OECD/OCDE

2018/06/25

試験ガイドライン No.433

急性吸入毒性：固定濃度法

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 (2018), Test No. 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264284166-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 433

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

急性吸入毒性：固定濃度法

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、科学的進歩および動物愛護を考慮する観点から定期的に見直されている。急性吸入に関するガイドライン 403 の初版は、1981 年に採択された。2001 年 12 月の OECD ガイドライン 420「経口経路での固定用量法（FDP）」改訂、および OECD ガイドライン 401「経口毒性試験」削除の採択を受け、吸入経路での固定濃度法（FCP）の作成は適切であるとみなされた。本 FCP ガイドラインにより、片性のみにおける急性吸入毒性の判定について、一連の固定濃度を使用できることになる。

2. 従来の急性毒性評価法は、動物の死亡／瀕死を唯一のエンドポイントとして用いている。1984 年、一連の固定濃度レベルでの被験化学物質投与に基づいた急性毒性試験の新たな手法が、英国毒性学会により示唆された[1]。この手法では、被験化学物質の分類基準となるエンドポイントとして、一連の固定投与量の 1 つでの毒性の明白な臨床徴候を組み入れており、これにより、動物の死亡／瀕死を全面的か意図的いずれかのエンドポイントとして用いることが回避された。この手法は本ガイドラインにも採用されている。「人道的エンドポイントに関する OECD ガイダンス文書」[2]およびその中に含まれる定義に従い、動物の苦しみや苦痛を最小限に抑え、実行可能な範囲で使用動物数を減らすため、改善が行われている。明白な毒性とは、被験化学物質投与後の毒性の明らかな徴候を述べる一般的な用語であるため、次の最も高い固定濃度では、ほとんどの動物で重度の疼痛および重度の苦痛の持続的な徴候か、瀕死状態、死亡の可能性のいずれかが予測できる。明白な毒性の認識に関するガイダンスは、Sewell et al.（2015）[3]により次のとおり示されている。以下記載した徴候のいずれか 1 つが（曝露日以降）1 匹または複数の動物に認められた場合、明白な毒性に到達している。振戦、活動性低下、不整呼吸、または体重減少（試験前の値の 10%超）。明白な毒性に関する明確さを欠く場合、その毒性は明白ではなく、さらなる試験を検討すべきであると結論を下すことができる。FCP の統計学的特性は、数学モデリングを用いて評価されている[4-6]。

3. 急性吸入試験の実施および解釈に関するガイダンスは、「急性吸入毒性試験に関するガイダンス文書 39」[7]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。

4. 本ガイドラインとの関連で用いられる定義は、「急性吸入毒性試験に関するガイダンス文書 39」[7]に見出せる。

5. 本方法は有害性に関する情報を提供し、急性毒性をもたらす化学物質の分類について、国際連合（UN）の「化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）」に従って、被験物質をランク付けし分類することを可能にする[8]。

最初に考慮すべき事項

6. 試験実施前に、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。その情報には、被験化学物質の同一性および化学構造、その物理化学的特性、被験化学物質に関するそれ以外の *in vitro* または *in vivo* 毒性試験結果、構造的に関連する物質について入手可能な（Q）SAR データおよび毒性学的データ、ならびに被験化学物質の予測される用途およびヒト曝露の可能性が含まれることになる。この情報の一部は、（例えば、構造的に関連した化学物質／同じ化学クラスの化学物質、および／または予測ソフトウェアデータの毒性からのリードアクロスを通じ）適切な開始濃度の選択に役立ち、あるいは、入手可能な情報が十分な場合、さらなる試験の回避を可能にする。規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。

本試験の概要

7. 本方法では、中程度の毒性濃度のみを用いるため、死亡／瀕死ではなく、「明白な毒性」（以下さらに詳述）をエンドポイントとして用い、致死的と予測される濃度は回避することを原則とする。また、腐食作用[1]または重度の刺激作用により、顕著な疼痛や苦痛を生じると予測される濃度では、投与すべきでない。刺激性または腐食性の化学物質を検討する場合、ガイダンスについて GD39 [7]を参照のこと。瀕死動物や、明らかな疼痛また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し、試験結果の解釈では、試験での死亡動物と同様にみなすものとする。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、別の OECD ガイダンス文書[2]のテーマとなっている。

8. 補遺 1 に設定したとおり、蒸気、粉塵／ミスト（エアロゾル）またはガスの適切な固定濃度を用いた段階的な手順で、1 群の片性の動物を短時間被験化学物質に曝露させる。最初の濃度レベルは、既存の情報または見当付け試験に基づいて、明白な毒性を生じると予測される濃度で選択する。すなわち、重度の毒性作用または死亡をもたらすことなく明らかな毒性徴候を示し、次の最も高い濃度に曝露すると、ほとんどの動物で重度の毒性または死亡／瀕死に至

[1] バリデートされた試験法（例えば、TG430 もしくは 431）または容認可能な予測により決定する。

© OECD 2018

ると予測される徴候を生じうる濃度とする。Stallard et al.（2011）による解析は、見当付け試験の根拠を示している[6]。明白な毒性の認識に関するガイダンスは40項に示され、Sewell et al.（2015）[3]による記述内容である。人道的エンドポイントに関するOECDガイダンス文書[2]記載の疼痛、苦しみ、差し迫った死亡に関連する臨床徴候および臨床状態の前に、「明白な毒性」が生じることに留意されたい。同文書では、明白な毒性を既に超えた動物の徴候および状態について記述している。さらなる群の動物では、より低濃度で明白な毒性や死亡の徴候がない場合、より高濃度で検討できる。

9. 本法は、明白な毒性かわずか1匹でも死亡／瀕死動物をもたらす濃度が確認されるまで継続し、あるいは、最高濃度で影響が認められない場合か、最低濃度で死亡／瀕死が生じる場合に継続する。試験の結果（すなわち、明白な毒性または死亡／瀕死）にもよるが、被験化学物質の急性毒性の判断を可能にするには、1濃度レベルでの試験で十分であると考えられる。明白な毒性とは、被験化学物質投与後の毒性の明らかな徴候と定義されるため、次の最も高い固定濃度では、ほとんどの動物で重度の疼痛および重度の苦痛の持続的な徴候か、瀕死状態、死亡の可能性のいずれかが予測できる。Sewell *et al.*（2015）[3]による解析では、以下記載した徴候のいずれか1つが（曝露日以降）1匹または複数の動物に認められた場合、明白な毒性に到達していることを示す。振戦、活動性低下、不整呼吸、または体重減少（試験前の値の10%超）。一方、この解析には、高い予測性もある、より稀に観察される他の徴候に関する情報も含まれる。本ガイダンスでは、試験責任者の経験と判断とを併せて用いるべきである。詳細なガイダンスについては、GD39 [7]を参照されたい。

試験方法

動物種の選択

10. 好ましいげっ歯類の種はラットであるが、時に他のげっ歯類を用いてもよい。他のげっ歯類またはげっ歯類以外の種の使用については、その正当性を示す。（入手可能な場合）既存の情報、または雄1匹および雌1匹を用いた見当付け試験の実施により、主試験で用いる最も感受性の高い性を選択できる[6]。この見当付け試験は必須ではない。見当付け試験の主な目的は、主試験での適切な開始濃度の選択にあるが、性別選択に関する情報も提供できる。感受性に明瞭な差がない場合、雄をデフォルトとして用い、雄より感受性が高いと思われる場合、雌のみを用いる。ただし、構造的に関連した化学物質の毒性学的特性またはトキシコキネティクスの特性に関する入手可能な知識も考慮に入れ、性別選択の適切な正当性を提示する。

