OECD/OCDE

2009/09/07

試験ガイドライン No.436

急性吸入毒性試験-急性毒性等級法

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 (2009), Test No. 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264076037-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

急性吸入毒性試験 - 急性毒性等級法

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、規制ニーズの変化および動物愛護に関する配慮を踏まえて定期的に見直しされている。急性吸入毒性試験の試験ガイドライン 403 の初版が採択されたのは 1981 年だが、このたび改訂が行われた(1)。急性吸入毒性試験についても急性毒性等級（ATC）法(2)(3)(4)の開発が適切であると判断されたが、これは急性経口毒性試験 - 毒性等級法（TG 423）(5)が 2001 年に採択されたことを受けてのことである。急性吸入毒性試験の ATC 法を後ろ向きに性能評価した結果、この ATC 法は、被験物質を分類し表示する目的で使用するのに適切であることが示されている(6)。吸入 ATC 法の試験ガイドラインである本ガイドラインでは、固定した目標濃度を用いた段階的な方法によって、被験物質の毒性を分類することが可能である。死亡した動物数を重要な評価項目として使用するが、瀕死動物や、重度の疼痛や苦痛を呈したり、苦しんでいたりする動物は、苦痛を最小限とさせるために安楽死させる。人道的エンドポイントに関するガイダンスは、OECD ガイダンス文書 No.19 (7)に示している。

2. 本試験ガイドラインの実施および結果の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 No.39（GD 39）(8)に示している。

3. 本試験ガイドライン中で用いた用語の定義は GD 39 (8)に示している。

4. 本試験ガイドラインでは、有害性に関する情報が得られるうえ、急性毒性を引き起こす化学物質を分類するための国連（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）(9)に従って、被験物質をランク付けおよび分類することが可能である。LC_{50} の点推定値または濃度反応解析が要求される場合、試験ガイドライン 403 (1)を使用することが適切である。試験ガイドラインの選択に関する詳細なガイダンスを GD 39 (8)に示している。本試験ガイドラインは、特殊な化学物質（たとえば溶解性の低い油水等容性もしくは繊維状の物質、またはナノマテリアル製品）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。

最初に考慮すべき事項

5. 使用動物数を最小限とするため、本試験ガイドラインに従った試験の実施を検討する前に、試験を実施する必要がないことを立証するデータが存在しないかどうか、過去に実施した試験の情報なども含め、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こと。最適な動物種、系統、雌雄、暴露法および暴露濃度を選択するうえで役立つ可能性がある情報は、被験物質の特定、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

© 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。

ータなどである。本試験ガイドラインでは、腐食性[1]または重度の刺激性によって重度の疼痛および苦痛を生じさせることが予測される濃度において試験を実施しないこと（GD 39 (8)を参照）。

試験の概要

6. 本試験法は、被験物質を分類するのに十分な急性吸入毒性に関する情報を、段階的な手順によって 4 時間の暴露時間の間に得るものである。規制によっては、その規制特有の目的を満たすために、4 時間以外の他の暴露時間を適用してもよい。本試験では、所定のいずれの濃度段階でも雌雄各 3 例を使用する。供試動物の死亡や瀕死状態の有無にもよるが、被験物質の急性毒性を判断するのに、濃度段階は 2 段階で十分であろう。どちらかの性で感受性が高いことを示す知見が得られた場合、以降の試験では感受性の高い性のみを使用してもよい。前段階の結果によって、次段階の内容を以下のいずれかに決定する。

a） これ以上の試験は不要である
b） 雌雄各 3 例で次段階の試験を行う
c） より感受性の高い性のみ 6 例で、次段階の試験を行う（すなわち、毒性等級の下限推定値は、供試動物の性にかかわらず、この 6 例の濃度群の結果に基づくものとする）。

7. 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 No.19 (7)に示している。

試験方法

動物種の選択

8. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を使用する。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

9. 雌は未経産で非妊娠のものを用いる。各個体の週齢は、暴露日に 8～12 週齢とし、体重は先に暴露した同週齢の動物の雌雄別平均体重の ± 20%以内とする。動物を無作為に選び、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。 新しい環境に対するストレスを軽減するために、試験開始前の短期間の間、試験装置にも馴化させる。

動物の飼育

10. 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%を維持するが、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、性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

[1] 腐食性は、ヒトおよび動物における知見、過去に実施した試験（たとえば TG 430 (10)、TG 431 (11)、TG 435 (12)）から得た（*in vitro*）データ、pH 値、類似化合物の情報およびその他の適切なデータなどから、専門家が判断して評価する。

個体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、通常の実験動物用試料を用いてよい。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

11. 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・鼻部暴露を含むこととする）。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は、鼻部暴露が通常望ましい。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 (8)に示している。

暴露条件

各濃度での暴露

12. 暴露時間は、平衡に達するまでの時間を除いて、4 時間に固定することが推奨される。特定の要件を満たすために、4 時間以外の他の暴露時間が必要となる場合があるが、そのような場合、試験報告書に妥当性を示すこと（GD 39 (8)を参照）。全身チャンバーを用いて暴露させる場合、供試動物は個別に収容する。これは、ケージ内のその他の個体の毛づくろいによって被験物質が取り除かれるのを防ぐためである。暴露中は、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。

13. 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、選択した暴露濃度あるいは取扱い中や使用中に最もよくみられるであろう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こと。爆発濃度にならないよう、注意する。

粒径分布

14. 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、エアロゾルの空気動力学的粒径（MMAD）は 1～4 µm、幾何標準偏差（σg）は 1.5～3.0 であることが望ましい(8)(13)(14)。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はこの基準より値が低く、荷電粒子、繊維および吸湿性物質（気道中の水分により粒径が増加する）はこの基準より値が高くなる可能性がある。

© OCDE（2009 年）

溶媒を用いた被験物質の調製

15. 試験空気中の被験物質の粒径および濃度を適切なものとするために、溶媒を使用してもよい。使用溶媒は原則として水が望ましい。粒子状物質が被験物質の場合、要求される粒径分布を満たすために機械的処理が必要となる場合もあるが、被験物質が分解したり変化したりしないよう注意する。機械処理（たとえば、過度の粉砕による極高温の摩擦熱）によって被験物質の組成が変化したと考えられる場合、被験物質の組成を分析によって確認する。被験物質が汚染されないよう、適切な注意を払うこと。吸入不可能となるように意図的に処方された難破砕性の顆粒状物質は、吸入毒性試験を行う必要はない。顆粒状物質については、摩耗試験を実施して、吸入性粒子[訳注：肺胞到達性粒子]が生じていないことを立証する。摩耗試験によって吸入可能な粒子が生じることが明らかになった場合、吸入毒性試験を実施する。

対照動物

16. 同時陰性対照（空気）群は不要である。適切な試験空気を調製するために水以外の溶媒を使用した場合、吸入毒性に関する背景データがない場合に限って溶媒対照群を設定する。被験物質と溶媒の混合物について毒性試験を別途実施した結果、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、溶媒対照群は不要である。

暴露条件のモニタリング

チャンバー内の空気流量

17. 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（すなわち試験空気の安定性）のモニタリング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な試験空気調製パラメータを非直接的に管理することが可能である。暴露システム内の気流の流れが試験空気の気流の流れとして適していない場合、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。任意の運転条件下で呼気の再呼吸が発生してないことを立証するためには、所定の方法論を使用することができる(8)(15)。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。

