OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.424

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 (1997), Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071025-en.

©OECD(1997)

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)

1997 年 7 月 21 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

げっ歯類の神経毒性試験

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、科学の進歩に伴い定期的に改訂されている。これは、危険有害性物質の特定および関連データにおける科学的進歩に、効果的に対応するためである。新規および既存の試験ガイドライン更新案は、OECD 加盟各国、OECD 事務局、そして国際的な科学団体が作成する。試験ガイドライン作成の手順に関するガイダンスは、OECD Environment Monograph no. 76 (1)で参照できる。

2. この試験ガイドライン案は 1990 年 3 月にワシントン DC で開催された神経毒性試験に関する OECD 会議で議論され(2)、1992 年 2 月にパリで開催された全身短期及び（遅発性）神経毒性に関する（訳者中：原語は on systemic short-term and (delayed) neurotoxicity となっており、正確な意味は不明。）専門家ワーキンググループで検討された結果である(3)。ガイドライン案は、以上の会議での結果と米国環境保護庁神経毒性ガイドライン(4)(5)に基づくものである。最終案は、カナダのオタワで 1995 年 3 月に開催された OECD 神経毒性ワーキンググループによって作成された(6)。ワーキンググループは、国際コーディネーターからのコメントを OECD 試験ガイドラインプログラムと神経毒性ガイドラインのカナダ案に取り入れた。

3. 本ガイドラインは、成熟動物にて化学物質の神経毒性をさらに特定するか、または確認に欠かせない情報を得るようデザインされている。既存の反復投与毒性試験のガイドラインと合わせて実施するか、または別試験として実施する。「神経毒性試験計画および方法についての OECD ガイダンス文書」(7)を、本試験ガイドラインに基づく試験デザインを補助するために用いることが推奨される。本ガイドラインで通常推奨される方法とした観察や試験手順の修正を考慮する場合に重要である。OECD ガイダンス文書は、特別な環境で用いる他の手順の選択について掲載している。神経毒性発生の評価は、別試験ガイドラインに記載する(8)。

試験の目的

4. 化学物質の毒性特性を評価するには、神経毒性作用を考慮することが重要である。反復投与全身毒性の試験ガイドラインには、神経毒性をスクリーニングする観察が既に含まれている。反復投与全身毒性試験でみられた神経毒性作用について、さらに情報を得るか、また確認するための試験計画に本ガイドラインを用いる。しかし、ある種の化学物質の神経毒性については、既存の反復投与全身毒性試験から得た神経毒性の可能性を考慮せずに、本ガイドラインで評価する方が適切な場合がある。このような例には、以下を含む。

- 反復投与全身毒性試験を除く毒性試験で、神経学徴候や神経病理学的病変がみられる
- 既知の神経毒性物質に関連する構造的関連または他の情報

5. さらに、本ガイドラインが適切な他の例もある。詳細は「神経毒性試験計画および方法についての OECD ガイダンス文書」を参照のこと(7)。

6. 本ガイドラインは、特定の病理組織学的および行動学的神経毒性を確認する必要に応じて、また神経毒性反応を特徴付け、定量できるように作成されている。

7. かつては、神経毒性は、神経の病理学的病変、または、発作、麻痺、振戦などの神経学的機能不全を含む神経障害（原語：neuropathy）と同等とされていた。神経障害は神経毒性の重要な症状の一つであるが、現在では神経系に対する毒性には、神経障害または他の種類の試験では把握されない他の多くの徴候（運動協調性欠損、感覚欠損、学習および記憶障害）があることも明らかとされている。

8. 本神経毒性試験ガイドラインは、げっ歯類成熟動物における主要な神経行動および神経病理学的作用を特定するためにデザインされている。行動影響は、形態学的変化がない場合においても、生体に対する有害な影響を反映するものではあるが、すべての行動変化が神経系に特異的なものではない。したがって、観察された変化は病理組織学検査、血液学的検査、血液生化学検査データ、および他の神経毒性についてのデータと照らし合わせ、評価する。神経毒性反応の特性および程度の情報を得るため本ガイドラインで要求される試験には、電気生理学および生化学検査によって補完される病理組織学的および行動学的検査手順が含まれる(7) (8)(9)(10)。

