

OECD： 化学物質テストガイドライン解説

東京理科大学ナノ粒子健康科学研究センター
小林 剛

1. はじめに

OECDの採択している化学物質テストガイドライン（TG）については、化学物質とその影響に関連する技術者や研究者の間には既に周知されて、国際的に最高レベルの信頼性が確立されており、あらためて解説するまでもないと、ごく最近まで考えていた。

ところが、先日、ある科学技術振興団体の有力者から、ナノマテリアルのヘルスリスク研究に関連して「玉石混交で信用できない」との言及があり、このような誤った認識を改め、OECDの名誉を守り、OECD-TGの内容についての正しい理解を促進するため、声を大にしてPRする必要性を痛感するに至った。

人間は、生育環境や受けた教育の領域により、情緒や感情が大きく影響を受けることは否定できない。理工系では、医学生物系と異なり、細菌や動物実験に対するアレルギーが強く、忌避反応を起こし易く、「動物では有害であっても、人間では判らない」などの迷言(?)を吐く人が多い。筆者の経験でも、30年ほど前に、ある自動車メーカーの研究所で、排気ガスの変異原性テストの実施を提案したところ、「サルモネラ菌が社員食堂に紛れ込んだらタイヘンだ」と拒否されたことが想起される。

2. 化学物質の健康影響研究についての国際的取組み

化学物質のヒトの健康と環境保全に対する有害影響を検出し評価するための国際的なテストガイドラインとしては、現時点においては、ここで紹介するOECD-TGのほかに、WHO・ILO・UNEPによるIPCS(国際化学物質安全性計画)の環境保健クライテリア(Environmental Health Criteria:EHS)が「双璧」をなすといつてよいであろう。

EHSでは、個々の化学物質を多く扱っているが、このOECD-TGでは、テスト方法を主眼にしており、OECD加盟各国のトップレベルの研究者の英知を結集した国際的合意により確立された「科学憲章」ともいふべき存在である。また、科学の進歩に応じて、随時、改訂するというフレキシビリティも堅持している。

従って、このOECD-TGに準拠した手法を用いた学術論文は、基本的には、学術誌への採否前の、同領域の専門家による、研究の信頼性や妥当性を検証するピアレビュー(査読)に十分に耐え得るとされている。

例えば、BASF社（ドイツの大規模総合化学メーカー）は、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の吸入毒性について、OECD-TG #413：亜慢性吸入毒性テスト：90日研究（1981年9月採択分、その後2009年に改訂）に厳密に準拠し、GLP（優良動物実験規範）の条件下で実施され、濃度依存性の肺とリンパ節内における炎症と肉芽腫を認め、MWCNTの吸入後におけるヘルスハザードの可能性を認めた。この重大な発見は、権威あるオックスフォード・ジャーナル社の毒性科学誌（Toxicological Sciences）（2009年8月）に発表された。この成果は、一面では、図らずも、ナノマテリアルのメーカー自身が、企業にとっては不具合な（？）クロのデータにもかかわらず公表するというフェア態度に対して、社会の賞賛の的となった。

3. OECD 化学物質テストガイドライン（OECD ホームページより）

OECD 化学物質テストガイドライン（TG）とは、政府・企業・独立ラボラトリーにより用いられている、最も国際的に合意された化学物質および農薬や工業化学品を含む化学製品に対するテスト方法の集積である。それらは、化学物質の物理化学的特性・ヒトの健康への影響・環境影響・環境中での分解と蓄積に対するテストをカバーしている。

その完全なリストは、OECD の化学物質-TG として、英語およびフランス語により入手でき、改訂版が含まれる。

TG の入手方法：

すべてのリーダーは、我々のオンライン・ライブラリーである [OECD Library](#) を介して、無料でアクセスできる。リーダーは、すべての改訂された新しいテストの恩恵を、オンラインで享受できる。OECD-TG は、次の 5 Section から構成されている。

Section 1: 物理化学的特性

Section 2: 生物システムへの影響（34 件）

Section 3: 分解および蓄積

Section 4: 健康影響（62 件）

Section 5: その他のテストガイドライン

4. OECD-TG のベネフィット及び GLP(優良試験所規範)

i) 啓蒙効果：化学物質の健康影響について、国際的に合意されたテストガイドラインを共有することにより、前述のような、他分野からの誤解や中傷を未然に防止する科学

ii) 経済効果：データの相互受理（MAD: Mutual Acceptance of Data）が、的根拠として極めて有用である。

1981年の理事会で採択された。これは、OECD-TG および GLP(優良試験所規範)に基くデータであれば、他国において規制目的で作成された試験データでも、OECD 加盟国の受け入れを求める協定である。これにより、不要なテストの重複が回避でき、特に高額な動物実験のコストが節約でき、動物保護の点からも極めて望ましい。その後、1997年には、OECD 非加盟国の参加も認められた。(ちなみに、OECD 加盟国は、いわゆる「先進国」の30ヶ国で、アジアでは、日本と韓国のみ)

なお、GLPとは、ラボラトリーにおいて作成されたテストデータの信頼性を確保するため、権威ある監視当局が、ラボラトリーの施設について、一定の基準を満たし、特定のテストを実施する能力を認定する制度である。OECD-GLP 規定(1997年改訂)では、ラボラトリーが遵守すべき基準として、次の諸点が挙げられている。①運営管理 ②テスト施設 ③テスト計画 ④内部監査 ⑤信頼性保証 ⑥標準操作手順書 ⑦データ・記録の保管。