チャンバー内の温度および相対湿度

18. 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モニタリングし、暴露時間が 4 時間以下の場合は暴露時間中に 3 回以上、暴露時間がより短時間の場合は 1 時間おきに相対湿度を記録する。相対湿度は理想的には 30～70%に維持するが、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

19. チャンバー内の暴露設定濃度を、その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、チャンバー内を通過した総空気量で除した値である。設定濃度は供試動物への暴露結果の特徴付けには使用しないが、

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、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

20. 実測濃度とは、吸入チャンバー内の供試動物の呼吸区域における被験物質の濃度である。実測濃度は、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）で得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捉されたことを示すこと。目標濃度、設定濃度および実測濃度を試験報告書に記載するが、致死濃度を算出する統計解析に使用するのは実測濃度のみである。

21. 被験物質は、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（ただしこれらに限定されるものではない）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。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。

22. 暴露空気は可能な限り一定に維持する。暴露空気は、分析方法に合わせて連続的または間欠的にモニタリングする。間欠的に試料を採取する場合、チャンバー内の空気試料を 4 時間に 2 回以上採取する。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、暴露時間全体を通じて試料採取を 1 回としてもよい。試料間で顕著な変動がみられた場合、次回の濃度測定時、暴露時間中の試料採取回数を 4 回とする。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}）を算出して記録し、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。暴露時間はまた、チャンバー内が平衡に達するのに必要な時間（t_{95}）を考慮に入れる。t_{95} の推定に関するガイダンスは GD 39 (8)に示している。

23. 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 (8)に示している。

被験物質：粒径分布

24. 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などのその他の装置を用いて、4 時間の暴露時間中に 2 回以上測定する。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

© OCDE（2009 年）

径分布測定ではその他の装置を使用してもよい。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 (8)を参照）。試験の初期段階で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。動物愛護の理由から、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。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（段落 14 を参照）。

試験手順

主試験

25. いずれの濃度段階でも、雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する。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。開始暴露濃度は、所定の濃度段階 4 段階の中から選択する。暴露した動物で毒性が認められる可能性が高い濃度を開始暴露濃度とする。ガス、蒸気およびエアロゾル用の試験手順流れ図（補遺 1～3 に示す）に、GHS 区分 1～4 (9)のカットオフ値とともに試験手順を示す。ガスのカットオフ値は 100、500、2500 および 20000 ppm/4h（補遺 1）、蒸気のカットオフ値は 0.5、2、10 および 20 mg/L/4h（補遺 2）、エアロゾルのカットオフ値は 0.05、0.5、1 および 5 mg/L/4h（補遺 3）である[訳注：”エアロゾル”は、GHS では“ミスト”と表記されている]。区分 5 は、限界濃度を超える濃度に関連するものである。開始濃度に応じた試験手順流れ図を適用する。該当する区分が判明するまで、安楽死させたまたは死亡を発見した動物の数に応じて、矢印に従って試験手順を進める。

26. 次濃度群への暴露を開始するまでの時間間隔は、毒性徴候の発現時期、その持続時間および重症度によって決定する。次濃度群への暴露は、現濃度での生存についてしかるべき確信が得られるまで実施すべきではない。遅発性毒性が観察できるよう、次濃度段階の暴露まで 3 または 4 日の間隔を空けることが推奨される。結論がはっきりしない反応がみられるなどの場合、間隔を適宜調整してもよい。

限度試験

27. 事実上非毒性である（すなわち、規制で要求される限界濃度を超えた濃度でしか毒性反応が発現しない）ことが知られている、または予測される被験物質では、限度試験を実施する。被験物質の毒性に関する情報は、過去に試験が行われた類似化合物、類似混合物または類似製品の知見から得ることが可能であるが、毒性学的に重要であることが知られている成分を特定し、その含有率を考慮する。毒性についてほとんど情報がない被験物質または毒性であると予測される被験物質では、主試験を実施する（詳細なガイダンスは、GD 39 (8)に示している）。

28. 通常の手順では、本試験ガイドラインの限度試験として、雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を 20000 ppm の濃度のガス、20 mg/L の濃度の蒸気または 5 mg/L の濃度（達成可能な場合）の粉塵／ミストに暴露する。エアロゾルの試験の場合、呼吸性粒子の粒径（MMAD で 1～4 µm）を達成することを優先する。この粒径は、ほとんどの被験物質において 2 mg/L の濃度で達成可能である。エアロゾルでは、呼吸性粒子の粒径を達成している場合のみ、2 mg/L を超える濃度での試験を検討する（GD 39 (8)を参照）。GHS は動物愛護の理由から、限界濃度を超える濃度で

の試験は実施しないよう勧告している(9)。GHS 区分 5 の濃度での試験は、その試験の結果とヒトの健康保護との間に直接的な関連がある可能性が非常に高い場合にのみ検討し(9)、その妥当性を試験報告書に示すこと。爆発の可能性がある被験物質の場合、爆発しやすい状態にならないよう注意する。不要な動物の使用を避けるために、限度試験の実施前に供試動物抜きで試運転を実施し、チャンバー内が限度試験の試験空気となっているかどうか確認する。

観察

29. 暴露中は、一般状態の観察を頻繁に実施する。暴露後は、暴露当日は 1 日 2 回以上（供試動物の反応に応じて、より頻回に）、それ以降は 1 日 1 回以上、一般状態の観察を行う。観察期間は少なくとも 14 日間とする。しかし、観察期間の長さは厳密に限定すべきではなく、毒性徴候の性質およびその発現時期、ならびに回復期間の長さによって決定する。毒性徴候の発現時期および消失時期は、特に遅発性の傾向がある場合、重要である。観察事項はすべて、個体別に管理している個々の記録に系統的に記録する。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、動物愛護の理由から安楽死させる。一般状態の観察では、暴露手技によって生じた暴露初期の軽度な所見および一過性の呼吸の変化などの毒性徴候を、処置に関連した毒性と間違えないよう注意する。人道的エンドポイントに関するガイダンス文書(7)に要約された原則および基準を考慮する。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。

30. 症状観察では皮膚、被毛、眼、粘膜、呼吸器系、循環器系、自律神経系、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。可能な場合、局所反応なのか全身反応なのか鑑別し、その結果を示すこと。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。

体重

31. 各個体の体重を馴化期間中に 1 回、暴露当日（Day 0）の暴露直前に 1 回、少なくとも Day 1、3 および 7 にそれぞれ 1 回（それ以降は週 1 回）および死亡時／安楽死時（Day 1 を超えて生存している場合）に測定し、記録する。体重は毒性の重要な指標であるため、試験前の体重と比較して 20%以上の体重減少が持続的にみられる個体は、綿密にモニタリングする。観察期間終了時に生存している個体は、体重を測定した後に安楽死させる。

病理学的検査

32. 肉眼的剖検を、試験中の死亡例や動物愛護の理由から安楽死させて試験から除外した例を含め、全例で行う。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。

33. 生存例の肺重量測定、気道の顕微鏡検査による刺激徴候の確認などの追加検査を試験デザイン設計時に*事前に*設定しておくと、本試験の解釈の価値が増すと考えられる。24 時間以上生存

