OECD/OCDE

2007/10/16

# 試験ガイドライン No.426

発達神経毒性試験

## 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 (2007), Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264067394-en.

©OECD(2007)

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)

2007 年 10 月 16 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

## 発達神経毒性試験

### はじめに

1. 1995 年 6 月にコペンハーゲンで開かれた生殖発生毒性に関する OECD のワーキンググループにおいて、OECD の当時の生殖発生毒性試験ガイドラインを更新し、そこに取り上げられていない評価指標を含む新しいガイドラインを作成する必要性が協議された(1)。このワーキンググループでは、米国環境保護庁（EPA）のガイドライン（その後改訂(2)）に基づく発達神経毒性試験ガイドラインの作成が推奨された。1996 年 6 月にコペンハーゲンで第 2 回諮問会議が開かれ、事務局に対して新しい発達神経毒性試験ガイドラインの概要に関する助言が行なわれたが、その中には主要な要素、すなわち、動物種の選択、投与期間、試験期間、評価項目および結果の評価基準などに関する詳細が含まれていた。1998 年には米国の神経毒性リスク評価ガイドラインが公表された(3)。2000 年 10 月には OECD の専門家諮問会議と国際生命科学研究機構リスク科学研究所（ILSI Risk Science Institute）のワークショップが連続して開催され、さらに 2005 年、東京において専門家諮問会議が開かれた。これらの会議では当時の試験ガイドラインにおける科学的および技術的な問題点が討議され、本試験ガイドラインの作成にあたってはこれらの会議からの提言(4)(5)(6)(7)が考慮された。本試験ガイドラインの実施、解釈および用語に関するその他の詳細は、ガイダンス文書 No.43「生殖毒性試験およびその評価」(8)ならびに No.20「神経毒性試験」(9)に記載されている。

### 最初に考慮すべき事項

2. 多くの化学物質がヒトおよび他の動物種で発達神経毒性を生じることが知られている(10)(11)(12)(13)。このため、化学物質またはその混合物（「被験物質」）の毒性学的特徴を見極め、評価するには、発達神経毒性の可能性を調べる必要があろう。発達神経毒性試験は、胎児期および生後の早い時期における暴露によって起きる可能性のある、出生児の発達中の神経系に対する機能的および形態的影響に関するデータ（用量反応関係を含む）が得られるようにデザインされている。

3. 発達神経毒性試験は独立した試験としても実施できるが、生殖毒性試験や成熟動物における神経毒性試験（試験ガイドライン 415(14)、416(15)、424(16)）に組み込んで、また出生前発生毒性試験（試験ガイドライン 414(17)）に追加して実施することも可能である。ただし、発達神経毒性試験を別の試験に組み込むか追加して実施する場合には、両種の試験の完全性を保つことが必須である。また、すべての試験は実験動物の研究使用に関する政府および所属機関の適切なガイドラインに従って実施しなければならない（18 など）。

4. 試験の実施前に被験物質に関する入手可能なすべての情報を検討する。その中には物質の同一性と化学構造、物理化学的性質、その物質に関する他のすべての *in vitro* および *in vivo* 毒性試験結果、構造関連物質の毒性データおよび予想される物質の使用法が含まれる。これらの情報はヒトの健康を守る上でその試験が役立つかどうかの懸念を払拭するのに必要であり、また適切な開始用量設定の参考にもなる。

試験の概要

5. 動物に対し、被験物質を妊娠および哺育期間中投与する。母動物の検査は妊娠および哺育中の動物に対する影響を評価するために行なわれるが、比較情報（母動物対出生児）が得られる場合もある。出生児については、各腹から無作為に選んで神経毒性学的評価を行なう。評価では、神経および行動全般の異常を検出するための観察（身体発育分化、初期行動発達、自発運動量、運動および感覚機能、学習および記憶を含む）、ならびに出生後の成長期と成熟後における脳重量測定および神経病理学的検査を行なう。

6. 独立した試験として実施する場合には、各群の余剰動物を用いて、特殊な神経行動学的、神経病理学的、神経化学的または電気生理学的手法による検査を行なってもよい。そうすることによって、本ガイドラインが推奨する検査で得られたデータを補足することができるであろう(16)(19)(20)(21)。経験的な観察結果や予想される影響、またはメカニズム／作用様式から特殊な型の神経毒性が示唆される場合には、これらの補足的手法は特に有用となる。また、これらの補足的手法は児動物だけでなく、母動物について実施してもよい。さらに、*in vivo* 試験の完全性を損なわない限り、*ex vivo* や *in vitro* の手法を用いることもできる。

試験方法 － 試験の準備

動物種の選択

7. 試験の動物種としては、ラットが望ましいが、適切であれば他の動物種を用いてもよい。ただし、本試験ガイドラインに明記されている妊娠および生後の日数は広く用いられているラットの系統に特異的なものであり、他の動物種や一般的でない系統を用いる場合には、相当する日数を設定しなければならない点に留意する。また、他の動物種を用いる場合には、毒性学的、薬物動態学的その他のデータに基づき、その妥当性を示す。出生後の動物に対して種特異的な神経行動学的および神経病理学的検査が行なえることは妥当性の条件として必須である。先に行なわれた試験で懸念が認められた場合には、問題となったその動物種／系統での試験を検討する。各系統のラットは異なる能力特性を示すため、供試動物として選択した系統の受胎能や反応性が適切であることを示す根拠が必要である。他の動物種については、発達神経毒性の検出における信頼性および感受性を示す証拠を提出する。

飼育および給餌条件

8. 動物飼育室の温度は 22±3℃とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。なお、機能および行動関連項目の評価を暗期、すなわち、動物が通常活動的である期間に（赤色光の下で）行なうため、交配前から試験期間を通じて明暗周期を逆転させてもよい(22)。明暗周期変更の際には、動物が新しい周期に慣れるように適当な馴化期間を置く。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。飼料の種類および水について報告書に記載する。また、両者について汚染物質の分析を行なう。

9. 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。交配にはその目的に合ったケージを用いる。交尾確認後または妊娠 15 日以内に、交配した雌を分娩用ケージに個別に収容する。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。分娩が近づいたら、確かな品質の適切な巣材を与える。妊娠中の不適切な取り扱い

やストレスにより、出生前損失や胎児期および生後の発育の変化など、有害な結果を生じる場合のあることが知られている。このため、投与とは無関係の因子による胎児の損失が起きないように、妊娠中は動物を注意深く取り扱い、大きな音など、外因によるストレスを防ぐ。

