

吸入毒性試験実施計画（案）

平成 19 年 6 月 5 日

1. 目的

モデル農薬を被検物質として吸入毒性試験を実施することにより、農薬吸入毒性評価手法の確立に必要な知見を得るとともに、モデル農薬の毒性評価を行う。

2. 基本的な考え方

本事業で想定する曝露シナリオを踏まえ、90日間の亜急性吸入毒性試験を実施する。

農薬の亜急性吸入毒性試験については、「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月24日付け12農産第8147号）において、農薬の登録申請時に提出すべき試験成績の作成に係る指針として、「90日間反復吸入毒性試験」に係るテストガイドラインが定められていることから（参考資料2）、当該テストガイドラインを原案とし、本事業で想定する曝露シナリオ等を踏まえた適切な修正を加えることにより試験計画を定めるものとする。

3. 試験実施機関

試験を実施する請負業者の選定にあたっては、以下の要件を課すこととする。

本実施計画で定める亜急性吸入毒性試験を実施できる試験設備を有すること。

毒性試験分野に係る農薬G L P（Good Laboratory Practiceの略）（平成11年10月1日農林水産省農産園芸局長通達11農産第6283号）への適合確認を受けた機関であること。

その他、吸入毒性試験に係る十分な知見、技術を有していること。

4. モデル農薬の選定

モデル農薬の選定にあたっては、「自治体における街路樹、公園緑地等での防除実態調査」（参考資料4）に基づき、街路樹、公園等の市街地における使用実態の多い5農薬（別紙1）の中から選定することとし、以下の観点を考慮の

上、平成19年度はフェニトロチオン及びトリクロルホンを選定することとする。

吸入毒性に係る知見が多く、毒性の観点から優先的に評価すべきと考えられるもの

農薬散布後の気中濃度データが入手可能で、かつ比較的高い気中濃度が測定されているもの

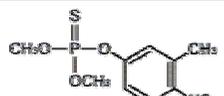
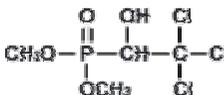
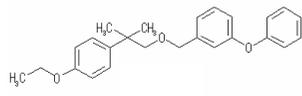
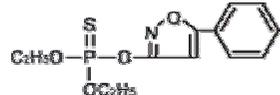
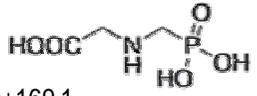
吸入毒性試験が技術的に可能なもの

なお、代謝物に係る吸入毒性試験の必要性については、農薬散布後の環境中における代謝物の生成等に係る知見を調査の上、検討することとする。

5. 試験計画

別紙2の試験計画に基づき、請負業者から詳細な試験計画を提出させ、最終的な試験計画を定めるものとする。

(別紙1) 街路樹、公園等の市街地における使用実態の多い5農薬

順位 (回答率)	農薬名	用途	構造式 / 物性 ^{*1}	気中濃度評価値 ^{*4} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	散布後最高気中濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) ^{*5}		吸入毒性	
					散布区域内	散布区域外	急性(LC ₅₀) ^{*1}	亜急性(NOEL)
1 (64%)	フェニトロチオン (MEP)	殺虫剤 (有機リン系)	 <p>分子量: 277.2 融点: 0.3^{*2} 沸点: 140-145 で分解^{*2} 蒸気圧: 1.57×10^{-3} Pa (25)</p>	10	22 (散布後0~1h)	8.66 (散布後1日、50m)	>2210mg/m ³	7mg/m ³ *6
2 (60%)	トリクロルホン (DEP)	殺虫剤 (有機リン系)	 <p>分子量: 257.4 融点: 83-84^{*2} 沸点: 100^{*2} 蒸気圧: 2.1×10^{-4} Pa (20)</p>	-	2.23 (散布後当日)	1.30 (散布後当日)	533mg/m ³	12.7mg/m ³ *2
3 (24%)	エトフェンプロックス	殺虫剤 (ピレスロイド系)	 <p>分子量: 376.5 融点: 37.4 ± 0.1 沸点: 200 で分解 蒸気圧: 8.13×10^{-7} Pa (25)</p>	-	0.20 (散布後当日)	0.54 (散布後、100m)	>5900mg/m ³	-
4 (24%)	イソキサチオン	殺虫剤 (有機リン系)	 <p>分子量: 313.3 融点: <25^{*3} 沸点: 160^{*3} 蒸気圧: 1.60×10^{-4} Pa (25)</p>	-	1.8 (散布後1~3h)	0.07 (散布後1~3h)	2040mg/m ³	-
5 (24%)	グリホサート	除草剤 (アミノ酸系)	 <p>分子量: 169.1 融点: 184.5^{*2} 沸点: 187 で分解^{*2} 蒸気圧: 1.31×10^{-5} Pa (25)</p>	-	-	-	>2470mg/m ³	-