© OCDE（2009 年）

した個体で肉眼的病理変化がみられた器官や、影響がみられることが知られている、または推測される器官についても病理学的検査を実施してよい。水と反応しやすい被験物質（たとえば酸および吸湿性物質）については、気道全体を顕微鏡検査することで有用な情報が得られる可能性がある。

データおよび報告

データ

34. 体重および剖検所見は、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動物または人道的理由から安楽死させた動物の数、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。

試験報告書

35. 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（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
- 動物数、週齢、性
- 無作為化の方法
- 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）

吸入チャンバー

- 吸入チャンバーの説明（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、吸気／排気の処理法、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
- 試験空気の時間的均一性／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
- 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）
- 酸素濃度および二酸化炭素濃度の測定に使用した装置の情報（該当する場合）
- 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重量濃度（たとえば mg/L、mg/m^3）で報告する。体積濃度（たとえば ppm、ppb）を併記してもよい
- 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

- 被験物質調製物の詳細（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）。機械的処理によって被験物質の組成が変化する可能性がある場合、被験物質の組成を確認するために行った分析の結果を示すこと
- 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）
- 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の表
- チャンバー内の設定濃度および実測濃度の表

© OCDE（2009 年）

- 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）
- 各個体の試験中の体重、観察期間中に死亡した場合はその死亡日時、各個体における毒性徴候の発現経過およびその可逆性
- 各個体の剖検所見、および必要に応じて病理組織学的所見
- GHS 区分分類および LC_{50} カットオフ値

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こと
- 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(7)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

参考文献

1. OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. Holzhütter, H-G, Genschow, E., Diener, W., and Schlede, E. (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77, 243-254.

3. Diener, W., Kayser, D. and Schlede, E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71, 537-549.

4. Diener, W, and Schlede, E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 1, 129-134.

5. OECD (2001), Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 423, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

6. OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. 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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

10. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion – Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). OECD Guideline for testing of chemicals No. 430, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

11. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion – Human Skin Model Test. OECD Guideline for testing of chemicals No. 431, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

12. OECD (2005), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13. Phalen, R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

© OCDE（2009 年）

14. SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18, 321-327.

15. Pauluhn, J. and Thiel, A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27, 160-167.

補遺 1

ガス（ppm/4h）用の開始濃度別の試験手順

総論

本補遺に示した各試験手順の流れ図は、各開始濃度別に実施すべき手順を示したものである。

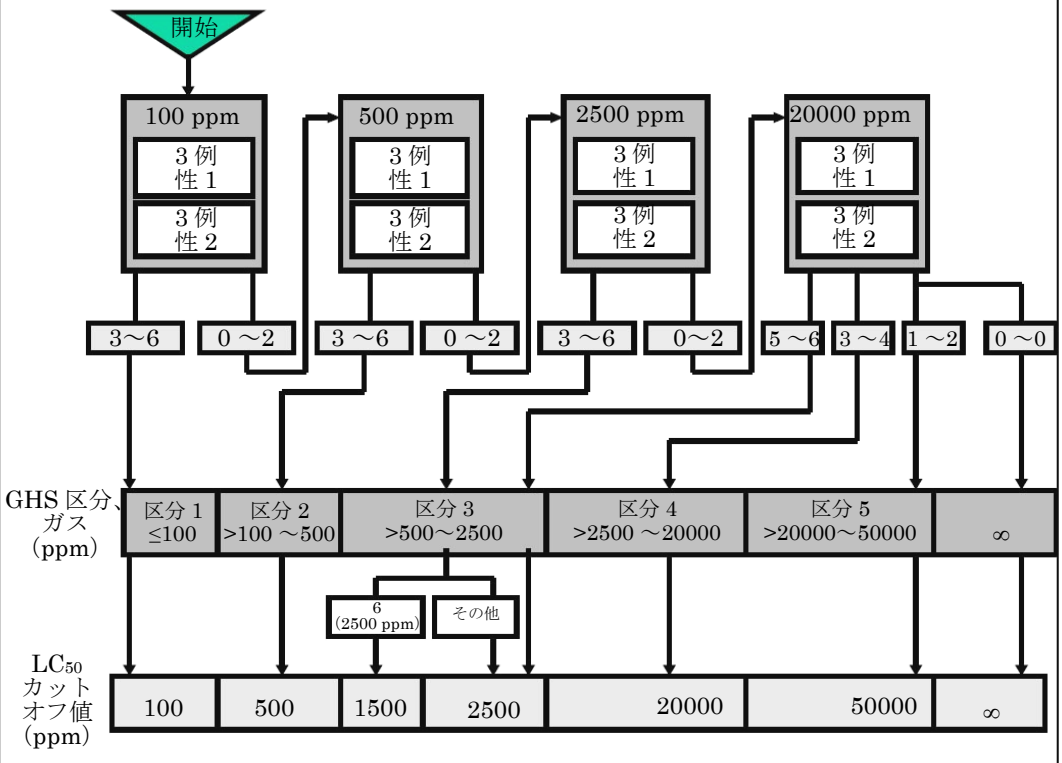
補遺 1a：開始濃度 100 ppm
補遺 1b：開始濃度 500 ppm
補遺 1c：開始濃度 2500 ppm
補遺 1d：開始濃度 20000 ppm

安楽死させた、または死亡を発見した動物の数に応じて、矢印に従って試験手順を進める。

© OCDE（2009 年）

補遺 1a

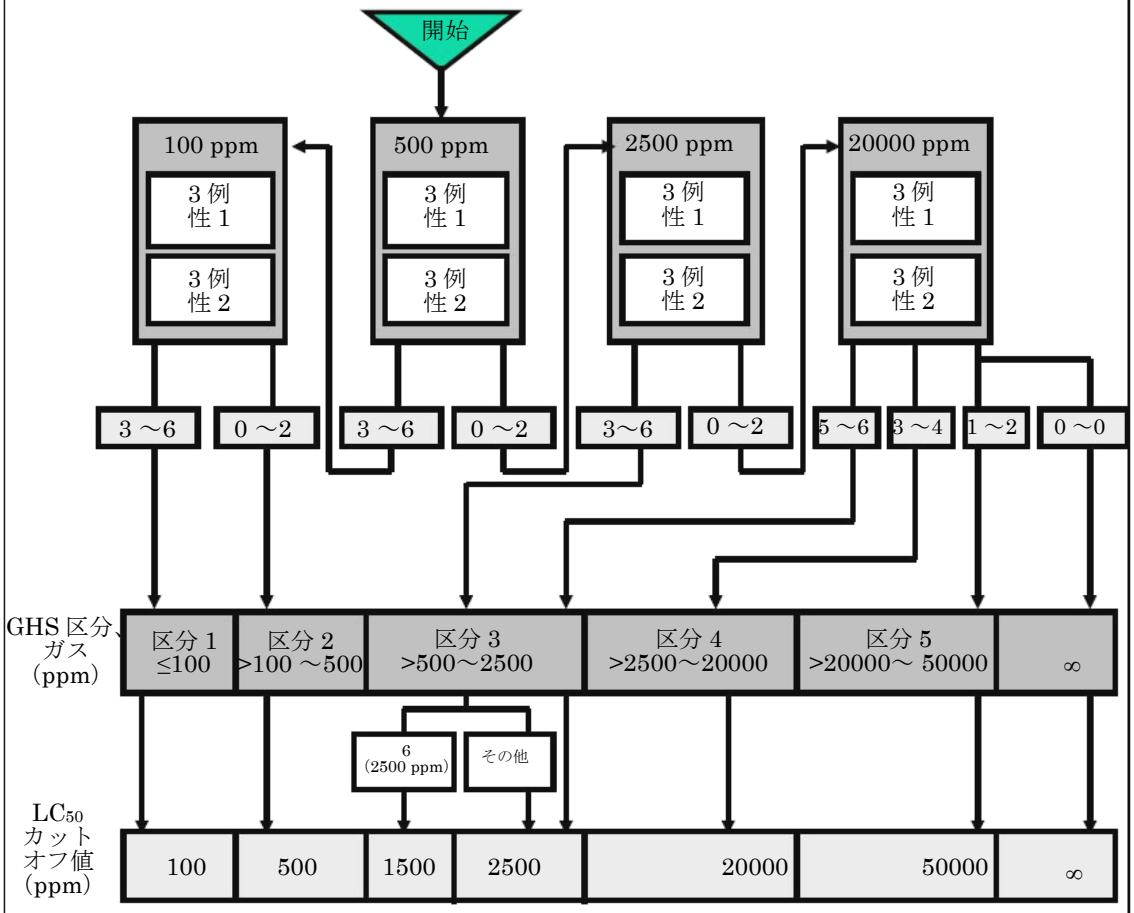
急性吸入毒性：
開始濃度が 100 ppm/4h のガス用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 20000 ppm/4h 以上の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 1b