9. 神経毒性物質は神経系の様々な標的に作用し、様々な作用機序がある。1 系列の試験ですべての物質の神経毒性を完全に評価することはできないので、観察されるかまたは予測される神経毒性の種類に特異的な他の *in vivo* または *in vitro* 試験を利用する必要が生じるであろう。

10. 本試験ガイドラインは、「OECD 神経毒性試験の計画および方法についてのガイダンス文書」(7)で示されたガイダンスとともに用いることで、用量－反応関係をさらに詳細に把握するとともに定量的評価の精度を向上させるべく、無毒性量のより良い推定を目指した試験の計画に使用可能であるし、また有害性が既知または疑われている化学物質の有害性を実証するための試験の計画にも使用可能である。例えば、神経毒性機序を発見し評価するとか、もしくは基本的な神経行動または神経病理学的観察手順により既に得ているデータを補完するように計画できる。そのような研究では、既に利用できるデータがあり、結果の解釈にも必要でないと考えられる場合、本ガイドラインで推奨される標準手順を用いて得られるデータで、既存のデータを再現する必要はない。

11. 神経毒性試験は単独または併用で、以下の情報を提供する。

- 神経系が被験物質により不可逆的、または可逆的に影響を受けるかどうか特定する
- 被験物質暴露に伴う神経系変化の特定、および機序の理解に関与する

- 無毒性量（化学物質の安全性基準を確立するために用いられる）を推定するために用量反応および時間反応関係を決定する

12. 本ガイドラインでは被験物質を経口投与する。他の投与経路（皮膚または吸入）が適切な場合は、手順の修正が必要である。投与経路は、ヒトでの暴露プロファイルや有効な毒性データまたは力学データを考慮して選択する。

13. 定義は付録に示す。

試験の概要

14. 被験物質を、段階的な用量で雌雄動物からなるいくつかの群に投与する。通常反復投与は必要であり、投与期間は 28 日間、亜慢性（90 日）または慢性（1 年以上）である。本ガイドラインで定められた手順は、急性神経毒性試験でも用いることができる。動物の行動異常や神経学的異常を検出するか、特定できるよう試験する。神経毒性物質によって影響を受ける行動範囲は、各観察期間中に評価する。試験終了時には、各雌雄の亜群を *in situ* で灌流し、脳、脊髄、末梢神経の切片を検査する。

15. 神経毒性をスクリーニングするか、または神経毒性作用を特定する単独試験として行う場合、各群の動物で灌流固定をして病理組織学敵検査（表 1）に供しないものには、特定の神経行動学、神経病理学、神経化学、電気生理学的方法を適用し、本ガイドラインで求められる標準試験項目から得られるデータを補強することができる(7)。このような補助手順は、経験観察や予測作用が特定の神経毒性種類もしくは標的を示唆する場合には特に有用である。また、げっ歯類の反復毒性試験ガイドラインで求められる評価に、余剰動物を用いることができる。

16. 試験ガイドライン手順を他の試験と組み込んで行う場合、両試験の観察に十分な動物数を用いる。

試験方法－試験の準備

動物種の選択

17. 試験の動物種としては、ラットが望ましい。他のげっ歯類を用いる場合には、その妥当性を明らかにする。通常用いられる種の健康な若齢動物を用いる。雌は未経産で妊娠していない動物とする。動物は離乳後 6 週齢に達する前に可能な限り早く投与を開始し、9 週齢前までには必ず投与する。しかし、本試験を他の試験との併合試験とする場合には、週齢要件は調整する必要がある。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の 20%を超えないこととする。短期反復投与試験を長期試験の予備試験とする場合、同じ供給元の同じ系統が望ましい。

飼育および給餌条件

18. 動物飼育室の温度は 22±3℃とする。清掃時を除き、相対湿度は 30%以上、70%を超えないよう、50～60％を保つようにする。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。間欠的な騒音は最小限とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要がある。動物は個別飼育するか、または同性の動物を少数匹ずつ飼育する。

