OECD/OCDE

2004/11/26

神経毒性試験に関する ガイダンス文書

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 (2004), Guidance Document for Neurotoxicity Testing, OECD Series on Testing and Assessment, No. 20, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/16d23a96-en.

©OECD(2004)

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

目次

緒言 12

神経毒性の有害性評価原理 13

評価および試験戦略の概要 14

初期試験 14
初期試験のデータ評価 15
一般原則 15
試験の計画および試験方法の選択 16

付録 1：OECD 試験ガイドライン 19

付録 2：特異的検査法 21

神経行動学的検査 21
何が測定できるのか？ 21
機能変化の評価方法 21
行動学的検査の一般的能力 21
行動学的検査の一般的限界 21
一般的なガイダンス 22
各種ガイダンス 22
運動機能の測定に用いる一般的方法（表 1） 22
感覚機能の測定に用いる一般的方法（表 2） 22
認知機能の測定に用いる一般的方法（表 3） 24
不安または嫌悪の測定に用いる一般的方法（表 3） 25
複合課題の遂行能力の測定に用いる一般的方法（表 4） 25
神経病理学的検査 25
病変の特性をさらに解明するための特殊な神経病理学的検査手法 27
神経線維の解きほぐし標本法 27
透過電子顕微鏡法 27
形態計測 28
免疫組織化学的形態計測 28
神経生理学的検査 28
脳波検査 29
誘発電位（EP） 29
末梢神経伝導速度 31
筋電図検査（EMG） 31
単一細胞活動記録法および ex vivo 法 31
神経化学的検査 31
一般生化学検査 31
特異的細胞マーカー 32
神経伝達 32
アセチルコリンの例 34
In vitro 試験 35

表 1：運動機能の測定に用いる一般的方法 36
表 2：感覚機能の測定に用いる一般的方法 38
表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法 41
表 4：複合課題の遂行能力の測定に用いる一般的方法 46
表 5：脳の自発性および誘発性電気活動の評価に用いる方法 47
表 6：受容器および末梢神経の誘発性電気反応の評価に用いる方法 49
表 7：特異的細胞機能に関する試験法 50

参考文献 47

翻訳版注記：
本目次のページ表記は、英文ガイダンス文書原文ならびに本翻訳版の該当箇所と整合しているものではない。

緒言

5. 本文書の目的は、化学物質の潜在的神経毒性を調べるため、その試験に必要な戦略と方法についてガイダンスを示すことである。本ガイダンスの目的は、化学物質曝露による神経毒性の適切なリスク評価を可能にする必要かつ十分なデータの確保である。発達神経毒性試験については、他のガイダンス（生殖毒性試験および評価に関する OECD ガイダンス草案）および試験ガイドライン（OECD 草案 426）に網羅されることになっているため、本文書では取り上げない。

6. 評価や試験を繰り返し実施する戦略が推奨される。動物の使用数の最小化および資源配分の最適化を図るために、試験を反復する前には毎回データの評価を実施し、化学物質の用途から生じるリスクの評価に十分なデータであるか、または追加試験を要するのかを判断する。データ評価は戦略全体の根幹をなす部分であるため、本文書では神経毒性の定義を示し、各種神経毒性作用について論じる。またデータを評価するために、または神経毒性作用を同定し、その特性を明確化するための試験法を選択するためには、試験方法を熟知しておくことが必須となることから、試験方法に関するガイダンスを示す。

7. 本文書は、現行の OECD 試験ガイドライン（付録 1）に対する重要な補足を含んでおり、化学物質の潜在的な神経毒性に関する情報入手に用いられる OECD 試験ガイドラインには、単回投与毒性試験（OECD 402、403、420、423、425 など）、反復投与毒性試験（OECD 407、408 など）、さらには成熟および若齢実験動物における神経毒性試験として開発された試験ガイドライン（神経毒性試験に関する OECD 試験ガイドライン（424）、有機リン化合物の遅発性神経毒性試験に関する OECD 試験ガイドライン（418 および 419）、発達神経毒性に関する OECD 試験ガイドライン（426）、反復投与毒性試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の複合試験に関する OECD 試験ガイドライン（422））に関する項目が含まれる。OECD ガイドライン下で実施されているほかの全身毒性試験（systemic toxicity testing）に関する試験からも関連情報が得られる。

8. 神経毒性データの評価に関する文書は、各国で多くの団体・組織が作成している。本ガイダンス文書の初稿は ECETOC（欧州化学物質生態毒性および毒性センター）のモノグラフ（1992）を基に作成された。そこには定義についての考察、一過性作用および間接作用の問題、注解付きで広範囲にわたる試験法のレビュー、ならびに試験戦略が含まれていた。北欧閣僚理事会（Nordic Council of Ministers）（1992）は、神経毒性化学物質の同定および分類のための基準定義を模索していた作業部会による報告書を公表した。そこで示された基準には、神経毒性を有する可能性が高いことなどに関する利用可能な証拠と化学物質の作用の強さ（potency）についての記載などに基づき、化学物質を群分けする手順が定められている。これは、有害化学物質の一覧表を作成するためのツールとなるよう意図されたものである。続いて、デンマーク環境保護庁（Danish Environmental Protection Agency）（1995）が、神経毒性評価の定義、方法論および基準を含む詳細な文書を発表した。また、米国環境保護庁による二文書（U.S. EPA, 1994, 1998）には神経毒性のリスク評価の原理およびガイドラインが記載された。この二文書も、一般的な定義と問題点、試験方法の概要、および米国におけるリスク評価の枠組み、すなわち有害性評価、用量反応評価、曝露評価およびリスクの総合判定（risk characterization）という枠組み内でのデータの解釈について、論じている。

神経毒性の有害性評価原理

9. 神経毒性（または神経毒性作用）の定義は、化学的、生物的、または物理的因子への曝露の結果生じる神経系の構造的または機能的な有害な変化である。この定義は「有害（adverse）」という言葉の解釈に左右される（OTA, 1990）。「有害な変化」には何が含まれるのかについては、研究者間で意見の相違がある。「有害な変化」の実用的な定義は、「生命体の生存能力、生殖能力、または環境適応力を低下させるような、処置に関連した基準値からのあらゆる変化」とされる（US EPA, 1994）。特に、「有害」という言葉は毒性学的意味でとらえられるべきであり、弊害をもたらす神経系の正常機能の阻害あるいは構造の有害な変化またはその両者を意味する。

10. 神経系の構造的または機能的な有害変化は、化学物質の単回投与または反復投与により引き起こされる。単回曝露および反復曝露のいずれもがヒトへの曝露で予想される事態であるため、神経毒性の評価および試験戦略を立てるにあたっては両者が考慮されなければならない。

11. 神経系の有害変化には、作用因子が神経系の標的部位へ直接作用する直接的なもの、あるいは神経系外にある標的部位に作用して神経系に続発的に影響を与えるような間接的なものがある。間接的変化は有害とはみなされても、必ずしも神経毒性とはみなされない（US EPA, 1994、Robins & Cotran, 1979）。化学物質の神経系に対する間接作用は、非常に高用量で実施される単回投与動物試験では特に関心がもたれることとなる。致死量近くの用量では、第一の標的が神経系でなくても、振戦、歩行失調、痙攣が観察されることが多い。他の間接的原因としては、脳への酸素および栄養供給の不足、ならびに腎機能障害および肝機能障害による毒性物質の血中および脳内への蓄積が挙げられる。しかし、1 回限りの投与による試験結果では直接作用と間接作用とを識別することは非常に困難であると思われる。

12. 神経毒性の評価では、影響のタイプ、重症度、数（訳者注：何種類の影響があったか）、および完全または部分的可逆性に基づく懸念の程度に配慮しなければならない。たとえば、痙攣は一般的に嗜眠傾向よりも懸念が高く、また麻痺は一般的に軽度の脱力よりも懸念が高い。同様に、関連する複数の作用が一定のパターンで生じたり同時に群発したりする場合には、単一の作用や相互の関連性がない作用よりも一般的に懸念が高くなる。他の臓器または生体内システムに対する毒性よりも、低用量で明確かつ一貫したパターンで神経毒性を生じさせる化学物質については、わずかな関連性のない作用しか生じない化学物質よりも一般的に懸念が高い。しかし、特定の評価項目の所見（振戦、痙攣など）については、たとえそれが唯一観察された変化で時間的に限られたものであっても、懸念するに十分な理由となりうる。

13. 神経毒性作用に関しては、作用の可逆性は特に重要な要素となる。神経毒性には可逆的作用および不可逆的作用があり、曝露前の状態に戻ることが不可能であり生体を永続的に変化させるものが不可逆的作用、曝露前の状態に戻ることが可能であり、生体が曝露前の正常状態に戻れるものが可逆的作用である。明らかな、あるいは実証可能な神経系の構造または機能の不可逆的変化は、可逆的変化よりも大きな懸念となる。

14. 生体の生存期間の特定の時期に神経毒性影響が認められる場合、それがゆっくりと元通りになる場合でも高懸念材料となる。一般的に、急速に回復する、または一過性の影響（すなわち、分、時間、日数単位で観察されるもの、作用物質の薬物動態と身体的な症状の出現に関連性がみとめられるもの）に対する懸念は低い。ただし、神経系には予備能があり、影響の可逆性が

細胞死の可能性を除外することとはならない。さらに、可逆的影響に対する懸念の度合いを考える際には曝露状況を考慮する必要がある。たとえば、工業施設内での重機の操作には、短時間の鎮静影響でも支障をきたす可能性があるため、仕事の作業条件または環境により生じる可逆的変化に対する懸念は高くなるであろう。このように、可逆的な神経毒性変化であっても評価を慎重に行って、適切な関心度を設定する必要がある。

評価および試験戦略の概要

15. 評価や試験を繰り返し実施する戦略が推奨されるが、つぎの反復試験を行う前に、利用可能な情報すべてを評価する。関連情報（物理化学的特性、構造活性相関、毒性学的データ、ヒトへの曝露で記録された情報、各化学物質に考えられている用途、ヒトへの曝露で想定される経路など）に基づいて物質ごとに試験計画を立てられるよう、試験戦略には柔軟性を持たせるべきである。また、この反復過程には、試験計画の完了後に明らかになった動物での研究やヒトにおける曝露データを定期的に見直すことも含まれる。

16. 構造的に類似した化学物質の毒性データは、初期評価時には特に重要な情報源となりうる。そのような情報は、行動学的、生化学的、生理学的および形態学的評価項目における変化の有無から得られる。初期評価の結果によっては追加情報を要することがあるが、そのような追加情報は全身毒性試験から得られる。神経系は多種多様な身体機能を支えているため、単一の試験で、使用可能な全評価項目についての詳細な情報を得ることは通常は不可能であり、非現実的である。そこで多くの場合、初期試験にいわゆる「スクリーニング試験」を取り入れて、簡易な評価項目について高用量にて試験を行い、系または臓器に特異的な作用をあぶり出す。ただし、利用可能なデータから神経毒性作用の可能性について重要な手掛かりが示されている場合には、特定の神経毒性作用について詳細な情報を得るため、初期試験の中に追加の評価項目を含めてもよい。

17. 利用可能な情報（背景データおよび初期試験）から潜在的な神経毒性を有する証拠が得られなかった場合、神経毒性についての有害性評価は初期試験だけで十分である場合が多い。その一方で、初期試験後に得られた情報を評価した結果、試験および評価を繰り返す必要が生じる場合もある。その際、後続試験の計画にあたっては、1 回目の試験時に得られた結果の重複にしかならないような簡易評価項目については、その数を最小限にすることが重要である。その代わりに、神経毒性作用の同定に必要な特異的かつ詳細な評価項目を入れて、神経毒性の不確定な機能的徴候または形態的徴候について全体像を得ること、神経毒性作用が直接神経毒性か、他の毒性の副次的作用であるかを明確に識別すること（臓器特異的毒性など）が必要である。

初期試験

18. 神経毒性評価のための最初の動物データは、神経系を含むすべての主要器官系について機能情報または病理組織学的情報を収集できるような、標準的な単回投与毒性試験（OECD 402、403、420、423 および 425）または反復投与毒性試験（OECD 407 および 408）から得られることが最も多い。

19. 利用可能な情報から神経毒性影響の可能性が示唆された場合、さらに特定の神経毒性作用について詳細な情報を得るために、初期の標準試験中に評価項目を追加してもよい（段落 11 を参照）。また、既存の情報から疑われる神経毒性作用を評価するために、特異的検査（付録 2 を参照）を含む神経毒性試験（OECD 424）を実施する必要性が示唆されることもある。初期試験に特異的な評価項目を追加すべきか判断する際には、初期試験で通常採用される高用量投与により毒性作用が交絡している可能性について考慮するべきである。