11. 一般に用いられている実験室系統の健康な若齢成熟動物を使用する。雌を用いる場合には、未経産で非妊娠のものとする。試験開始時、各動物は8～12週齢とし、体重は、*先に曝露させた動物の*平均体重の±20%の間隔内とする。

飼育および給餌条件

12. 実験での動物飼育室の温度は22 ± 3°Cとする。相対湿度は、飼育室清掃時を除き30%以上、70%以下が望ましいが、目標値を45～65%とする。照明は

© OECD 2018

人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。給餌には、通常の実験室飼料を用いてよい。飲水の摂取は制限しない。飼料は可能であれば自由摂取とする。動物は濃度ごとに群飼するが、1 ケージ当たりの動物数を、各動物の明確な観察の妨げとはしないこと。

動物の準備

13. 動物は、曝露開始前に 5 日間以上実験室の条件に馴化させる。試験での使用に向け動物を無作為に選択し、個体識別ができるようマークを付ける。

曝露方法

14. 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。頭部／鼻部のみと全身の曝露法の両方を用いることができる。頭部／鼻部のみの曝露法は、吸入以外の経路による曝露または取り込みを最小化し、大量の物質を必要とせず、限度試験に必要な高濃度で個々の動物を検討できる。さらなる利点には、均一な試験雰囲気の維持が容易であること、被験化学物質の不安定性の可能性をより低くすること（例えば、排泄物や湿度との反応）、および、必要な体積がより小さくなるため、チャンバー雰囲気の平衡をより迅速にすることが挙げられる。一方、頭部／鼻部のみの技法では、曝露期間全体を通じ全身曝露では必要とされない動物の拘束を要するため、全身での技法よりストレスを生じる。ただし、鼻部専用のチャンバーから苦痛を受けた動物の方が、全身用のチャンバーより除去するのが容易である。選択される曝露モデルは、試験の科学的目的と一致させ、動物が経験する疼痛、苦痛、または苦しみを最小化するよう設計する[2]。

頭部／鼻部のみの曝露法

15. 曝露中、動物を曝露チューブ内で被験化学物質に曝露させる。動物拘束チューブは、動物に過度のストレスを課さず、動物の温熱ストレスを回避するよう構築し、動物が吸入曝露を回避できないようにする。ただし、供給および抽出される空気量の負のバランスを回避できない場合、（曝露チューブを介した）バイアス気流による試験雰囲気の希釈は防止する。吸入チャンバーは、十分に換気された化学物質用フード内で操作する。動物については、吸入装置内におけるすべての動物の呼吸換気量に対し、少なくとも 2 倍を超える動的気流を維持するよう設計された吸入装置により検討する。19%以上の十分な酸素含有量、1%以下の二酸化炭素濃度とし、各曝露ポートで同程度の曝露条件を確保する。試験雰囲気のサンプリング中、気流動態の顕著な乱れを回避する。気流速度を調節し、装置全体の条件が本質的に同一であるよう確保する。鼻部のみの曝露法の原則とその特有の利点および欠点は、GD39 [7]に記載されている。

全身の曝露法

16. 動物の試験には、約 12～15 回/時の換気回数の動的気流を維持するよう

© OECD 2018

設計された吸入装置を用いる。被験化学物質が課す特定の要件を満たすには、別の気流速度が有用な場合がある。その場合でも、19%以上の十分な酸素含有量、1%以下の二酸化炭素濃度とし、均等に分布する曝露雰囲気を確保する。チャンバー雰囲気の安定性を確保するための一般原則として、試験動物の総体積は試験チャンバーの体積の 5%を超えないこと。全身の曝露法の原則とその特有の利点および欠点は、GD39 [7]に記載されている。

曝露条件

17. 平衡に達するまでの時間を除き、4 時間の固定曝露時間が推奨される。特定の要件を満たすには、それ以外の時間を必要とする場合がある。

18. 適切な曝露濃度の確立には、動物なしでの技術的な試用テストが必須である。特定の固定曝露濃度を正確に満たす試験雰囲気を生成することは、技術的に困難である。したがって、不必要な繰り返し試験を防ぐため、個々のチャンバー濃度サンプル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%を超えず、液体または固体のエアロゾルでは±20%を超えないこと。爆発のおそれがある被験化学物質の場合、爆発しやすい状態を回避するよう留意する。詳細なガイダンスについては、GD39 [7]に見出せる。

粒径

19. 最も反応の高い気道領域や最も有害な粒径の予測は困難であるため、粉塵およびエアロゾルの粒径分布については、すべての気道領域の曝露を行えるようにする。包括的な気道曝露の発生を確保するには、空気動力学的質量中央径（MMAD）が 4 μm 以下で、幾何標準偏差（GSD）が 1～3.0 の範囲のエアロゾルが推奨される[10]。検査実施機関がこの推奨 MMAD から万一逸脱している場合、その説明と正当化を行う。例えば、金属ヒュームはこの基準を下回る可能性があり、（気道の湿潤環境で大きさが増加する）荷電粒子、繊維、吸湿性物質はこの基準を超える可能性がある。

試験雰囲気の生成

20. 必要であれば、被験化学物質に適切な溶媒を添加することで、大気中で被験化学物質を適切な濃度に生成し、呼吸を可能にするのに役立てることができる。溶媒を用い、大気中で適切な濃度の被験物質を生成するのに役立てる場合、その溶媒の急性吸入毒性を明らかにする。特性が十分に明らかにされている対照溶媒については、同時溶媒（またはそれ以外の）対照群は不要とみなされる。粒子状物質は、必要な粒径分布の達成に機械的処理を受ける可能性があるが、厳密な機械的処理により、粒径分布が元の物質から変化すると考えられるため、被験化学物質の分解および変化を生じないよう留意し、そのことを分析により検証する。被験化学物質を汚染しないよう十分に留意する。吸入不能となるよう意図的に調剤されている、非破砕性の顆粒状物質を検討する必要はない。摩耗試験を用い、この顆粒状物質を処理しても、呼吸可能粒子が生じないことを立証する。摩耗試験で呼吸可能物質が生じた場合、吸入毒性試験を実施する。

© OECD 2018

曝露条件のモニタリング

チャンバー内の気流

21. 曝露チャンバーを通る気流を継続的にモニターし、各曝露中に 3 回以上記録する。

チャンバー内の温度

22. 被験動物の呼吸域の気温を継続的にモニターし、各曝露中に 3 回以上記録する。理想的には、温度は 22 ± 3°C の範囲内に維持する。この範囲から逸脱することがあれば、曝露結果に関する影響の評価と共にコメントする。

相対湿度

23. 頭部／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に 3 回記録する。相対湿度は、理想的には 30～70%の範囲に維持すべきであるが、特定の状況下では、これを達成できない可能性（例えば、水ベースの製剤を検討する場合）か、被験化学物質が試験方法の妨げになるため測定できない可能性のいずれかがあると認識されている。