5. まとめ

以上、化学物質の安全性評価が、高い信頼性を構築するために、国際的にどのように実施されているかについて、OECD の果たしている重要な役割と大きな努力を紹介したが、理工学系の諸氏のご理解の一助となることを期待している。

なお、OECD のテストガイドラインそのものは、高度の内容から、当然、専門家向けで頁数も多いため、このたび、健康影響 Section のアブストラクトのみに対して、一般向けの注釈を加え、さらに、暴露経路別(吸入・経口・経皮など)と発現影響別(世代毒性・生殖/発生毒性・神経毒性・内分泌毒性・発ガン性・遺伝毒性など)に分け、原著と対訳を付し、理解し易いような構成を試みた。これを出発点として、さらにフルテキストを参照されるようお願いしたい。

OECD：
化学物質テストガイドライン・アブストラクト集
[健康影響分野]

企画・訳注：東京理科大学ナノ粒子健康科学研究センター
小林 剛

目次

[テストガイドライン No.・タイトル (採択年月)]

PART I：暴露経路別リスト

1. 吸入毒性

- 403： 急性吸入毒性テスト (2009/09)
- 412： 反復投与吸入毒性 28日または14日テスト (2009/09)
- 413： 亜慢性吸入毒性テスト (2009/09)
- 436： 急性吸入毒性テストー急性毒性等級法 (2009/09)

2. 経口毒性

- 407： げっ歯類における28日間反復経口投与毒性テスト (2008/10)
- 408： げっ歯類における90日間反復経口投与毒性テスト (1998/09)
- 409： 非げっ歯類における90日間反復経口投与毒性テスト (1998/09)
- 420： 急性経口毒性テストー固定用量法 (2004/04)
- 423： 急性経口毒性テストー毒性等級法 (2001/12)
- 425： 急性経口毒性テストー上げ下げ法 (UDP) (2008/10)

3. 経皮毒性

- 402： 急性経皮毒性テスト(1987/02)
- 404： 急性皮膚刺激性/腐食性テスト (2002/04)
- 405： 急性眼刺激性/腐食性テスト(2002/04)
- 406： 皮膚感作性テスト (1992/07)
- 410： 反復投与経皮毒性テスト：21日または28日テスト (1981/05)
- 411： 亜慢性経皮毒性 90日テスト(1981/05)
- 427： *In vivo* 皮膚吸収テスト (2004/11)
- 428： *In vitro* 皮膚吸収テスト (2004/11)

- 429： 皮膚感作テスト：局所リンパ節テスト (2010/07)
- 430： *In vitro* 皮膚腐食性：経皮電気抵抗テスト (TER) (2010/11)
- 431： *In vitro* 皮膚腐食性：ヒト皮膚モデルテスト (2004/04)
- 435： 皮膚腐食性評価のための *in vitro* 膜バリアテスト (2004/08)
- 437： 眼腐食性および強度刺激物質同定のための、
ウシ角膜を用いる混濁度および透過性テスト (2009/08)
- 438： 眼腐食性および強度刺激性物質を同定するための
ニワトリ摘出眼球を用いるテスト (2009/08)
- 439： *In vitro* 皮膚刺激性：再生ヒト表皮テスト (2010/07)
- 442A： 皮膚感作性：局所リンパ節テスト：DA (2010/07)
- 442B： 皮膚感作性：局所リンパ節テスト：BrdU-ELISA (2010/07)

PART II：発現毒性別リスト

1. 毒性動態

- 417： 毒性動態 (2010/07)
- 452： 慢性毒性テスト (2009/09)
- 453： 慢性毒性/癌原性組合せテスト (2009/09)
- 432： *In vitro* 3T3 NRU 光毒性テスト (2004/11)

2. 世代毒性

- 414： 出生前発生毒性テスト (2001/01)
- 415： 一世代生殖毒性テスト (1983/05)
- 416： 二世代生殖毒性テスト (2001/01)

3. 生殖/発生毒性

- 421： 生殖/発生毒性スクリーニングテスト (1995/06)
- 422： 反復投与毒性テストと生殖毒性スクリーニングテストの組合せテスト (1996/03)

4. 神経毒性

- 418： 急性暴露後の有機リン化合物の遅延性神経毒性テスト (1995/07)
- 419： 有機リン化合物の遅延性神経毒性テスト：28日反復投与テスト (1995/07)
- 424： げっ歯類の神経毒性テスト (1997/06)
- 426： 発達神経毒性テスト (2007/10)

5. 内分泌毒性

- 440： げっ歯類における子宮肥大テスト：エストロゲン様作用の

短期スクリーニングテスト (2007/10)

- 441: ラットにおけるハーシュバーガー・バイオアッセイ：
（抗）アンドロゲン様作用の短期スクリーニングアッセイ (2009/09)
- 455: 化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、
安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化テスト
(2009/09)