急性吸入毒性：
開始濃度が 500 ppm/4h のガス用試験手順

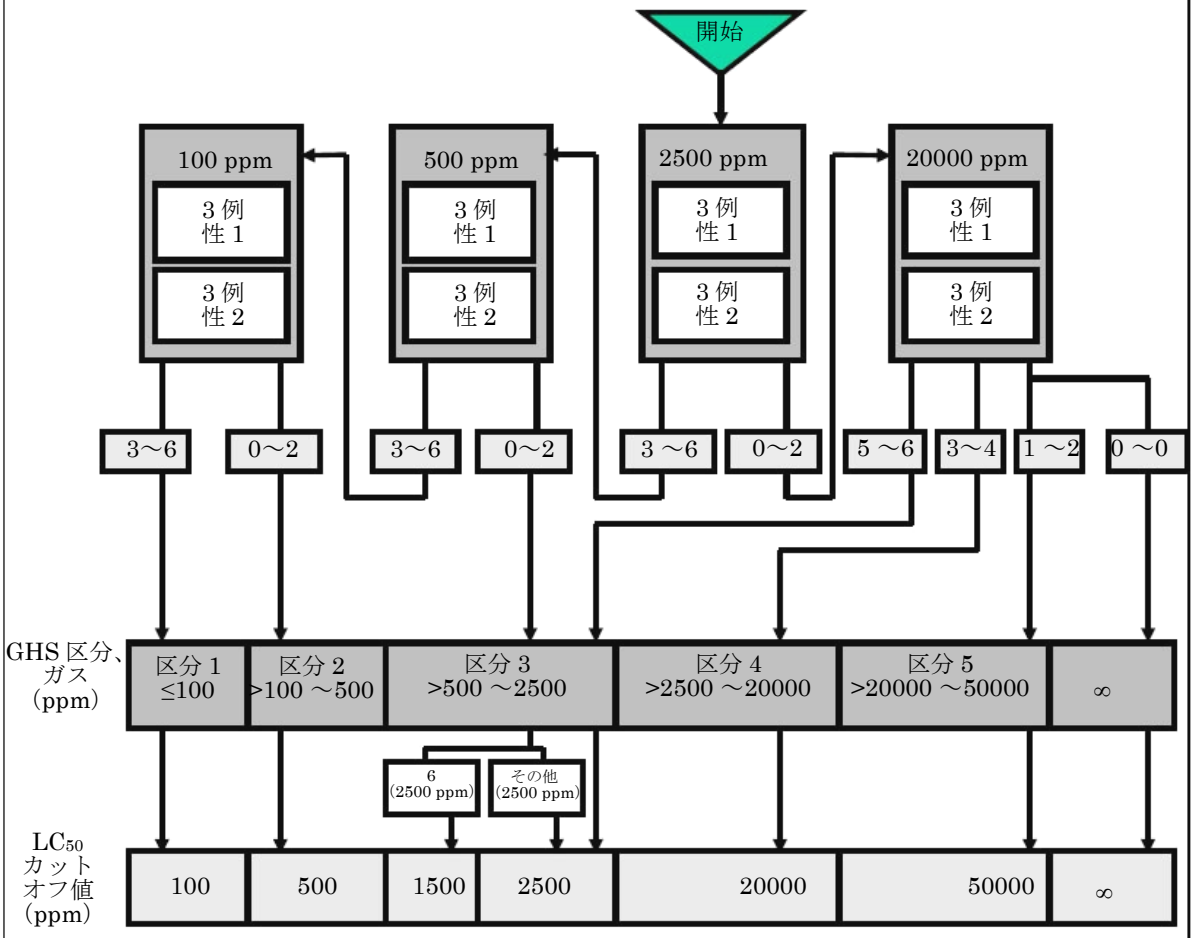


- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 20000 ppm/4h 以上の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）