被験化学物質の濃度

24. 被験化学物質の実際の濃度は、頭部／鼻部のみと全身の曝露の両方で、ラットの呼吸域において測定する。曝露時間中、被験化学物質の実際の濃度は、分析法に応じ、実行可能な限り一定に維持し（段落 17 参照）、継続的または間欠的にモニターするものとする。間欠的なサンプリングを用いる場合、約 1 時間間隔で 5 例以上のサンプルを採取する。限られた気流速度または低濃度のため実行できない場合、サンプルの収集をより少なくでき、曝露期間全体にわたり最低 1 サンプルの収集にできる。揮発性がきわめて低い単一成分の固体のエアロゾルおよび液体については、重量分析を容認可能である。これらの試験に用いるより高い曝露濃度において、重量分析のサンプリングを実施する場合、（圧力 x 体積 = 一定という関係に基づく）フィルター全体の圧力低下の関数として、抽出されたサンプルの体積測定に用いる流量計（または乾式ガスメーター）を較正するよう留意する。用いる流量計または乾式ガスメーターごとに、体積の検量線を作成する。

25. 一定の重量まで蒸発可能な液体製剤のエアロゾルについては、乾燥残留物の重量分析を用いることができる。製剤の重量を算出する適切な外挿を、重量分析データに適用する。被験動物の呼吸域における混合物がこの製剤と類似している場合、不活性成分の分析は不要であるが、その結論の根拠を試験報告書に提示する。沈殿、不均質な混合物、揮発性成分、またはそれ以外の要因のため、チャンバーの分析濃度の測定が幾分困難な場合、不活性成分の追加分析が必要となりうる。

26. 重量分析が不適切であり、試験雰囲気に複数の成分が含まれる場合、主

© OECD 2018

要有効成分の化学分析に続く製剤の濃度への外挿は容認できるが、その正当性を明らかにする。

27. 被験化学物質が製剤である場合はいつでも、有効成分だけでなく、製剤全体の分析濃度を報告する。

粒径分布

28. 被験エアロゾルの粒径分布を、4 時間の曝露ごとに 2 回以上測定する。様々なサンプリング装置が適切であるが、選択した装置は MMAD（段落 18 参照）を算出可能とする。幾何平均径（GMD）は、走査型移動度粒径測定装置（SMPS）を用い測定できる。多成分エアロゾルの場合、濃度測定には上記原則を適用する。試験施設内において適切な情報を入手可能にすることで、こうしたサンプラーが、動物による曝露大気の典型的な大気試料について収集していることを立証する。

名目濃度

29. 曝露チャンバーの名目濃度は、生成期間中に曝露チャンバー／チューブに散布された被験化学物質の量を記録し、この量を同期間中のチャンバー／チューブを通る気流全体で除することにより決定される。

手順

見当付け試験

30. 見当付け試験の目的は、主試験で最も感受性の高い性および適切な開始濃度の選択を可能にすることにある。ただし、開始濃度および／または最も感受性の高い性の選択について、指針となる事前の情報が得られている場合、見当付け試験は必要ないと考えられる。したがって、見当付け試験は必須とはみなされない。被験化学物質を、選択した開始濃度で 2 匹の動物（雄 1 匹および雌 1 匹）に 4 時間以上、同時に投与する。補遺 1 のフローチャート[6]に従い、結果に応じ試験は逐次方式で継続する。両動物が同一の死亡反応、非致死的で明白な毒性、あるいは影響なしであると認められた場合、見当付け試験を中止し雄で実施される主試験に導くか、次の濃度で 2 匹の動物（雄 1 匹および雌 1 匹）の試験を継続するかのいずれかとする。いずれかの濃度で性差が示された場合、感受性のより高いことが示された性を用い主試験を実施することになり、適切な主試験開始濃度を決定するよう、その性のみでの見当付け試験を継続する。明白な毒性の徴候に基づく場合、あるいは、最低固定濃度で死亡／瀕死が認められる場合、主試験の開始濃度を決定可能な時点で見当付け試験を終了する。感度に明らかな性差がない場合、主試験では雄を用いる。

31. 同一の化学的および／または構造的に関連した化学物質に関する既存データの証拠に基づき、可能であれば、明白な毒性をもたらすと予測される濃度として、見当付け試験の開始濃度は補遺 1 記載の固定濃度レベルから選択する。こうした情報がない場合、蒸気、粉塵／ミスト（エアロゾル）およびガスの開始濃度をそれぞれ 10 mg/L、1 mg/L または 2500 ppm とする。

© OECD 2018

32. 各ペアの動物の試験間隔は、24 時間以上にできる。すべての動物を、通常 1 週間以上観察する。

33. 見当付け試験の最低固定濃度レベルで被験動物が死亡し、あるいは、毒性の明らかな臨床徴候を示した場合、通常の手順では、（補遺 1 に示すとおり）主試験での検討に進まず見当付け試験を終了し、被験物質を GHS [8]区分 1 に割り当てることになる。ただし、さらに分類の確認が必要な場合（すなわち、片性のみの死亡／瀕死が生じた場合）、以下のとおり、任意の補足的手順を実施できる。最も感受性の高い性の追加動物を、最低固定濃度で検討する。この動物が死亡した場合、GHS 区分 1 であることが確認され、見当付け試験を直ちに終了する。この動物が生存している場合、本濃度でさらに最大 3 匹の動物を検討する。死亡リスクが高いと考えられることから、これらの動物は、動物愛護に伴う保護のため逐次方式で検討する。各動物の曝露間隔は、その前の動物について、生存しうることを立証するのに十分な時間とする。追加の死亡／瀕死が生じた場合、本試験手順を直ちに終了し、動物をさらに検討しない。分類は補遺 1 に示すとおりで、2 匹以上の死亡／瀕死（結果 A）が認められた場合は区分 1、1 匹の死亡／瀕死（結果 B）が認められた場合は区分 2 とする。

主試験

動物数および濃度レベル

34. 開始濃度レベルで試験後に取るべき措置を、補遺 1 のフローチャートに示す。各試験の結果に応じ、3 つの措置（試験を中止し適切な危険有害性クラスを割り当てる、より高い固定濃度で検討する、あるいは、より低い固定濃度で検討する）の 1 つが必要となる。ただし、不必要な苦しみから動物を保護するため、見当付け試験で死亡／瀕死を生じた濃度レベルは、主試験では再検討しない（補遺 1 参照）。経験から示されているのは、開始濃度レベルで最も考えられる結果により被験化学物質を分類でき、試験をさらに必要としないことである。濃度低下に進む一連の試験で 2～3 匹の死亡が認められた場合（結果 A の範囲内）、動物愛護の利益のため試験を中止し、被験化学物質を、この一連の試験での次の濃度の結果 C に従って分類する。明白な毒性の認識に関するガイダンス（結果 B の範囲内）は 40 項に示され、Sewell et al.（2015）[3]による記述内容である。

35. 見当付け試験で用いた動物のペアに加え、検討した各濃度レベルには片性の動物計 5 匹（見当付け試験で示された最も感受性の高い性か、雄のみ）を通常用いる。

36. 各レベルでの曝露間隔は、毒性徴候の発現、持続期間、重症度により決定する。先に検討した動物の生存が確実になるまで、次の濃度での動物の曝露は延期する。遅延毒性の観察を可能にするため、各濃度レベルでの曝露の間に 3～4 日間の期間を設けることが推奨される。時間間隔は、例えば反応が不確定な場合など、必要に応じ調整できる。

限度試験

37. 限度試験は、被験化学物質が無毒性である可能性があること、すなわち、

© OECD 2018

規制上の限界量を上回る場合のみ毒性であることを示す情報を試験責任者が得ている場合に主に用いられる。被験化学物質の毒性に関する情報は、毒性学的重要性があると知られている成分の同一性および割合を考慮し、類似の被験化合物または類似の被験混合物もしくは被験製品に関する知識から得ることができる。その毒性に関する情報がほとんどないか全くない場合、または被験化学物質に毒性があると予測される場合には、主試験を実施する。