6. 発ガン性/変異原性/遺伝毒性

- 451: 癌原性テスト (2009/09)
- 471: 細菌復帰突然変異テスト (1997/07)
- 473: 哺乳類の *in vitro* 染色体異常テスト (1997/07)
- 474: 哺乳類赤血球小核テスト (1997/07)
- 475: 哺乳類骨髄染色体異常テスト(1997/07)
- 476: 哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異テスト (1997/07)
- 477: 遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死テスト (1984/04)
- 478: 遺伝毒性：げっ歯類を用いる優性致死テスト (1984/04)
- 479: 遺伝毒性：哺乳類動物細胞を用いる *in vitro* 姉妹染色分体交換テスト
(1986/10)
- 480: 遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異テスト (1986/10)
- 481: 遺伝毒性：酵母を用いる体細胞組み換えテスト (1986/10)
- 482: 遺伝毒性：DNA 損傷および 修復/哺乳類動物を用いる
in vitro 不定期 DNA 合成テスト (1986/10)
- 483: 哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常テスト (1987/07)
- 484: 遺伝毒性：マウススポットテスト (1986/10)
- 485: 遺伝毒性：マウス転座テスト (1986/10)
- 486: 哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) テスト (1997/07)
- 487: 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核テスト (2010/07)

OECD：化学物質テストガイドライン

PART I 暴露経路別テストリスト

1. 吸入毒性

403：急性吸入毒性テスト (2009/09)

この方法は、テスト物質（ガス・ベーパー・エアロゾル/粒子などの）をテストするため、吸入による短期暴露より生じる可能性のある健康ハザードについての情報を示している。

この改訂テストガイドラインでは、2件の研究を記述している。それらは従来方式のLC50 (50%致死濃度) および濃度×時間 (C×t) のプロトコールである。それは、致死濃度中央値 (LD50)、非致死閾値濃度 (LC01) およびスロープの推定と性別感受性の確認に用い得る。このテストガイドラインは、テスト物質の定量リスクアセスメントと、化学物質類の区分と表示方式について、国際的に統一されたシステムに従った分類が可能である。従来方式のLD50プロトコールにおいては、1種類の限界濃度あるいは3種類の濃度と、最低でも、予め決定された時間、一般には4時間に暴露される。各濃度について、10匹の動物を用いるべきである。C×Tプロトコールでは、動物は複数の時間について、1種類の限定濃度あるいはシリーズの濃度に暴露される。通常、各C×tの間隔について2匹の動物が用いられる。動物（生物種としては、ラットが望ましい）は、最短でも14日間観察すべきである。この研究には、測定（体重を含む）および毎日の詳細な観察と肉眼的解剖検査が含まれる。

412：反復投与吸入毒性 28日または14日テスト (2009/09)

この改訂テストガイドライン412 (TG 412) は、限定期間 (28日間) における吸入経路の反復暴露により、テスト試料の毒性の特性を十分に解明し、定量的吸入リスクアセスメントのデータを示すためにデザインされている。

少なくとも、5匹のメスおよび5匹のオスのげっ歯類のグループが1日当り6時間、28日間、a)テスト試料の3種類以上の濃度レベルに b)濾過空気 (陰性対照) と c)媒体 (vehicle) (媒体対照)に暴露される。動物は、通常、週に5日間暴露されるが、7日間も許される。必ず、オスとメスがテストされるが、テスト試料に対して片方の性の感受性が高いことが知られている場合には、異なる濃度に暴露される。このガイドラインでは、研究管理者に対して、テスト試料の毒性をより良く解明するため、サテライト・グループ (可逆性：reversibility)、気管支肺胞洗浄液 (BAL)、神経学的テスト、追加的臨床病理学および組織病理学的評価などを包含する融通性を許可している。

413： 亜慢性吸入毒性テスト：90 日研究 (2009/09)

この改訂テストガイドラインは、亜慢性期間（90 日間）における吸入経路によるテスト試料の特性を十分に解明し、定量的吸入リスクアセスメントの明確なデータを示すためにデザインされている。10 匹のオスおよびメスのげっ歯類のグループが、a) テスト試料の 3 種類以上の濃度レベルに b) 濾過空気（陰性対照）と c) 媒体（vehicle）（媒体対照）に暴露される。動物は、通常、週に 5 日間暴露されるが、7 日間も許される。必ず、オスとメスがテストされるが、テスト試料に対して片方の性の感受性が高いことが知られている場合には、異なる濃度に暴露される。この研究結果には、体重測定と毎日の詳細な観察（血液学および臨床化学）のほか、眼科、肉眼的解剖検査、臓器重量測定、組織病理学的検索が含まれる。このテストガイドラインは、テスト試料の毒性をより良く解明するため、サテライト・グループ（可逆性：reversibility）、気管支肺胞洗浄液（BAL）、神経学的テスト、追加的臨床病理学および組織病理学的評価などを包含する融通性を許可している。

436： 急性吸入毒性テストー急性毒性等級法 (2009/09)

このテストガイドラインで記述された方法では、テスト試料に対する吸入による短期暴露のハザードアセスメントを可能にする情報を示し、化学物質の区分と表示方式についての国際的統一システム（GHS）に準拠した分類が可能である。このテスト方法は、段階方式に基き、各段階では、オス・メス各 3 匹の動物（ラットが推奨される）が用いられる。動物は、吸入チャンバーにおいて、予め決定された濃度に 4 時間暴露される。ある段階における、試料化合物に関連する動物の死亡の有無により、次の段階が決定される。極度の苦痛あるいは困憊状態の動物は、安楽死させるべきである。開始濃度は、ガス・ベーパー・エアロゾルについての GHS カテゴリーに対応する 4 種類の固定レベルから選定する。動物は、最短 14 日間、毒性の臨床サインについて、毎日観察される。動物の体重は、少なくとも、週毎に測定すべきで、すべての動物は、肉眼的解剖検査に供せられる。

2. 経口毒性

407： げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性テスト(2008/10)