補遺 1c

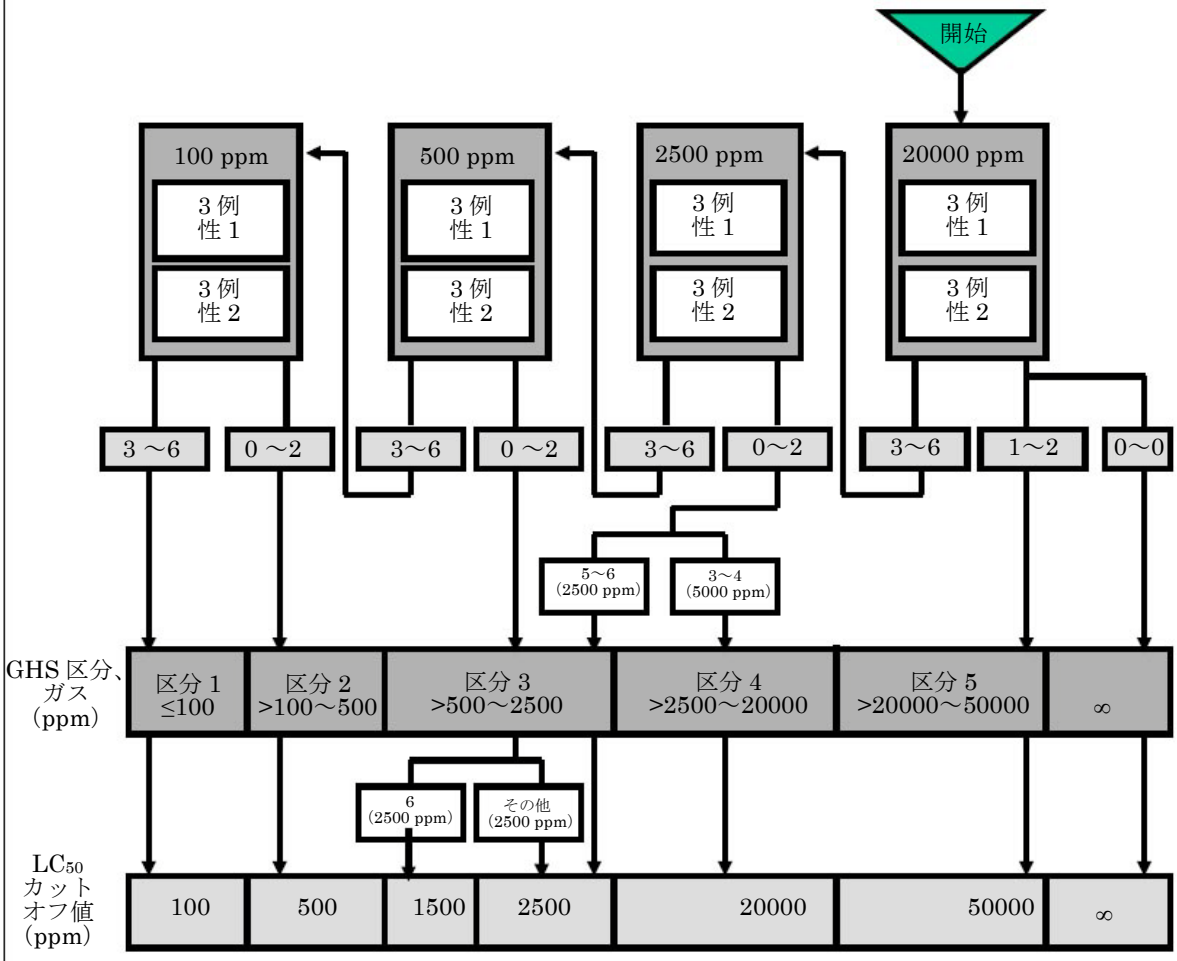
急性吸入毒性：
開始濃度が 2500 ppm/4h のガス用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 20000 ppm/4h 以上の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 1d

急性吸入毒性：
開始濃度が 20000 ppm/4h のガス用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 20000 ppm/4h 以上の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）

補遺 2

蒸気（mg/L/4h）用の開始濃度別の試験手順

総論

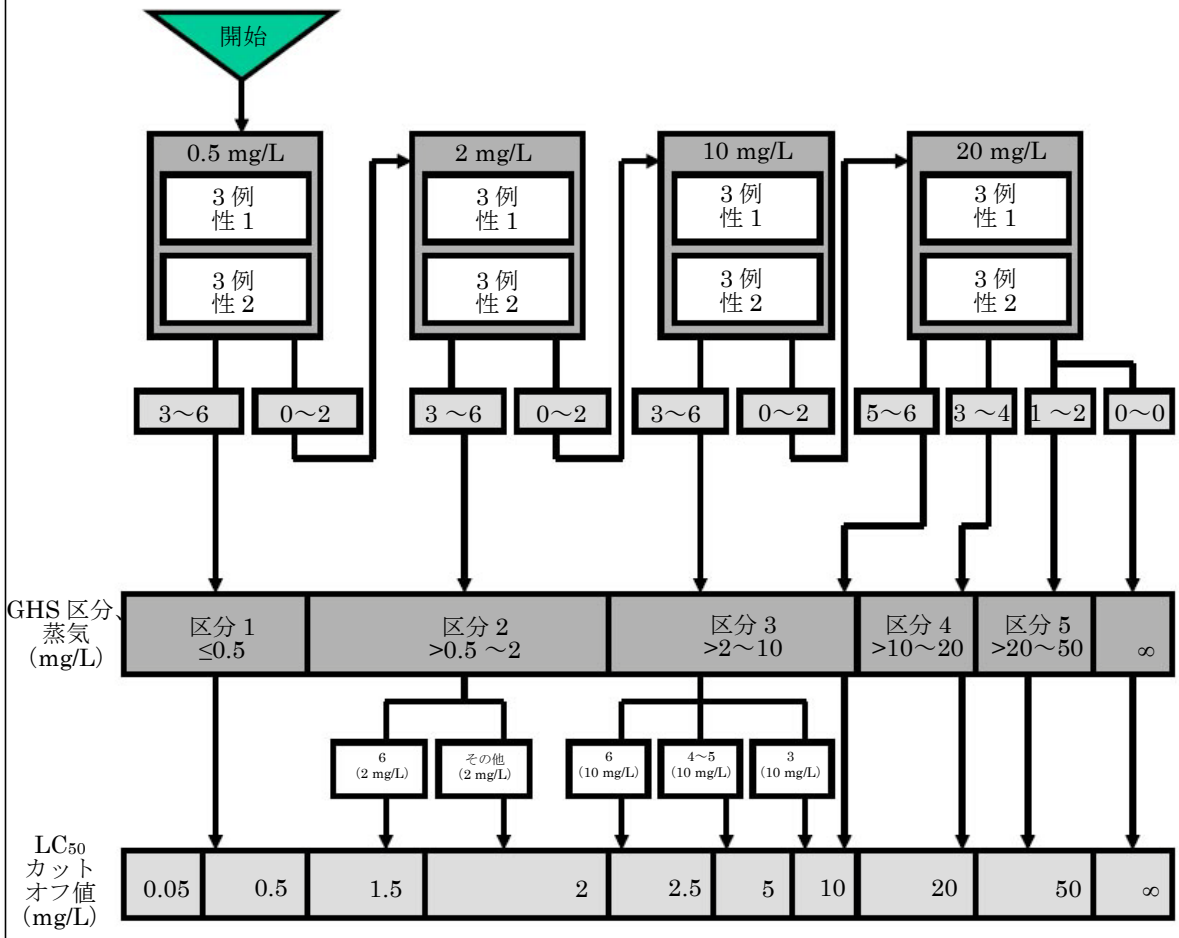
本補遺に示した各試験手順の流れ図は、各開始濃度別に実施すべき手順を示したものである。

