OECD/OCDE

1995/07/27

試験ガイドライン No.418

急性暴露後の有機リン化合物の遅延性神経毒性試験

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 (1995), Test No. 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070905-en.

©OECD(1995)

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

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

1995 年 7 月 27 日理事会にて採択

急性暴露後の有機リン化合物の遅延性神経毒性試験

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学的進歩や実際の評価法の変化を踏まえて定期的に見直している。本改訂ガイドラインは、高用量での作用を決定する神経障害標的エステラーゼ阻害（NTE、従来の神経毒性エステラーゼ）の測定法を含む改訂法を用いており、Day21（投与 21 日後）反復投与する必要がない(1)(2)(3)。脳および脊髄での投与 24～48 時間以内の NTE 阻害は、10～20 日後にみられる臨床的および形態学的遅延性の神経毒性効果と関連する。NTE 試験モデルは男性で遅延性の神経障害を生じることが知られている、全ての有機リンエステルに対して有用であることが判明した(4)。したがって、NTE 阻害の定量データは、行動学的または病理組織学的データでみられるあいまいな結果が遅延性神経毒性を示唆しているかを決定する重要な手段となる(1)(2)(3)(4)。

2. 本改訂ガイドライン 418 は、1992 年 2 月にパリで開かれた体系的な短期（または遅延性）神経毒性に関する特別専門家作業委員会の協議会により得られたものである(5)。1990 年 3 月にワシントン郊外で開かれた神経毒性試験に関する OECD 会議で検討された早期の提案(6)、および提案に対する各国のコメントに基づくものである。

最初に考慮すべき事項

3. 化学物質の毒性を評価するにあたり、他の毒性試験では特定できない種類の神経毒性を生じさせる物質分類について考慮するのは重要である。ある有機リン化合物は遅延性の神経毒性を生じさせるため、本ガイドラインの評価候補として考えられる(7)(8)（補遺を参照）。更に、*in vitro* スクリーニング試験では、遅延性の多発性神経障害を生じる化学物質を特定する方法として用いることができる(9)(10)(11)。しかし、*in vitro* 試験の陰性結果は、被験物質が神経毒性物質ではないことを証明するものではない。

4. 本ガイドラインの評価項目（生化学検査、病理組織学検査、行動学的観察）で陰性結果がみられても、追加の遅延性神経毒性の試験は必要ではない。あいまいな結論や結論のでない結果には、追加の評価が必要である。

5. 用いた定義を補遺に示す。

試験の概要

6. 被験物質は単回経口投与とし、必要であれば急性コリン作動性刺激を避けた雌鶏に投与する。行動異常、運動失調、麻痺について 21 日間観察する。生化学検査、特に NTE は各群から無作為に選択した雌鶏に実施する（通常投与 24 および 48 時間後）。暴露から 21 日後、残りの雌鶏を屠殺し、選択した神経組織について病理組織学的検査を行う（段落 23 を参照）。

試験方法

動物種の選択

7. 試験の動物種としては 8～12 カ月齢の産卵鶏（*Gallus gallus domesticus*）が望ましい。標準的な大きさ、血統、系統の雌鶏を、自由に動くことのできる環境で飼育する。

飼育および給餌条件

8. 自由に歩き回ることができ、歩行状態を容易に観察できるよう、十分な広さのケージまたは囲いを用いる。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。適切な飼料を与え、飲水は自由に摂取させる。

動物の準備

9. ウイルス感染、薬物処理、歩行異常のない健康な若齢雌鶏を、投与群と対照群に無作為に割り付ける。5 日間以上飼育室環境に馴化した後に試験に用いる。

投与経路および投与の準備

10. 被験物質は強制的に、ゼラチンカプセル、またはそれに相当する方法による経口投与とする。液体は原液のままか、コーン油などの適当な溶媒に溶解する。ゼラチンカプセルでの高用量の固体は効果的に吸収されないことがあるため、可能な限り溶解する。非水溶性の溶媒は毒性特性が分かっている物質を用いるか、情報がない場合には試験開始前にあらかじめ調べておく。

手順

動物数および投与群

11. 投与群に加えて、溶媒対照群と陽性対照群を用いる。

12. 投与群と溶媒対照群では 6 羽を生化学検査のために屠殺し（3 羽ずつ 2 回測定）、6 羽は 21 日間の観察期間まで生存させて病理学検査に用いることができるよう、十分な数を確保する。

13. 溶媒対照群は被験物質を投与しないこと以外、全ての点で同様に取り扱う。

14. 陽性対照群は平行して同時に投与するか、最近の背景対照群とする。遅延性の神経毒性が知られている物質を、最低 6 羽の雌鶏に投与する（生化学検査 3 羽、病理学検査 3 羽）。広く用いられている神経毒性物質には、リン酸トリオルソクレシル（TOCP）がある。背景データは定期的に更新することが推奨される。試験実施機関にて基礎項目（系統、飼料、飼育条件など）を変更した場合には、新たな陽性対照データを作成する。