動物の準備

10. 健康な動物を飼育室環境に馴化させた後に用いる。本試験を別試験に組み込んで行なう場合（3段落参照）を除き、動物は以前に実験に供されたことのないものとする。供試動物については、動物種、系統、供給元、性、体重および週齢を明らかにする。各動物には固有の識別番号を付し、それを表示する。現実的に可能な限り、全試験群の動物の体重および週齢を均一にする。体重はその動物種および系統の正常範囲内とする。各用量群とも未経産の若齢成熟動物を用いる。兄妹交配をしないように特に注意する。膣栓または精子が認められた日を妊娠0日とする。供給元から交配日指定妊娠動物を購入する場合には、適切な馴化期間（2～3 日）を設ける。交配した雌は偏りが生じない方法で対照群と投与群に割付け、可能な限り群間で均一に分布するようにする（例えば、体重に基づくものなど、層別無作為法により、全群に均一に分布させることが推奨される）。また、同じ雄で受精させた雌は全群に等しく割付ける。

手順

動物数および性

11. 神経毒性の評価に適切な数の出生児が確実に得られるように、各投与群および対照群には十分な数の妊娠動物を含め、これらを被験物質に暴露する。各用量とも合計20腹を得ることが望ましい。各群の腹数を必要な数とするため、実験を反復したり、投与の時期をずらしたりすることも許容できるが、適切な統計学的モデルによって実施時期による影響を説明できるようにすること（訳者注：通常影響がないことを統計学的に示すことと考えられるが、影響があっても統計学的手法により補正可能な場合も含むと考えることも可能）が求められる。

12. 生後4日（出生日を生後0日とする）またはそれ以前に、余分な児動物を無作為に選んで取り除き、同腹児数がすべて等しくなるように調整する(23)。ただし、その数は、その系統のラットにおける平均同腹児数（8～12匹）を超えないこととする。同腹児中の雌雄の数は可能な限り等しくする。児動物の選択的除外（体重に基づく除外など）は適切でない。同腹児数の標準化（間引き）後、機能的評価項目の検査前に人道的で適切な児動物用の識別方法（24など）を用い、離乳前および離乳後検査に予定されている動物の個体識別を行なう。

機能および行動試験、脳重量測定ならびに神経病理学的検査への動物の割付け

13. 本ガイドラインでは、胎児期および哺乳期に暴露された動物を機能および行動試験、性成熟検査、脳重量測定ならびに神経病理学的検査に割付ける方法に関し、様々な選択肢を認めている(25)。また、本来必要とされている検査の完全性を損なわない限り、必要に応じて神経行動機能（社会的行動など）や神経化学、また神経病理学に関するその他の検査を追加することも可能である。

14. 各用量群から児動物を選び、生後4日以降に行なわれる各評価項目の検査に割付ける。児動物の選抜は、可能な限り、各群各腹の雌雄がすべての検査に均等に含まれるように行なう。自発運動量検査では、同じ雌雄について離乳前の各日齢（35 段落参照）の検査を行なう。他の種々の行動試験では、割付ける雌雄の組合せは同じでも異なっていてもよい。離乳児

と成熟動物の認知機能試験については週齢と訓練の影響で測定結果が複雑にならないように、別々の動物を割付ける必要があるかもしれない(26)(27)。検査用に選抜されなかった児動物は、離乳時（生後 21 日）に人道的方法で排除する。児動物の割付けに関する変更はすべて報告書に記載する。検査結果の統計解析は母動物ごとに行ない、児動物ごとには行なわない。

15. 離乳前および離乳後の検査、認知機能試験、病理学的検査などへの児動物の割付けには様々な方法がある（一般的なデザインについては図 1 を、割付け例は補遺 1 を参照のこと）。離乳前および離乳後の検査における各用量群の推奨最低動物数は、以下の通りである。

| | |
|---|---|
| 一般状態の観察および体重 | 全動物 |
| 詳細な状態の観察 | 20 匹／性（1 腹につき雌雄各 1 匹） |
| 脳重量（固定重量）、生後 11～22 日 | 10 匹／性（1 腹につき 1 匹） |
| 脳重量（新鮮重量）、生後約 70 日 | 10 匹／性（1 腹につき 1 匹） |
| 神経病理学的検査（浸漬または灌流固定）、生後 11～22 日 | 10 匹／性（1 腹につき 1 匹） |
| 神経病理学的検査（灌流固定）、生後約 70 日 | 10 匹／性（1 腹につき 1 匹） |
| 性成熟 | 20 匹／性（1 腹につき雌雄各 1 匹） |
| 他の発達指標（任意） | 全動物 |
| 初期行動発達 | 20 匹／性（1 腹につき雌雄各 1 匹） |
| 自発運動量 | 20 匹／性（1 腹につき雌雄各 1 匹） |
| 運動および感覚機能 | 20 匹／性（1 腹につき雌雄各 1 匹） |
| 学習および記憶 | 10 匹／性[a]（1 腹につき 1 匹） |

a） 認知機能試験の感度によっては、さらに多くの動物（1 腹につき雌雄各 1 匹など）について検査することを検討する（動物の割付けについては付録 1 を参照）（検査動物数に関する詳細はガイダンス文書 43(8)に記載されている）。

**投与量**

16. 少なくとも 3 段階の用量および同時対照を設ける。用量は、段階的な毒性が生じるように間隔をあけて設定する。被験物質の物理化学的性質や生物学的影響による制限がない限り、最高用量は何らかの母動物毒性（症状、体重増加抑制（10%以下）、標的器官における用量制限毒性など）を生じさせる用量とする。最高用量は 1000 mg/kg 体重/day を限度としてよいが、例外もあり、例えばヒトで予想される暴露量からより高い用量の必要性が示唆される場合がこれに該当する。また予備試験や用量設定試験を行なって、軽度の母動物毒性を生じるような最高用量を設定する方法もある。標準的な発生毒性試験や予備試験において被験物質が発生毒性を示した場合には、最高用量は神経毒性の適切な評価ができなくなるような出生児に対する過度の毒性（胎児期や新生児期の死亡または奇形）を生じさせない最大量とする。最低用量は、母動物毒性および発生毒性（神経毒性を含む）のいずれも生じない用量とする。最高用量から最低用量に至る各用量段階は投与による反応を明らかにし、無毒性量（NOAEL）か、またはベンチマーク用量を決定できるような検出限界に近い用量を得られるように設定する。用量段階の設定には公比 2～4 が通常最も適しており、用量間隔を非常に大きくとるよりも（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。

17. 用量段階の設定では、その時点で得られているあらゆる毒性データに加え、被験物質やその関連物質の代謝およびトキシコキネティクスに関するその他の情報もすべて考慮に入れる。これらの情報は投与法の適切さを示す根拠ともなる。暴露量および薬物動態に関する