補遺 2a：開始濃度 0.5 mg/L
補遺 2b：開始濃度 2.0 mg/L
補遺 2c：開始濃度 10 mg/L
補遺 2d：開始濃度 20 mg/L

安楽死させた、または死亡を発見した動物の数に応じて、矢印に従って試験手順を進める。

補遺 2a

急性吸入毒性：
開始濃度が 0.5 mg/L/4h の蒸気用試験手順

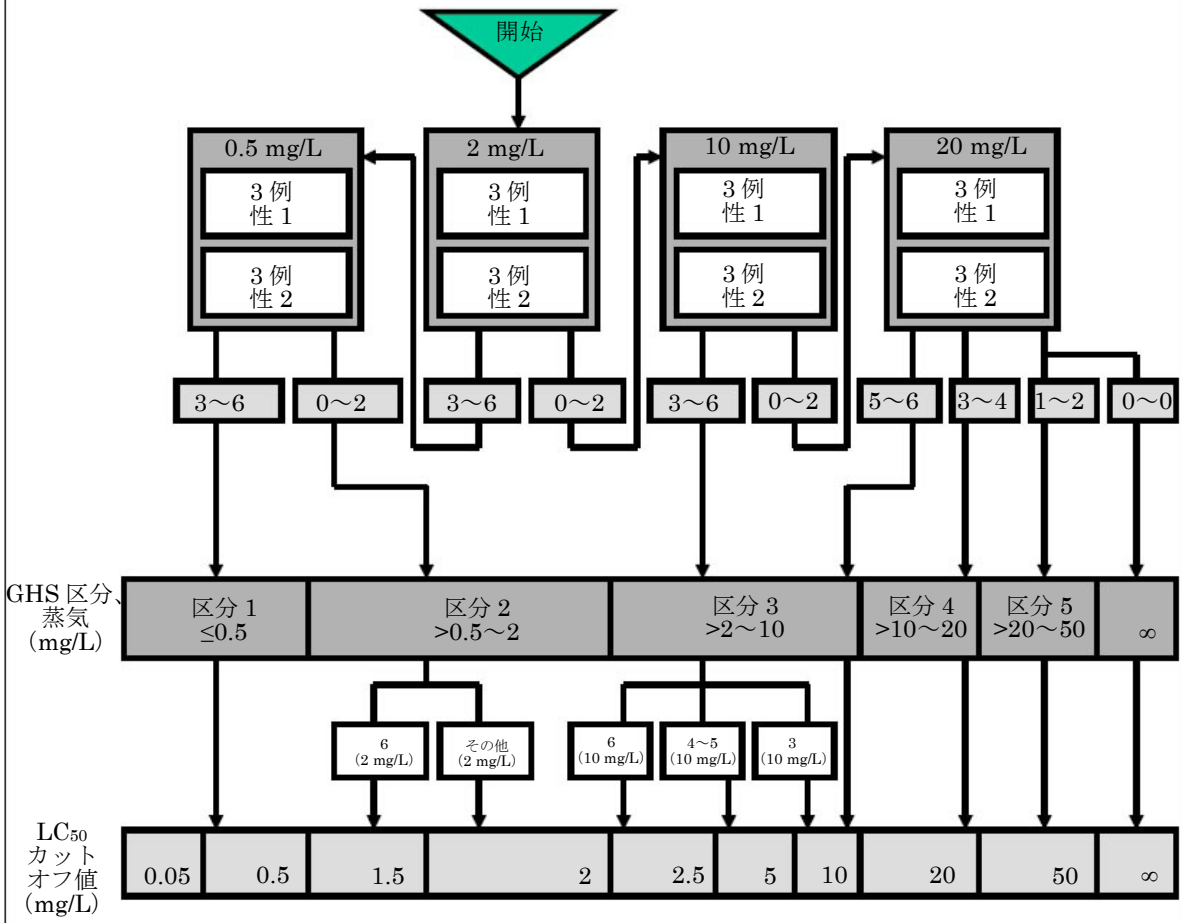


- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 50 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）

補遺 2b

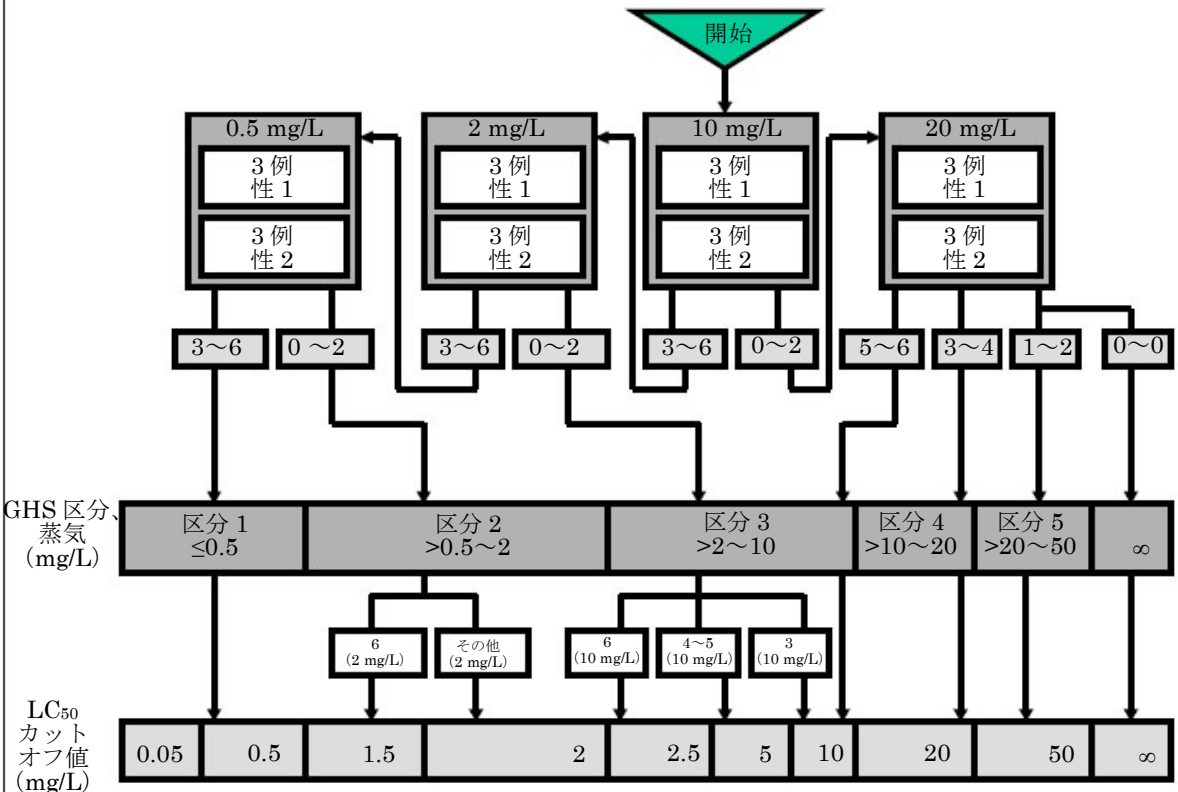
急性吸入毒性：
開始濃度が 2 mg/L/4h の蒸気用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 50 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 2c

急性吸入毒性：
開始濃度が 10 mg/L/4h の蒸気用試験手順

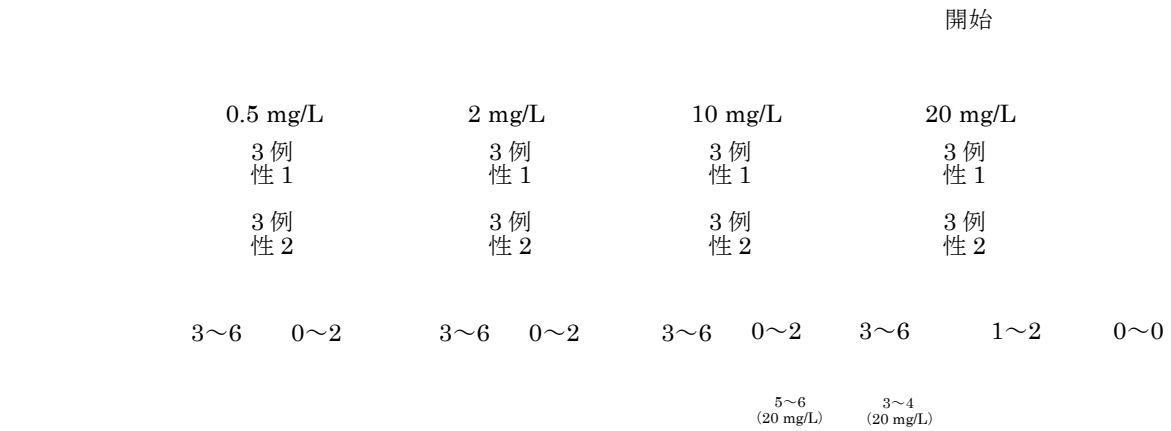


- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 50 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）