20. 初期の反復投与試験は単回投与試験の初回後に行うことが多い。そのような場合、反復投与試験の結果は、単回投与のリスク評価に関連する結果を提供することがある。通常、そのようなデータは、行動または他の評価項目の投与直後の所見から得られる。ただし、反復投与試験には限界があり、耐性、感作、その他の代償機構を生じる可能性がある。反復投与試験の標準プロトコールについては急性作用の評価が求められていないため、反復投与試験のプロトコールを修正して第 1 回目の投与後の観察を含めるようにしないと、急性毒性が過小評価される可能性がある。

初期試験のデータ評価

21. 単回投与毒性試験から、化学物質使用に際して生じるリスクの評価にとって重要なデータを得ることが可能である。ただし、初期の単回投与試験は通常致死量または致死量近くの用量で行われるため、観察された機能的影響が直接的か、間接的かという判断が困難になるという限界がある（段落 7～9 を参照）。

22. 初期の反復投与試験は初期の単回投与試験よりも低い用量で実施される。通常、神経系、およびその他の器官系に対する毒性は低用量の方がゆっくり進行するため、徴候の進行具合を比較し、神経系に対する間接影響と直接影響（段落 7～9 を参照）とを識別する良い機会となる。

一般原則

23. 試験を繰り返し実施する必要があるかどうかは、利用可能な情報をすべて使って臨機応変に考えられるべきである。化学物質の用途および予見される誤用に関するリスクを評価には、既存のデータでは不十分であると判断した場合にのみ追跡試験が実施されるべきである。追加試験の必要性を検討する際に、考慮すべき要素としては以下のものが含まれる。

(a) **懸念の程度。**神経毒性の懸念が低い化学物質よりも高い化学物質のほうが、試験の反復がより求められる。実験動物を用いた全身毒性試験、ヒトの曝露、または構造活性相関から神経系への影響を示す証拠が認められない場合には、一般的に懸念度は低くなる。

(b) **神経毒性が直接的影響か、間接的影響か識別する必要性。**直接的影響と間接的影響を識別するため、他の器官系の解剖学的および臨床病理学的評価項目を追加する必要があるのか否か、慎重に考慮するが必要である。

(c) **不確定な形態的または機能的神経毒性徴候について全体像を得る必要性。**用量もしくは被験体の追加、または機能的・形態学的により精緻な方法（例えば灌流固定、組織化学的手法、形態計測）が必要であるかの慎重な考慮が必要である。

(d) **神経毒性作用の特性を明確化する必要性。**神経毒性を示唆する明らかな証拠があり、かつ、データが化学物質の用途に起因するリスク評価に十分である場合は通常、追加試験は必要ない。リスクの評価のために追加のデータが必要な場合は、まず神経毒性

の種類の同定を行うのが正当である（NCM-NIOH, 1992、Simonsen et al., 1994、ECETOC, 1992、Eisenbrandt et al., 1994）。作用の同定には、特異的な行動学的、形態学的、神経化学的または神経生理学的指標が含まれる（付録 2 を参照）。このような作用の同定は、その後、リスク評価のための妥当なデータの構築に利用される最も感受性の高い指標の定義に必要とされることがある。そのように定義されたパラメータを用いて、単回曝露試験、長期試験、各種曝露経路（経口、経皮、吸入）または特定の曝露集団（性別、年齢、動物の系統など）についての試験など、様々な曝露状況における NOAEL または LOAEL が決定される。同定に用いる試験（後述の方法のセクションを参照）では、神経系の構造および機能に関係する神経毒性の特定側面に対処する必要があり、妥当な場合には、有害作用と処置に関連する他の作用との識別に寄与するものとする。

(e) **用量作用曲線の型、および神経毒性について無毒性量を設定する必要性。**用量作用曲線が急勾配であれば（高用量では明らかな神経毒性の徴候が発現するが、より低い 2 用量では徴候が認められない場合など）、試験をさらに繰り返す必要性は低くなる。用量作用曲線が緩勾配であれば､NOAEL を決定するためには試験をさらに反復する必要性は高くなる。

(f) **化学物質の用途または予見される誤用に起因するヒト曝露の経路およびその確率。さらに**試験を繰り返し実施するかどうかを決定する際には、化学物質に曝露される集団の大きさ、また、その曝露集団が実際にその化学物質を吸収する可能性について慎重に検討する。化学物質には、意図的にせよ、不測の事態であるにせよ、ヒトへの重大な曝露の可能性を有するもの（医薬品、農薬など）もあれば、曝露の可能性が非常に限られているもの、または可能性がないもの（場所限定中間体、放出の可能性がない物質に取り込まれた物質など）もある。また、化学物質の種類が異なれば曝露経路も異なり、そこからの吸収にも非常にばらつきがある。たとえば、ほとんど吸収されない物質もあれば、複数の経路から迅速に吸収されると思われる物質もある。追加試験の決定に際しては、投与径路および試験期間とともに、これらの要素についても慎重に考慮する必要がある。

(g) **曝露集団の特殊事情。**追加して実施する繰り返し試験を計画する際には、曝露集団の特性（年齢、性別、系統など）についてはそのすべてを慎重に考慮する。

24. 追跡試験の計画を立てる際には、用量および試験条件の検討を慎重に行い、一般的な全身毒性の交絡を最小限にする。また、先に行われた試験から得られた情報の複製にしかならない評価項目については、その数が最小限になるよう考慮する。

実験デザインおよび試験方法の選択

25. 神経毒性データを得るには、行動学的、神経学的、神経化学的および形態学的手法など多種多様な方法を用いる（付録 2 を参照）。このことから、試験デザインの決定にあたっては、所轄官庁や関係機関の専門家が試験受託者／試験施設とともに判断を下すことが非常に重要になる。

26. 最適な試験法の選択にあたっては、被験物質についての利用可能な情報をすべて考慮して個別に決定する。試験法の中には、神経系器官以外における変化やその他の要素（年齢、性別、飼育条件、ホルモン状態、給餌または給水制限など）の影響を、直接的また間接的に受ける可能性のあるものがあるため、試験の計画に際してはそれらの要因変数の潜在的影響を考慮する。

27. 試験の計画（試験法の選択を含む）に際しては、考慮すべき点として以下のことを含む。

(a) 必要とする重要データについて、そのすべてを特定し、列挙できるか。その試験デザインでそれらの必要なデータを対象とできるか。対象として取り扱えなければ、必要なデータを網羅して対象とするために複数の試験が必要か。

(b) 全評価項目の測定に必要な被験体数とするために、サテライト群が必要か。

(c) 被験物質の毒性が十分同定されているか（被験物質の影響を受ける神経系の部位・領域を確定できるか、など）。できるのであれば、その情報は神経毒性の評価項目に着目する際に使えるか。

(d) 神経系以外の器官に対する有意な毒性が予想されるか。その試験デザインは、全身毒性と神経毒性との識別に十分なデータが含まれているか、用量範囲は十分か。

(e) その試験デザインは、データに影響を及ぼす可能性のある既知の要因変数（給餌制限、性別、飼育条件（群飼対個別飼育、雌雄分離飼育対混合飼育など）、被験体の老化など）による影響を考慮したものか。

(f) 神経系に対する直接影響と間接影響の識別の一助とするため、補助試験（甲状腺機能試験、生化学試験など）を採用する価値があるか。

(g) 陰性結果は有害作用がないことを示すものであるか。変化が認められれば有害とみなされるような個別の評価項目はあるか。

(h) 可逆性が問題になる場合、可逆性または部分的可逆性の評価にその試験デザインは適切か。その試験デザインで一過性の影響と持続的影響とを区別できるか。

(i) 当該試験またはこれらの試験方法の結果は、ヒトの曝露条件へ外挿することが可能か。可能でない場合、被験体にげっ歯類以外を採用することを考えるべきか。曝露経路を変更すべきか。

(j) 試験法は、感受性および特異性が高いか。定量的結果が必要か。提示された方法で影響の重篤度を評価できるか。

28. **統計解析：**試験結果の解析には、一般的に受け入れられている統計手法のうち、反復測定デザインなど、試験デザインに見合った手法をデータ種に応じて（連続データにはパラメトリック検定、度数・順位データにはノンパラメトリック検定など）用いる。解析法の選択に際しては測定した変数の分布を考慮し、多重比較のための調整の必要性についても考えること。使用可能な手法は数多くあるが、一般的に認められている統計手法を用い、試験計画時に試験デザインの一部として選択する。

付録 1：OECD 試験ガイドライン

29. *本付録では、段落 3 に記載した OECD の試験ガイドライン、すなわち単回投与毒性（402、403、420 および 423）および反復投与毒性（407、408 および 422）、ならびに若齢および成熟実験動物における神経毒性試験に特化した OECD 試験ガイドライン（418、419、424 および 426）を取り上げる。全身毒性試験に関する他の OECD ガイドライン下で実施される試験からも関連情報が得られる。*

30. OECD 試験ガイドライン 424（げっ歯類の神経毒性試験）には、(i) 飼育ケージ内およびオープンフィールドにおける詳細な症状観察、(ii) 自発運動量などの機能検査、(iii) 灌流固定組織を用いた神経病理学的検査が含まれる。基本的に OECD ガイドライン 407 および 408 と同じ試験法（機能検査、一般状態の観察）が用いられるが、OECD ガイドライン 407 と比較してサンプルサイズは大きく、求められる機能検査はより頻繁に測定され、観察については投与内容を知らない者が行わねばならず、長期曝露が可能である。OECD ガイドライン 426 は、灌流固定組織が必要である点で OECD ガイドライン 407 および 408 と異なる。OECD の神経毒性ガイドライン 424 では余剰動物を他の試験で用いることを認めており、また神経毒性試験の計画に柔軟性を持たせることができるため、資源を最大限に活用することができる。その際、すでに反復投与毒性試験から得られている結果の重複にしかならない簡易評価項目については、その数を最小限にすることが重要である。その代わりに、神経毒性影響の同定に必要な特異的かつ詳細な評価項目を入れる必要がある。

31. OECD 試験ガイドライン 424 は、反復投与、経口投与、および供試動物種としてラットを選択することを前提に作成された。急性曝露、他の投与径路（特に吸入）、および他の動物種（イヌ、晩成型及び早成型のげっ歯類（訳者注：原文では altricial and procial rodents とあるが、正しくは altricial and precocial と思われる））を用いる場合はガイドラインの修正が必要となる。本ガイドラインで求められている一般状態の観察および機能検査を急性毒性試験における時間的制約下で行うためには、特別な配慮が必要となる（U.S. EPA, 1998a などを参照）。

32. ヒトに適用する状況を予想して、経皮、吸入、その他の曝露経路を用いた複数の試験で神経毒性を調べる必要性が出てくる場合がある。これらの投与径路を用いる場合は、試験を実際に実施する上で、例えば観察検査のタイミングや頻度に影響を与えるなど、試験実施スケジュールやその他の面で制約が増えることもあり得る。この点については、試験の計画および実施にあたって慎重に検討する必要がある。

33. 経皮および吸入曝露は通常、最低でも 1 日 6 時間、1 週間に 5 日間継続されるため、標準的な就業時間内で全個体の詳細な一般状態の観察と機能検査を行うことは、実質的に困難または不可能となる。一般的に、この種の試験および急性曝露のための現実的な解決方法は、曝露レベルや性別をカウンターバランスさせつつ、供試動物を複数回分に振り分け（たとえば 4～5）、より管理しやすい個体数の少ない群での検査をできるようにすることである。

34. さらに反復曝露試験の場合、とりわけ曝露系の複雑さから被験体をすべて同時に曝露する必要性が具体化しうる吸入試験などでは、非曝露日（週末、計画的に追加された非曝露日）に検査を行うことを検討するとよい。そのような状況下では、総曝露回数は亜慢性試験で目標とされる総曝露回数（たとえば 65 回）となるよう試験を延長する必要が出てくる。

35. 試験の焦点を考慮した場合、反復曝露試験における毎日の曝露作業に絡んで、検査時間の決定に際しては異なるアプローチが必要となることがある。たとえば、累積した毒性が主目的ならば、急性影響（24 時間未満）を除外するため、毎日の投与作業の前に検査を実施する。また試験期間中、投与後の決まった時間に検査を行って、急性影響による変化に焦点を置きたい場合もあるだろう。経皮および吸入試験では、例外的に曝露時間中に行わなければならないような検査もあるが、実際にはほとんどの検査は毎日の曝露後に行う。このような必要性がある場合、試験デザインおよび日程は大きな影響を受けることになる。