[引用元]

*1(*2、*3を除く) 農薬ハンドブック 2005年版 (社団法人日本植物防疫協会)

*2 国際化学物質安全性計画 環境保健クライテリア (<http://www.inchem.org/pages/ehc.html>)

*3 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質総合情報提供システム

*4 航空防除用農薬環境影響評価検討会報告書(平成9年12月環境庁水質保全局)

*5 以下の資料より散布後の最高気中濃度を抜粋

・航空防除用農薬環境影響評価検討会報告書(平成9年13月環境庁水質保全局)

・環境省農薬残留対策総合調査における気中濃度測定結果について(平成18年度第2回農薬飛散リスク評価手法等確率調査検討会 参考資料5)

・その他の研究機関における気中濃度測定結果について(暫定版)(平成18年度第2回農薬飛散リスク評価手法等確率調査検討会 参考資料6)

*6 フェニトロチオンの毒性試験の概要(日本農薬学会誌 13, 401-405 (1988))

(別紙2)

90日間反復吸入毒性試験

<引用元>

農薬の登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産第8147号)

「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について(平成13年10月10日付け13生産第3986号)(斜字部分)

1. 目的

本試験は、被験物質を90日間にわたって反復吸入暴露したときに生じる毒性変化及び毒性変化の認められない最高投与量(無毒性量)についての科学的知見を得ることにより、農薬使用時の安全な取扱方法を確立することを目的とする。

2. 供試動物

- (1) 1種以上の哺乳動物(通常、ラット)を用いる。
- (2) 若齢成獣を用いる。
- (3) 原則として、雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

【論点】

- ・ 供試動物はラット1種としてよいか?
- ・ ラットの系統(SD, Wistar, Fischer等)について、優先的に指定すべき系統はあるか?

3. 暴露方法

- (1) 適切な性能を有する吸入装置を用いる。暴露中は給餌、給水を行わない。
 - ・ 全身暴露型又は鼻部暴露型吸入装置を用いる。
 - ・ 鼻部(頭部)暴露法は比較的少ない被験物質で試験を実施できること、非吸入経路での吸収が少ないこと、試験実施者にとっても安全性が高いこと等の理由から、広く用いられるようになっている。

(2) 暴露中、流量、被験物質の実際濃度、粒子径分布、温度、湿度等をモニタリングし、一定条件に保つ。

- ・吸入装置内では3か月間の実測濃度の平均値が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内となるように発生させる。
- ・原則として、被験物質をそのまま暴露に供するが、被験物質を吸入装置内に適切に発生させるために、必要に応じて適当な溶媒に溶解又は懸濁したり、粉剤の粒子径をより小さくするために粉碎又は発生の時点で媒体を使用する場合もある。
- ・暴露濃度は、暴露期間中に3回以上実際に動物が吸入する領域からサンプリングし測定する。原則として化学分析を実施する。
- ・吸入装置内濃度は連続してモニターし、暴露時間の起点は暴露を開始してから濃度が安定するまでの時間を考慮し決定する。
- ・暴露中に吸入装置内が低酸素状態にならないように留意する。全身暴露では換気回数が12回以上/時間、鼻部暴露では動物の呼吸換気量の合計の2倍以上の空気流量が必要である。
- ・暴露中の吸入装置内温湿度は飼育環境と同様であることが望ましい(高濃度の暴露を除く)。

(3) 粒子径(空気力学的質量中位径)は、 $1\sim 4\mu\text{m}$ 又は実施可能な最小粒子径とする。

- ・粒子径は、暴露期間中に少なくとも1回実際に動物が吸入する領域からサンプリングして、重量分析又は化学分析を実施し、空気力学的質量中位径(MMAD)及び幾何標準偏差(GSあるいはg)を算出する。
- ・吸入可能な粒子径として、以前は鼻腔に吸入される 10 又は $15\mu\text{m}$ が目安とされていたが、近年は気管支に到達するとされる $4\mu\text{m}$ が一つの基準となっている。MMADは $1.4\mu\text{m}$ が望ましいが、被験物質によっては $4\mu\text{m}$ 以下にすることが難しい場合が考えられる。このような場合は、分析結果から、 $4\mu\text{m}$ 以下の粒子が含まれる割合(%)を算出する。