38. 通常の手順を用い、蒸気、粉塵／ミスト（エアロゾル）およびガスについてそれぞれ 20 mg/L、5 mg/L または 20 000 ppm の濃度で開始し、続いて、この濃度でさらに 5 匹の動物が曝露する主試験は、達成可能である場合、本ガイドラインの限度試験として機能する。エアロゾルを検討する場合、主要な目標は呼吸可能粒子径（すなわち、MMAD 4 μm 以下）の達成である。この目標は、ほとんどの被験化学物質において 2 mg/L の濃度で達成可能である。2 mg/L 超でのエアロゾルの試験は、呼吸可能粒子径を達成可能な場合にのみ試みる。場合によっては、一部の規制当局により要求されているとおり、GHS 区分 5 の限度まで試験を実施することがある。ただし、区分 5 の範囲での動物試験は抑制され、その試験結果が、ヒトの健康の保護に直接関連していると考えられるという可能性が高い場合にのみ考慮すべきである[8]。

観察

39. 曝露期間中は、動物を頻回に観察する。加えて、曝露後は、曝露日に 2 回以上、あるいは投与に対する動物の反応が示される場合にはより頻回に、慎重な臨床観察を行う。その後の臨床観察は、少なくとも 1 日 1 回、計 14 日間行う。観察期間の長さは固定しないが、臨床徴候発現の性質および時期、ならびに回復期間の長さにより決定する。毒性徴候の発現時間および消失時間は重要であるため、特に発現が遅延する傾向のある毒性徴候については記録する。各動物について個体別の記録を残すと共に、すべての観察結果を体系的に記録する。瀕死状態で発見された動物、および重度の疼痛および／または重度の苦痛の持続的な徴候を示している動物は、遅滞なく人道的に屠殺する。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。安楽死を要する動物は死亡したとみなす（結果 A と結果 B とを分類するため）。

40. 動物が引き続き毒性の臨床徴候を示す場合、追加の観察が必要であると考えられる。観察には皮膚および被毛、眼および粘膜に加え、呼吸器系、循環器系、自律神経系および中枢神経系、ならびに体性運動活動および行動パターンの変化も含める。可能な場合、局所作用と全身作用との識別の判断を下す。振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠（活動性低下）、不整呼吸、睡眠、昏睡、体重減少の観察に注意を向ける（下記の注 40 および 41 参照）。急性吸入試験で観察されうる徴候に関する臨床徴候の語彙は、Sewell et al.（2015）の論文[3]に見出せる。「人道的エンドポイントに関するガイダンス文書」に要約されている原則および基準を考慮する[2]。瀕死状態で発見された動物、および重度の疼痛または重度の苦痛の持続的な徴候を示している動物は、動物愛護の理由から人道的に屠殺する。瀕死状態で屠殺された動物は、試験結果の解釈では、試験中に死亡した動物と同様であるとみなす。毒性の臨床徴候の検査を実施する場合、

© OECD 2018

曝露手順に起因する初期の外観不良および一過性の呼吸器系の変化が、投与関連の影響と誤解されないよう留意する。したがって、曝露日に認められた徴候は慎重に取り扱う。

41. 結果 B に従って、以下記載した徴候のいずれか 1 つが（曝露日以降）1 匹または複数の動物に認められた場合、明白な毒性に到達していることを示す。振戦、活動性低下、不整呼吸、または体重減少（試験前の値の 10%超［すなわち、曝露日との比較］、段落 41 参照）。明白な毒性の認識に関するガイダンスは、Sewell et al.（2015）[3]により提示されており、そこには、大規模な後ろ向きデータセットの証拠から、これらの徴候のいずれか 1 つが曝露日以降少なくとも 1 匹の動物に認められれば、ほとんどの場合、次の最高濃度で複数の動物の死亡を認めることが示された。この解析には、他のより稀に観察され、高い予測性も備え考慮可能な徴候に関する情報も含まれている。明白な毒性の認識に関するこうした推奨事項は、本試験ガイドラインで使用すべきであるが、これらは、試験責任者の経験および判断を覆すことを意図したものではなく—指針としてのみ機能することを意図したものである。（上記に明示されていない徴候を含む）重度の毒性が曝露日または試験中のいずれかの時点で認められた場合、試験を中止し、必要に応じ動物を安楽死させる。死亡なしで結果 B と C の間の判断を下しつつあり、明白な毒性が認められた（すなわち、結果 B の誘因となる）か否か不確実であると試験責任者が判断した場合、次に高い濃度限界で検討する選択肢がある。

体重

42. 馴化期間中に最低 1 回、曝露当日の曝露前（0 日目）、少なくとも 1、3、7 日目（その後は週 1 回）、および 1 日目を過ぎた場合は死亡または安楽死の時点で個々の動物の体重を記録する。体重は毒性のきわめて重要な指標として認識され、曝露日に比べ 10%超の減少を呈した動物は、明白な毒性に達していることを示す。動物の状態を巡る懸念がある場合、より頻回に体重測定を実施する。生存動物は、曝露後の期間終了時に体重を測定し、人道的に屠殺する。

病理学的検査

43. すべての被験動物（試験中死亡した動物または動物愛護の理由で本試験から除外された動物を含む）について、肉眼的剖検を行う。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、すべての肉眼的病変を記録する。顕微鏡検査から有用な情報が得られることがあるため、初回曝露後 24 時間以上生存した動物を対象に、肉眼的な病理学的検査の証拠を示す臓器の顕微鏡検査を検討することもできる。

データおよび報告

データ

44. 動物の個体ごとのデータを示す。さらに、すべてのデータを表形式に要

© OECD 2018

約し、被験群ごとに、使用動物数、毒性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（または、正確な時間が不明の場合、おおよその死亡時間）、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。

試験報告書

45. 試験報告書は、必要に応じ以下の情報を含む。

被験化学物質および対照物質

- 入手可能である場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 判明している場合、被験化学物質それ自体の安定性
- 判明している場合、溶媒中での被験化学物質の溶解度および安定性
- 必要に応じて、被験化学物質が添加された培地の pH、浸透圧および沈殿物の測定

単一成分物質:

- 物理的外観、水溶性、およびさらに関連する物理化学的特性
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合など、国際純正・応用化学連合（IUPAC）名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、不純物の化学的同一性などでの化学物質の識別

多成分物質、UVCB 物質（組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生物材料）および混合物

- 可能な限り成分の化学的識別（上記参照）、定量的発生、関連する物理化学的特性により特徴付ける。
- 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）。

被験動物

- 用いた種／系統
- 判明している場合、動物の微生物学的状況
- 馴化期間
- 動物の数、週齢、性別（該当する場合、雄ではなく雌を用いる根拠を含む）
- 供給元、飼育条件、履歴データ、飼料など

試験条件

- 粉末の粒子径縮小、または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

© OECD 2018

- 試験雰囲気を生成し、この試験雰囲気に動物を曝露させるため用いる装置の説明（図を含めるのが望ましい）
- チャンバーの温度、湿度および気流のモニターに用いる装置の詳細
- チャンバー濃度および粒径分布測定用のサンプル収集に用いる装置の詳細
- 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
- 動物への曝露前に曝露濃度の平衡に要する時間の詳細
- 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
- 開始濃度の選択の根拠