予備投与量選択試験

15. 主試験での投与量を確立するために、適切な数の雌鶏と投与量を用いた予備試験を実施する。主試験の投与量を最大化するのが目的であり、急性試験の結果から 28 日試験の必要性について決定する。主試験では適切な投与量を決定するため、予備試験には致死量が必要な場合がある。ただし、急性コリン作動性刺激による死亡を防ぐために、遅延性の神経毒性を阻害しないことが知られるアトロピンや他の薬剤を使用する。多様な試験方法を被験物質の最大非致死量の確定に用いることができる（ガイドライン 420）。雌鶏の背景データまたは他の毒性学的情報は、投与量決定の参考になる。

限度試験

16. 本試験の手順を用いて投与量 2000 mg/kg 体重/day 以上で毒性がみられない場合、および構造的に関連する物質のデータから毒性が予測されない場合には、更に高用量の試験を実施することは必要ではない。ヒトで更に高用量を用いる必要性が示唆される場合を除き、限度試験を適用する。

主試験の投与量選択

17. 主試験の被験物質の投与量は予備投与量選択試験の結果と上限 2000 mg/kg 体重を考慮し、できるだけ高用量とする。死亡がみられても、21 日での生化学（6 匹）と病理学（6 匹）検査を行うのに十分な数の動物が生存するようにする。急性コリン作動性刺激による死亡を防ぐため、遅延性の神経毒性反応を阻害しないことが知られているアトロピンまたは他の薬剤を用いる。

観察

18. 観察は暴露後ただちに行う。全ての雌鶏を最初の 2 日は数回、注意深く観察し、その後は 21 日間または予定した死亡まで 1 日 1 回以上観察する。毒性徴候の発現時期、種類、程度、行動異常期間についての毒性症状を記録する。運動失調は 4 段階以上の判定基準に基づいて評価し、麻痺を記録する(12)。病理学的検査を行う雌鶏は週 2 回以上ケージの外に出し、はしご登りなどの強制運動を行い、最小毒性作用を観察する。瀕死状態の雌鶏は試験から除外し、剖検のために屠殺する。

体重

19. 全ての雌鶏は被験物質投与直前、その後は週 1 回以上体重を測定する。

血液生化学検査

20. 各投与群と溶媒対照群から 6 羽、陽性対照群から 3 羽（同時に試験している場合）を無作為に選択し、投与後数日以内に屠殺する。脳および腰脊髄を採取し、NTE 活性を測定する(1)(13)(14)(15)。更に、坐骨神経を採取して NTE 活性を測定することは有用である(16)(17)(18)。通常、対照群と各投与群の 3 羽は 24 時間後、3 羽は 48 時間後に屠殺する。また、陽性対照群の 3 羽は 24 時間後に屠殺する。毒性症状から（通常はコリン作動性徴候の発現時間によって評価できる(2)）毒性物質の排泄がきわめて緩徐であると判断される場合には、24 時間から 72 時間までの間に 2 回、3 羽からサンプル組織を採取するのが望ましい。

21. NTE 活性を測定した同じ動物の組織について、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）の活性を測定することが評価の助けとなる(19)(20)。ただし、AChE の自発的な再活性が *in vivo* でみられることがあり、AChE 阻害剤としての物質の可能性を過小評価することになる。

病理学的検査

肉眼的剖検

22. 全動物（予定した死亡および瀕死状態による死亡）に剖検を行い、脳および脊髄を観察する。

病理組織学的検査

23. 観察期間に生存し、生化学検査に用いなかった全動物の神経組織を顕微鏡検査する。灌流して組織を *in situ* で固定する。切片には小脳（中央縦断面）、延髄、脊髄および末梢神経を含める。脊髄切片は上頚部、中胸部および腰仙部から採取する。脛骨神経の遠位部、腓腹筋の分岐部、および坐骨神経を採取する。切片は髄鞘と軸索を適切な手法で染色する。

データおよび報告

データ

24. 動物の個体ごとのデータを示す。更に各投与群について、試験開始時動物数、病変や行動学的・生化学的作用がみられた動物数、病変や作用がみられた種類と程度、病変や作用の種類および程度がみられた動物の割合を総括表として示す。

結果の評価

25. 試験の結果を、発現率、程度、行動学的・生化学的・病理組織学的作用との相関、投与群および対照群でみられた他の作用の点から評価する。

26. 適切で一般的に認められている統計方法で結果を評価する。統計方法は試験計画時点で選択しておく。

試験報告書

27. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 物理的性質（異性化、純度、物理化学的特性を含む）
- 特定データ

溶媒（必要に応じて）
- 水以外の場合、溶媒選択の妥当性

供試動物
- 使用した系統
- 動物数、月齢
- 供給元、飼育条件など
- 試験開始時の個体ごとの体重

試験条件
- 必要に応じて、被験物質の調製方法の詳細、安定性および均一性
- 被験物質投与の詳細
- 飼料および水の質の詳細
- 用量設定根拠
- 溶媒、容量、投与物質の物理学的性状の詳細を含む投与量の詳述
- 拮抗薬の投与の特定および詳細

結果
- 体重データ
- 死亡を含む、群別の毒性反応データ
- 一般状態観察の変化の種類、程度および期間（可逆性の有無を含む）
- 生化学的検査と所見の詳細記述
- 剖検所見
- 全ての病理組織学的検査所見の詳細記述
- 必要に応じて、結果の統計処理方法

結果の考察

結論

参考文献

(1) Johnson, M.K. (1982). The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. E. Hodgson, J.R. Bend, R.M. Philpot, eds., Rev. Biochem. Toxicol., 4, 141-212.