情報によっては児動物に対する直接投与も考慮する(28)(29)。ただし、直接投与試験を行なう場合には、その利点と難点を事前に注意深く検討する(30)。

18. 同時対照群は擬似投与（シャム）対照群または溶媒対照群（被験物質投与に溶媒を用いる場合）とする。通常はすべての動物に体重当たり同容量の被験物質または溶媒を投与する。投与しやすくするために溶媒その他の添加物を用いる場合には、被験物質の吸収、分布、代謝、滞留に対する影響、被験物質の化学的性質に対する影響（その毒性学的特性を変える可能性のあるもの）、および動物の摂餌量や摂水量または栄養状態に対する影響といった特性について考慮する。溶媒は、試験の解釈を妨げる恐れのある影響を引き起こしたり、神経行動学的な毒性や生殖または発生に対する影響を示したりするものであってはならない。新規の溶媒物質については、溶媒対照群に加えて擬似投与対照群を設ける。対照群の動物は投与群の動物と同様に取り扱う。

<u>投与</u>

19. 被験物質および溶媒の投与は、供試動物の代謝および分布に関する情報を考慮しながら、ヒトで最も起こり得る暴露経路によって行なう。投与経路は一般に経口（強制、混餌、飲水など）であるが、被験物質の性状によって、また、既知の、もしくは予想されるヒトの暴露経路によっては他の経路（経皮、吸入など）を用いてもよい（詳細はガイダンス文書43(8)に記載）。選択した投与経路についてはその妥当性を明らかにする。被験物質の投与は毎日ほぼ同じ時刻に行なう。

20. 各動物に対する投与量は、通常、その個体の最新の体重値に基づいて決められる。ただし、妊娠末期の投与量調整では注意を要する。投与群の母動物で過度の毒性が認められた場合には、その動物を安楽死させる。

21. 児動物が出生前および出生後の神経発達期を通じて被験物質に暴露されるように交配した雌に対し、最低でも着床時（妊娠 6 日）から哺育期間（生後 21 日まで）を通じて毎日、被験物質または溶媒を投与する。ヒトの暴露により近似した試験デザインであることを示すことができるならば、投与開始時の日齢、投与期間および投与頻度を調整してもよい。他の動物種については、脳の初期発達（ヒトの出生前および出生後初期における脳の発達に相当）の期間全体を通じて確実に暴露されるように、投与期間を調整する。妊娠初日（妊娠 0 日）に投与を開始してもよいが、被験物質によって着床前胚損失が生じる可能性を考慮する。妊娠 6 日に投与を開始すればこの危険性はなくなるが、妊娠 0～6 日の発生段階の間は投与されないことになる。しかし、交配日指定妊娠動物を購入する場合には妊娠 0 日からの投与は現実的でなく、妊娠 6 日が投与開始日としては妥当であろう。投与スケジュールは、被験物質の作用、それまでの経験および作業上の手間などに関する情報に基づいて決定する。場合によっては、離乳後までの投与延長も考えられる。分娩を完了していない動物については、分娩日の投与を行なわない。一般に、児動物は母乳を通じて暴露されると考えられるが、出生児に対する継続的な暴露を示す証拠がみられない場合には、児動物に対する直接投与を考慮する。継続的な暴露の証拠は薬物動態データ、児動物における毒性、バイオマーカーの変化などから得られる(28)。

観察

母動物の観察

22. すべての母動物について少なくとも 1 日 1 回、病気の有無および生死を含む健康状態を注意深く観察する。

23. 投与および観察期間中、各群 10 匹以上の動物について、より詳細な状態の観察を定期的に（少なくとも妊娠期の投与期間中 2 回および哺育期の投与期間中 2 回）行なう。観察は飼育ケージの外において、訓練された検査担当者が盲検で行なう。また、動物のストレスと観察者による偏りを最小にし、異なる観察者間でも一定の結果が得られるような標準化された方法を用いる。可能であれば、一つの試験の観察は同じ検査担当者が行なうことが望ましい。

24. 観察された症状を記録する。程度付けできるものについては程度も記録する。皮膚、被毛、眼・眼球および粘膜の変化、分泌物の有無、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徴候など）を観察するが、それに限るものではない。

25. 体位、運動活性（標準的な観察台における探索行動の低下または亢進）および運動協調性に関する異常反応もすべて記録する。歩行の異常（よろめき歩行、歩行失調など）、姿勢（円背位など）、および動物の取扱い操作、置き直しその他の環境刺激に対する反応、ならびに間代性または強直性の動き、痙攣、振戦、常同行動（身づくろいの変化、くびふり、旋回など）、異常行動（咬みつきまたは過剰な舐め方、自咬、後ずさり、異常発声など）および攻撃性を記録する。

26. 毒性徴候について、発現日、発現時刻、程度および持続期間を含めて記録する。

27. 動物の体重は試験期間を通じて少なくとも週 1 回、分娩日またはその前後、および生後 21 日（離乳時）の投与時に測定する。強制経口投与試験では、少なくとも週 2 回体重を測定する。必要に応じて、各体重測定時に投与量を調整する。また、妊娠および哺育期間中、少なくとも週 1 回、摂餌量を測定する。飲水投与を行なう場合には、摂水量を少なくとも週 1 回測定する。

児動物の観察

28. すべての児動物について少なくとも 1 日 1 回、毒性徴候、ならびに病気の有無および生死を注意深く観察する。

29. 投与および観察期間中、1 腹につき少なくとも雌雄各 1 匹の児動物について、より詳細な状態の観察を行なう。観察は訓練された検査担当者が盲検で行なう。また、偏りを最小にし、異なる観察者間でも一定の結果が得られるような標準化された方法を用いる。可能であれば、観察は同じ検査担当者が行なうことが望ましい。観察対象の発達段階に応じて、少なくとも 24 および 25 段落に示した評価項目について観察する。

30. 児動物のすべての毒性徴候について、発現日、発現時刻、程度および持続期間を含めて記録する。

身体及び発達指標

31. 離乳前の発達指標の変化（耳介の開展、眼瞼開裂、切歯萌出など）は体重と密接に関連している(30)(31)。したがって、身体的発達の指標としては体重が最適かもしれない。このため、体重以外の発達指標の検査は、それによって新たな情報がもたらされることが事前に確認されている場合のみ推奨される。発達指標の検査時期を表 1 に示す。予想される影響および初回の検査結果によっては、検査時点を追加したり、他の発達段階に検査を行なったりすることが望ましい場合がある。