この方法は、テスト物質の経口投与により生じる可能性のあるヘルスハザードについての情報を示す。本方法は、一定期間における（毎日 1 用量レベルで 28 日間）対象物質の反復経口投与に基いている。本ガイドラインでは、主として、げっ歯類（ラットを推奨）の使用を予定している。各用量レベルには、少なくとも、10 匹の動物（オス・メス各 5 匹）を用いるべきである。最小でも 3 テスト・グループを用いるべきである。テスト化合物は、強制経口投与（by gavage）あるいは食餌または飲料水により投与される。限定テストは、1000 mg/kg 体重/日の用量において影響がないと予想された場合に実施されよう。本研究のリポートには、臨床および機能上の観察、体重、食餌/水摂取量、血液検査所見、臨床生化学検査結果のほか、肉眼的解剖検査および組織病理学的所見が含まれる。

408： げっ歯類における90日間反復経口投与毒性テスト (1998/09)

この方法は、テスト物質の経口投与により生じる可能性のあるヘルスハザードについての情報を示す。反復投与方法を用いる亜慢性経口毒性の決定は、急性または28日間反復毒性テストから得られた当初の毒性情報に基づいて実施される。

本法は、長期間（毎日1用量レベルで90日間）にわたる対象物質の反復経口投与に基いている。本テストガイドラインは、主として、げっ歯類（ラットが望ましい）の利用を予定している。各テストグループには、少なくとも20匹の動物（オス・メス各10匹）を用いるべきである。最少でも、3種類の濃度を用いるべきである。テスト化合物は、強制経口投与あるいは食餌または飲料水により投与される。限定テストは、1000 mg/kg 体重/日の用量において影響がないと予想された場合に実施されよう。本研究のリポートには、各種測定値（毎週少なくとも1回の体重測定、食餌/水摂取量）、毎日の詳細な観察（眼科検査、血液検査所見、臨床生化学および尿検査結果）（これらの実施は、同時刻における実施が望ましい）のほか、肉眼的解剖検査および組織病理学的所見が含まれる。適切に実施された90日間の亜慢性テストは、無影響レベルについて満足し得る推定を示すであろう。

409： 非げっ歯類における90日間反復経口投与毒性テスト (1998/09)

本方法は、テスト物質の短期暴露により生じる可能性のあるヘルス・ハザードについての情報を示す。反復投与を用いた亜慢性経口毒性の決定は、急性あるいは反復投与28日間毒性テストから得られた当初の毒性についての情報により実施されよう。

本法は、対象物質の長期間（毎日1用量レベルで90日間）の反復経口投与に基いている。本ガイドラインは、主として、非げっ歯類の利用を予定している。通常用いられる非げっ歯類はイヌである（ビーグル犬が用いられることが多い）。各テストグループには、少なくとも8匹（オス・メス各4匹）を用いるべきである。最少でも3種類の濃度を採用すべきである。テスト化合物は、食餌あるいは飲料水により、強制経口投与またはカプセルにより投与される。限定テストは、1000 mg/kg 体重/日の用量において影響がないと予想された場合に実施されよう。適切に実施された90日間の亜慢性テストは、無影響レベルについて満足し得る推定を示すであろう。

420： 急性経口毒性テストー固定用量法 (2004/04)

本方法の原理では、主要研究において、適度の毒性用量のみが用いられ、この用量の投与では、致命影響の回避が考えられている。

このガイドラインでは、ラットの使用が予定されている。単一の性（通常はメス）の動物グループに対

して、5、50、300、2000 mg/kg（例外的には、5000 mg/kg）の固定用量が、段階的な方法で投与される。最初の用量レベルは、重篤な毒性影響や死亡を引き起こさない程度の毒性サインを示す用量の観察研究に基づいて選定される。その後、各グループは、毒性サインあるいは死亡の有無により、より高い、または、より低い用量が投与される。この手法は、明らかな毒性あるいは死亡、影響の見られない最高用量、死亡が発生する最低用量が確認されるまで継続される。テスト物質は、単回投与により、胃チューブあるいは適当なカニューレ挿管を用いて、強制経口投与される。動物は、投与前には絶食させるべきである。単一の性の5匹の動物は、通常、検討される各用量レベルの検討に用いられる。本研究の結果には、測定値（少なくとも週1回の体重測定）、毎日の詳細な観察のほか、肉眼的解剖検査が含まれる。本法は、危険な特性についての情報を示し、化学物質類の分類および表示についての国際統一システムによる急性毒性の区分を可能にする。

423: 急性経口毒性テストー毒性等級法（2001/12）

これは、急性毒性等級法を用いた急性経口テストガイドラインである。

（訳者注：毒性等級法については、436の急性吸入毒性テスト参照）

425：急性経口毒性テストー上げ下げ法（UDP）（2008/10）

この方法は、国際的に合意している化学物質類の区分と表示システムに準拠した急性毒性に分類が可能で、あるレベルの信頼区間（confidence interval）（訳者注）と結果が推定できる。