結果

- チャンバーの温度、湿度および気流の表
- チャンバーの名目濃度データと実際の濃度データの表
- 分析サンプル収集データ、粒径分布、ならびに MMAD および GSD の算出など、粒径データの表
- 各動物（すなわち、死亡、性質、重症度、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
- 曝露日、その後週 1 回間隔、および死亡または安楽死の時点における動物の個体別体重；計画された安楽死前の場合の死亡日時、毒性徴候発現の時間的経過、および各動物におけるこれらの徴候に関する可逆性の有無
- 入手可能な場合、各動物の剖検所見および病理組織学的所見

結果の考察および解釈

- 明白な毒性が認められたか否かについて不確実性があり、結果を得るのに判断が必要であった場合、その旨を考察においてすべて説明する。追加試験を実施した場合には、その正当性を示す。

結論

© OECD 2018

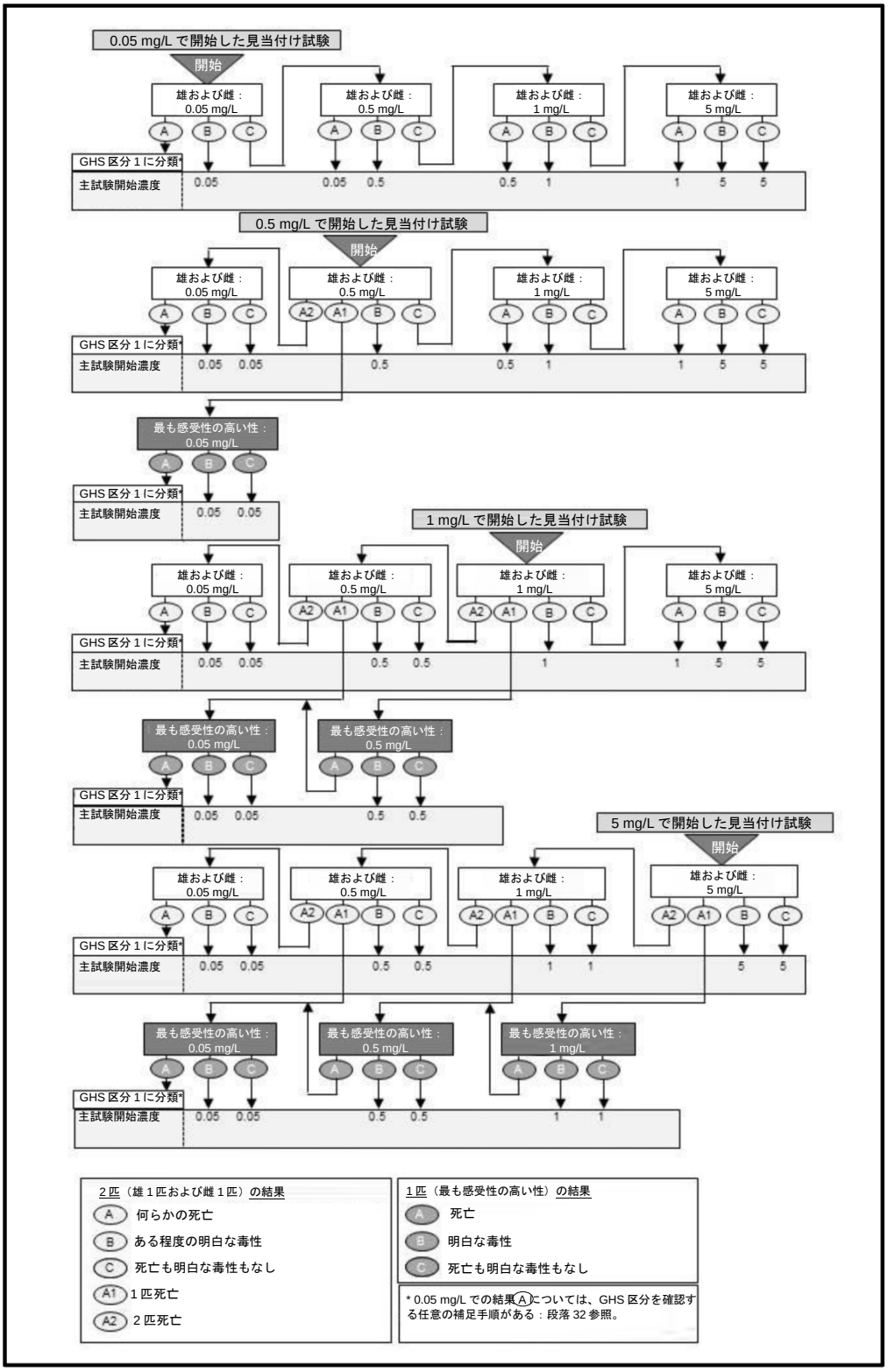
参考文献

1. BTS, A new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. A report by the British Toxicology Society working party on toxicity. Hum Toxicol, 1984. **3**(2): p. 85-92.
2. OECD, Guidance Document No. 19 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 Tetsing and Assessment No 19. Paris. 2000.
3. Sewell, F., et al., A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of 'evident toxicity' as an endpoint: towards adoption of the Fixed Concentration Procedure. Regul Toxicol Pharmacol, 2015. 73. 770-779.
4. Stallard, N., A. Whitehead, and I. Indans, Statistical evaluation of the fixed concentration procedure for acute inhalation toxicity assessment. Hum Exp Toxicol, 2003. **22**(11): p. 575-85.
5. Price, C., et al., A statistical evaluation of the effects of gender differences in assessment of acute inhalation toxicity. Hum Exp Toxicol, 2011. **30**(3): p. 217-38.
6. Stallard, N., et al., A new sighting study for the fixed concentration procedure to allow for gender differences. Hum Exp Toxicol, 2011. **30**(3): p. 239-49.
7. OECD, Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment, Paris. 2009.
8. UN, Globallly Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), sixth revised edition ST/SG/AC.10/30/Rev.6, New York and Geneva. 2015.
9. Warbrick, E.V., et al., The reduction and refinement of animal use in acute inhalation toxicity testing. Toxicology, 2002. **192**(1): p. 92.
10. van den Heuvel, M.J., et al., The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Food Chem Toxicol, 1990. **28**(7): pp. 469-82.