付録 2：特異的検査法

神経行動学的検査

何が測定できるのか？

36. 行動学的方法は、各種感覚機能、運動機能、認知機能および自律神経機能の測定に利用できる（Tilson & Harry, 1992）。本文書では、神経毒性試験でこれらの機能評価に用いられることが多い方法を取り上げる。

機能変化の評価方法

37. 多くの場合、運動には神経系を構成する様々な部分の統合された活動が必要であるため、一検査法で複数の機能についての情報が得られることが多い。たとえば、ラットの足趾を挟むと後肢の屈曲反応および足先の引込み反応を生じる。この場合、屈曲反応から挟まれたことを感知していることについての情報が得られ、屈曲引込み反応の強さからは筋力についての情報が得られる。挟んでも反応しなければ、挟まれたことを感知していないか、後肢を動かすことができないかのいずれかである。一種類の行動学的検査結果のみの解釈では問題があるため、他の行動学的方法、または他の面から神経系を検査する方法、すなわち、電気生理学、神経化学、神経内分泌学、神経免疫学、神経病理学と組み合わせると効果的であることが多い。

行動学的検査の一般的能力

38. 一般的に行動学的検査は定量的かつ非侵襲的である。このため、毒性試験中、同じ動物を繰り返し検査に用いて、影響の有無、重篤度、発現時期、持続期間または回復についての詳細な情報を得ることが可能である。行動は生体システムの統合的な評価項目であり、構成するすべての生体システムにおけるわずかな変化も行動の変容に反映されうる。行動評価項目は、軽微な機能障害に対し高い感度を持つ戦略の一つとなる。さらに、行動上の代償性反応によって補われないような神経系のまたは神経系以外の変化についても、行動評価項目を用いて明らかにすることが可能である。

行動学的検査の一般的限界

39. 化学物質曝露後の行動変化が神経毒性に関連したものではない場合も多い。一つの試験で、観察された影響に対する神経毒性の寄与分と一般的な具合の悪さ（illness）の寄与分を定量的に評価することは困難である。特に高用量群を含む試験に関してはそう言える。神経系の機能的予備能のため、形態的障害を負いながらも機能は正常範囲内にある個体が存在する可能性がある（Mitchell & Tilson, 1982）。また、化学物質が神経系に検出可能な形態変化をもたらすことなく、行動変化を生じる可能性もある。さらに、行動変化すべてが、神経系に対する被験物質の特異作用を意味しているわけではなく、行動学的検査の中には神経系以外の器官における変化（Gerber & O'Shaughnessy, 1986、Rice, 1990）、すなわち食餌制限（Albee et al., 1987）、ホルモン状態（Robbins, 1977）、疲労（Bogo et al., 1981）、動機付け（Cooper, 1981）、発育時の飼育条件（Laviola, 1996、Laviola & Terrenova, 1998）、年齢（Soffie & Bronchart, 1988）の影響を受けるものもある。ストレスの大きい外部刺激（電気ショックなど）へ供試動物を曝露することが必要な行動学的検査もあれば、絶食または絶飲が必要なものもある。神経毒性影響の評価には、自然な刺激、すなわち動物種に関連した刺激（捕食者、受容可能な異性による刺激な

ど）と自然な行動（ラット児動物の超音波発声、母性行動など）を用いた検査も考慮に入れても良い（Alleva, 1993、Vitale & Alleva, 1999）。これらの動機付けについて考慮するような場合、試験の計画が複雑となる。一部の試験は特殊な装置や試験責任者の専門性を必要とするかもしれない。

一般的なガイダンス

40. 実験計画および影響の解釈に際しては、行動学的試験の実施経験があり、その実験方法で得られる結果の解釈についても経験のある研究者、少なくとも一人に相談することを強く推奨する。

41. 1 回の検査でも多くの変数が行動に影響を与えていることから、相互の相関を考察することが可能なように異なった複数の方法で影響を捉えるよう試みることが賢明である。このためには、同一または類似の評価項目を用いた別の行動試験を追加するか、評価項目に異なる分野の指標（電気生理学、神経化学、神経内分泌学、神経免疫学、神経病理学など）を追加してデータを収集する。たとえば、末梢運動神経についてはは、前肢および後肢の握力、末梢神経伝導速度、筋肉の間接的誘発電位、針筋電図検査、病理組織学的検査により評価可能である。

各種ガイダンス

運動機能の測定に用いる一般的方法（表 1）

42. 運動機能検査の多くは、比較的費用効率が高く、標準毒性試験に採用されているかそれらと同等とみなされているものであり、多くの試験施設で実施可能なものである。動物の訓練はほとんどまたは全く必要ないが、各動物個体の能力または積極性は様々であるため、感受性が低くなったり、適切なデータ解釈ができない可能性がある。また、これらの検査に用いる動物の能力が、疾病、給餌制限および時間帯（概日リズム）など、神経系以外の要因の影響を受けることもある。遊泳能力（Alder and Zbinden, 1983、Spyker et al., 1972）、歩行分析（Jolicoeur et al., 1979、Schallert et al., 1978）、傾斜板試験（Fehling et al., 1975、Graham et al., 1957）、ロープ上り（Carlini et al., 1967）、および振戦解析（Gerhart et al., 1985、Hudson et al., 1985、Tilson et al., 1985）など、化学物質により誘発された神経運動障害を同定するために考案された検査法も数多い。垂直方向や水平方向の動きの測定（運動量検査など）は、広範囲の種類の行動を代表するもので、感覚、運動、およびそれらを統合する過程が協調的に関与したものである。また、運動量の測定は非侵襲的であるため、多くの化学物質の急性および反復の曝露影響評価に利用されてきた（MacPhail et al., 1989、Maurissen and Mattsson, 1989）。運動量は概日リズムに応じて変化するため、検査に際しては、動物の飼育条件を一定の明暗周期下に保って、その周期内の特定の時間帯に行うようにする。

感覚機能の測定に用いる一般的方法（表 2）

43. 感覚系には、視覚系、聴覚系、味覚系、嗅覚系、体温調節系、体性感覚系（圧力、触覚、四肢位置など）、痛覚系（疼痛性刺激）がある。テイルフリック試験またはホットプレート試験などの簡単な検査法は、化学物質により誘発された痛覚系の変化を評価するのによく利用される。オペラント行動を指標にしたより複雑な試験法は、嫌悪刺激に対する閾値変化、または体性感覚の閾値変化の測定に利用されてきた。また、化学物質には聴覚毒性を生じるものもあるため、感覚機能検査法として音刺激に対する反応性を調べる方法が開発されてきた。聴覚性驚愕反応のプレパルスによる変容を測定する試験や聴覚閾値を測定するためのオペラント試験法など、より複雑な試験法も利用されてきた。嗅覚および味覚検査法も実施可能ではあるが、神経毒性試験としては一般的ではない。

44. 感覚機能試験では通常測定項目が感覚刺激に対する運動反応であるため、その解釈には注意しなければならない。また、感覚刺激に対する反応の動機付けは、飼育条件および過去のストレス体験の影響を受ける。運動機能や感覚刺激に対する動機付けに影響を及ぼす化学物質は、感覚機能の測定指標に交絡影響を与える可能性がある。

認知機能の測定に用いる一般的方法（表 3）

45. 「認知（cognition）」という用語には意識（awareness）という意味が包含されており、知覚したり（perception）、思考したり（thinking）、思いだしたり（remembering）といった多くのものが含まれている。このため、「認知」を調べることのできる単一の試験はない。代わりに、神経毒性学者らは、認知の構成要素（学習および記憶など）が検査過程で用いられる試験法を採用する。認知機能（学習および記憶）に対する化学物質の影響を評価するための多種多様な動物試験が利用可能である（表 3 を参照）。また、認知機能の指標は、感覚、運動および動機付けなどの要因変数の影響を受ける可能性がある（Tilson et al., 1980、Pryor et al., 1983）。認知機能試験から得られたデータの解釈にあたっては、適切な統制手続きを導入するか、それぞれの変数を個別に評価するにより、これらの変数に配慮すべきである（Eckerman et al., 1980）。通常、比較的単純な認知機能試験では、そのような認知以外の要因を統制したり、個別に評価するよう計画されることはないが、一方で、認知以外の要因の統制手続きを組み込むために、被験動物でより多くの訓練を実施したり特殊な装置を使用したりする必要のある、より複雑な検査課題による試験もしばしば計画される。

46. 学習および記憶は、理論上の概念であり、実験上、分離することが困難な場合もある。どちらか一方を重視して計画される試験もある。学習とは、その後の反応を変容するために新たな情報を利用する過程であり、記憶とは、その後の反応を変容するために既知の情報を利用することである。学習の一形態が馴化であり、通常、同一試験セッション内または時間的に接近連関した試験セッション中に、特定の刺激あるいは一組の環境刺激に対する反応の変化として測定される指標である。認知機能試験には、条件性味覚嫌悪課題や受動的回避課題など、訓練期間中の数回の試行における変化として学習の評価ができるものもあれば、能動的回避課題や迷路課題の一部など数日または数週間かけて反復学習試行を行う必要があるものもある。弁別学習課題、見本合わせ課題（Paule et al., 1998）、反復獲得課題（Cohn and Paule, 1995）などのオペラント課題には、通常訓練に数週間を要する。時には、最終課題による測定手続きに入る前に、数日または数週間かけて被験動物に条件付け訓練を行うこともある。1 回の試行しか行わない課題（受動的回避課題など）を用いた試験は、複数回の試行が必要な課題を用いた試験と併行して行うのがよい。

47. 学習および記憶試験として一般的に用いられる検査法には、動物に対して正の強化を受けるか、負の強化を避けるよう（訳者注：原文に avoid negative reinforcement とあるが、正しくは「avoid negative reinforcer（負の強化子を避けるよう）」と記述すべき）に反応する訓練を行うものが多いため、そのような試験では動機づけに関わる要因が重要となる。行動学的検査には、瞬目条件付けや条件性味覚嫌悪学習のようにレスポンデント条件付け、すなわち古典的条件付け、によるものもあれば、弁別学習および見本合わせのようにオペラント条件付け、すなわちまたは道具的条件付け、によるものもある。また、遅延見本合わせ課題のように、試験セッション内に、比較的短い時間に対応する短期記憶を評価する検査もあれば、モリス水迷路で参照記憶を試験するときのように、より長時間の記憶を評価するものもある。反復獲得課題のように実験状況下で近くにある手がかりに対する直接的反応を評価するものもあれば、モリス水迷路および T 迷路試験では遠くにある空間手がかりを使った動物のナビゲーション能力を評価するものもある。受動的回避、モリス水迷路、能動的回避など認知機能試験は多種多様であるが、試験によって評価対象となる学習や記憶の種類が異なるため、どのような化学物質でも用いる特異的試験の方法によ

って異なる影響を認知機能に及ぼすものと考えておくことが合理的である。

不安または嫌悪の測定に用いる一般的方法（表 3）

48. 不安（anxiety）は一般的な情動（emotion）であり、実験用げっ歯類では人工的な環境下にある典型的な行動パターンにより観察できる。動物モデルは 2 種類に分類されるが、これには（1）動機づけ（motivation）（給餌や給水制限など）と罰（punishment）（足への電気ショック）や報酬喪失（loss of reward）との間で生じる葛藤（conflict）によるものと、（2）動物行動学（ethology）に基づいた方法で、新奇環境における刺激状況（広い場所、高い場所、明るい照明、未知の同居パートナー）に対する嫌悪と、探索を指向する性質との間で葛藤が生じるようにして観察する探索行動に基づくものがある（Costall et al., 1988、File and Hyde, 1978、Rodgers and Cole, 1994、Silverman, 1988）。試験法は単純で不安に関連する行動の変化の増減双方向性に対して感度がある。運動機能に影響を及ぼす化学物質では不安の指標測定に干渉を受ける可能性がある。運動に関する要因の影響を統制するためには移動運動量を同時測定するとよい。

複雑な課題の遂行能力の測定に用いられる一般的方法（表 4）

49. スケジュール制御オペラント行動（Schedule-controlled operant behaviour）（SCOB）には、正または負の強化によって維持されている行動（レバー押しなど）がある（表 4）。反応率や反応パターンは、反応と後続する強化との関係により様々に制御される。SCOB により行動遂行能力（performance）の測定が可能であるが、学習訓練および動機付けに関わる要因変数の影響をデータ評価時には考慮に入れなければならない。化学物質等の作用因子と、感覚処理、運動出力、動機付けに関わる要因、訓練履歴、ベースラインとなる行動の特性値（強化スケジュールのパラメータ）との間には相互作用が働く可能性がある。また、化学物質等の作用因子が、行動に対するスケジュール性制御が獲得されていく過程（学習など）と相互作用する可能性もある。強化スケジュールによって様々な随伴事象を設定できるが、この随伴性次第で、安定した状態の（すなわち、ベースラインの）SCOB に対して化学物質がもたらす変化から、長期記憶や他の様々な脳機能を明らかにするための知見が提供される（Paule 1994）。