32. 身体的発達を評価する際には、出生後の日齢ではなく、交尾後の日齢を用いることが望ましい(33)。なお、離乳日に児動物を検査する場合には、離乳に伴うストレスで複雑な影響が出ないように、実際の離乳前に検査を実施することが推奨される。また、離乳後 2 日間は児動物の検査を行なわない。

**表 1： 身体的発達指標および機能／行動評価項目の検査時期（a）**

| 時期 / 評価項目 | 離乳前（b） | 成長期（b） | 若齢成熟動物（b） |
|---|---|---|---|
| **身体的発達指標** | | | |
| 体重および状態観察 | 週 1 回（c） | 2 週に 1 回以上 | 2 週に 1 回以上 |
| 脳重量 | 生後 22 日（d） | | 試験終了時 |
| 神経病理学 | 生後 22 日（d） | | 試験終了時 |
| 性成熟 | -- | 適当な時期 | -- |
| 他の発達指標 | 適当な時期 | -- | -- |
| **機能／行動評価項目** | | | |
| 初期行動発達 | 2 回以上 | | |
| 自発運動量（慣れを含む） | 1～3 回（f） | -- | 1 回 |
| 運動および感覚機能 | -- | 1 回 | 1 回 |
| 学習および記憶 | -- | 1 回 | 1 回 |

a） この表は検査を行なう最低回数を示したものである。予想される影響および初回の検査結果によっては、検査時点を追加したり（より日齢の進んだ動物など）、他の発達段階に検査を行なったりすることが望ましい場合がある。

b） 離乳後 2 日間は児動物の検査を行なわないことが推奨される（32 段落参照）。成長期の推奨検査日齢は、学習および記憶 = 生後 25 ± 2 日、運動および感覚機能 = 生後 25 ± 2 日である。若齢成熟動物の推奨検査日齢は、生後 60～70 日である。

c) 児動物に直接投与する場合には、急激な体重増加を示す時期に適切な用量調整を行なうため、体重を少なくとも週 2 回測定する。
d) 必要に応じて、脳重量測定および神経病理学的検査をやや早い時期（生後 11 日など）に行なってもよい（39 段落参照）。
e) 必要に応じて、体重以外に追加した発達指標（眼瞼開裂など）について記録する（31 段落参照）。
f) 35 段落参照。

33. 生存児動物について、匹数を数え、肛門・生殖結節間距離の目視または測定などにより性別を確認する(34)(35)。また、各児動物の体重を出生時またはその直後、哺育期間中少なくとも週 1 回、およびその後は少なくとも 2 週に 1 回、測定する。性成熟を検査する場合には、1 腹につき少なくとも雌雄各 1 匹の児動物について、膣開口時(36)または包皮分離時(37)の日齢および体重を調べる。

初期行動発達

34. 1 腹につき少なくとも雌雄各 1 匹の児動物について、適切な時期に一部の行動の発達を検査する。検査では、全検査日の全評価行動について同じ児動物を用いる。その行動の正常な発達または投与による発達の変化が確認できる期間にわたり、均一な間隔で検査を行なう(38)。発達の評価が可能な行動の例としては、正向反射、背地走性および自発運動量が挙げられる(38)(39)(40)。

自発運動量

35. 離乳前および成熟後に自発運動量を測定する(41)(42)(43)(44)(45)。離乳時の測定については 32 段落を参照のこと。測定時間は、無処置対照動物が慣れを示すのに十分な長さとする。初期行動発達の評価には自発運動量を用いることが強く推奨される。初期行動発達検査として自発運動量を測定する場合には、離乳前の全測定時に同じ動物を用いる。測定は、時間内の慣れの発達を十分評価できる頻度で行なう(44)。そのためには、離乳日を含め、離乳前に 3 回以上行なわなければならない可能性がある（生後 13、17、21 日など）。また、試験終了前に、成熟後（生後 60～70 日など）の同じ動物または同腹の動物について測定を行なう。必要に応じて、さらに別の日に測定を行なってもよい。自発運動量の測定は、運動量の増加および減少の双方を検出できるような運動量自動記録装置を用いて行なう（すなわち、その装置によって測定されたベースラインの運動量は、減少を検出できないほど低くてはならず、増加を検出できないほど高くてもいけない）。各装置については、装置間および測定日間で可能な限り一定の動作が得られるように、標準的な手順に従って確認する。それぞれの群は各装置に対して可能な限り均一に割付ける。各動物については個別に測定を行なう。運動量が概日リズムによって紛らわしい影響を受けることを避けるため、各群の測定時刻には偏りがないようにする。測定条件の差を最小にし、また、その差が投与に体系的に関連づけられることがないように留意する。自発運動量を含め、行動関連項目の多くに影響を与えかねない因子としては、音量、測定用ケージの大きさと形、温度、相対湿度、照明条件、臭い、飼育ケージを用いるか、新しい測定用ケージを用いるか、および周囲のざわつきなどが挙げられる。

運動および感覚機能

36. 運動および感覚機能の詳細な検査を、少なくとも成長期に 1 回、若齢成熟動物（生後 60～70 日）について 1 回行なう。離乳時の検査については 32 段落を参照のこと。感覚様相（体性感覚、平衡感覚など）および運動機能（筋力、協調性など）を適切かつ量的に示すことができるように十分な検査を行なう。運動および感覚機能検査の一部の例としては、伸筋

突伸反応(46)、立ち直り反射(47)(48)、聴覚驚愕馴化(40)(49)(50)(51)(52)(53)(54)、および誘発電位(55)などがある。

学習および記憶

37. 連合学習および記憶の試験を、離乳後（25±2 日など）および若齢成熟動物（生後 60 日以上）について行なう。離乳時の試験については 32 段落を参照のこと。これら二つの発達段階で用いる試験は、同一であっても異なっていてもよい。離乳児および成熟動物における学習および記憶の試験の選択には、ある程度の柔軟性が許されるが、以下の二つの基準を満たすようにデザインされた試験であることとする。第一に、学習の評価は数回の反復学習試行における変化として、また、1 回の試行しか行なわない試験では、訓練経験と連合していない影響を制御した条件と比較して行なう。第二に、試験には原学習（獲得）に加えて記憶（短期および長期）に関する何らかの検査を含める。ただし、この記憶の検査結果は、同じ試験で得られた獲得に関する検査結果と併せて示す必要がある。学習および記憶の試験で被験物質の影響が明らかになった場合には、感覚機能、動機付け、または運動能力の変化に基づく別の解釈の可能性を除外するため、追加試験を行なうことを検討する。また、上記の二つの基準に加え、文献で情報が得られるならば、被験物質と同じ種類の化合物に対して感度が証明されている試験を用いることが推奨される。そのような情報がない場合、上記の基準を満たすようにできる試験の例としては、受動的回避(43)(56)(57)、遅延位置見本合わせ（成熟ラット：58、幼若ラット：59）、匂い条件付け(43)(60)、モーリス水迷路(61)(62)(63)、ビール型またはシンシナチ型迷路(64)(65)、放射状迷路(66)、T-迷路(43)、およびスケジュール制御行動の習得と維持(26)(67)(68)がある。ラットの離乳児および成熟動物用の他の試験については、文献に記載されている（離乳児：26、27、成熟動物：19、20）。