補遺 2d

急性吸入毒性：
開始濃度が 20 mg/L/4h の蒸気用試験手順



GHS 区分、蒸気（mg/L）	区分 1 ≤0.5			区分 2 >0.5～2			区分 3 >2～10			区分 4 >10～20	区分 5 >20～50	∞
			6 (2 mg/L)	その他 (2 mg/L)		6 (10 mg/L)	4～5 (10 mg/L)	3 (10 mg/L)				
LC_{50} カットオフ値（mg/L）	0.05	0.5	1.5			2	2.5	5	10	20	50	∞

- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 50 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 3

エアロゾル（mg/L/4h）用の開始濃度別の試験手順

総論

本補遺に示した各試験手順の流れ図は、各開始濃度別に実施すべき手順を示したものである。

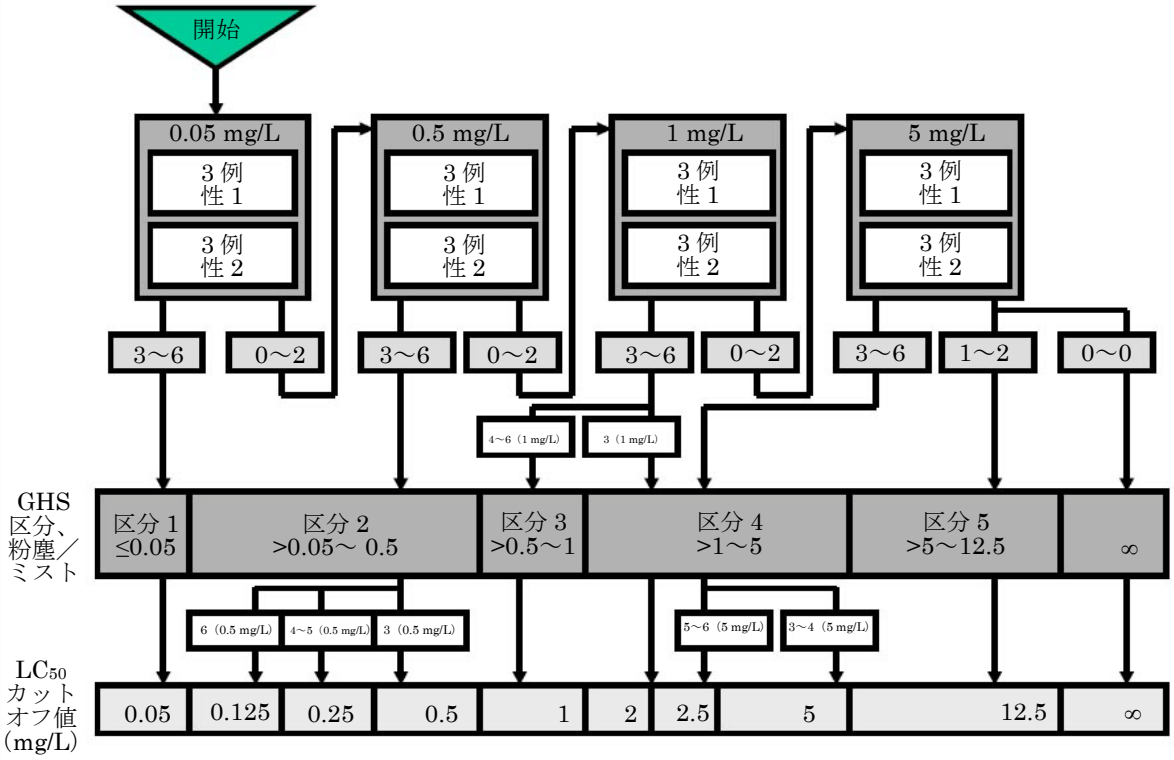
補遺 3a：開始濃度 0.05 mg/L
補遺 3b：開始濃度 0.5 mg/L
補遺 3c：開始濃度 1 mg/L
補遺 3d：開始濃度 5 mg/L

安楽死させた、または死亡を発見した動物の数に応じて、矢印に従って試験手順を進める。

© OCDE（2009 年）

補遺 3a

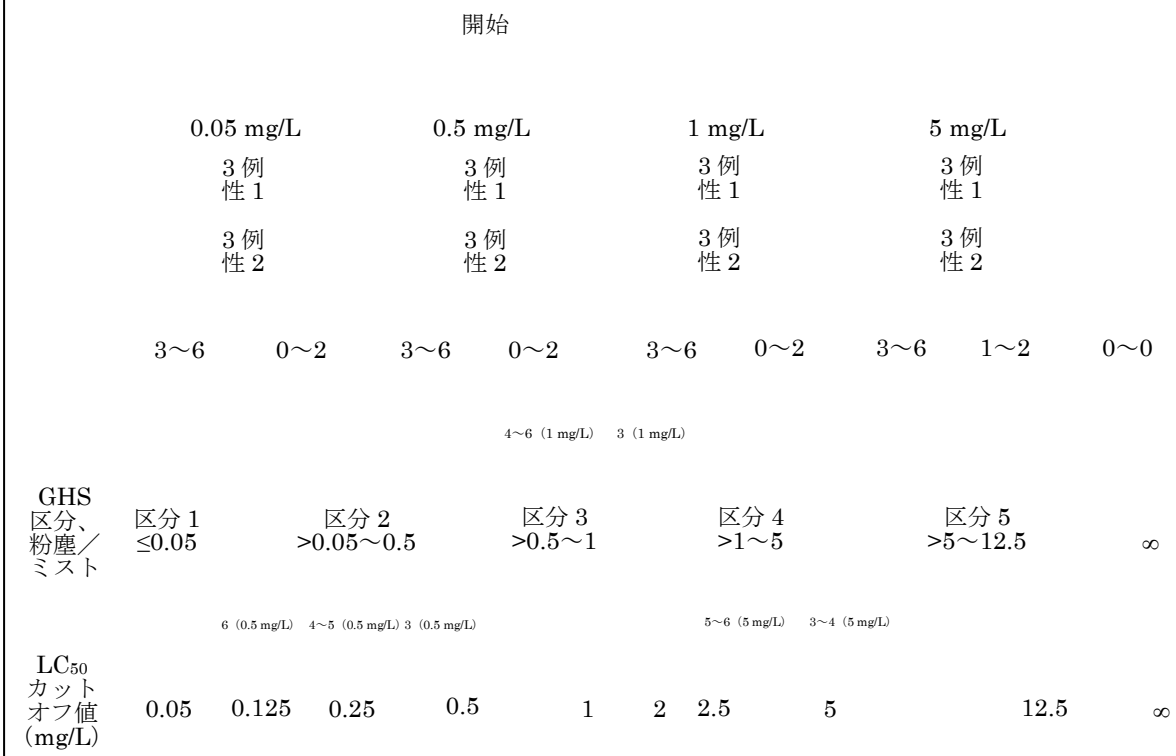
急性吸入毒性：
開始濃度が 0.05 mg/L/4h のエアロゾル用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 12.5 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 3b