訳者注：信頼区間とは、統計学で母数がどのような数値の範囲にあるかを確率的に示す方法で、通常、95%あるいは99%などの数値を用いる。

最も容易な方法は、数日以内に死亡を来す量の試料の投与である。本ガイドラインでは、げっ歯類（ラットのメスを推奨）の使用を予定している。これには、限界テスト（limit test）およびメインテストがある。限界テストは、低毒性と推定される化学物質類を効果的に確認できる。テスト試料は、一般的には、投与前に絶食させた動物に対して、単回、強制経口投与される。1匹の動物には、48時間の間隔で、連続して投与される。最初の動物には、事前に推定されるベストのLD50(50%致死量)以下の量が投与される。第二の動物には、それよりも低い量（最初の動物が死亡の場合）あるいは高い量（最初の動物が生存の場合）が投与される。動物に対しては、最初の4時間は特に細心の観察を行い、その後14日間、毎日、一般的な観察が継続される。動物の体重測定は、少なくとも週1回行う。すべての動物は、肉眼による解剖検査に供せられる。最大可能性法（maximum likelihood method）を用いて、全般としてのLD50が算定される。これにより、LD50の推定間隔（interval estimates）の算出が可能となり、最も狭い間隔がLD50推定値として望ましい。

テストガイドライン 425 および 432 には、ソフトウェアが用いられる。このソフトウェアは、化学品安全データの相互受理 (MAD: Mutual Acceptance of Data) (訳者注)には含まれない。

訳者注：MAD とは、1981 年の OECD 理事会において採択された協定で、OECD テストガイドラインおよび GLP(優良試験所基準)に基づくデータであれば、他国で規制目的のために作成されたテストデータでも、OECD 加盟国にデータの受け入れを求める内容を有し、これにより、不要なテストの重複が回避され、貿易の促進も可能となった。1997 年より、OECD 非加盟国でも参加が可能となった。

OECD: 化学物質テストガイドライン・アブストラクト集 (II)

3. 経皮毒性

402: 急性経皮毒性テスト (1987/02)

本方法は、固体あるいは液体のテスト試料の経皮経路による短期暴露から発生する可能性のある健康ハザードについての情報をもたらす。

このテストガイドラインは、主として、げっ歯類 (ラット・ウサギ・モルモットが用いられよう) の採用を予定している。各用量には、少なくとも 5 匹の動物が用いられる。テスト試料は、数グループの実験動物に対して、累進的用量により、皮膚 (体表面積の 10%以上) に適用される。最低でも 3 種類の用量レベルにより、用量-反応カーブの作成に適切なスペースに適用すべきである。2000 mg/kg における限度テストが実施される。観察期間は最短でも 2 週間とすべきである。実験初日は、動物を頻繁に観察し、その後は毎日観察を行うべきである。すべての動物の解剖検査を実施し、全部の肉眼的病理学的変化を記録すべきである。経皮経路による急性毒性研究と、経皮 LD(致死量)の決定は、経皮暴露による試料物質の相対的毒性 (relative toxicity) の推定を可能にし、分類と表示のベースとして有用である。この急性経皮毒性テストは、亜慢性およびその他の研究の用量確立における最初のステップであり、試料の経皮吸収および毒性の作用機序についての情報をもたらすであろう。

404: 急性皮膚刺激性/腐食性テスト (2002/04)

本方法は、経皮適用による固体あるいは液体のテスト試料の暴露から発生する可能性のある健康ハザードについての情報をもたらす。このテストガイドラインでは、腐食/刺激についての *in vitro* (試験管内) あるいは *ex vivo* (生体外) において、信頼性が確認され容認されているパフォーマンスが含まれる連続的なテスト戦略を推奨している。

実験動物としてはシロウサギが推奨されている。試料物質は、実験動物の皮膚の狭い部分 (約 6cm²) に単回適用され、動物の適用されない皮膚の部分は対照として用いる。暴露時間は 4 時間とし、次いで、残留テスト物質は除去すべきである。テスト部位には、液体では 0.5 ml、固体の場合は 0.5g が適用される。本法は、最初のテストおよび確認テスト (最初のテストで腐食性が認められなかった場合のみ実施)

から構成される。すべての動物は、紅斑 (erythema) 浮腫(oedema)の徴候について、14日間検査される。皮膚刺激スコアは、損傷の特性と重症度、それらの可逆性の有無との関連において評価すべきである。反応が観察期間の14日間の末期まで継続した場合には、そのテスト試料は刺激物質と見なすべきである。

405: 急性眼刺激性/腐食性テスト (2002/04)

本方法は、試料物質（液体、固体あるいはエアロゾル）の眼への適用への暴露から発生する可能性のある健康ハザードについての情報をもたらす。

このテストガイドラインでは、シロウサギの使用が推奨されている。テスト物質は、各動物の片眼の結膜嚢に単回適用される。処置されなかった他の眼は、対照として用いられる。動物を用いるイニシャル・テストの用量レベルは、テスト試料の特性に依存する。確認テストは、イニシャル・テストで腐食性影響が認められなかった場合に実施すべきで、刺激性あるいは陰性の影響は、さらに2匹の動物を用いて確認すべきである。その実施には、同時に2匹の動物を暴露させず、一回には1匹の動物として、連続的に行うことが推奨されている。観察期間は、影響の強さと可逆性を十分に評価できる長さとするべきである。眼の観察は、テスト物質適用後、1、24、48、72時間に行うべきである。眼の刺激スコアは、損傷の特性と重症度、可逆性の有無との関連で評価すべきである。個々のスコアは、物質の刺激性の絶対的な基準を代表せず、テスト物質の他の影響も評価される。

406: 皮膚感作性テスト (1992/07)

このテスト方法は、皮内注射および/あるいは表皮適用を介するテスト物質の暴露から生じる可能性のあるヘルスハザードについての情報をもたらす。本テストガイドラインでは、Magnusson と Kligmann のアジュバンド（免疫助成剤・抗原性補強剤）を用いる GPMT(訳者注：原意の「モルモットの作用を最大化するテスト」から、通常は「GPMT テスト」「皮膚感作性テスト」と意識される)と、アジュバンドを用いないビューラーテスト (Buehler Test) が推奨される。