神経病理学的検査

50. 神経病理学的手法を選択する際は、試験目的を慎重に考慮しなければならない。化学物質の毒性に関する初期試験を行う場合、被験動物および資源の有効利用には、中枢および末梢神経系の精査が可能で、かつ、他臓器の病理学的検査を妨げないような方法の選択が挙げられる（Fix and Garman, 2000）。このため、神経毒性のスクリーニング試験（OECD ガイドライン 407 および 408）に際して、過去に神経毒性影響が示唆されたことが全くない場合には、神経系組織の浸漬固定とパラフィン切片を含む標準的な病理学的検査を試験計画書に盛り込むこと。

51. 組織の浸漬固定およびパラフィン包埋は、迅速かつ広く用いられている神経系の広範なスクリーニング方法である。これらの手法は神経病理学の研究機関で組織診断によく用いられている方法であり、標準毒性試験の試験計画書でも広く用いられる。浸漬固定法は、毒性試験中に自然死した動物から採取した組織の固定に用いられる唯一の手法である。組織および細胞を細部まで際立たせるために一般的に用いられる染色法は、ヘマトキシリン・エオジン染色である。しばしば、脳および神経系組織の染色には、クレシルバイオレットなどによるニッスル染色が用いられる。これらの標準的な方法で処理された組織で観察された病変については、各種特殊染色および免疫組織化学的検査を用いて、さらに調べることが可能である。これらの手法を利用する上での主な欠点は、細胞および細胞内の微細構造の解像度が合成樹脂包埋組織よりも劣ること、また灌流固定を用いた組織と比較して浸漬固定を用いた組織では固定によるアーチファクトが多いことである（Cammermayer, 1960、Garman, 1990）。たとえば、死後の低酸素状態により生じる神経壊死は、神経毒性物質の曝露により生じる神経壊死との鑑別が難しい。

52. OECD 試験ガイドライン 424 でその実施が求められている灌流固定は、浸漬固定よりもはるかに迅速に微細な内部構造にまで固定液を到達させることができる。灌流することで急速に固定されるため、剖検時の組織の自己融解および変形から生じるアーチファクトを有意に減らすことができる。ただし、特に血管内圧が過剰な場合、または不適切な pH および浸透圧にて行った場合には、灌流そのものにより組織のアーチファクトが誘発される可能性がある（Schultz and Karlsson, 1965）。灌流液にはホルムアルデヒド溶液またはグルタールアルデヒド溶液のいずれかを用いる。組織の一次固定にグルタールアルデヒド溶液を用いた場合でも、グルタールアルデヒドは時間がたつにつれて組織の硬化を招き、薄切を困難または不可能にする可能性があるため、保存には一般的にホルムアルデヒド溶液を用いる。また、グルタールアルデヒド固定した組織は、ホルムアルデヒド固定した組織ほど容易には特殊染色に使えない。灌流固定の主な欠点は、時間がかかること、また組織灌流により臓器の重量だけでなく、色、大きさ、質感も変化するために、肉眼病理検査と臓器重量が干渉を受け、結局、標準的な毒性試験計画書に動物を追加する必要が出てくるということである。灌流固定の原則および手法については、いくつかのテキストに詳細が出ている（Zeman and Innes, 1963、Hayat, 1970、Spencer and Schaumburg, 1980、WHO, 1986、Scallet, 1995）。

53. 合成樹脂包埋法も組織のアーチファクトを減らし、細胞および細胞内の細部にいたるまで解像度を上昇させたい場合に用いられる。神経病理では、エポキシモノマーまたはメタクリル酸塩モノマーが最も利用頻度の高い包埋剤である。メタクリル樹脂を用いる利点は、大きな組織ブロックであっても作製と薄切が可能であることである。ただし、エポキシ樹脂の方が同一包埋標本を光学顕微鏡検査、電子顕微鏡検査の両方に利用できるため、利用頻度は高い。合成樹脂包埋法は浸漬固定された組織、灌流固定された組織のいずれにも適用可能である。パラフィン包埋組織からは比較的大きな組織ブロックが作製できるのに対して、合成樹脂包埋組織のブロックは大きな切り出し組織の内部にまでプラスチックモノマーを浸透させること、および大きなブロックを薄切することが困難であることから、通常ははるかに小型である。厚さ 1 μm のプラスチック包埋切片の染色には通常、トルイジンブルーを用いる。パラフィン包埋組織で用いられる特殊染色法の多くは、合成樹脂包埋組織には適用できない。

54. 神経病理学的試験においては、組織の選択が重要である。検査対象となる特定部位については、試験ガイドライン（OECD 407、408、424）に適宜記載されている。脳組織を正中矢状面に定位するとよい。この場合、脳幹および小脳から前方の嗅球まで正確に薄切できれば、多くの重要構造物を代表する組織が 1 枚の切片で得られる。初期の神経毒性試験では、組織の採取に際して神経系の重要な標的部位をもらさないよう広範に採取する。神経病理学的検査を行う病理学者は、ガイドラインで個別に指定されている組織の他に、化学物質の曝露により影響を受ける可能性がある神経部位に関して組織の選択と試験手順の絞り込みが可能になるようなあらゆる情報を認識しておくことが重要である。試験手順の絞り込みに有用な情報の種類としては、化学構造生物活性相関、ヒトの症例研究報告、過去の試験結果、および試験中に認められる徴候などがある。採取後に神経病理学的検査の初期段階で用いなかった神経組織については、初期の標本スライドの観察所見から集中的な組織検査を追加する必要性が示唆されるような場合に備えて、保存しておくことを推奨する。

55. 実験動物を用いて神経病理学的検査を実施する場合、試験結果の解釈を混乱させる可能性もある自然発生的な背景病変を識別できることが重要である。実験動物では、老化および外傷による神経系の背景病変の保有率が少なくない。一般的な背景病変については、McMartin ら（1997）および Mohr ら（1994、1996）による総説を参照されたい。

56. プロトコールおよび神経病理学的検査結果の報告書を作成する際は、曖昧な用語の使用を避け、神経系の病変および部位の記載に用いる用語体系は合意を得ている基準に従う（McMartin et al., 1997）。影響を受けた神経領域における病変の位置確認のほか、細胞種についても確認できた範囲で記載する。神経毒性影響の特性が正確に表現されるよう、病変の説明は

できるだけ具体的に行う。規定の評定尺度を用いて、半定量的評価または病変の等級付けを実施する。また、病変の分布パターンに着目する。化学物質誘発性の変化が生じる場合、通常は両側性・対称性である。

57. 形態的な外観および染色上の変化は当てにならない（Cammermeyer, 1961）。その上、通常の組織学的検査では変性した神経細胞が選択的に染色されることがないため、検査がより曖昧になり時間浪費につながる。Nauta およびその共同研究者ら（Nauta & Gygax, 1954）は、アンモニア銀による染色を抑えて、変性した神経細胞だけを染め分ける方法を初めて示した。その後、追随する研究者ら（de Olmos et al., 1994、Nadler & Evenson, 1983、Gallays et al., 1980）が、何十年にもわたって、Nauta らの方法をより簡単でより信頼性の高いものにする変法を開発した。理想的には de Olmos の方法を用いると変性した神経細胞が完全に染色でき、より簡易な Nadler と Evenson（1983）の方法を用いると細胞体および軸索終末内部の強調染色ができる。

58. 抑制銀染法（suppressed silver methods）には変性した神経細胞のみを選択的に染色できるという利点があるが、要する労力が大きい上にむらがあるため、常に陽性対照および陰性対照の両方を要する。比較的最近、Fluoro-Jade および Fluoro-Jade B という 2 種類の同系の蛍光色素が神経変性の直接的なマーカーとして紹介された（Schmued & Hopkins, 2000）。変性した神経細胞とその樹状突起、軸索および神経終末を簡便、迅速、正確に染色できることが利点である。この方法は抑制銀染法と違い、固定組織にも未固定組織にも、また包埋組織にも未包埋組織にも適用可能であるという点で柔軟性に優れた方法である。観察には、フルオレセインまたは FITC を可視化できるよう設計されているフィルター装置付きの落射蛍光顕微鏡を用いる。

病変の特性をさらに解明するための特殊な神経病理学的検査手法

59. これまで説明してきた方法は、神経病理学的損傷の同定と特徴解析に用いることを目的としている。したがって、試験中に採取したほぼすべての被験動物の組織試料について、これらの方法を適宜用いることになる。病変の特性化を追加して行う必要がある場合には、予備試験で典型的病変が認められた個体、および関連病変を有することが予想される組織に的を絞って検査を行う。そこで、以下で説明する方法は、通常試験で用いた動物の一部、または追跡試験用に特定される小規模群について実施する。

神経線維の解きほぐし標本法

60. 神経線維を解きほぐす手順には、浸漬固定または灌流固定した末梢神経線維を解剖顕微鏡下で分離していく操作が含まれる。神経線維の浸漬固定標本におけるズダンブラック染色法は Schaeppi ら（1984）により紹介されている。また、Dyck & Lais（1970）、および Spencer & Thomas（1970）は灌流固定した神経線維を低粘性エポキシ樹脂に包埋する方法を紹介した。神経線維の解きほぐし標本は、線維全長にわたる軸索および髄鞘病変の観察、節性脱髄の同定および髄鞘再生の確認に特に有用である（Spencer & Schaumburg, 1980、Griffin, 1980）。神経線維を解きほぐす操作は大きな労力を要する上に時間がかかるが、末梢神経線維病変の形態形成の検索には最適である。神経線維の解きほぐし標本を利用する場合、組織学的病変を有するごく一部の動物および適当な対照動物に制限した方がよい。

透過電子顕微鏡法

61. 透過電子顕微鏡法のための中枢および末梢神経系の超薄切片作製法については、Hayat（1970）、Spencer & Schaumburg（1980）、その他の研究者による文献がある。電子顕微鏡法は、光学顕微鏡法と比較して本質的に高解像度であるため、神経毒性物質の標的となる細胞内構造・細胞小器官の特定に用いられる（Hirano & Llena, 1980、Thomas, 1980、Price & Griffin,

1980、WHO, 1986）。超微細構造所見は化学物質の作用機序に関する仮説設定の礎となる。電子顕微鏡法を行うには、広範囲の訓練、経験および資本投資が必要であり（WHO, 1986）、また、同法は神経毒性試験に必要なルチーンの検査ではないが、神経毒性物質の細胞内における影響の特徴解析を行うための強力な手段であるので、神経毒性試験の他の所見または情報から実施する価値があると思われた場合には補足的な試験として考慮に入れること。化学物質の神経毒性試験において、電子顕微鏡検査は超微細構造に対する影響をより正確に特定して、より明確に定義する必要がある試験に限る。電子顕微鏡法に用いる組織試料は小さいため、光学顕微鏡法にて認められた変化を確実に選択して超微細構造検査に供するためには、組織の適切な選択が必要不可欠である。電子顕微鏡法は光学顕微鏡法に対して付加的かつ補助的に用いる手段として考えられている。

形態計測

62. 神経細胞およびその他の細胞の総数、脳内の各領域の容積、構造物の長さ、表面積、神経細胞または神経細胞核の大きさを 3 次元的に定量計測する方法（Stereological methods for quantification）については多くの文献がある（Gundersen et al., 1988 a, b、Korbo et al., 1990, 1993、Coggelshall & Lekan, 1996、Geinisman et al., 1997、Hyman et al., 1998、Peterson, 1999、Schmitz, 1997、Skoglund et al., 1996）。これらの方法は、組織の形態、または組織中で観察された構造物の形態に関する仮定に基づくものではないので、ある種のサンプリングバイアスを回避できる。3 次元的計測法を用いることで、ラット脳における 16%程度の神経細胞の脱落が同定されている（Strange et al., 1991、Korbo et al., 1996）。3 次元的計測法の有用性を最大限引き出すためには、効率的で偏りのないサンプリング手法を要する。特に、病理学的な組織変性に対して選択的な手法を用いる急性影響評価では神経毒性が明らかにならなかった場合、慢性曝露後に形態計測手法を適用することが示唆される。これらの手法は、神経細胞数のみならず、神経細胞における樹状突起やシナプスなどの数や形態といった測定値の、より緩徐な変化に対して感受性が高いため、ある種の神経毒性物質の蓄積作用の指標となるものである（Scallet, 1995）。

