OECD/OCDE

1995/07/27

試験ガイドライン No.419

有機リン化合物の遅延性神経毒性試験：28 日反復投与試験

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. 419: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070929-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

419

1995 年 7 月 27 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

1995 年 7 月 27 日理事会にて採択

有機リン化合物の遅延性神経毒性試験：28 日反復投与試験

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、被験物質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いる(1)(2)(3)。脳および脊髄での投与 24～48 時間以内の NTE 阻害は、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、遅延性神経毒性や無毒性量を示唆しているかを決定する重要な助けとなる(1)(2)(3)(4)。本改訂ガイドラインは 90 日間暴露を必要とした前版と比較すると 28 日以上の暴露を必要としたものである。この期間は、有機リン化合物の反復暴露による特性を得るのに十分である(4)(5)。多くの農薬では 28 日の期間が 90 日よりも実際の暴露に近いことが多い。

2. 本改訂ガイドライン 419 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(6)。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(7)、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. 本ガイドラインは有機リン化合物の毒性について評価するのに用いる。通常、反復暴露による遅延性神経障害の可能性は、急性試験（ガイドライン 418）の後に評価する。遅延性神経毒性の急性試験および他の試験から得た情報は、反復暴露試験を計画するにあたり有用となる(8)(9)(10)。

4. 本 28 日遅延性神経毒性試験では、限られた期間に反復暴露したことによる健康リスクについて情報を得る。用量反応の情報を提供し、暴露の安全性基準を確立するために用いる無毒性量の推定を示すことができる。

5. 化学物質によっては（可塑剤など）使用方法により、長い暴露期間（90 日）が必要なこともある。しかし、解釈が困難なデータを解決する場合、または化学物質の使用条件を特定することが更に求められる場合には、追加の試験が必要である。

6. 用いた定義を補遺に示す。

試験の概要

7. 被験物質を 1 日 1 回、28 日間雌鶏に経口投与する。動物の行動異常、運動失調および麻痺について最終投与から 14 日まで 1 日 1 回以上観察する。生化学検査、特に NTE(1)(2)(3)は、各群から無作為に選択した雌鶏に実施する（通常最終投与 24 および 48 時間後）。最終投与から 2 週間後、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。

試験方法

動物種の選択

8. 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

9. 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

10. 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

11. 被験物質を毎日、週 7 日間投与する。強制的に、またはゼラチンカプセルによる経口投与が望ましい。液体は原液のままか、コーン油などの適切な溶媒に溶解する。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

12. 各投与群では 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 14 日間の観察期間後に屠殺するため、十分な数を確保する。

13. 通常、3 回以上の投与群と溶媒対照群を用いるが、他のデータ（単回投与試験（ガイドライン 418）*in vivo* スクリーニング試験(10)(11)(12)、構造活性関連物質(8)(9)）から 1000 mg/kg

体重で作用がみられないことが予期される場合には、限度試験を行う。

14. 溶媒対照群と各投与群では生化学検査に 6 羽以上、病理学検査に 6 羽以上を確保する。溶媒対照群は被験物質の投与しないこと以外、全ての点で同様に取り扱う。

予備投与量選択試験

15. 遅延性神経毒性の急性試験（ガイドライン 418）の結果、また被験物質に関する他の毒性データやキネティックデータを考慮して投与量を選択する。最高用量として遅延性の神経毒性をもたらすが、死亡または明らかな苦痛がみられない量を選択する。その後、投与量の降順は用量関連反応を示し、最低用量で無毒性量となるように選択する。

限度試験

16. 本試験の手順を用いて投与量 1000 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で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。

観察

17. 観察は投与後ただちに行う。全ての雌鶏について、投与 28 日間、投与後 14 日間または予定した死亡まで 1 日 1 回以上、注意深く観察する。毒性徴候の発現時期、種類、程度、期間について記録する。観察には行動学的異常を含めるがこれに限らない。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(13)。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

18. 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

19. 各投与群と溶媒対照群から 6 羽を無作為に選択し、最終投与から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)(14)(15)(16)。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(17)(18)(19)。通常、対照群と各投与群の 3 羽は最終投与から 24 時間後、3 羽は 48 時間後に屠殺する。急性試験（ガイドライン 418）または他の試験（トキシコキネティクス）のデータから、最終投与後の屠殺時点で他に望ましい時点があれば実施し、その理由を記載する。

20. 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(20)(21)。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

21. 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

22. 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。まず、対照群と最高用量群の全動物の保存組織について顕微鏡試験を行う。最高用量群で作用のエビデンスがみられれば、中間用量と最低用量の動物について顕微鏡試験を実施する。

データおよび報告

データ

23. 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

24. 試験の結果を発現率、重度、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。

25. 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

26. 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

結果
－体重データ
－死亡を含む、用量別の毒性反応データ
－無毒性量
－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) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria 60.

(6) 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.

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

(8) 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.

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

(10) 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.

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

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

(13) 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.

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

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

(16) 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.

(17) Carrera, V., Diaz-Alejo, N., 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

(18) 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

(19) Tormo, N., Gimeno, J.R., Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N. and Vilanova, 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

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

(21) 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、神経組織の神経毒性標的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、または本分類でみられる場合によっては神経毒性を生じる他の物質。