このテストガイドラインでは、主としてモルモットの使用を予定しているが、最近、感作性評価についてのマウスモデルが開発されている。GPMT については、動物は、最少でも処置グループには10匹、対照グループには5匹が用いられる。ビューラーテストでは、動物は、最少でも、処置グループでは20匹、対照グループでは10匹が用いられる。テスト動物は最初にテスト物質に暴露され、休息期間と免疫反応が発現する誘発期間（10-14日間）の後、動物はチャレンジ用量に暴露される。このGPMTテストの実施には約23-25日間、ビューラーテストには30-32日間を要する。各誘発暴露に用いられるテスト物質の濃度は、全身的に十分に耐えられ、軽度から中等度の皮膚刺激を発生させる最高値とするべきで、チャレンジ暴露では無刺激の最高用量を用いるべきである。すべての皮膚反応および異常所見は記録すべきである（疑わしい反応の解明には、別の手法が実施されよう）。

410: 反復投与経皮毒性テスト：21日または28日テスト（1981/05）

本研究は、固体あるいは液体のテスト物質の経皮適用によるヘルスハザードの分析に関連している。この方法は、メインテストとリミットテストの二つから構成されている。本テストでは、成獣のラット・ウサギ・モルモットの使用を予定している。各用量レベル（最少でも3種類）において、健康な皮膚を有する動物を、最少でも10匹用いるべきである。最高用量は、毒性影響を生じさせるが、死亡の発生のないレベルとすべきである。リミットテストは、最低でも1000 mg/体重 kgにおける用量レベルに対応する。この方法は、限定期間（21/28日間における毎日数時間）における対象物質の反復適用に基いている。テスト物質は身体表面積の10%以上に適用すべきである。この研究結果には、毎日の体重測定や詳細な観察（血液検査・臨床生化学および尿分析）のほか、肉眼的解剖検査および組織病理学検査結果が含まれる。適切に実施された21日および28日研究は、反復吸入暴露の影響についての情報をもたらし、さらに長期の研究のニーズを示し、後者の用量レベルについての情報を与える。

411： 亜慢性経皮毒性テスト：90日テスト（1981/05）

本研究は、固体あるいは液体のテスト物質の経皮適用によるヘルスハザードの分析に関連している。これは、急性テストにより得られた初期の情報の後に実施される。

この方法は、メインテストとリミットテストから構成されている。このテストガイドラインでは、成獣のラット・ウサギ・モルモットの使用を予定している。各用量レベル（最少3種類）においては、健康な皮膚を有する最少20匹の動物（メス・オス各10匹）を用いるべきである。最高用量は、毒性影響を発生させるが死亡させないレベルとすべきである。リミットテストは、最低1000 mg/kg 体重の用量レベルに対応する。この方法は、限定期間（21/28日間における毎日数時間）における対象物質の反復適用に基いている。テスト物質は身体表面積の10%以上に適用すべきである。この研究結果には、毎日の体重測定や詳細な観察（眼科検査・血液検査・臨床生化学および尿分析）のほか、肉眼的解剖検査および組織病理学検査結果が含まれる。適切に実施された亜慢性テストは、無影響レベルについて十分な推定を可能にするであろう。

427： *In vivo* 皮膚吸収テスト(2004/04)

このテストガイドラインにおいて設定された *in vivo*（生体内）経皮吸収研究は、経皮暴露後の安全アセスメントの際の、経口研究からの外挿に必要な関連を示す。このガイドラインに記述された *in vivo* 方法は、テスト物質の皮膚経由の全身部分への進入の決定を可能にする。

テスト物質には放射性標識が推奨され、使用中の代表的な調製物の形状で、1種類以上の適切な用量により、動物の剃毛皮膚に、一定期間適用される。最も多く使用される動物はラットである。各調製物および予定された各屠殺時期について、最少でも、メス・オス各4匹の動物が用いられる。既知量のテスト

調製物が、部位に均等に適用される。テスト調製物の量は、通常、ヒトの暴露量に準ずるべきで、典型的には、固体の場合は $1-5 \text{ mg/cm}^2$ 、液体では $10 \mu\text{l/cm}^2$ である。予想されるヒトの暴露時間に基き、適切な暴露時間（通常は、6 あるいは 24 時間）を用いるべきである。動物に対しては、毒性/異常反応の徴候について 研究の全期間にわたり、ある間隔をもって観察すべきである。本研究には、毎日の測定（排泄物）、定期的な詳細な観察のほか、予定された屠殺時の採血分析が含まれる。

428 : *In vitro* 皮膚吸収テスト (2004/04)

このテスト方法は、テスト物質（放射性標識が理想的）の吸収についての情報をもたらすようにデザインされており、皮膚サンプルの表面に適用された物質は、拡散細胞の二つのチャンバー（ドナーチャンバーおよびレセプターチャンバー）に分かれる。静的およびフロースルー（flow-through）拡散細胞の双方を用いることができる。