免疫組織化学的形態計測

63. 普通染色で観察された所見について、さらに精査する方法として、免疫組織化学的検査法が用いられてきた。可視的な組織損傷を受ける前の過程を実証するために、免疫組織化学的検査の利用が可能な場合もある。免疫組織化学的検査法は神経系の局在変化の発見が可能であることから、生化学的検査法よりも微小病変の検出に優れている。形態学的な染色手法は生化学的分析法および免疫学的分析法を応用したものである。たとえば、酵素法は神経系におけるミトコンドリア毒性発生後のエネルギー産生能の喪失を組織化学的に可視化する目的に利用できる（Nony et al., 1999）。神経毒性発現過程において、免疫組織化学的手法によって存在を示すことが可能なペプチドが神経系には数多く存在する。たとえば、「ヒートショック」プロテインであるユビキチンは、病理学的過程において神経系を含む多くの細胞内で発現する（Mayer and Westbrook, 1987）。また、いくつかの研究室では、数種の神経毒性物質、特にトリメチルスズやトリエチルスズにより誘発される神経系の変化を検出するために、神経細胞性タンパク質やグリア細胞性タンパク質を複数選択し、これらを対象とした免疫組織化学的方法と組織ラジオイムノアッセイ法を用いたテストバッテリー試験を行っている（Brock and O'Callaghan,1987、O'Callaghan and Miller, 1988）。

神経生理学的検査

64. 電気生理学的検査法は神経生理学者および神経科医の間では一般的に用いられている方法である。このため、試験データの解釈に役立つ参考資料は実験的文献および臨床文献から多数得られる（Thompson and Patterson, 1974、Barber, 1980）。電気生理学的検査については、その神経学的な基盤がほとんどがわかっており、ヒトを含む生物種にまたがってすぐにでも応用できる検査が多い。このため、検査結果の解釈およびヒトへの外挿が容易であるが、神経系に対す

る化学物質の影響をより理解するためには複合的アプローチ（行動および神経病理学的評価項目を試験に入れるなど）を推奨する（WHO, 1986、OTA, 1990）。

65. 心拍ダイナミクス（心電図の RR 間隔により測定）が自律神経系の状態を調べる非常に効率的な検査指標であること（Akselrod, 1988）が、ヒトでも（Mestivier et al., 1997、Giuliani et al., 1998）実験動物でも（Japundzic et al., 1990、Dabiré et al., 1998）示されている。疫学的研究でも、神経毒性検査として心拍ダイナミクスの指標の感度は、観察可能なその他の生理学的指標の感度よりも高いことが示された（Murata et al., 1994、Araki et al., 1997、Arden et al., 1999、Liao et al., 1999）。これらの特徴と心拍ダイナミクスの一般的意味が全生物に共通していること、および提案されている測定法が比較的容易であるという理由と相まって、心拍変動（HRV）は神経毒性試験にふさわしい候補となっている。

66. 神経生理学的方法には特殊な装置と訓練を受けたスタッフを要するものもあり、通常、受託試験機関では行えないことが多い。また、電気生理学的検査には動物にとって侵襲的な検査もあるため、そのような検査を毒性試験に取り入れる場合にはサテライト群が必要となる。

脳波検査

67. 脳波（EEG）の周波数、振幅、変動およびパターンは、脳の瞬間的な統合的活動における動力学的過程の指標である（表 5 を参照）。EEG には中枢神経系における活動状態の瞬時変化が反映されることから、覚醒または麻酔状態の指標として用いられることが多い。

68. 表面電極または硬膜外電極による EEG 測定では、主として電極下数 mm にある神経細胞の電気的活動が総和として表現されるため、深部構造の活動は正確に反映されない。深部の電気的活動については、皮質下に電極を埋め込むことで記録可能になる（Dyer et al., 1979a, b、Naasland, 1986）。特定の運動神経路または感覚神経路の統合性については、EEG から情報を得られない。得られたデータの解釈が困難である可能性があり、また細胞レベルの情報を得られないため、毒性メカニズムの詳細を得るために用いることは困難であるかもしれない（Johnson 1980、Arezzo et al., 1985、Seppalainen 1988）。

誘発電位（EP）

69. 外的刺激に対する反応時に脳から記録される電位を誘発電位（EP）という。実験動物で最も一般的に記録される EP の種類について表 5 に示す。

70. 視覚誘発電位（VEP）には光誘発電位（FEP）とパターン誘発電位（PEP）があり、神経系で視覚に関与している領域に対する化学物質の影響評価に用いられる。散光式のフラッシュから形および色の複雑な模様まで、各種刺激を用いて電位を発生させることができる。FEP に異常が認められたら、その解釈の補助試験として網膜電位を測定するとよい（Rebert, 1983）。PEP は模様の知覚能力の指標であり、テレビまたはコンピューター画面上の模様を次々に変化させていくことで誘発される。これらの検査を行う際は、網膜に対して刺激を適切に調節し、画面の前に覚醒動物を保定する必要がある。

71. 聴覚誘発電位は短時間の聴覚刺激（「カチッ」または「ピッ」という音）に対する反応時に皮質または脳幹（脳幹聴覚誘発反応：BAER）から記録され、聴覚系に特異的な機能障害の検出に用いられる。聴覚皮質誘発電位には覚醒動物が必要である。また BAER は、保定した覚醒動物、または麻酔動物の小脳および脳幹上部の皮下に電極を設置することで測定可能である。

72. 体性感覚誘発電位（SEP）は足部、尾部または皮膚の感覚受容器または末梢神経に電気刺激を与えることで誘発され、体性感覚皮質から記録される。小脳からの記録を取ることで、影

響の識別および病変のより詳細な位置特定に役立つ。SEP は他の誘発電位と同様に、毒性反応、体温、低酸素、感覚障害、中枢系の機能障害、ビタミン欠乏、神経路周囲の状態など、様々な因子により変化するため、解釈上の困難さがないわけではない（Rebert, 1983、Albee et al., 1987、Sohmer 1991）。このため、直接的な神経毒性影響を投与により生じた他の結果から識別することが難しい場合がある。

末梢神経伝導速度

73. 神経伝導速度（NCV）は、神経毒性試験で最も多用される電気生理学的検査の 1 つである。電気生理学的検査は in vitro では摘出した神経を用いて（Birren and Wall, 1956）、in vivo では外科的に露出した神経（McDonald, 1963、DeJesus et al., 1978）または無傷動物を用いて行う（表 6）。末梢神経伝導速度を測定する他の方法として H 反射の測定がある（Stanley 1981、Mattsson et al., 1984）。運動神経と感覚神経の NCV は分離測定が可能である。

74. NVC を測定する場合には、評価する神経分節の長さが正確な測定を行うために十分でなければならないため、げっ歯類ではすべての神経で容易に評価を行えるわけではない。算出した伝導速度については、神経周囲の組織または恒温槽内の温度変化による変動を補正することが重要である（Birren and Wall, 1956、DeJong et al., 1966）。

筋電図検査（EMG）

75. 筋電図（EMG）とは横紋筋電位の細胞外記録であり、表面電極から、または針電極を皮膚から筋肉内へ刺入して記録する。EMG の利用はヒトの臨床研究では特定の筋疾患および神経疾患の診断方法として普及しているが（Licht, 1961、Merletti et al., 1992）、実験動物を用いた神経毒性試験ではまれである（表 6）。毒性試験において EMG の利用が限られている理由の 1 つは、EMG 検査では検査対象の筋を段階的に随意に収縮させることが含まれているおり、これが実験動物では難しいためである。

単一細胞活動記録法および ex vivo 法

76. 細胞内微小電極法、イオン導入法、電圧固定法、パッチクランプ法などの電気生理学的手法により、毒性物質の作用機序が細胞レベルで測定可能となった（表 3 を参照）。これらの手法（イオンチャネルを個別に測定するパッチクランプ法など）は Kerkut & Heal（1981）、Atchison（1988）、Baxter & Byrne（1991）などにより広く検証されている。

神経化学的検査

77. 神経系が正常に機能するためには、神経シグナルの伝搬、シナプスにおける伝達およびシナプス可塑性の基盤となる、多くの生化学的機序が適切に働くことが必要である。神経細胞またはグリア細胞の機能的統合性の評価には、神経毒性試験で多くの生化学的または神経化学的評価項目を測定することになる。これらの評価項目の中には、特定の細胞の有無について情報が得られるものもあれば、細胞の統合性または機能に関連するものもある。神経毒性試験におけるこれらの評価項目の意義は、構造変化および行動変化などの他の評価項目との相関性が示唆される場合、または毒性機序との関連性が認められる場合に最もよく分かる。神経系には無数の化学伝達物質があり、複雑であるため、初期試験に神経化学的手法を選択的に用いることには正当性があるが、一定の条件がある。神経化学的検査の長所は、in vivo であれ、in vitro であれ、神経毒性物質の一次標的部位の特定の一助となって作用機序を解明すること、または既知の作用機序もしくは疑われる毒性機序を迅速にスクリーニングすることにある。その一例が、神経毒性物質 MPTP による損傷に反応して生じるヒートショックプロテインの細胞内合成である

（Freyaldenhoven and Ali, 1995、1996、Freyaldenhoven et al., 1997）。

一般生化学検査

78. 神経細胞やグリア細胞が損なわれていないことを示すために、神経組織の一般的な生化学的測定値を利用することができる。そのような一般的な生化学的指標には、細胞毒性、エネルギー関連機能の変化、または細胞成分もしくはタンパク質合成の変化に関する評価項目がある。細胞死に関する評価項目については一般に認められた有害作用に関する基準が存在するが、他の評価項目については基準に問題があるため、神経毒性の他の評価項目と関連づけて使用すべきである。

79. 細胞成分に関する評価項目の例としては、神経組織の脂肪含有量のほとんどを占め、ミエリン塩基性タンパク質など特有のタンパク質を含んでいる髄鞘がある。脂質組成の変化は脱髄を反映している可能性がある；脱髄による変化であれば、ミエリンタンパク質・ミエリン脂質の減少を伴う含水量の増加が認められ、コレステロールエステルの発現を伴うこともある（Norton and Cammer, 1984）。同様に、ミエリン塩基性タンパク質の含有量や合成（Hamano et al., 1996、Conti et al., 1996）の測定は、脳における髄鞘形成を定量化したり、毒性障害に対する反応として生じる合成を定量化するものとなる。ヒートショックプロテインは、神経毒性物質曝露などの各種ストレスに反応して細胞内合成される（Gonzalez et al., 1989）。神経毒性機序がすでに分かっており、関係する生化学的評価項目が決定できれば、その評価項目を直接測定することで高感度で信頼性の高い神経毒性評価が可能である。機序に基づく神経化学的評価項目の例（Abou-Donia and Lapadula, 1990）として、一部のコリンエステラーゼ阻害剤により阻害され、有機リン酸エステル誘発性の遅発性神経疾患と関連するとされる神経障害標的エステラーゼが挙げられる。mRNA およびタンパク質合成の低下（Schotman et al., 1978、 Albrecht, 1984）、エネルギー関連機能の変化（Lai et al., 1980、Husain et al., 1986、Sickles & Goldstein, 1986）、酸素ラジカルの産生増加（LeBel et al., 1990）からも神経毒性影響が示唆される。これらのパラメータの変化は、薬理学的な活性物質（Muller and Martin, 1984）、感覚刺激（Sharp et al., 1981）、運動や感情の変化（Roland et al., 1982; LeDoux et al., 1983）でも生じるので、毒性に関係する変化と識別することが重要である。

特異的細胞マーカー

80. 特異的細胞マーカーの定量化は細胞変性や反応性星状神経膠細胞増殖（gliosis）の特定に役立つが、細胞の機能が損なわれているかどうかの予測性は概して乏しい。特定細胞の定量化法は組織病理学的検査と関連付けて行うのが最良であるが、形態変化の位置を免疫組織化学的に特定するために特異的細胞マーカーに対する抗体を用いてもよい（神経病理学的検査のセクションを参照）。影響を評価するためには、適切なマーカーとその測定に関する時間の選択が極めて重要である。

81. 星状膠細胞の肥大を生じる化学物質（カドミウム、MPTP など）による神経系損傷では、星状膠細胞の主要な中間線維性タンパク質であるグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）の増加が認められており（O'Callaghan, 1991）、GFAP は免疫測定法または免疫組織化学的方法を用いて測定することができる。これらの細胞特異的マーカーの中には、c-fos または fra 関連抗原などのように、神経毒性を示さない薬理学的活性物質によっても変化を生じるものもあるが（Murphy et al., 1991）、他方では変化が一過性で（Sakurai-Yamashita et al., 1991）、臨界時期をはずれて測定すると見落とす可能性があるものもある。