(2) Johnson, M.K. (1983). Delayed neurotoxicity tests of organophosphorus esters: a proposed protocol integrating neuropathy target esterase (NTE) assays with behaviour and histopathology tests to obtain more information more quickly from fewer animals. Proc. Int. Conf. Envir. Haz. Agrochem. in Devel. Countries, Alexandria, Egypt. I, 474-493.

(3) U.K. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. Working Document No. 5/5 in Data Requirements for Approval under the Control of Pesticide Regulations. October, 1986.

(4) IPCS (1990). Principles for the Toxicological Assessment of Pesticide Residues in Food, Environmental Health Criteria 104, 61-63.

(5) OECD (1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity, held in Paris, February 1992.

(6) OECD (1990). Summary Report of the ad hoc Meeting on Neurotoxicity Testing, held outside Washington, March 1990.

(7) Davis, C.S., Richardson, R.J. (1980). Organophosphorus compounds. In: Exper Clin Neurotoxicol, P.S. Spencer, H.H. Schaumberg, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore; 527-544.

(8) Johnson, M.K., (1975). Organophosphorus esters causing delayed neurotoxic effects: Mechanism of action and structure/activity studies. Archiv. Toxicol. 34, 259-288.

(9) Henschler, D., Schmuch, G., Van Aerssen, M. and Schiffmann, D. (1992). The Inhibitory Effect of Neuropathic Organophosphate Esters on Neurite Outgrowth in Cell Cultures: A Basis for Screening for Delayed Neurotoxicity. Toxic. in vitro 6, 327-335.

(10) Veronesi, B., and Ehrich, M. (1993). Using neuroblastoma cell lines to evaluate insecticides neurotoxicity. In Vitro Toxicology 6, 57-65

(11) Ehrich, M., Correl, L. and Veronesi, B. (1994). Neuropathy target esterase inhibition by organophosphorus esters in human neuroblastoma cells. Neurotoxicology 15, 309-314.

(12) Roberts, N.L., Fairley, C., Phillips, C. (1983). Screening acute delayed and subchronic neurotoxicity studies in the hen: Measurements and evaluations of clinical signs following administration of TOCP. Neurotoxicol 4, 263-270.

(13) Johnson, M.K. (1977). Improved Assay of Neurotoxic Esterase for Screening Organophosphates for Delayed Neurotoxicity Potential. Archiv Toxicol., 37, 113-115.

(14) Zech, R., Chemnitius, J.M., (1987). Neurotoxicant sensitive esterase: Enzymology and pathophysiology of organophosphorus ester-induced delayed neuropathy. Prog Neurobiol 29, 193-218.

(15) Kayyali, U.S., Moore, T., Randall, J.C., Richardson, R.J., (1991). Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. J. Anal Toxicol 15, 86-89.

(16) Carrera, V., Diaz-Alejo, Sogorb, J.L., Vicedo, J.L., Vilanova, E. (1994). *In vivo* inhibition by mipafox of soluble and particulate forms of organophosphorus neuropathy target esterase (NTE) in hen sciatic nerve. Toxicology Letters 71, 47-51.

(17) Moretto, A., Capodicasa, E., Peraica, M. and Lotti, M. (1991). Age sensitivity to organophosphate-induced delayed polyneuropathy. Biochemical and toxicological studies in developing chicks. Biochem. Pharmac, 41(10), 1497-1504.

(18) Tormo, N., Gimeno, J.R., Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N. and Vilaanoa, E. (1993). Soluble and particulate organophosphorus neuropathy target esterase in brain and sciatic nerve of the hen, cat, rat and chick. J. Neurochem. 61(6), 2164-2168

(19) Johnson, C.D., Russell, R.L., (1975). A rapid, simple, radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. Anal. Biochem. 64, 229-238.

(20) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Featherstone, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem., Pharmacol. 7, 88-95.

補遺

定義

遅延性神経毒性：運動失調、脊髄および末梢神経の遠位軸索変性症、神経組織の神経障害エステラーゼ阻害およびエイジングが遅延して発現する症候群。

有機リン化合物：有機リン酸／有機ホスホン酸／有機ホスホルアミド酸の未荷電有機リンエステル、チオエステル、無水物、または関連するホスホロチオ酸／ホスホノチオラート／phosphorthioamidic acids の未荷電有機リンエステル、チオエステル、無水物、または本化学分類でみられる遅延性の神経毒性を生じる他の物質。