剖検

38. 母動物は児動物の離乳後に安楽死させてよい。

39. 生後 22 日またはそれ以前（生後 11～22 日）、および試験終了時に児動物を安楽死させ、その組織について神経病理学的検査を行なう。生後 22 日までに殺処分した児動物については、脳を検査する。試験終了時に殺処分した動物については、中枢神経系および末梢神経系双方の組織を検査する。生後 22 日またはそれ以前に殺処分した動物については、浸漬または灌流固定のいずれでもよい。試験終了時に殺処分した動物については、灌流固定を行なう。組織標本作製の全過程（動物の灌流から、組織試料の採取、切り出し、包埋、薄切、スライドの染色まで）は、それぞれの作業 1 回分の中に各用量群の試料が均等に含まれるような方法で行なう。神経病理学的検査に関する詳細は、ガイダンス文書 No.20(9)に示されている。また、文献 103 も参照のこと。

組織標本作製

40. 剖検時に認められたすべての肉眼的異常を記録する。神経系のすべての主要部位について代表的な組織試料を採取し、適切な固定液に保存した後、公表されている標準的な組織標本作製法に従って標本を作製する(69)(70)(71)(103)。中枢および末梢神経系の組織ともパラフィン包埋でよいが、より高い解像度が必要なもの（末梢神経障害が疑われる場合や形態計測を行なう場合の末梢神経など）については、オスミウムによる後固定とエポキシ樹脂包埋がより適切な場合がある。形態計測用に採取した脳は、固定液中での長期保存による収縮のアーティファクトが出ることを防ぐため、すべての用量群を同時に適切な包埋剤に包埋する(6)。

神経病理学的検査

41. 定性的検査の目的は、以下の通りである。

i） 神経病理学的変化の徴候を示す神経系の部位を明らかにすること
ii） 被験物質暴露による神経病理学的変化の種類を明らかにすること
iii） 神経病理学的変化の程度の範囲を明らかにすること

組織試料から作製された代表的な切片を、適切に訓練された病理学者が顕微鏡で検査して神経病理学的変化の徴候を調べる。すべての神経病理学的変化に程度を示す主観的なグレードを付す。生後 22 日またはそれ以前に安楽死させた動物の脳切片の検査はヘマトキシリン･エオジン染色で十分かもしれないが、試験終了時に殺処分した動物の中枢および末梢神経系組織の切片については、髄鞘染色（ルクソール・ファスト青／クレシル紫など）および渡銀染色（Bielschowsky または Bodian 染色など）が推奨される。また、病理学者の専門的判断および観察された変化の種類によっては特定の型の変化の存在を明らかにし、その特徴を知るために、他の染色法が適切と考えられる場合もある（グリアおよびミクログリアの変化を調べるためのグリア線維性酸性タンパク（GFAP）またはレクチン組織化学(72)、壊死を検出するための Fluoro-jade(73)(74)、神経変性に特異的な渡銀染色(75)など）。

42. 形態計測（定量的）評価を行なう。これらのデータは投与の影響を検出するのに役立つ場合があり、また投与による脳重量や脳の形態の変化の解釈にも有用である(76)(77)。このため、神経組織の採取と標本作製は形態計測が可能となるように行なう必要がある。形態計測では、脳の特定部位の長さや面積の測定などを行なう(78)。長さや面積の測定には、信頼できる組織学的指標に基づいて注意深く選択した均質な切片を用いる必要がある(6)。特定の神経解剖学的部位の大きさや細胞数などの項目に対する投与の影響を明らかにするために、立体学が使われる場合もある(79)(80)(81)(82)(83)(84)。

43. 脳について、投与による神経病理学的変化のあらゆる徴候を検査する。綿密な検査が行なえるように、脳のすべての主要部位（嗅球、大脳皮質、海馬、基底核、視床、視床下部）、中脳（中脳蓋、被蓋、大脳脚）、橋、延髄、小脳）から適切な試料を採取する。すべての動物について同じ平面の切片を作製することが重要である。試験終了時に安楽死させた成熟動物については、脊髄および末梢神経の代表的な試料も採取する。検査部位には、視神経および網膜を含む眼球、脊髄の頸膨大および腰膨大、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）、ならびに脛骨神経の腓腹筋分岐部を含める。また、脊髄および末梢神経切片には横断または縦断切片の両方を含める。

44. 神経病理学的検査では、細胞変化（神経細胞空胞化、変性、壊死など）および組織変化（神経膠症、白血球浸潤、嚢胞形成など）に加え、神経系の発達障害の徴候を検査する(6)(85)(86)(87)(88)(89)。この際、殺処分時の発達段階で起きることが知られている、正常な発達に伴う変化(90)と被験物質の影響とを区別することが重要である。発達障害を示唆する重要な変化を以下に示すが、これに限るものではない。

- 嗅球、大脳、小脳の全体的な大きさ、または形の変化

- 脳の各部位の相対的な大きさの変化。正常では一時的にのみ存在する細胞集団や軸索投射の消失または残存による部位の拡大や縮小（小脳外胚芽層、脳梁など）を含む。
- 増殖、移動、分化の変化。これらは過剰なアポトーシスや壊死を示す部位、異所性、配列不整、奇形などを示す神経細胞の集塊または散在性の分布、皮質構造各層の相対的な厚さの変化などにより示唆される。
- 髄鞘形成パターンの変化。全体の縮小や髄鞘構造の染色性の変化を含む。
- 水頭症の徴候。特に、脳室拡張、中脳水道狭窄および大脳半球菲薄化。

神経病理学的変化の用量反応関係の解析

45. 定性的および定量的な神経病理学的検査では、以下のような段階的方法が推奨される。はじめに高用量群と対照群の切片を比較し、高用量群の動物に神経病理学的変化の徴候が認められなければ、それ以降の検査は必要ない。高用量群の動物に神経病理学的変化の徴候が認められた場合は、中間および低用量群の動物を検査する。死亡その他問題となる毒性により高用量群で早期に処分される動物がいた場合には、高および中間用量群について神経病理学的変化を検査する。また、より低い用量群で神経毒性の徴候がみられた場合には、それらの群についても神経病理学的検査を実施する。定性的または定量的検査において投与による神経病理学的変化が認められたならば、全用量群の全動物を検査して、病変の発現率、発現頻度および程度を示すグレードの用量依存性、または形態計測における変化の用量依存性を明らかにする。この検査では、神経病理学的変化の徴候を示した脳の部位をすべて含める。また、各病変についてグレードごとの定義を記載し、各グレードを区別するための特徴を示す。各病変の発現頻度およびそのグレードを記録し、統計解析を行なって用量反応関係の特徴を評価する。なお、スライドは盲検化することが推奨される(91)。