神経伝達

82. 他の神経毒性指標からも分かるように、神経毒性物質は短期間または持続的に作用して、神経伝達または神経細胞のイオンチャネル機能を混乱させる。生合成酵素、取り込み機構、神経伝達物質の貯蔵・放出・分解、受容体機能、情報伝達などが影響を受ける。これによって、神経伝達物質濃度もしくはその代謝産物の変化、または受容体発現量の増加もしくは減少を招く。このような神経化学的作用（特に一過性作用）については薬理学的作用の結果としても生じうるため、その毒性学的解釈には問題がある。このため、神経化学的指標の価値は、行動変化などの他の神経毒性評価項目との相関性が示唆される場合に最も高いものとなる。

83. 本ガイダンス文書では、化学的神経伝達物質チャネルに関する多様で膨大なリストを掲載するよりも、代表的な神経伝達物質であるアセチルコリンを引用して説明した方が、神経毒性評価手段としての神経化学的方法の利用をよく説明できるであろう。毒性物質の神経化学的評価で取り上げられる可能性のある既知の神経伝達物質の最新リストについては、最近の文献（Siegel et al., 1998 など）を参照されたい。

アセチルコリンの例

84. 神経伝達物質または前駆物質の取り込みについては、シナプス *in situ* モデルでも、また調製シナプトソームなどシナプス前神経終末の *ex situ* モデルでも測定可能である（Lai et al., 1980）。神経伝達物質濃度については、微小透析法などの手法を用いて神経組織中の濃度を直接測定することもできる（Takahashi et al., 1998）。

85. 伝達物質の放出は、シナプトソームでも、組織切片でも（Login et al., 1998）、*in situ* でも（Schilstrom et al., 1998）測定可能である。神経伝達物質受容体には、それぞれ特有な薬理学的特徴および神経分布を有する多種の亜型がある。受容体の特徴については、標識した神経伝達物質や神経修飾物質のリガンドを用いて、精製膜画分による in vitro 試験か、薄切片によるオートラジオグラフィーで測定可能である。さらに、ex vivo または in vivo 試験を行うことで、異なる脳領域における受容体の分布および調節についての情報を広範囲に得られる（Nakayama et al., 1997、Flynn et al., 1997）。Scatchard 解析（Scatchard, 1949）などの薬理学的解析法を用いると、そのようなパラメータが解離定数として測定でき、受容体密度の特徴が分かる。受容体レベルで作用する化学物質であれば、一過性の作用も持続的な作用も生じ得る。受容体発現量の増減は多くの神経伝達物質受容体に共通する性質であり、被験化学物質曝露よりも長時間持続することから長期的な影響を招くこともある。（Miao et al., 1998、Pope et al., 1992）

86. 急性および反復曝露は、特に神経系の発達の臨界期を考えた場合、異なる神経化学的作用を生じる（Chanda and Pope, 1996）。二次伝達物質、タンパク質リン酸化、遺伝子活性化など情報伝達経路における後続反応も、神経化学的評価項目として評価可能である（Costa, 1992、Zimmer et al., 1997）ほとんどの伝達物質は、細胞膜の取り込み機構を介して不活化される。アセチルコリンの場合、シナプス後面に局在するアセチルコリンエステラーゼ酵素がアセチルコリンを酢酸とコリンに加水分解する。アセチルコリンエステラーゼ阻害の結果生じるアセチルコリン蓄積は、ムスカリン受容体の発現低下など様々な形で現れ、耐性、認知機能障害、またはコリン様作用薬に対する感受性増強の要因になる作用を示すこともある（Pope et al.,1992）。コリン自体は特定のアセチルコリン受容体の亜型に対して顕著なアゴニスト活性を有す。

87. アセチルコリン（取り込み、受容体結合、不活化）を例に説明した神経毒性作用の標的部位については、他の化学的神経伝達物質にも当てはめて考えることができる。広範囲な研究の対象となってきた他の神経伝達物質にドーパミンがある。黒質線条体ドーパミン作動系は、モノアミン酸化酵素 B により活性毒性物質 1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン（MPP+）に変換される神経毒 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）の影響を受ける。

MPP+は新線条体のドーパミン取り込み系の対象となる（Javitch et al., 1985）；この機序と一致して、ドーパミン取り込み阻害剤およびモノアミン酸化酵素 B 阻害剤はテトラヒドロピリジン系神経毒に対する効率的な保護剤となっている。また、アミノ酸系伝達物質の受容体を第一標的とする神経毒性物質がある（カイニン酸およびドウモイ酸など）ことが分かってきた。神経毒性作用は、興奮性アミノ酸受容体の過剰活性化または過剰抑制により生じ（Olney, 1995、Tilson and Mundy, 1995）、神経病理と広く関連付けられている。

88. 神経細胞膜電位感受性のイオンチャネルも神経毒性における潜在的標的となる。たとえば、ナトリウムチャネルでは、遮断（テトロドトキシン）、活性化（バトラコトキシン）、または電位感度の変化・不活性化（DDT）によって毒性作用が表れる。イオンチャネルについては、標識した毒性物質を用いて結合試験および局在試験を行うとよい。また、イオンチャネル機能の阻害については、電気生理学的検査法が最善である場合が多い。

In vitro 試験

89. 神経毒性評価用の in vitro 試験は急速に発展している研究分野であるため、最新の包括的な総説を参考にする（Harry et al., 1998）。

90. 神経毒性物質の神経化学的評価方法には、in vitro 試験法および分子生物学的試験法が広く利用されている。特定の受容体の亜型については、クローン化受容体を卵母細胞中に一時的に発現させるか、非神経細胞株中に安定的に発現させることが可能であり（Gopalakrishnan et al., 1996）、神経毒性リスクにおいては受容体選択性（Yamamoto et al., 1998）が有効な基準である。神経伝達物質の取り込み輸送体およびイオンチャネルがクローン化され、in vitro 発現用に利用可能である。また、クローン細胞株を用いた細胞培養試験でも神経伝達物質放出を調べることが可能である（Greene & Rein, 1977）。クローン細胞株を用いた試験の他に、ラット胎児の神経組織を用いた初代培養系でも伝達物質機能を調べることが可能である：たとえば、ニコチン刺激による中枢神経細胞からのカテコールアミン放出（Gallardo and Leslie, 1998）、またはコリン作動性刺激による二次伝達物質の代謝に対する神経毒性物質の作用（Kovacs et al., 1995）などである。脳組織の外植片を用いると、移植による除神経の結果、制約が生じるものの、元の組織の構造的および機能的特性をある程度保持した組織複雑性が付加される。

91. 考えられる全神経毒性機序について特化した in vitro 試験を設定し、実施することは可能ではない。しかし、機序に依存しない in vitro 神経毒性モデルが提案され、現在、追加試験が行われている（Atterwill et al., 1994）。特定化合物が生物全体に危険をもたらす程度を過大評価するかまたは過小評価する要因になりうるものは多くある。たとえば、血液脳関門の欠如、in vitro 標本における代謝能の低下または欠如、培地中の化学物質濃度を曝露レベルへ外挿する困難さなどである。記憶、学習および感覚処理など、神経系の特定の統合機能に対する神経毒性物質の軽微な影響は in vitro データからは予測不可能である。

表 1：運動機能の測定に用いる一般的方法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
握力 （OECD 407、408、422、424 を参照）	歪みゲージを用いた前・後肢の筋力	末梢神経疾患を生ずる影響因子で低下（アクリルアミドなど）、筋緊張亢進を生ずる影響因子で上昇（2,4,-D など）	ラットおよびマウスを使用；特に若齢（離乳期前）動物では、後肢の握力の測定は困難であることがある。	動物の訓練は必要ない；重度機能低下動物では把握反応がない。 体重の影響を受ける場合がある。 簡単な装置を要する。	Broxup et al., 1989 Meyer et al., 1979 Moser & MacPhail, 1990 Pryor et al., 1983 Schulze & Boysen, 1991 Tilson & Moser, 1992 Ross, 2001
回転ロッド **（ロータロッド、加速ロッド）**	回転ロッドに供試動物を乗せる。落下する時間、または動物が落下した時点の回転速度を計測。 運動機能および運動協調性の指標となる。	末梢神経疾患（アクリルアミドなど）、歩行失調（エタノールなど）、前庭機能障害（IDPN など）を生ずる影響因子で低下	ラットおよびマウス；離乳期前のラットおよびマウスでも可能。	動物の訓練はほとんど必要ない。 動物が「自発的に」飛び降りることがある。 装置を要する。 標準毒性試験と両立可能。	Alder & Zbinden, 1983 Bogo et al., 1981 Capacio et al., 1992 Kaplan & Murphy, 1972
後肢の着地開脚幅	両足間の距離を測定；垂直方向の支持を失った後の神経学的反応を評価する。	末梢神経疾患を生ずる影響因子で上昇（アクリルアミドなど）	成熟ラット	機能？低下の解釈は困難である。 動物の訓練は必要ない。 必要な装置が最小限。 標準毒性試験と両立可能。	Broxup et al., 1989 Edwards & Parker, 1977 Moser et al., 1988 Moser & MacPhail, 1990 Tilson & Moser, 1992 Ross, 2001

表 1：運動機能の測定に用いる一般的方法（続き）

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
自発運動量 （OECD 407、408、422、424 で採用）	測定チャンバー内での水平または垂直運動、またはその両方を測定	中枢神経系刺激物質（アンフェタミンなど）およびムスカリン受容体拮抗剤（スコポラミンなど）で増加。 中枢神経系抑制物質（クロルプロマジンなど）およびコリンエステラーゼ阻害剤（カルバリルなど）で減少。 物質によっては二相性の用量反応作用、すなわち低用量で増加、用量の増加とともに減少（ペントバルビタール、溶媒など）。	生後 13 日齢以上のラット；それ未満の動物では、成熟ラットと同程度の測定値が得られるよう装置を改良する必要がある。 成熟マウス	自動運動測定装置が必要。 動物の訓練は必要ない。 特に薬理学的に誘発された場合、競合する運動行動（常同行動、すくみ行動など）の影響を受ける。	Archer, 1973 Alder & Zbinden, 1983 Broxup et al., 1989 Crofton et al., 1991 Pryor et al., 1983 Reiter, 1978 Ruppert et al., 1982 Schorring, 1979 Schulze & Boysen, 1991 Maurissen & Mattsson, 1989 Ruppert et al., 1985

表２：感覚機能の測定に用いる一般的方法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
痛覚（ホットプレート試験、テイルフリック試験）	被験動物をホットプレートに乗せて、手足を挙上する、または舐めるまでの潜時を記録。動物が尾部に与えられた機械刺激または熱刺激に反応して尾を動かすまでに要した時間。	鎮痛剤（アヘン剤など）、コリンエステラーゼ阻害剤（カルバリルなど）および一部の神経毒性物質（メチル水銀など）で潜時が増加。	成熟マウスおよび成熟ラット 新生仔ラット	動物の訓練は必要ない。 簡単な装置を要する。 皮膚温または中核体温が結果に影響を及ぼすことがある。 頻回な反復検査には不向きである。 標準毒性試験と両立可能。	Pryor et al., 1983 Walsh et al., 1984a Takagi et al., 1966 McCormack et al., 1998 Hole And Tholsen, 1993
感覚刺激	軽度の刺激性のある溶液（ジンゲロンなど）を少量点眼し、「払いのける」動作の回数とその持続時間を測定する。	カプサイシン アクリルアミド	成熟ラット	動物の訓練は必要ない。 装置はほとんど、または全く必要ない。 標準毒性試験と両立可能。	Miller et al., 1984 Szolcsanyi and Jansco-Gabor, 1975
体性感覚の弁別オペラント課題	刺激の手がかり（光、音、臭気など）の存在に反応するよう動物を訓練する。手がかりの変化に対する動物の識別能力を測定する。	末梢神経機能（アクリルアミドなど）、痛覚（コリンエステラーゼ阻害剤、または重金属のトリエチルスズなど）に影響する化学物質が影響をおよぼす。	成熟ラット、サル	広範な訓練を要する。 反応維持のため、動機付け操作（給餌または給水制限など）が必要となる場合もある。 刺激の制御および反応の記録のための装置を要する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 運動機能に対する化学物質の作用により、感覚の評価が交絡を受けることがある。 サテライト群を要する。 標準毒性試験と両立できない。	Elsner, 1991 Maurissen et al., 1983 Tilson & Burne, 1981 Weiss & Laties, 1961 Wood, 1979、1981