© OECD 2018

補遺　フローチャート

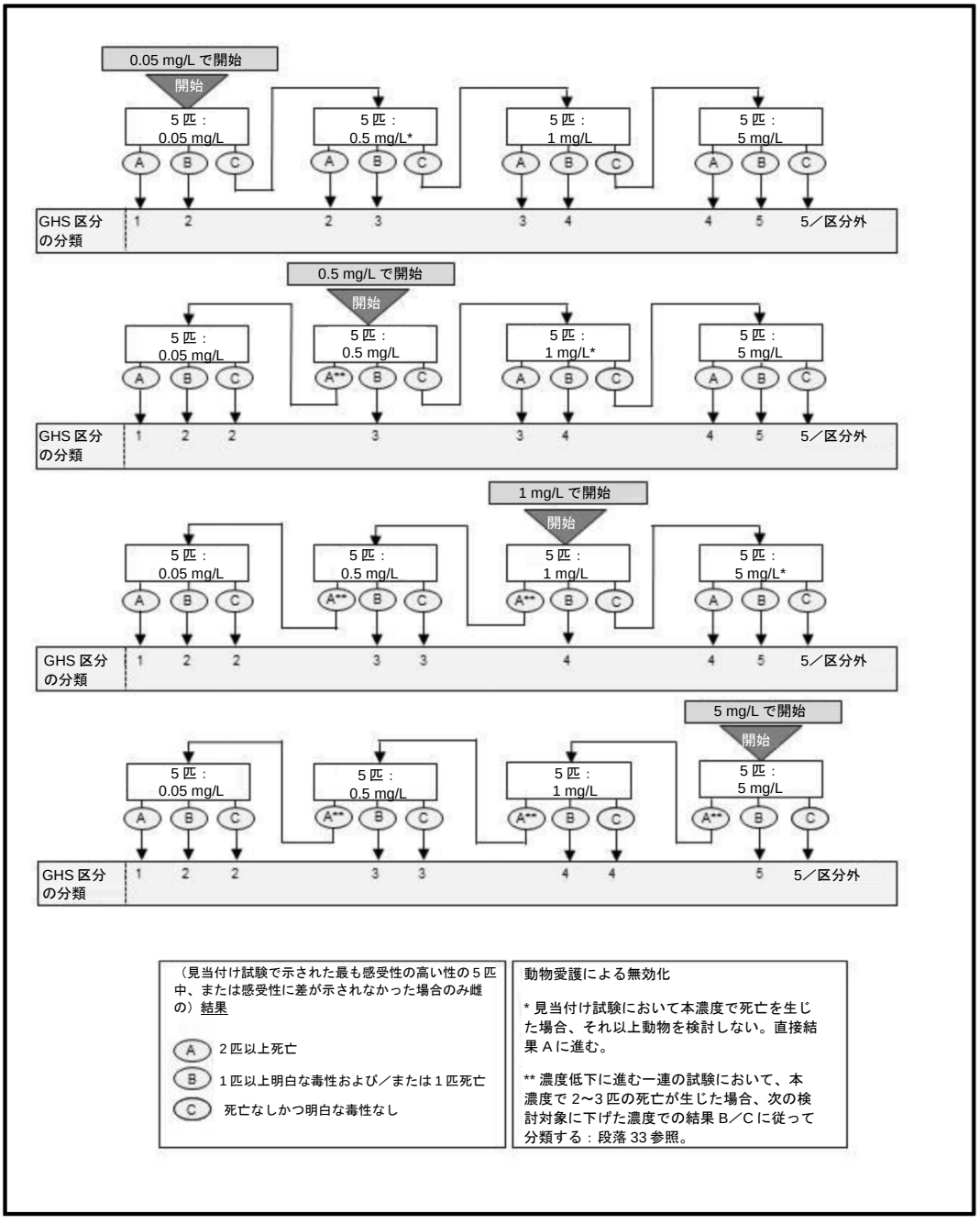
見当付け試験のフローチャート—粉塵／ミスト（エアロゾル）



© OECD 2018

補遺 1（続き）

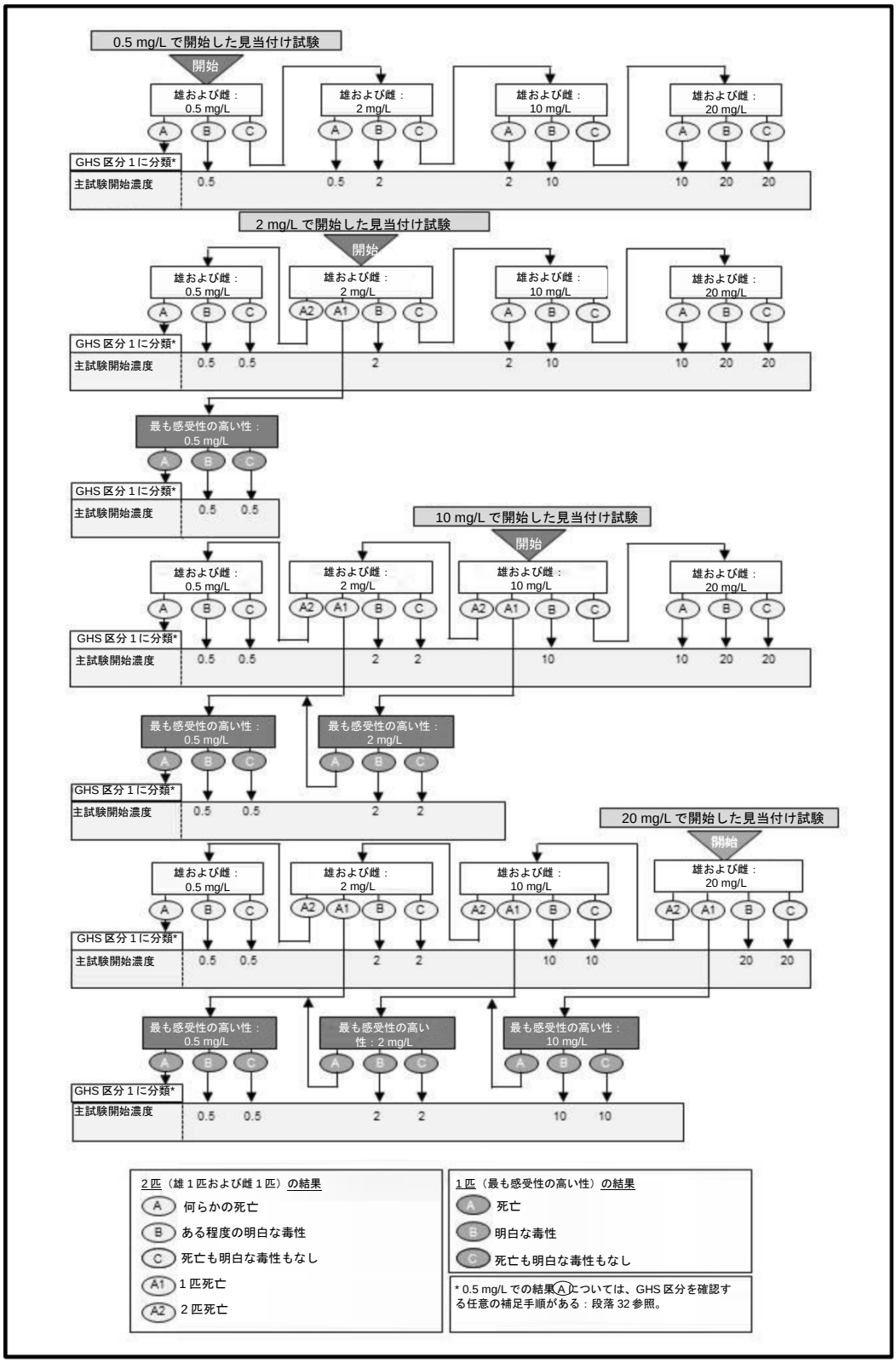
主試験のフローチャート—粉塵／ミスト（エアロゾル）