データおよび報告

データ

46. データは個体ごと、および総括表として示す。各用量群について、変化の種類ならびに各変化を示した母動物数、児動物数（雌雄別）および腹数を記載する。児動物に対して直接出生後の投与を行なった場合には、その経路、期間および時期を示す。

結果の評価と解釈

47. 発達神経毒性試験では、胎児期および生後の早い発達段階における被験物質の反復暴露による影響について情報が得られる。全身毒性と発達神経毒性の両方の指標が重視されているため、試験結果から母動物の全身毒性がなくても生じる神経の発達に対する影響と、母動物にも毒性が出る用量でのみ発現するものとを区別することができる。試験デザイン、統計解析およびデータの生物学的意義が相互に複雑に関連しているため、発達神経毒性データの適切な解釈には専門的判断が必要である(107)(109)。また、知見の重要性を考慮した証拠の重み付けにより試験結果を解釈する(20)(92)(93)(94)。行動学的および形態学的所見の型（みられる場合）ならびに用量反応関係について考察する。この特性解析には、ヒトに

おける疫学的研究や症例報告および実験動物を用いた試験（トキシコキネティクスデータ、構造活性相関情報、他の毒性試験データなど）を含めた、発達神経毒性の評価に関連するあらゆる試験のデータを取り入れ、また、被験物質の用量と各性における神経毒性の有無、頻度および程度との関連性を考察する(20)(95)。

48. データの評価では、生物学的意義と統計学的意義の双方について考察する。統計解析はデータの解釈の仕方を示す一助とのみみなすべきで、これを決定するものではない。統計学的有意差があるという理由のみで投与の影響と結論してはならないのと同様に、統計学的有意差がないという理由のみで投与の影響でないと結論すべきではない。偽陰性の所見が生じないようにしながら、常に困難とされる「陰性の証明」を適切に行なうため、投与の影響がみられなかった場合には特に、入手可能な陽性対照データおよび背景データについて考察を行なう(102)(106)。偽陽性の可能性は、データの統計学的評価全体を踏まえて考察する(96)。また評価では、観察された神経病理学的変化と行動学的変化の関連性（あれば）に関する考察を含む。

49. 結果の解析には常に試験デザインに適した統計モデルを用いる(108)。パラメトリック解析かノンパラメトリック解析かの選択は、データの性質（変換または未変換）およびその分布、ならびに統計解析方法の相対的な頑健性などの要素を考慮に入れた妥当なものである必要がある。また、試験の目的およびデザインから、第一種過誤（偽陽性）と第二種過誤（偽陰性）を最小にする統計解析方法の選択が導かれるはずである(96)(97)(104)(105)。多産の動物種を用いる発達毒性試験では、1腹当たり多数の児動物が試験されるが、第一種過誤率が不当に大きくならないように、腹単位のデータについて統計モデルを適用する(98)(99)(100)(101)。各項目の統計上の単位は児動物ではなく1腹（母動物ごと）とし、同腹児の観察結果を個々の独立した結果として取り扱わないよう試験をデザインする。また、ある評価項目で同じ個体について繰り返し測定する場合には、各測定値の非独立性を考慮に入れた統計モデルを用いて解析する。

## 試験報告書

50. 試験報告書には、以下の情報を含める。

被験物質：
- 物理的性質、また必要に応じて物理化学的特性
- 識別データ、供給元を含む
- 使用ロットの純度、また既知若しくは予想される不純物

溶媒（必要に応じて）：
- 水または生理食塩液以外の場合は、溶媒選択の妥当性

供試動物：
- 使用した動物種／系統、またラット以外の場合は選択の妥当性
- 供給元
- 動物数、開始時週齢、性
- 供給元、飼育条件、飼料、水など
- 試験開始時の個体ごとの体重

試験条件：
- 用量設定根拠
- 投与経路および投与期間の設定根拠
- 投与内容の細目、溶媒、容量、投与物質の物理的形状の詳細を含む
- 被験物質溶液／被験物質混合飼料の調製方法の詳細、調製物の濃度分析値、安定性および均一性
- 母動物および児動物の個体識別方法
- 母動物の試験群への割付け、間引き動物の選抜、および児動物の各検査への割付けに用いた無作為化手順の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 必要に応じて、飼料／飲水中または吸入における被験物質濃度（ppm）から実際の投与量（mg/kg 体重/day）への換算方法
- 環境条件
- 飼料および水（水道水、蒸留水など）の質の詳細
- 試験開始日および終了日

観察および検査手順：
- 観察および検査手順の標準化に用いた方法の詳細、また実際的な観察結果の尺度基準
- 全検査手順の一覧、またその使用の妥当性
- 機能／行動試験および病理学的、神経化学的、電気生理学的検査手順の詳細、自動機器の情報および詳細を含む
- 機器のキャリブレーションおよび同等性確認手順、また検査において試験群の偏りをなくすための手順
- 専門的判断を含めて、すべての決定（）の妥当性についての簡潔な理由

結果（個体データおよび総括データ、必要に応じて平均および分散を含む）
- 試験開始時の動物数および試験終了時の動物数
- 各検査で用いた動物数および腹数
- 各動物およびその動物が属する腹の識別番号
- 出生時の同腹児数および平均体重、雌雄別
- 体重および体重変化、母動物および児動物の最終体重を含む
- 摂餌量、また必要に応じて摂水量（被験物質を飲水投与した場合など）
- 毒性反応データ、雌雄および用量別、毒性徴候および死亡率を含む、必要に応じてその時期および死因を記載
- 詳細な状態の観察でみられた所見の性質、程度、期間、発現日、発現時刻およびその経過
- 観察時ごとの各発達指標（体重、性成熟、初期行動発達）の尺度
- 機能／行動試験および神経病理学的、神経化学的、電気生理学的検査所見の詳細、雌雄別、対照群と比較しての増加および減少の両方を含む
- 剖検所見
- 脳重量
- 神経症状および神経病変から得られた診断（自然発生性疾患または状態を含む）
- 典型的な所見像