表２：感覚機能の測定に用いる一般的方法（続き）

検査試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
音響驚愕反応およびプレパルス抑制	聴覚刺激に対する反射反応の大きさと潜時を測定。 本試験のプレパルス抑制検査では、反射誘発刺激に先だって短い音刺激を提示する。プレパルス刺激から驚愕反射は抑制を受ける。 プレパルス抑制はこの抑制刺激に対する知覚能力によるため、聴覚閾値を測るためにいろいろな強さまたは周波数のプレパルスが用いられる。	反応性の上昇（ピレトリン、DDTなど）。 聴覚毒性を有する作用因子（有機溶剤およびある種の抗生物質）では、反応性の低下と聴覚閾値の上昇を認める。 中枢神経系を抑制する作用因子（ペントバルビタールなど）では、非特異的な反応性低下が認められることがある。	成熟ラット、マウス	多数回の刺激提示および反応の記録が必要。 同一動物の再検査が可能。 動物の訓練はほとんど必要ない。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 驚愕反応は運動反応であるため、適切な制御なしにその結果を感覚機能障害の解釈に用いた場合には、問題が生じる可能性がある。 プレパルス抑制試験では、運動成分の制御を行う。 プレパルス抑制試験は多様な感覚様相の検査が可能。 試験ガイドラインの標準試験と併用可能だが、日程調整が困難。 驚愕度は体重の影響を受ける場合がある。 通常、驚愕試験では動物を保定するため、神経化学的および内分泌指標に影響が出ることがある。	Chiba and Ando, 1976 Crofton & Reiter, 1984 Crofton & Sheets, 1989 Fechter & Young, 1983 Hoffman & Ison, 1980 Ison & Hoffman, 1983 Marsh et al., 1978 Pryor et al., 1983 Wecker & Ison, 1984 Young and Fechter, 1983 Davis et al., 1982a Davis, 1980 Crofton, 1992

表２：感覚機能の測定に用いる一般的方法（続き）

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
聴覚弁別試験	音の手がかりの存在により、反応が強化されるよう動物を訓練する。実験的に手がかりを変化させた場合の反応の確からしさを測定する。化学物質曝露により手がかりの認知が変化し、反応の確からしさが損なわれる。	聴覚毒性のある作用因子（抗生物質など）により確からしさが低下する。	成熟ラット、モルモット、サル	弁別学習のため、広範な動物の訓練を要する。 反応の動機付けのため、給餌または給水制限が必要となる場合が多い。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 閾値測定が可能。 運動機能に対する化学物質の作用により、感覚の評価が交絡を受けることがある。 サテライト群を要する。 標準毒性試験と両立できない。	Stebbins & Rudy, 1978 Bushnell et al., 1994 Pryor et al., 1987
視覚的弁別課題	視覚的手がかりの存在により、反応が強化されるよう動物を訓練し、手掛かりを実験的に変化させる。 化学物質曝露により手がかりの認知が変化し、反応の確からしさが損なわれる。	向精神薬（幻覚剤など）、感覚に影響を及ぼす毒性物質（メチル水銀など）で低下。	成熟ラット、サル、ハト	弁別学習のため、広範な訓練を要する。 反応の動機付けのため、給餌または給水制限を要する。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 閾値測定が可能。 通常、ラットは視覚障害の評価に適したモデルではない。 運動機能に対する化学物質の作用により、感覚の評価が交絡を受けることがある。 サテライト群を要する。 標準毒性試験と両立できない。	Blough, 1957 Evans et al., 1975 Friedman & Carey, 1978 Merigan et al., 1982 Rice & Gilbert, 1982

表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
馴化試験	不連続刺激（音刺激に対する驚愕反応または定位反応の低下）または複合刺激（測定チャンバー内での自発運動量、立ち上がり回数、覗き込み回数の経時的減少）の反復提示に伴う反応の強さ。または回数の漸減、セッション内でもセッション間でも評価可能。	コリンエステラーゼ阻害剤、有機塩素系殺虫剤（ピレトリンなど）、鉛、飼料中の鉄、殺菌剤	21 日齢のラット、成熟ラット、マウス	動物の訓練は必要ない。 自発運動量または音響驚愕反応測定用機器を要する。 試験条件下の反応性は認知に関係のない要因変数の影響を受ける可能性がある。 データの解釈は馴化が生じた時間の操作的定義に依存する。 ガイドライン試験の自発運動量試験でセッション内馴化が認められる。 セッション間馴化の評価はガイドライン試験では困難。	File and Wardill, 1975 Gerhardt et al., 1993 Overstreet, 1977 Ruppert et al., 1985 File, 1981 Ross, 2001 Pilz and Schnitzler, 1996 Davis, 1982b Buelke-Sam et al., 1985
動物行動学に基づいた不安検査 （高架式十字迷路試験、明暗箱試験、社会的相互作用試験）	被験動物を新奇の嫌悪環境におく（壁のない走路および壁のある走路を 2 本ずつ備えた高架式装置；暗い区画と明るい照明のある区画に区切られた箱；未知のパートナーと箱に入れられる）。 嫌悪的な場所に入る回数と滞在時間、接触回数および時間、ならびに自発運動をそれぞれ測定する。	リンデン、サリン、ソマン、TMPP、パラチオンメチル、ニコチン受容体作動薬、メチル水銀、スコポラミン	ラット、マウス、モルモット	検査は簡単、迅速。訓練の必要はなく、装置も最小限。 絶食は必要ない。 侵害刺激は必要ない。 試験法は感度が双方向性である。	Costall et al., 1988、 File and Hyde, 1978、 Rodgers and Cole, 1994、 Silverman, 1988

表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法（続き）

検査 試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
条件付け味覚嫌悪（CTA）	化学物質曝露と飼料または水分との組み合わせによって生じる飼料または水分摂取の低下。 CTA の消去を測定して学習を評価する。 飼料または水分の味覚回避について閾値測定をすることで、味覚神経細胞の感度評価が可能。	非特異的疾患を引き起こす作用因子（塩化リチウムなど）、精神活性作用因子（アンフェタミン、トリアジメホンなど）、神経毒性物質（トリアルキルスズ類、IDPN、カプサイシンなど）。	主に成熟ラットを使用するが、ほとんどの動物種で可能	反応測定（すなわち、摂取量の変化など）は比較的容易。 装置はほとんど必要ない。 評価する刺激の組み合わせと記憶との間に遅延の導入が可能。 学習試行はほとんど必要ない。被験物質は CTA の無条件刺激（UCS）として用いることができ、他の作用因子（リチウムなど）への CTA の波及について被験物質の影響を評価することも可能である。 CTA は学習測度というよりも、毒性指標として嫌悪度の測定に用いられる。 通常、給餌または給水制限を要する。 サテライト群を要する。 標準毒性試験と両立できない。	MacPhail, 1982 Peele et al., 1990 Peele, 1989 Riley &Tuck, 1985
能動的回避	被験動物を測定チャンバーにおき、陰性強化子に先行する手がかり（光、音など）を与える。動物は、陰性強化子に先行する手がかりに反応すれば、陰性強化子を回避することができる。 手がかり提示後の陰性強化子の回避数および回避潜時を測定することで学習を測定する。	体性感覚機能障害を生じる作用因子（クロルプロマジンなど）、有機塩素系殺虫剤（クロルデコン、DDT、リンデンなど）により、学習基準（正解率 80%など）に達するまでの試行回数が増加。	成熟ラットおよびマウス	反復試行を行うと、動物はセッション中に（集中試行）または数日間（離散試行）で習得する。 負の強化を要する。 強化子に対する感度は被験物質によって変化することがある。 優れた感覚運動的要素を要するため、データの解釈には考慮に入れなければならない。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 学習または習得に対する作用には感受性があるが、動作指標としての感度はまだ確立されていない。 自発運動量を変化させる作用因子が本課題の成績に非特異的作用を与える可能性がある。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	King, 1985 Tilson et al., 1982

表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法（続き）

検査 試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
受動的回避	陰性強化子の提示と手がかりとを組み合わせて、反応しないよう動物に学習させる。陰性強化子を予測させる手がかり提示後、能動的反応によらない（すなわち、陰性強化子を回避するためには反応しないことが必要）陰性強化子の回避数および回避潜時を測定することで学習を測定する。	ムスカリン受容体拮抗剤（スコポラミンなど）、有機塩素系殺虫剤（クロルデコン、トリアルキルスズなど）で反応潜時が減少。	離乳期以降のラットおよびマウス	学習を確認するまでの試行はほとんど必要ない。 記憶の実証には試験期間の追加が必要となる。 負の強化を要する。 強化子に対する感度は作用因子によって変化する。 優れた感覚運動的要素を要する。 本課題の成績は、自発運動量を非特異的に変化させる作用因子の干渉を受ける可能性がある。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 ガイドラインプロトコルに使用可能。	Costa & Murphy, 1982 Mactutus et al., 1982 Peele et al., 1990 Walsh et al., 1982b
空間迷路（モリス水迷路、ビール型水迷路、T 迷路）	陽性強化子（餌など）を獲得するため、または陰性強化子（水から逃れるなど）を回避するために迷路を進むよう動物に学習させる。 強化子獲得までの時間、反応確度、回避までの時間、成功率を測定する。	トリメチルスズ、興奮性アミノ酸神経毒性物質（ドウモイ酸など）、コリンエステラーゼ阻害剤	成熟ラットおよびマウス	課題学習のため、数日間の訓練を要する。 陽性または陰性強化子に対する動機付け操作を要する； 陽性強化子として餌または水を用いる場合は、反応の動機付けのため、給餌または給水制限を要する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 優れた感覚運動的要素を要する。 強化子に対する感度は作用因子によって変化する。 通常、刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 一旦、学習を生じれば、各種記憶様式（作業記憶、参照記憶など）および手がかり弁別能力の測定が可能。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Alessandri et al., 1994a,b Bushnell & Angell, 1992 Chrobak et al., 1987 FitzGerald et al., 1988 McDonald et al., 1988 Milgram et al., 1988 Petrie et al., 1991 Rogers & Tilson, 1990 Walsh and Chrobak, 1987 Walsh et al., 1984b D'Hooge and De Deyn, 2001

表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法（続き）

検査 試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
条件性弁別（単純弁別、見本合わせ）	光または音などの手がかりの存在により、反応が強化されるよう動物を訓練する。 強化された反応の次の機会を導くため、手がかりを提示する。 強化利用率の予測となる反応の不確実性は、頻繁に毎日でも変化するため、セッション内学習が必要。 学習測度を考慮して、異なる刺激ごとに反応するよう動物を訓練することで刺激制御を評価する。 反応率、反応の正確性およびパターンの測定が可能。	鉛、カドミウム、一酸化炭素	ラット、サル、ハト	数日間にわたる広範な訓練を要する反応維持のための動機付け操作を要する。 通常、反応の動機付けのため、給餌または給水制限を要する。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 優れた感覚運動的要素を要する。 刺激方法および強さだけでなく、動機付けおよび運動反応も結果に影響する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Gabriel et al., 1991 Heise & Millar, 1984 McMillan, 1981 Paule et al. 1998 Paule, 2000 Rice & Gilbert, 1990 Rice, 1984、1985 Schrot et al., 1984 Winneke et al., 1977 Zenick et al., 1978
遅延弁別（遅延見本合わせ、遅延交代） 反復獲得	条件付け弁別と似ているが、学習および記憶の測度である。弁別刺激の提示と反応する機会間に遅延時間を設けて動作の確度を測定することで、記憶力を評価する。	トリメチルスズ、向精神薬、コリンエステラーゼ阻害剤	ラット、サル、ハト	条件性弁別に同じ。 陽性強化子として餌または水を用いる場合は、反応の動機付けのため、給餌または給水制限を要する。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Dews, 1971 Katz, 1982 Evans et al, 1975 Paule, 199、1995、2000 Cohn and Paule, 1995 Schrot et al., 1984 Rice, 1984、1985 Eckerman and Bushnell, 1992

表 3：認知機能の測定に用いる一般的方法（続き）

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
瞬目条件付け	音などの刺激を瞬目反応を引き出す別の刺激（エアパフ刺激または軽い電気ショックなど）と組み合わせる。試行を繰り返すと、音により条件付けされた瞬目反応が生じる。 瞬目条件反射を生じるまでの試行回数を測り、条件反応の大きさおよび潜時を測定する。	テトラヒドロカンナビノール、MAMM、抗コリン剤、重金属、エタノール	ラット、サル	眼瞼運動の記録および誘発刺激用の電極を埋設する。 1 日反復試行を行えば、学習が生じる。 動機付け因子は必要ない。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 優れた感覚運動的要素は必要ない。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Stanton & Freeman, 1994