© OECD 2018

補遺 1（続き）

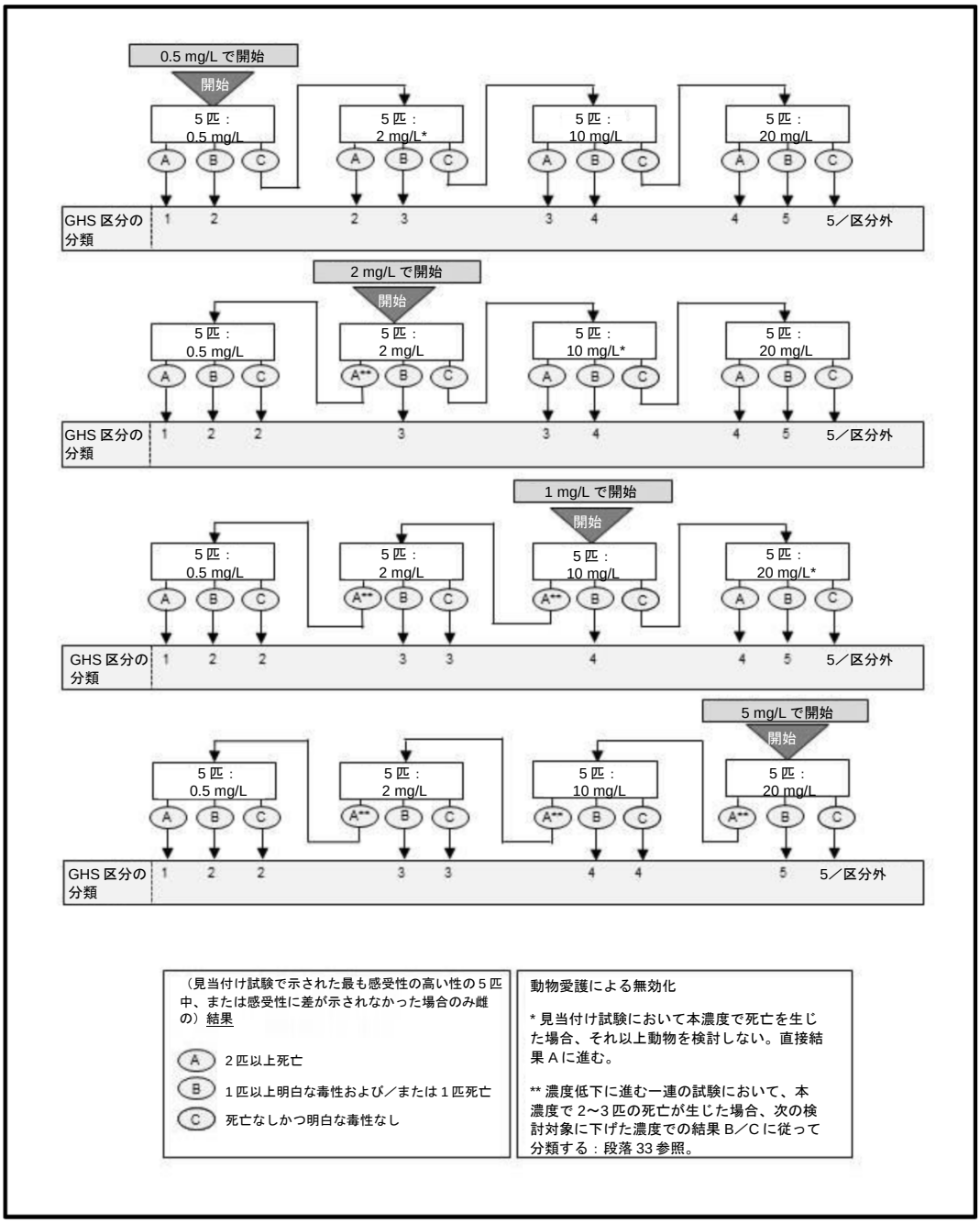
見当付け試験のフローチャート—蒸気



© OECD 2018

補遺 1（続き）

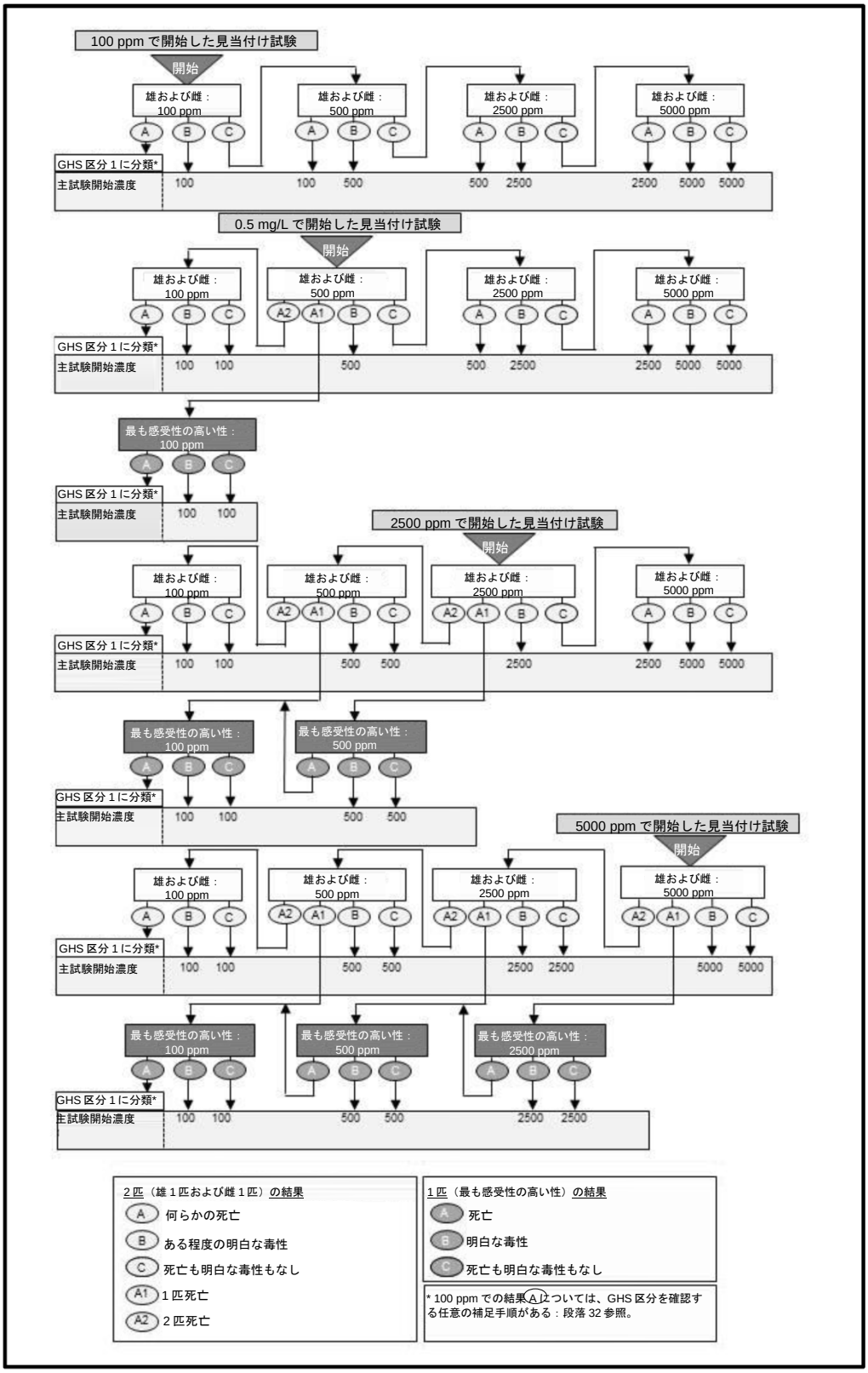
主試験のフローチャート—蒸気



© OECD 2018

補遺 1（続き）