動物の準備

19. 健康な若齢動物を、投与群と対照群に無作為に割付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。各動物には固有の識別番号を付す。飼育室環境に 5 日間以上馴化した後に試験に用いる。

投与経路および投与の準備

20. 本ガイドラインは被験物質の経口投与とする。被験物質は強制経口投与とするが、混餌、飲料水、カプセルを用いての投与も可能である。他の投与経路（皮膚または吸入）を用いる場合は手順の修正が必要である。投与経路は、ヒトでの暴露プロファイルや有効な毒性データもしくは力学データを考慮して選択する。投与経路を選択した理由と本ガイドラインの修正箇所を明示する。

21. 必要に応じて、被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁する。可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液を、その後に他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性がわかっていなければならない。さらに、吸収、分布、代謝、保持に影響を与える溶媒、被験物質の毒性を変える特性に影響を与える溶媒、摂餌または飲水、栄養状態に影響を与える溶媒を用いる場合は注意が必要である。

手順

動物数および性

22. 単独の試験として実施する場合、詳細な症状観察および機能検査のために各群と対照群には 20 匹以上（雌 10 匹、雄 10 匹）を用いる。雌雄各 10 匹からそれぞれ 5 匹以上を選択して *in situ* で灌流し、試験終了時に詳細な神経病理学的検査を行う。用量群で神経毒性の徴候が観察された動物数がわずかであれば、灌流する動物数を考慮する。反復毒性試験との併合試験とする場合、両試験の目的を満たすよう十分な数の動物を用いる。試験の様々な組み合わせについて、各群最低動物数を表 1 に示す。中間剖検または投与後毒性作用の回復、維持、遅延を観察する回復群を予定するか、または追加で観察を検討する場合、観察と病理組織検査が有効となるのに必要な動物数まで増加させる。

投与群と対照群

23. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。他のデータから、1000 mg/kg 体重/day の反復投与でも毒性作用が予測されない場合、限度試験を行う。適切なデータがない場合は、用量を決定する目的で用量設定試験を行う。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。溶媒を用いる場合には、用いられる最大量の溶媒を対照群に投与する。

信頼性の保証

24. 試験を行う実施機関は、試験を実施できる能力および手順の精度を示すデータを提示すべきである。そのようなデータは、自律神経徴候、感覚運動反応、握力測定、自発運動量など、観察が推奨されている評価項目における変化を検出し定量すべきものは定量可能なことの証拠となる。異なる神経毒性反応の原因となる化学物質や陽性対照物質として用いる化学物質の情報を参照 8～15 に示す。背景データは、実験手順の基礎部分が同じであれば用いることができる。背景データの定期的な更新が望ましい。手順の精度を保っていることを示す新たなデータは、実施機関による試験または手順の基礎部分が変更になった場合に提出する。

投与量の選択

25. 被験物質および関連物質に関する過去の毒性ならびに力学データを考慮し、投与量を決定する。最高用量は、神経毒性または全身毒性を明らかに生じさせる量とする。その下の各用量段階は投与量と影響との関連性を明らかにし、最低用量で無毒性量（NOAEL）を決定できるように設定する。基本的に神経系に及ぼす主な毒性作用と、全身毒性に関連する作用とが区別できるように投与量を設定する。投与量段階の設定には公比 2～3 が通常最も適しており、用量間隔が非常に大きくなるよりは（公比 10 を超える場合など）、4 群目を追加した方がよいことが多い。

限度試験

26. 本ガイドラインに記載された方法で試験を行なった結果、1000 mg/kg 体重/day 以上の 1 用量において毒性がみられなかった場合、および構造的に関連する化合物のデータから毒性がないと予想される場合には、数段階の用量を用いた完全な試験は不要と考えられ、ヒトの暴露量からより高い経口用量の必要性が示唆されない限り、限度試験が適用される。吸入や経皮など他の投与方法については、多くの場合、被験物質の物理化学的性質が最高投与可能量を決定するであろう。急性経口投与試験では、限度試験は 2000 mg/kg 以上とする。