- 形態計測に用いた切片の均質さを評価するための低倍像
- 可能であれば、吸収および代謝データ、別のトキシコキネティクス試験で得られた補足データを含む
- 結果の統計処理、データ解析に用いた統計モデルおよび解析結果、有意か否かを問わない
- 試験従事者、専門的訓練の内容を含む

考察

- 用量反応関係に関する情報、雌雄および群ごと
- 被験物質の神経毒性に関する結論とその他の毒性との関連性、雌雄および群ごと
- トキシコキネティクス情報の結論に対する影響
- 既知の神経毒性物質との影響の類似性
- 検査方法の信頼性と感度を裏付けるデータ（陽性対照および背景データ）
- 神経病理学的変化と機能変化との関連性、あれば
- 母動物および児動物における NOAEL またはベンチマーク用量、雌雄及び群ごと

結論

- 結果に基づいた、データの総合的な解釈に関する考察、被験物質が発達神経毒性を引き起こすか否かに関する結論および NOAEL を含む

参考文献


1. OECD (1995) Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
2. US EPA (1998) U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
3. US EPA (1998) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].
4. Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.
5. Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.
6. Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.
7. OECD (2003) Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
8. OECD (draft) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Draft Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
9. OECD (2003) OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
10. Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.
11. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
12. Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.
13. Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14. OECD (1983) Test Guideline 415. OECD Guideline for Testing of Chemicals. One-generation reproduction toxicity study. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

15. OECD (2001) Test Guideline 416. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Two-generation reproduction toxicity study. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

16. OECD (1997) Test Guideline 424. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Neurotoxicity Study in Rodents. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

17. OECD (2001) Test Guideline 414. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Prenatal developmental toxicity study. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

18. ILAR (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, ISBN 0309053773, National Academies Press, Washington DC.

19. WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20. WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22. De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

23. Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

24. Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

25. Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

26. Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27. Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

28. Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

29. Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

30. Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

31. ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use. Available: [http://www.ich.org/UrlGrpServer.jser?@_ID=276&@_TEMPLATE=254].

32. Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

33. Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

34. Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

35. Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

36. Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

37. Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

38. Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

39. Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

40. Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.

41. Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

42. Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

46. Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661-669.

48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

49. Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351

50. Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

51. Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

52. Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

53. Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25-30.

54. Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

55. Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.

56. Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

57. Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

58. Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

59. Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

60. Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

61. Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

62. Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

63. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

64. Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

65. Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

66. Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

67. Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

68. Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

69. Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

70. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

72. Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

73. Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

74. Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

75. De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupricsilver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

76. De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

77. De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

78. Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

79. Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

80. Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

81. Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

82. Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

83. West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

84. Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813– 831.

85. Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

86. Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

87. Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.

88. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

89. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

90. Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91. House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

92. Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

93. US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=116283].

94. US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=2838].

95. Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96. Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

97. Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

98. Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

99. Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

100. Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

101. Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

102. Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

103. Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

104. Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

105. Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

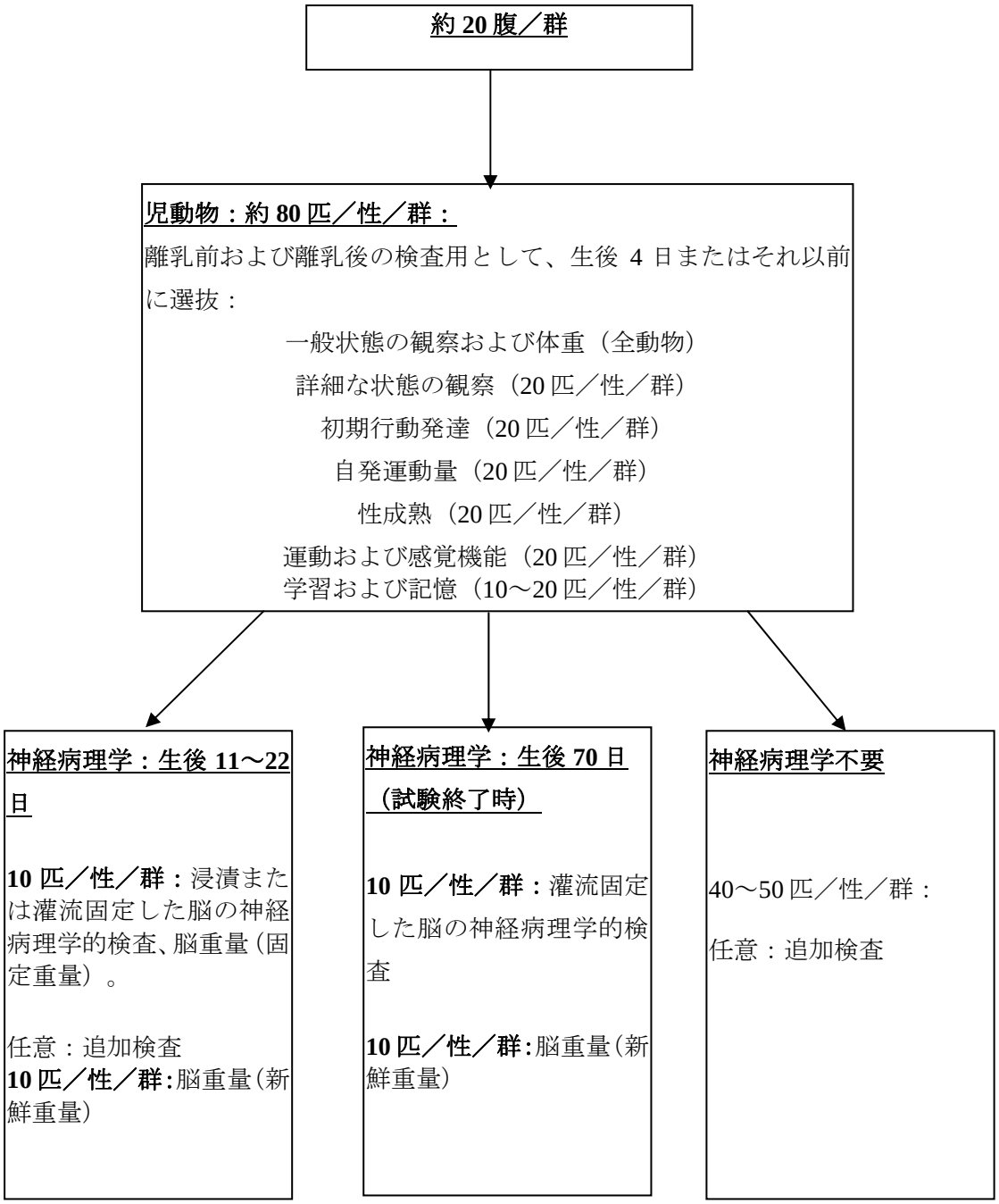
106. Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2007) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).

107. Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2007) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).

108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2007) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).

109. Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2007) Identification and interpretation of treatment-related effects in developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicology and Teratology* (in press).

**図 1. 機能／行動試験、神経病理学的検査および脳重量測定の一般的な試験デザイン。この図は 13～15 段落の記載に基づく。動物の割付け例を補遺 1 に示す。**



## 補遺 1

1. 考えられる割付けの例を以下に記載し、また表で示す。これらの例は、各種検査への供試動物の割付けには多くの方法があることを示すために載せるものである。

### 例 1

2. 児動物 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）を 1 組とし、これを離乳前の初期行動発達検査に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を生後 22 日に安楽死させ、脳を摘出して秤量し、病理組織学的検査に供する。さらに、残りの各群雌雄各 10 匹の新鮮脳について脳重量を測定する。

3. 別の 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）の組を離乳後の機能／行動試験（成長期における詳細な状態の観察、自発運動量、聴覚驚愕および認知機能試験）ならびに性成熟日齢の検査に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を試験終了時（生後約 70 日）に麻酔し、灌流固定する。そのままさらに灌流した後、脳を摘出し、病理組織学的検査に供する。

4. 若齢成熟動物（生後 60～70 日）の認知機能試験には、3 組目の 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）を用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を試験終了時に殺処分し、脳を摘出して秤量する。

5. 残りの 20 匹／性／群は、追加検査を行なう場合に備えて残しておく。

**表 1**

| 児動物番号 [a] 雄 | 雌 | 検査に割付ける児動物数 | 検査／試験 |
|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 雄 20 + 雌 20 | 初期行動発達 |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 生後 22 日の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 生後 22 日の脳重量 |
| 2 | 6 | 雄 20 + 雌 20 | 詳細な状態の観察 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 自発運動量 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 性成熟 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 運動および感覚機能 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 学習および記憶（生後 25 日） |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 若齢成熟動物（生後約 70 日）の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| 3 | 7 | 雄 20 + 雌 20 | 学習および記憶（若齢成熟動物） |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 若齢成熟動物（生後約 70 日）の脳重量 |
| 4 | 8 | -- | 動物の差し替えまたは追加検査用の予備動物 |

a) この例では、各腹を雄 4 匹 + 雌 4 匹に間引きし、雄の児動物には 1～4 の、雌の児動物には 5～8 の番号を付す。

**例 2**

6. 児動物 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）を 1 組とし、これを離乳前の初期行動発達検査に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を生後 11 日に安楽死させ、脳を摘出して秤量し、病理組織学的検査に供する。

7. 別の 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）の組を離乳後の検査（詳細な状態の観察、自発運動量、性成熟日齢の検査、運動および感覚機能）に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を試験終了時（生後約 70 日）に麻酔し、灌流固定する。そのままさらに灌流した後、脳を摘出して秤量し、病理組織学的検査に供する。

8. 成長期の動物および若齢成熟動物の認知機能試験には、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を用いる。生後 23 日と若齢成熟動物の認知機能試験には別の動物を用いる。若齢成熟動物の試験に用いた動物のうち 10 匹／性／群を試験終了時に殺処分し、脳を摘出して秤量する。

9. 検査用に選抜されなかった残りの 20 匹／性／群は、離乳時に殺処分して廃棄する。

**表 2**

| 児動物番号 [a] 雄 | 雌 | 検査に割付ける児動物数 | 検査／試験 |
|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 雄 20 + 雌 20<br>雄 10 + 雌 10 | 初期行動発達<br>生後 11 日の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| 2 | 6 | 雄 20 + 雌 20<br>雄 20 + 雌 20<br>雄 20 + 雌 20<br>雄 20 + 雌 20<br>雄 10 + 雌 10 | 詳細な状態の観察<br>自発運動量<br>性成熟<br>運動および感覚機能<br>若齢成熟動物（生後約 70 日）の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| 3 | 7 | 雄 10 + 雌 10[b] | 学習および記憶（生後 23 日） |
| 3 | 7 | 雄 10 + 雌 10[b] | 学習および記憶（若齢成熟動物）<br>若齢成熟動物の脳重量 |
| 4 | 8 | -- | 生後 21 日に殺処分して廃棄 |

a) この例では、各腹を雄 4 匹 + 雌 4 匹に間引きし、雄の児動物には 1～4 の、雌の児動物には 5～8 の番号を付す。

b) 生後 23 日と若齢成熟動物の認知機能試験には、別の児動物を用いる（全 20 腹のうち腹番号が奇数／偶数のものなど）。

**例 3**

10. 児動物 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）を 1 組とし、これを生後 11 日の脳重量測定および神経病理学的検査に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）は生後 11 日に安楽死させ、脳を摘出して秤量し、病理組織学的検査に供する。残りの各群雌雄各 10 匹の新鮮脳についても、脳重量を測定する。

11. 別の 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）の組を初期行動発達（自発運動量）、離乳後の検査（自発運動量、性成熟日齢の検査）、および成長期の動物の認知機能試験に用いる。

12. さらに別の 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）の組を運動および感覚機能の検査（聴覚驚愕試験）ならびに詳細な状態の観察に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を試験終了時（生後約 70 日）に麻酔し、灌流固定する。そのままさらに灌流した後、脳を摘出して秤量し、病理組織学的検査に供する。

13. 残りの 20 匹／性／群（1 腹につき雌雄各 1 匹）の組を若齢成熟動物の認知機能試験に用いる。これらの動物のうち、10 匹／性／群（1 腹につき雄または雌 1 匹）を試験終了時に殺処分し、脳を摘出して秤量する。

**表 3**

| 児動物番号 [a] 雄 | 雌 | 検査に割付ける児動物数 | 検査／試験 |
|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 雄 10 + 雌 10 | 生後 11 日の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 生後 11 日の脳重量 |
| 2 | 6 | 雄 20 + 雌 20 | 初期行動発達（自発運動量） |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 自発運動量 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 性成熟 |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 学習および記憶（生後 27 日） |
| 3 | 7 | 雄 20 + 雌 20 | 聴覚驚愕試験（成長期の動物および若齢成熟動物） |
| | | 雄 20 + 雌 20 | 詳細な状態の観察 |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 若齢成熟動物（生後約 70 日）の脳重量／神経病理学／形態計測 |
| 4 | 8 | 雄 20 + 雌 20 | 学習および記憶（若齢成熟動物） |
| | | 雄 10 + 雌 10 | 若齢成熟動物の脳重量 |

a) この例では、各腹を雄 4 匹 + 雌 4 匹に間引きし、雄の児動物には 1～4 の、雌の児動物には 5～8 の番号を付す。