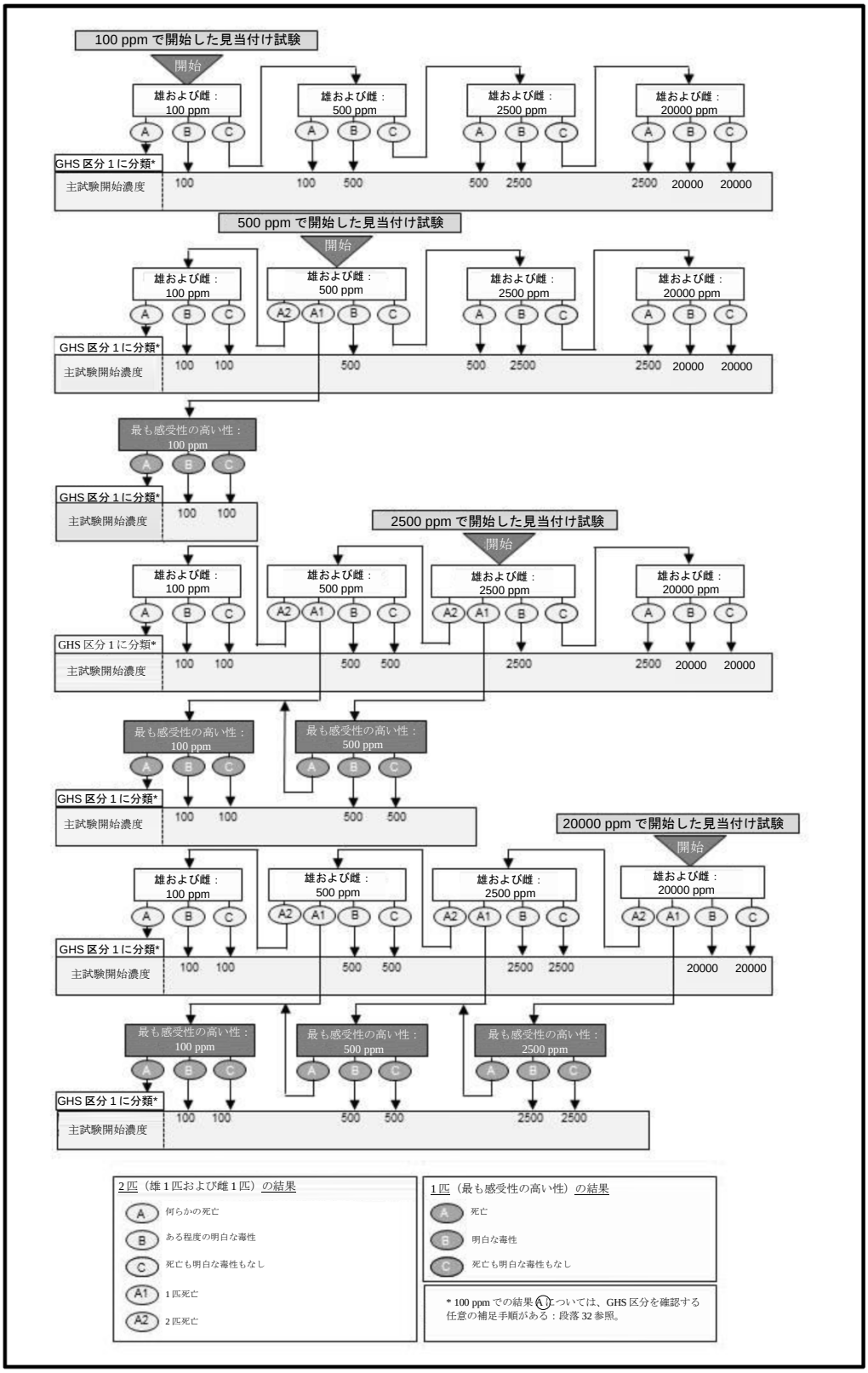
見当付け試験のフローチャート—ガス



© OECD 2018

補遺 1（続き）

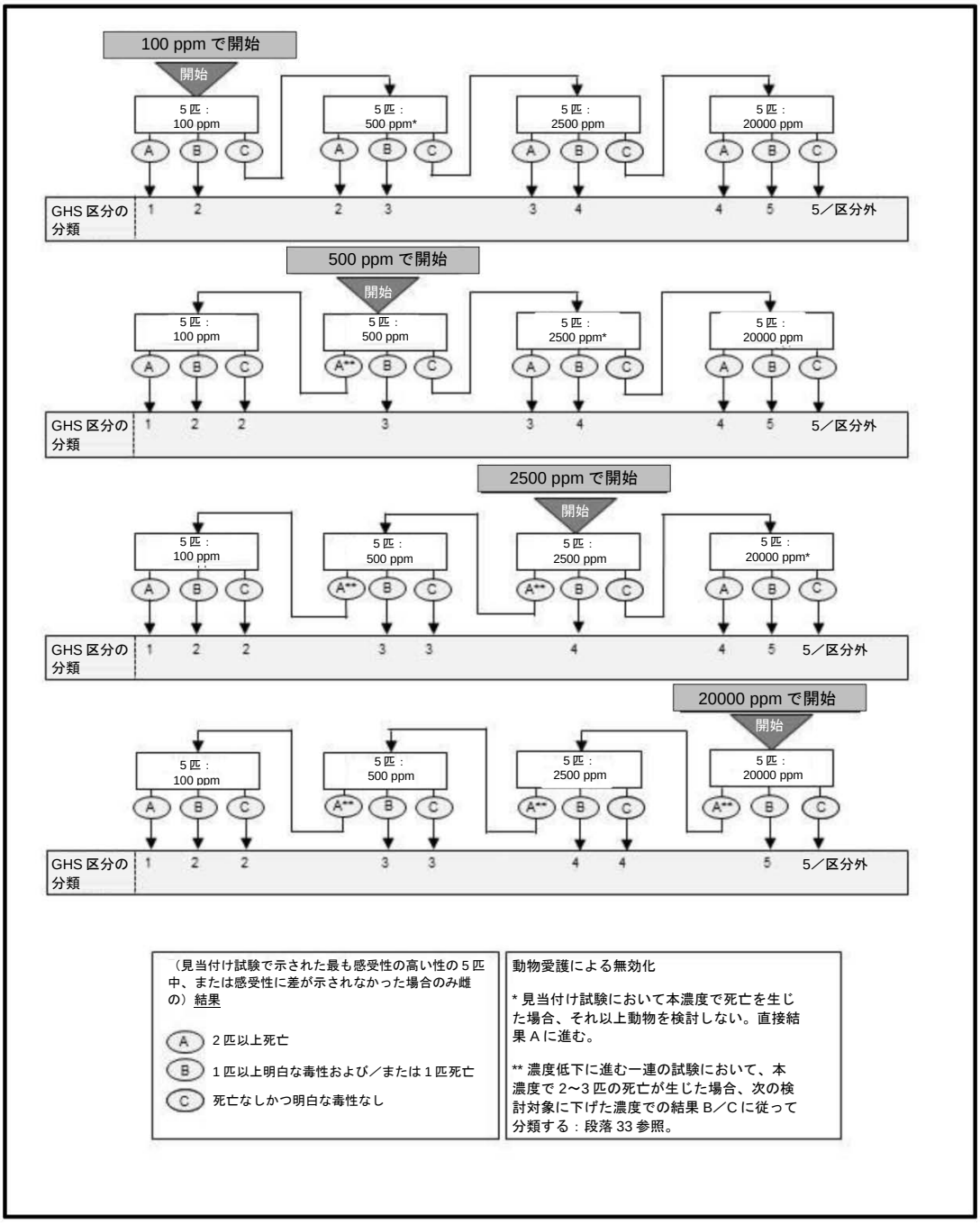
主試験のフローチャート—ガス



© OECD 2018

補遺 1（続き）

主試験のフローチャート—ガス



© OECD 2018