テストには、ヒトおよび動物からの皮膚を利用できる。生存状態の皮膚が望ましいが、非生存状態の皮膚も用いられる。皮膚は、皮下吸収の間に、ある種の化学物質を代謝する能力を示す。この場合には、テスト化学物質の代謝は、適切な方法により分析されるであろう。通常は、典型的な調製物のテスト物質の 1 種以上の濃度が用いられ、ヒトの暴露の可能性のある現実的な範囲に及ぶ。適用は、ヒトの暴露に似た状態で行い、通常では、皮膚への適用は、固体の場合は $1-5 \text{ mg/cm}^2$ 、液体では $10 \mu\text{l/cm}^2$ で行うべきである。温度は、化学物質の受動的拡散に影響するため、一定に保つべきである。一定時間中（通常は 24 時間）でのテスト物質の吸収は、レセプター液と、テストシステム中におけるテスト化学物質の分布により測定され、時間による吸収プロファイルを示すべきである。

429: 皮膚感作テスト : 局所リンパ節テスト (2010/07)

マウスにおける局所リンパ節テスト (LLNA) の基礎を形成する基本原則は、化学物質適用部位の水分を排出するリンパ節におけるリンパ球の一次的増殖を誘発する感作体である。この増殖は適用量に比例し、感作性の測定をもたらす。この方法では、細胞増殖の測定には放射性標識を利用している。各用量グループには、最少で 4 匹の動物と 3 種類のテスト物質の濃度が用いられ、担体のみを負荷された陰性対照グループのほか、必要な場合には、陽性対照が加えられる。このアッセイの実験予定は 6 日間である。その後、動物は屠殺され、リンパ節の細胞懸濁が調製される。3H-メチルチミジンの取り込みは、分当りの崩壊 (DPM) として、シンチレーション・カウンターにより測定される。本ガイドラインには、機能的およびメカニズム的に LLNA に類似した、新しい、あるいは改良した信頼性確認状態の評価に用い得る性能基準が含まれる。動物数の 40%以上の削減に用い得る LLNA のアプローチの低減も、オプションとして加えた。本研究には、測定（体重、DPM）と毎日の臨床観察が含まれる。結果は、感作指標 (SI) として表現される。この SI は、計算により得られ、テスト物質を皮膚感作物質として分類する前提として、 $i\dot{Y}$ (刺激指数) 3 を要件とすべきである。

430: *In vitro* 皮膚腐食性: 経皮電気抵抗テスト (TER) (2010/11)

化学物質の国際的分類および表示についての統一システムでは、皮膚腐食に対して、テスト物質の適用後における皮膚組織内の不可逆性損傷の生成と定義している。

テスト物質は、区画間の分離として、皮膚ディスク機能における二つの区画テストシステムにおいて、(表面に、150 μ Lの脱イオン水に、150 μ Lの液体または固体として)、皮膚ディスク(各テストと対照物質に3個のディスクが用いられる)の表皮表面に24時間以上適用される。皮膚ディスクは、28-30日齢のラットを安楽死させて採取された。腐食性物質は、閾値レベル(ラットでは、5KΩ)以下の電気抵抗(TER)の低下として測定され、それらの正常の角質層の機能とバリアを喪失させる能力により確認された。角質層の物理的破壊によるイオン浸透性の増加を決定するため、テスト手法には、染料結合ステップが組み込まれている。

431: *In vitro* 皮膚腐食性: ヒト皮膚モデルテスト (2004/04)

このテストガイドラインで記述されたテストは、腐食性化学物質および混合物の同定と、その他の現存情報を用いたテスト結果の重要性評価の決定による非腐食性物質の同定を可能としている。また、このテストのプロトコールは、重篤とさほど重篤でない皮膚腐食を区別する徴候も示している。このテストガイドラインは、皮膚腐食性の評価について、生きている動物あるいは動物組織を必要としない。

テスト物質(固体または液体)は、最低でも、機能的な角質層を有する再生表皮から構成される三次元のヒトの皮膚モデルの表面に対して、均一に適用される。複製された2種類の組織は、各処置(暴露時間)と対照に対して用いられる。腐食性物質は、特定の暴露時間における細胞生存応力を決定する閾値レベル以下に低下させる能力により同定される。ヒトの皮膚モデルアッセイの原理は、腐食性化学物質は拡散あるいは腐食により、角質層を浸透する能力を有し、基底の細胞層に対して細胞毒性を示すとの仮説に基いている。

435: 皮膚腐食性評価のための *in vitro* 膜バリアテスト (2004/08)

このテストガイドラインは、腐食性物質の同定に用いることのできる *in vitro* の膜バリアテストである。

本テストは、局所において、動物の皮膚に類似した態様で反応するようにデザインされた人造膜を用いる方法である。*In vitro* 膜バリアテストは、固体・液体(pHが4.5-8.5の範囲の液状物質はテストに不適な場合が多い)・エマルジョンのテストに用いられるであろう。このテストにより、GHS(国際統一システム)における腐食性物質類の細分類が可能である。この分類は、膜バリアを通過する物質の浸透時間に基いている。本テストシステムは、合成大分子バイオバリアと、化学物質検出システム(テスト物質を)という二つの要素から構成されている。各テスト物質には、適当数の複製物と、それらに対応する

対照が調製される。膜バリアに対してテスト物質が適用される時間は、記録され、夫々に配置される。テスト物質の膜への適用から膜の浸透との間の時間（分単位）は、テスト物質の腐食性の予測に用いられる。

437: 眼腐食性および強度刺激物質同定のための、ウシ角膜を用いる混濁度および浸透性テスト (2009/09)