投与

27. 被験物質を動物に週 7 日間、28 日以上投与する。5 日投与レジメン、またはそれより短い期間は補正する必要がある。強制経口投与する場合は、胃ゾンデまたは適切な挿入カニューレを用いて単回投与する。最高容量は、試験動物の大きさにより 1 回で投与できる量とする。1 回に投与する液体の量は、体重 100 g 当たり 1 mL を超えないようにする。水溶液について

は体重 100 g 当たり 2 mL まで可能とする。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。

28. 飼料または飲水を介して被験物質を投与する場合には、飼料中や飲水中の被験物質量が正常な栄養や水のバランスを乱さないようにすることが重要である。被験物質の混餌投与では、飼料中濃度（ppm）を一定にする方法か、動物の体重当たりの用量を一定にする方法が用いられるが、いずれを用いたかを明らかにしておかなければならない。被験物質の強制経口投与では、毎日ほぼ同じ時刻に投与を行ない、少なくとも週 1 回、投与量を調整して体重当たりの用量を一定に保つ。反復投与試験を長期試験の予備試験とする場合、同じ飼料を用いる。急性試験で単回投与が不可能な場合、24 時間を超えない時間で低い濃度となるよう投与する。

観察

観察および検査の頻度

29. 反復投与試験では、観察期間は投与期間中を満たすものとする。急性試験では、14 日間投与後期間に観察する。投与後期間中に暴露しないサテライト群でも、同様の期間観察をする。

30. 行動異常または神経学的異常を最大限に認められるよう、十分な回数の観察を行う。観察は同時刻が望ましく、投与後、影響が最大になると予想される時間を考慮に入れて観察する。一般状態観察および機能検査の頻度を表 2 にまとめる。過去の試験で得られた動態データまたは他のデータから、観察、試験、もしくは事後観察期間に関して、異なった時点での実施が必要となる場合は、情報が最大限得られるようスケジュールの変更が必要である。スケジュールの変更理由は示されるべきである。

健康状態および病気の有無／生死

31. すべての動物について健康状態を 1 日 1 回以上、病気の有無／生死については 1 日 2 回以上観察する。

詳細な症状観察

32. 最初の投与（個体内比較のため）前 1 回、その後は試験期間に応じた間隔で、観察のために選択したすべての動物について症状を詳細に観察する（表 2 参照）。サテライト回復群の詳細な観察は、回復期間終了時に行う。詳細な症状観察は、ケージの外の観察台にて行うことが望ましい。観察記録は、各測定指標についての判定基準または数値スケールを含むスコアリングシステムを用い、注意深く行なう。使用する判定基準または数値スケールは、試験実施機関が明確に定義すべきである。試験状態の変動を最小限になるよう努力し（投与処理と系統的に関連することがないよう）、実際の投与内容を知らない観察者が観察を行う。

33. きちんと定義された基準（「正常」範囲の定義を含む）を系統的に各動物の観察に適用しつつ、構造化された方法で観察を行うことが望ましい。「正常」とする範囲を明確に記載するべきである。すべての観察された徴候を記録する。可能な場合はできる限り観察された徴候の程度を記録する。症状観察には皮膚、被毛、眼・眼球および粘膜の変化、分泌・排泄、ならびに自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸パターンの異常や口呼吸、排尿または排便に関する異常、尿変色など）を含むがこれに限らない。

34. 姿勢、活動レベル（標準範囲における探索行動の亢進または低下）、運動協調性に関する異常な反応を記録する。歩行の異常（よろめき歩行、失調歩行など）、姿勢（円背位）、取扱操作への反応、置き直しその他の刺激に対する反応、ならびに間代性または強直性の動き、痙攣または振戦、常同運動（過度の身づくろい、くびふり、旋回）、異常行動（咬みつきまたは異常な舐め方、自咬、後ずさり、異常発声）についても記録する。