急性吸入毒性：
開始濃度が 0.5 mg/L/4h のエアロゾル用試験手順



GHS 区分、粉塵／ミスト	区分 1 ≤0.05		区分 2 >0.05～0.5			区分 3 >0.5～1		区分 4 >1～5		区分 5 >5～12.5	∞
LC_{50} カットオフ値（mg/L）	0.05	0.125	0.25	0.5		1	2	2.5	5	12.5	∞

6（0.5 mg/L） 4～5（0.5 mg/L） 3（0.5 mg/L）

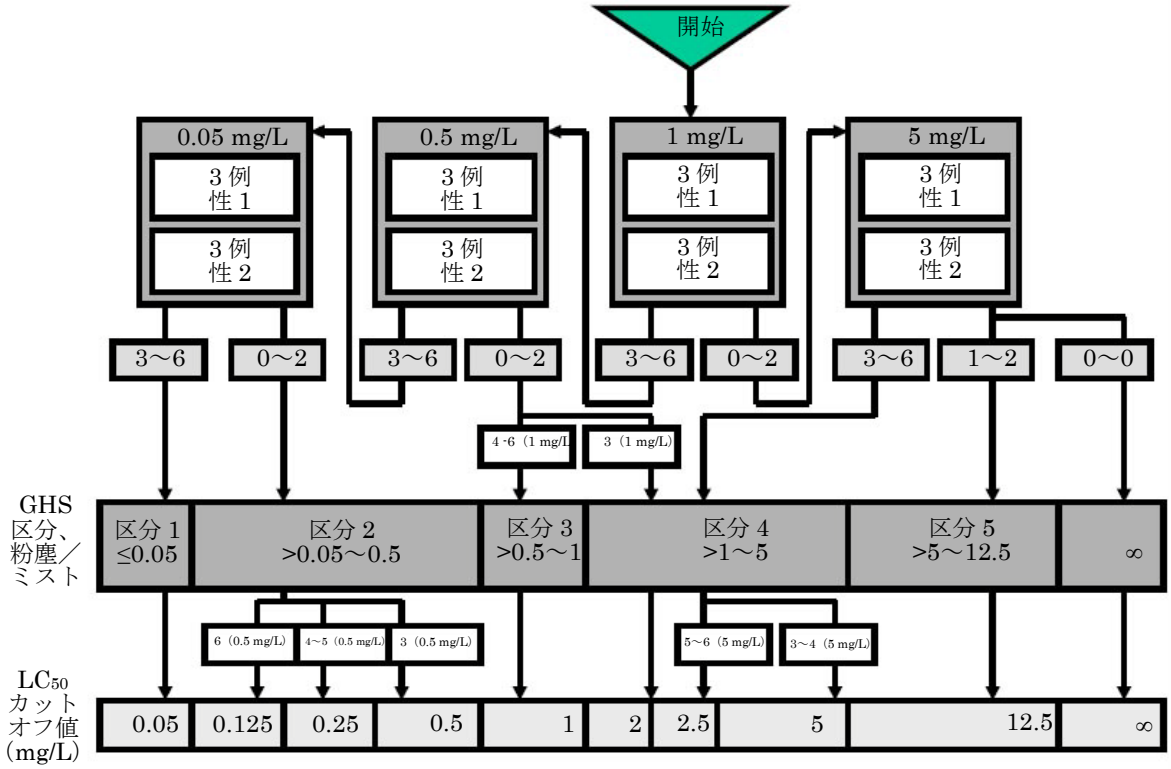
5～6（5 mg/L） 3～4（5 mg/L）

- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 12.5 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）

補遺 3c

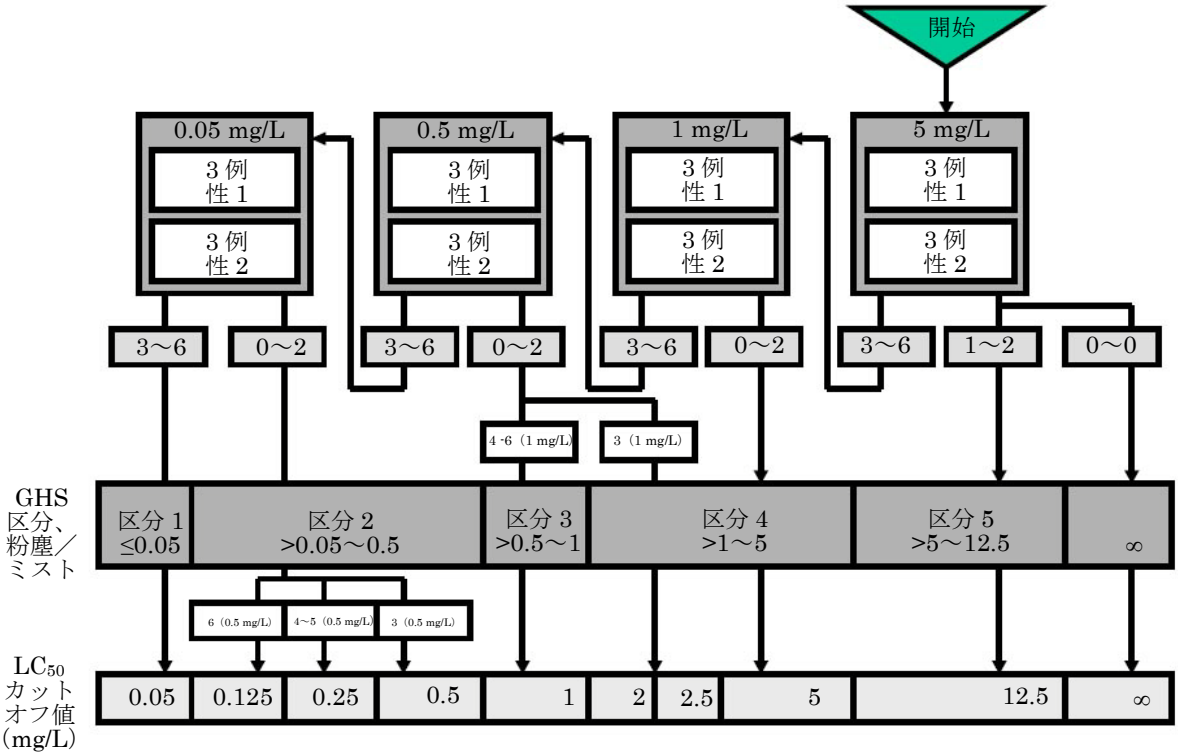
急性吸入毒性：
開始濃度が 1 mg/L/4h のエアロゾル用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 12.5 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

補遺 3d

急性吸入毒性：
開始濃度が 5 mg/L/4h のエアロゾル用試験手順



- 各段階あたり雌雄各 3 例または感受性の高い性 6 例を使用する
- 0～6：当該濃度における瀕死または死亡動物数
- GHS：化学品の分類および表示に関する世界調和システム
- ∞：分類せず
- 12.5 mg/L/4h の濃度での試験については、ガイダンス文書 39(8)を参照のこと

© OCDE（2009 年）