ウシ角膜混濁度/浸透性テスト(BCOP: Bovine Corneal Opacity Test)は、眼腐食性および強度刺激物質を分類するために用い得る *in vitro* テスト法である。このBCOPは、商業目的で食肉用に屠殺されたウシの眼から分離された角膜を用いることにより、ラボラトリーの実験動物の使用を回避している。各処置グループ（テスト物質負荷と陰性/陽性対照）には、最少で三個の角膜が摘出され、ホルダーに載せられる。テスト物質が上皮表面を適切にカバーすることが重要であるため、テスト物質の物理化学的特性により、異なる方法をとることができる。角膜に対する毒性は、各処置グループの *in vitro* 刺激性スコア (IVIS) を組み合わせた混濁度と浸透性により測定される。IVISについて、55.1と同等以上を誘発した物質は、腐食性あるいは強度の刺激物質と同定される。

438: 眼腐食性および強度刺激物質同定のための、ニワトリ摘出眼球を用いるテスト (2009/09)

摘出ニワトリ眼球 (ICE: Isolated Chicken Eye) テスト法は、物質を「眼腐食性/強度刺激性」に分類するために用いる *in vitro* テスト法である。ICEは、人間の消費のために、食肉用に屠殺されたニワトリから採集されるため、ラボラトリーの実験動物の使用を省くことが出来る。眼球は摘出後、角膜を水平にするよう眼球ホルダーに載せられる。角膜には、テスト物質と陰性/陽性対照が適用される。角膜への毒性は、混濁の定性的測定と、蛍光停留に基づく表皮の損傷の定性的アセスメント、厚さの増加（腫脹）の定量的測定、表面の損傷形態の肉眼的定性的評価により測定される。最終的発現影響は、ICEテストが発生させる各発現影響とは分離し、各テスト物質の刺激性分類 (Irritancy Classification) と組み合わせて評価される。

439: *In vitro* 皮膚刺激性：再生ヒト表皮テスト (2010/07)

このテストガイドラインは、国連：国際分類/表示システム (GHS) カテゴリー2に一致する刺激性化学物質類（物質および混合物）のハザード同定について用いられる *in vitro* 手法を述べている。これは、ヒトの皮膚の上層部分の生化学的および生理学的特性のすべてをそっくり模倣したデザインにより再生されたヒトの上皮 (RhE) に基いている。細胞の生存能力は、組織からの抽出後に定量的に測定されたブルー・ホルマザン塩中の生体色素 MTT (テトラゾリウム塩) の酵素変換により測定される。刺激テスト物

質は、決定された閾値レベル（国連 GHS カテゴリー 2 についてのレベル以下あるいは 50%）以下への、細胞の生存度を低下させる能力により決定される。また、このテストガイドラインには、RhE ベースのテストの類似法あるいは改法のアセスメントについての性能基準のセットが含まれる。このテストガイドラインを遵守した 3 種類のテストの信頼性が確認されている。この手法は、規制の枠組みと採用している分類システムに応じて、テスト物質の皮膚刺激性の決定に、in vivo 皮膚刺激テストの独立的あるいは部分的代替テストとして、層別テスト戦略の中で用いられるであろう。

442A: 皮膚感作性:局所リンパ節テスト：DA

局所リンパ節テスト：DA(LLNA: DA)は、皮膚感作性の可能性のあるテスト物質を同定する LLNA 法の非放射性の改法で、リンパ節内のリンパ球の増殖を測定する。マウス（CBA/J 系）において、増殖の指標として、バイオ蛍光法により、アデノシン三リン酸（ATP）成分が測定される。各用量グループには最少 4 匹の動物、テスト物質の濃度は最少 3 種類、さらに、陰性対照、必要な場合には、陽性対照が用いられる。実験期間は 8 日間である。動物の屠殺から、ATP の測定までの時間は 30 分以内とすべきである。ATP 測定のためのリンパ節の摘出手法は、各動物に対して一定とし、20 分以内に終了すべきである。相対的蛍光単位（RLU）におけるバイオ蛍光の測定には、ルシフェリン/ルシフェラーゼ法が適用される。本研究には、測定（体重・RLU）、毎日の臨床的観察が含まれる。結果は、計算により刺激指標（SI）として表される。SI は、テスト物質がその後の評価において、皮膚感作物質の可能性を評価する前提として、iY（刺激指数）1.8 を要件とすべきである。（442A）

442B: 皮膚感作性: 局所リンパ節テスト：BrdU-ELISA (2010/07)

局所リンパ節テスト：BrdU-ELISA(LLNA: BrdU-ELISA)は、皮膚感作性テスト物質の可能性を確定するための LLNA 法の非放射性改法で、リンパ節内に誘発するリンパ球の増殖を測定する。この方法ではマウス（CBA/JA 系）が用いられ、この増殖の指標として、チミジンの類似体の 5-ブロモ-2-デオキシウリジン(BrdU)成分の測定に基いている。各用量グループには最少 4 匹の動物が用いられ、テスト物質の濃度は最少 3 種とし、同時に、陰性/陽性対照グループが加えられる。実験期間は 6 日間である。その後、動物は屠殺され、リンパ節細胞（LNC）懸濁液が調製される。LNC の調整手法は、特に NC 動物における小型リンパ節については重要である。次いで、市販キットを用い、リンパ球中の DNA 内の GrdU が ELISA（酵素免疫法）により測定される。本研究には、測定（体重、BrdU）、毎日の臨床観察が含まれる。結果は、平均 BrdU 表示指標から算出される感作指標（SI）として得られる。この SI は、テスト物質がその後の評価において、皮膚感作物質として評価する前提として、iY（刺激指数）1.6 を要件とすべきである。（B）