機能検査

35. 一般状態観察と同様に、機能検査を暴露前 1 回とその後頻回に選択したすべての動物について行う（表 1 参照）。機能検査の頻度は試験期間による（表 2 参照）。表 2 に定めた観察期間に加えて、サテライト回復群の機能検査は剖検時にできるだけ近くで行う。機能検査は種々の刺激に対する感覚運動反応（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激）(11)、(12)、(13)、握力測定(14)、自発運動量(15)が含まれる。自発運動は、運動の増加と減少をともに測定できる自動装置で測定する。他の規定されたシステムを用いるときは定量が可能であり、精度と信頼性を提示する。各装置について、装置間の時間と整合性における信頼性を試験する。さらに詳細な手順は、各参照に記載する。他のデータ（構造活性、疫学データ、他の毒性試験）で神経毒性が示されているならば、さらに感覚機能、運動機能、学習・記憶に関する影響を詳細に試験することを考慮する。特殊試験の詳細な情報および使用を、「神経毒性試験の計画および方法についてのガイダンス文書」(7)に記載する。

36. 例外として、機能検査を重度に妨害する範囲まで毒性が認められた群については、機能検査を省略することができる。機能検査から除外した理由を記載する。

親動物の体重および摂餌量／摂水量

37. 90 日までの試験では、すべての動物について週 1 回以上体重を測定し、週 1 回以上摂餌量を測定する（溶媒経由で投与する場合は飲水量を測定する）。長期試験では、すべての動物について最初の 13 週まで週 1 回以上、その後 4 週ごとに 1 回以上体重を測定する。開始から 13 週までは週 1 回以上摂餌量を測定し（溶媒経由で投与する場合は飲水量）、その後健康状態や体重が特に変化しない限りは、約 3 ヵ月に 1 回摂餌量を測定する。

眼科学的検査

38. 28 日以上の試験では、すべての動物を対象に被験物質投与前と試験終了時に検眼鏡または同等の装置を用いて眼科学的検査をするのが望ましいが、少なくとも対照群と最高用量群に行う。眼球の変化が認められたか、または徴候が認められたすべての動物を検査する。長期試験では、13 週に眼科学的検査を行う。同様の期間および同様の投与量で行った他の試験で眼科学的検査データがあるならば、検査を行う必要はない。

血液学的検査および血液生化学検査

39. 神経毒性試験を反復投与毒性試験との併合試験として行う場合、血液学的検査および血液生化学検査は全身毒性試験のそれぞれのガイドラインに従う。神経行動への影響が最小限となる方法で検体を採取する。

病理組織学的検査

40. 神経病理学検査は、試験の *in vivo* 相での観察を補完し、拡充するよう計画すべきである。5 匹以上／雌雄／群（表 1 および 41 段落参照）の組織を一般的に認められた方法で灌流固定し、*in situ* で固定する（参考文献 9 の 5 章および参考文献 10 の 50 章）。すべての肉眼的変化を記録すること。神経毒性のスクリーニング試験としてまたは神経毒性作用を特定するため、単独試験として実施するときは、ここに記述した手続きによる検査法を補完できるように、特定の神経行動学的(16)(17)、神経病理学的(16)(17)(18)(19)、神経化学的(16)(17)(20)(21)、及び電気生理学的(16)(17)(22)(23)方法に余剰動物を用いても良いし、、病理組織学検査のための動物数を増やすために用いても良い。このような補助手順は、観察結果や予測される作用が神経毒性の種類や標的を示唆する場合には特に有用である(8)(9)。さもなくば、余剰動物を反復毒性試験ガイドラインに記載されている通常の病理組織学的評価に用いることもできる。

41. パラフィン包埋したすべての検体にヘマトキシリン・エオジン（H&E）等の一般的染色手順を施し、病理組織学的検査を行う。末梢神経系に障害の徴候が認められるか、または疑われる場合、末梢神経細胞の樹脂包埋を作製し、観察する。状態により検査部位の追加または特殊染色が必要になることがある。検査部位の追加に関するガイダンスは(9)(10)を参照のこと。特殊な病理組織学的変化を示す特殊染色を(24)に示す。

