に投与する。3 匹中 1 匹のみの死亡であれば、LD_{50}値は 5000 mg/kg 超と推測される。2 匹とも死亡したならば、2000 mg/kg での投与を行なう。