表 4：複合課題の遂行能力の測定に用いる一般的方法

検査 試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
スケジュール制御オペラント行動 （SCOB）	陽性強化子を獲得するために反応（レバー押しなど）するよう動物を訓練する。反応と強化との関係により制御される反応パターンおよび反応率を測定する。	メチル水銀、農薬、アクリルアミド、一酸化炭素、鉛、溶媒、スズ	成熟ラット、マウス、サル	最終的な反応ベースラインを得るまで訓練を要する。 反応維持のための動機付け因子を要する。 陽性強化子として餌または水を用いる場合は、反応の動機付けのため、給餌または給水制限を要する。 優れた感覚運動的要素を要し、データの解釈時には考慮に入れる。 刺激の提示および反応の記録のための装置を要する。 反復投与試験において同一動物の反復検査が可能。 神経系作用因子を調べるための安定した動作基準がある。 サテライト群を要する。	Anger et al., 1979 Armstrong et al., 1963 Barthalmus et al., 1977 Rees and Li, 1994 Cory-Slechta et al., 1981 Dietz et al., 1978 Laties & Evans, 1980 MacPhail & Leander, 1981 Moser & MacPhail, 1990 Paule, 1994、1995、2000 Rice, 1988 Tilson et al., 1980 Weiss et al., 1981 Wenger et al., 1984 Li et al., 1999 Moser et al., 2000

表５：脳の自発性および誘発性電気活動の評価に用いる方法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
自然電位脳波検査（EEG）	脳の最表層部（皮質）の自発性電気活動を測定する。 覚醒および睡眠段階、ならびに発作の機能活動について容易に観察できる。	麻酔薬、トルエン、有機リン酸エステル	ほとんどの実験動物。 通常、げっ歯類では埋め込み電極が用いられる。 覚醒イヌでは、取り外し可能なピン電極を皮下に刺入して測定できる。	直接観察可能なのは大きな変化のみ。 明白には分からない周波数、振幅、変動性、またはパターンの変化に対しては、データの定量分析を要する。 標準毒性試験と両立できない（イヌを除く）。 サテライト群を要する。	Beningnus, 1969、1984 Beningnus & Muller, 1982 Eccles, 1988 Fox et al., 1982 Hisanaga & Takeuchi, 1983 Johnson, 1980 Nagymajtenyi et al., 1988 Takeuchi & Hisanaga, 1977 WHO, 1986
誘発電位（EP）：概要	感覚系に物理的刺激（光、音など）または電気的刺激を与える；脳につながる、または脳内の感覚神経路による統合的な電気的反応を測定する。 神経系のピーク電位の発生機序の知識から損傷部位の確認が可能であり、また目的とする神経病理学的評価に役立つ。	水銀、二硫化炭素	ほとんどの実験動物。 マウスについては、その体格の小ささから技術的な問題がある。	通常、同一個体内および個体間で再現性があり、動物種間でも再現性が保たれる場合も多い。 得られる情報は、EP 一種につき一感覚経路（体性感覚、視覚、または聴覚）についてのみである。 電極を埋め込むと質の良いデータが得られる。感覚刺激パラメータの制御には細心の注意を払わなければならない。 皮質または小脳の EP 測定時は、動物の保定または麻酔は望ましくない。 麻酔を用いる場合は体温を管理する。 誘発電位は体温で変化する。 完全な装置は市販されていない。 特殊専門技術を要するが、受託試験機関では困難である場合が多い。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Boyes, 1994 Dyer, 1985 Dyer et al., 1978 Johnson, 1980 Lund & Simonson, 1993 Mattsson & Albee, 1988 Mattsson et al., 1992 Otto et al., 1988 Rebert, 1983 Rebert et al., 1986

表 5：脳の自発性および誘発性電気活動の評価に用いる方法（続き）

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
視覚誘発電位：光誘発電位（FEP）およびパターン反転誘発電位（PREP）	視覚刺激に対する視覚伝導路（眼から脳まで）の統合反応を記録する。 閃光刺激およびパターン刺激により各種視覚機能が分かる。	トリエチルスズ、一酸化炭素	ラット、サル、イヌ	アルビノ種では網膜および視覚伝導路に異常があるため、光誘発反応は記録可能であるが、視覚誘発電位での利用は制限される。 げっ歯類の老齢アルビノ種では網膜病変の自然発症率が高い。 暗順応レベルおよび瞳孔径が重要となる。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Boyes, 1994 Brancack et al., 1990 Dyer, 1985 Dyer and Annau, 1977 Hudnell et al., 1990 Mattsson & Albee, 1988 Otto et al., 1988 Suzuki et al., 1991
聴覚誘発電位（AEP）脳幹聴覚誘発反応（BAER）	聴覚刺激に対する聴覚伝導路（耳から脳まで）の統合反応を記録する。 聴覚伝導路に沿って発生した電位から損傷部位の確認が可能である。	溶媒（トルエンなど）、スチレン、聴覚毒性を有するアミノグリコシド系抗生物質	ラット、サル、イヌ	高刺激レベル時の記録電位は、感覚の動員によって聴覚閾値を反映していない場合がある。 聴力低下は周波数選択的である場合があるため、高帯域試験または限定周波数試験では作用を見落とす可能性がある。 げっ歯類はヒトよりも高周波数域の音を聞き取るため、特別な刺激装置を要する。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Chen & Chen, 1990 Johnson et al., 1988 Legatt et al., 1988 Pryor et al., 1987 Rebert et al., 1982 Rebert et al., 1991 Shapiro, 1994 Simonson & Lund, 1995 Yano et al., 1992
体性感覚誘発電位（SEP）	機械刺激、固有覚刺激、または温度刺激に対する体性感覚経路（皮膚または筋肉の受容器から脳まで）の統合反応を記録する。 体性感覚経路に沿って発生した電位から損傷部位の確認が可能である。	鉛、二硫化炭素、アクリルアミド	ラット、サル、イヌ	神経伝導速度と同じ装置が使用可能。 被験体間で刺激レベルを等しくなるよう注意を要する。 げっ歯類の遠隔電場電位の測定は困難。 標準毒性試験と両立できない。 サテライト群を要する。	Allison et al., 1991 Arezzo et al., 1979 Dyer, 1987 Mattsson et al., 1989 Rebert & Becker, 1986 Wiederholt & Iraqui-Mandoz, 1977

表 6：受容器および末梢神経の誘発性電気反応の評価に用いる方法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
末梢神経（運動および感覚神経）誘発電位神経伝導速度（NCV）（米国環境保護庁 Health Effects Test Guideline 870.6850 末梢神経機能の項を参照）	電極を用いて末梢神経を電気的に刺激し、神経の伝導速度およびその誘発電位の大きさを電極で測定する。	末梢神経毒性物質で低下（二硫化炭素、ヘキサクロロフェン、メチル水銀、アクリルアミドなど）。	ほとんどの実験動物。マウスについては、その体格の小ささから測定が困難である。	NCV は感覚および運動神経線維の個別測定が可能。 NCV が反映するのは感覚および運動神経線維の最速伝導速度のみ。 誘発電位の大きさの測度は電極およびその設置により変化する。 感覚または運動神経電位の大きさの変動を防ぐため、設置した電極の維持を要する。 運動神経刺激に誘発される筋肉反応の大きさを測定しやすい。 通常、供試動物の前処置時には麻酔下にて行うが、覚醒動物でも実施可能。 NCV は体温により変化するため、体温管理が重要。 標準毒性試験と両立可能。	Arasaki, 1992 Chen et al., 1992 DeJesus et al., 1978 Glatt et al., 1979 Goto & Peters, 1974 Herr and Boyes, 1995 Maxwell & Le Quesne, 1979 Misumi, 1979 Miyoshi & Goto, 1973 US EPA, 1998a
筋電図検査（EMG）	手持ち式の小型電極を使って筋肉に機械的刺激を与え、誘発筋電位（刺入時活動電位）を記録する。	神経筋機能に対する作用因子により放電パターンが変化（マンガン、有機リン酸エステルなど）	ほとんどの実験動物。マウスについては、その体格の小ささから測定が困難である。	非麻酔下で筋の段階的な随意収縮時の電気的活動が測定可能であるヒトと比較して、動物の EMG は不完全である。 針電極の刺入により筋の病理学的検査時に病理組織学的所見として認められる可能性がある。 標準毒性試験と両立可能。	Johnson, 1980 Lukas, 1970 Merletti et al., 1992 Ross & Lawhorn, 1990 Ulrich et al., 1979
網膜電図検査（ERG）	網膜に光刺激を与えた時に生じる電気的活動を電極で記録する。 A 波は光受容体を反映。B 波は双極細胞およびミュラー細胞を反映。	メタノール、明るい光に対する持続的曝露	ほとんどの実験動物。マウスについては、その体格の小ささから測定が困難である。	刺激条件の正確な設定を要する。 暗順応レベルおよび瞳孔径が重要となる。 動物実験における基準は臨床実務を参考にするとよい。 標準毒性試験と両立可能。	Fox & Faber, 1988 Fox et al., 1991 Jones et al., 1994 Nylen et al., 1993 Xu & Karbowski, 1995

表 7：特異的細胞機能に関する試験法

試験法	指標および方法	影響因子	被験動物種	備考	参考文献
単一細胞活動記録法	単一細胞または単一イオンチャネルの自発性電気活動、膜電位、または膜電流を測定する。	興奮毒性を有する化学物質（グルタミン酸塩、ピレスロイド系殺虫剤など）	ほとんどの実験動物。 通常、神経系の一部から採取した分離標本を要する（脳切片、末梢神経など）。	侵襲的手技、または *ex vivo* 組織を要する。 前・後シナプス受容体、特異的イオンチャネルに作用する可能性がある化学物質で特に有効。 下等脊椎動物モデルに利用可能。 通常の受託試験機関にはない特殊装置を要する。 組織は*死亡後*に採取できるが、標準毒性試験と両立できない。	Atchison, 1988 Baxter & Byrne, 1991 Kerkut and Heal, 1981 Ravindranath and Pai, 1991 Sakmann and Neher, 1995 Rudy and Anderson, 1992

参考文献

Abou-Donia, M.B. and Lapadula, D.M. (1990). Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: Type I and Type II. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 405-40.

Akselrod S. (1988). Spectral analysis of fluctuations in cardiovascular parameters: a quantitative tool for the investigation of autonomic control. Trends in Pharmacol. Sci., 9, 6-9.

Albee, R.R., Mattsson, J.L., Yano, B.L., and Chang, L.W. (1987). Neurobehavioural effects of dietary restrictions in rats. Neurotoxicol. Teratol., 9, 203-211.

Albrecht, J. (1984). Enhanced RNA and protein synthesis *in vitro* in astrocytes derived from rats in the early stage of the experimental hepatogenic encephalopathy. Acta Neurol. Scand., 70, 314-316.

Alder, S. and Zbinden, G. (1983). Neurobehavioural tests in single and repeated-dose toxicity studies in small rodents. Arch. Toxicol., 54, 1-23.

Alessandri, B., Fitzgerald, R.E., Schaeppi, U., Krinke, G.J. and Classen, W. (1994a). The use of an unbaited tunnel maze in neurotoxicology: I. Trimethyltin-induced brain lesions. Neurotoxicol., 15, 349-358.

Alessandri, B., Vonau, M-H. and Classen, W. (1994b). The use of an unbaited radial maze in neurotoxicology: II. Sensory inputs, general malaise and locomotor activity. Neurotoxicol., 15, 359-370.

Alleva, E. (1993). Assessment of aggressive behavior in rodents. In: Paradigms for the study of behavior. Conn, P.M. (Ed). Methods in Neurosciences, California, 14, 111-137.

Allison, T., McCarthy, G., Wood, C.C., and Jones, S.J. (1991). Potentials evoked in humans and monkey cerebral cortex by stimulation of the median nerve. A review of scalp and intracranial recordings. Brain, 114(Pt6), 2465-2503.

Anger, W.K., Jordan, M.K. and Lynch, D.W. (1979). Effects of inhalation exposures and intraperitoneal injections of methyl n-amyl ketone on multiple fixed-ratio, fixed-interval response rates in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 49, 407-416.

Araki, S., Yokoyama, K. and Murata, K. (1997). Neurophysiological methods in occupational and environmental health: Methodology and recent findings. Environ. Res., 73, 42-51.

Arasaki, K. (1992). Maximal and minimal motor nerve conduction velocities determined by a collision method: correlation with axonal conduction velocity of type-identified motor units. J. Neurol. Sci., 110(1-2), 131-138.

Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. Anim. Behav., 21, 205-235.