42. 中枢神経および末梢神経系の代表的な切片について病理組織学的検査を行う（参照 9 の 5 章、参照 10 の 50 章）。前脳、海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経と網膜を含む眼球、脊髄の頚膨大と腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根および後根、近位の坐骨神経、近位の脛骨神経（膝部）、脛骨神経の腓腹筋分岐部を含む。脊髄および末梢神経の切片は、横断面と縦断面の両方を含む。神経の血管系に注意を払う。骨格筋、特に腓

腹筋を検査する。神経毒性により影響を受けることが知られる CNS および PNS の細胞と線維の構造や模様の部分には注意を払う。

43. 毒性による神経病理学的変化のガイダンスは、参照(9)(10)に記載する。組織検体の段階的な検査が望ましく、最初に最高用量群と対照群を比較する。神経病理学的変化が認められなければ、その後の分析は必要ではない。最高用量群で変化が認められたならば、中間用量または最低用量群の組織検体をコード化し、検査する。

44. 定性試験で神経病理学的変化が認められた場合、変化が認められた神経系の全領域に 2 度目の試験を実施する。全群の変化がみられた部位をコード化し、コードを盲検化して検査する。各病変の頻度と程度を記録する。全投与群の全領域を記録し、コードを解除して用量反応関係について統計解析を行う。各病変の重度が異なる検体を記録する。

45. 神経病理学的知見は、行動の観察や測定と合わせた文脈で評価されるべきであるが、同様に被験物質の全身臓器毒性（訳者中：原文は systemic toxicity studies）に関する先行研究及び進行中の研究から得られるその他のデータとともに評価されるべきである。

データおよび報告

データ

46. 各動物のデータを提示する。各試験群および対照群について、試験開始時動物数、試験中に死亡が発見されたり人道的理由により安楽死させた動物数、死亡または安楽死の時期、毒性徴候を示した動物数、観察された毒性徴候の内容（毒性の発現時期、持続期間、程度を含む）、病変がみられた動物数（種類、程度を含む）を、総括表として示す。

47. 試験での所見は、神経行動および神経病理学的作用（補完試験を含む場合には神経化学、電気生理学作用）の頻度、程度、関連および観察されたその他の有害作用の点から評価する。可能であれば、数値結果について、一般に認められた適切な統計解析手法を用いて評価する。統計解析手法は試験計画時点で選択する。

試験報告書

48. 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、純度、物理化学的特性を含む）
- 識別データ

溶媒（必要に応じて）
- 溶媒選択の妥当性

供試動物
– 使用した動物種／系統
– 動物数、週齢、性
– 供給元、飼育条件、飼料など
– 試験開始時の個体ごとの体重

試験条件
– 被験物質溶液／被験物質混合飼料の調製方法の詳細、濃度分析値、調製物の安定性および均一性
– 投与物質の溶媒、容量、物理学的形状の詳細を含む投与物質の仕様
– 被験物質投与の詳細
– 用量設定根拠
– 投与経路および投与期間の根拠
– 必要に応じて、飼料／飲水中の被験物質濃度（ppm）から実際の投与量（mg/kg 体重/day）への換算方法
– 飼料および水の質の詳細

観察および試験手順
– 灌流亜群ごとの各群の評価詳細
– 詳細な状態観察での測定基準および点数スケールを含むスコアリングシステムの詳細
– 種々の刺激に対する感覚運動反応（聴覚刺激、視覚刺激、固有受容器刺激）、握力測定、自発運動量（探索活動を測定する自動装置を含む）、他に用いた手順の機能検査詳細
– 眼科学的試験の詳細、必要ならばベースライン値に基づく血液学的検査および血液生化学検査を含む
– 神経行動、神経病理学、神経化学、電気生理学検査手順の詳細

結果
– 屠殺時の体重を含む体重データおよび体重変化
– 必要な場合、摂水量、食餌量
– 性および用量ごとの毒性反応データ、毒性徴候と死亡を含む。
– 詳細な状態観察での変化の種類、程度および期間（発現時期と継続期間を含む）（可逆性の有無を含む）
– 機能検査結果の詳細な記述
– 剖検所見
– 可能な場合、神経行動、神経病理学、神経化学、電気生理学検査所見の詳細
– 可能な場合、吸収および代謝データ
– 必要な場合、結果の統計処理方法

考察
– 用量反応

– 被験物質の神経毒性についての結論と他の毒性作用の関連
– 無毒性量

結論
– 被験物質の全体的な神経毒性の特性を明確に記載する

参考文献

(1) OECD Environment Monograph No. 76, Guidance Document for the Development of OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris, 1993.

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

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

(4) U.S. Environmental Protection Agency Pesticide Assessment Guidelines (1991). Subdivision F. Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals, Addendum 10. Neurotoxicity. Series 81, 82 and 83. EPA 540/09-91-123. PB 91-154617.

(5) United States Environmental Protection Agency (1992). Health Effects Testing Guidelines Subpart 6 - Neurotoxicity. 40 CFR 798. 6050-6400.

(6) OECD Report of the Meeting of the *ad hoc* OECD Working Group on Neurotoxicity, held in Ottawa, Canada, March 1995.

(7) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(8) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In Preparation.

(9) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.

(10) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

(11) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(12) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(13) Moser V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(14) Meyer O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(15) Crofton K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(16) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(17) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(18) Broxup, B. (1991). Neuropathology as a Screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(19) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl. Toxicol., 18, 343-352.

(20) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(21) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(22) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299-335.

(23) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

(24) Bancroft, J. D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

表 1：神経毒性試験を単独で、または他試験との併合試験として行う各群に必要な最低動物数

	神経毒性試験として			
	単独試験	28日試験との併合試験	90日試験との併合試験	慢性毒性との併合試験
各群の動物数	雌雄各10匹	雌雄各10匹	雌雄各15匹	雌雄各25匹
一般状態観察を含む機能検査に必要な動物数	雌雄各10匹	雌雄各10匹	雌雄各10匹	雌雄各10匹
in situ 灌流と神経病理学的検査に必要な動物数	雌雄各5匹	雌雄各5匹	雌雄各5匹	雌雄各5匹
各ガイドラインに記載された反復投与／亜慢性／慢性毒性観察、血液学的検査、血液生化学検査、病理組織学的検査に必要な動物数		雌雄各5匹	雌雄各10匹*	雌雄各20匹*
必要に応じて追加の観察	雌雄各5匹			

*神経毒性試験の一部として一般状態観察および機能検査のための雌雄各5匹を含む。

表 2：一般状態観察および機能検査の頻度

観察の種類		試験期間			
		急性	28日	90日	慢性
全動物	一般健康状態	毎日	毎日	毎日	毎日
	病気の有無、死亡の有無	1日2回	1日2回	1日2回	1日2回
機能検査の動物	一般状態観察	- 初回投与前 - 投与後8時間以内の最高濃度到達時 - 投与7日と14日	- 初回投与前 - 以降は週1回	- 初回投与前 - 1週または2週目まで週1回 - 以降は月1回	- 初回投与前 - 1ヵ月まで1回 - 以降は3ヵ月に1回
	機能検査	- 初回投与前 - 投与後8時間以内の最高濃度到達時 - 投与7日目と14日目	- 初回投与前 - 4週目までの暴露期間終了時に近い時点	- 初回投与前 - 1週または2週目まで週1回 - 以降は月1回	- 初回投与前 - 1ヵ月まで1回 - 以降は3ヵ月に1回

補遺

定義

有害作用：　生物の生存、生殖、環境への適応能力を減少させるベースラインからの投与に関連する変化。

投与量：　投与した被験物質の量。投与量は重量（g、mg）または体重あたりの重量（mg/kg）で表すか、混餌濃度（ppm）とする。

用量：　投与量、投与頻度および投与期間で構成される一般的な用語である。

神経毒性：　化学物質、生物学的物質、物理学的物質により神経系の機能または構造が有害に変化すること。

神経毒性物質：　神経毒性となる可能性のある化学物質、生物学的物質、物理学的物質。

NOAEL：　無毒性量の略語であり、投与に関連する有害な所見が観察されない最高用量である。