(4) 揮発性物質の場合は、爆発の起こる濃度にならないよう注意する。

【論点】

- ・1日あたり長時間の曝露を行う場合、全身曝露型吸入装置の方が望ましいか？
- ・周辺住民等に対して想定される曝露シナリオを踏まえ、被験物質はガス状態で曝露させることでよいか？(この場合、粒子径分布に係るモニタリングは当然不要となる。)

4. 暴露期間

1日の暴露時間は少なくとも6時間とし、毎週5日間以上、90日以上暴露する。

【論点】

- ・周辺住民等の1日の曝露時間については個人差が大きいと考えられるものの、安全側に立って、曝露期間は6時間よりも長くすべきか？（試験技術上、最長何時間までの曝露が可能か？）
- ・また、毎週の曝露期間は、7日間（毎日）としてよいか？

5. 動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

1群当たり雌雄各10匹以上とする。

各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。なお、試験結果の評価を行う上で十分な動物数を確保すること。

(2) 試験群の設定

被験物質投与群

ア 対照群の他に少なくとも3段階の暴露群を設ける。

イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。

対照群

ア 対照群は、被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。

イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

- ・毒性徴候の回復状況等を観察するための衛星群を設けてもよい。なお、衛星群の規模は、雌雄各10匹以上とし、投与終了後もさらに28日間以上飼育する。

【論点】

- ・用量設定にあたっては、急性吸入毒性試験（必要に応じ、3～4週間の亜急性吸入毒性試験）を予備試験として実施し、その結果に基づいて3段階の用量を設定することでよいか？
- ・また、予備試験において、被検物質をガス状態にして曝露させるにあたり、試験技術上実施可能な最高用量においても急性毒性が観察されない場合は、当該用量を本試験における最高用量とすることでよいか？
- ・対照群は1群とし、通常の空気を曝露させることでよいか？
- ・衛星群を設け、毒性徴候の回復状況を観察する必要はあるか？

6. 観察及び検査

次の(1)～(5)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

すべての動物について、毎日、死亡の有無及び一般状態（毒性徴候の発現時期やその程度）を観察するとともに、定期的に体重及び摂餌量を測定する。

体重及び摂餌量の測定の頻度は、通常、投与開始前及び投与開始後少なくとも週1回とする。

- ・一般状態の観察では、暴露部位が気道であるため呼吸の変化等に注意が必要である。

(2) 血液検査

少なくとも試験終了時に1回、原則として、すべての動物について行うことが望ましいが、実施上の理由から、各群の一部（少なくとも5匹）の動物に限っても差し支えない。

検査前に一晩絶食させることが望ましい。

通常、次の項目について行うが、そのほか試験ごとに適切な項目を追加選定して行うことが望ましい。なお、検査項目及び検査方法は、国際的に広く採用されているものを考慮に入れて選定する。

ア 血液学的検査

赤血球数、白血球数、血液像（白血球型別百分率）、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値、その他必要に応じて網状赤血球数、凝固能（プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）等

イ 血液生化学的検査

血清（血漿）総蛋白、アルブミン、ブドウ糖、ビリルビン、尿素窒

素、クレアチニン、トランスアミナーゼ [AST (GOT)、ALT (GPT)]、 γ -GTP、アルカリフォスファターゼ、電解質 (ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン等) 等

(3) 尿検査

各群雌雄ごとに一定数の動物 (少なくとも5匹) について血液検査と同時期に必要な応じて尿検査を行う。

検査は、通常、次の項目について行う。

尿量、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、比重等

(4) 眼科学的検査

可能な限りすべての動物 (少なくとも高用量群と対照群) について、投与開始前と試験終了時に行う。異常が発見された場合にはすべての動物について行う。

(5) 病理学的検査等

剖検

ア すべての動物について剖検後、体表、開口部、頭蓋、胸腔及び腹腔並びに内部器官の観察を行う。

イ すべての動物について、次の器官を含む主要な臓器の重量を測定する。

肝臓、腎臓、副腎、精巣

・剖検では、被験物質の暴露部位である呼吸器系臓器に留意する。

器官及び組織の保存

試験終了後も必要な応じて病理組織学的検査を実施できるように、次に掲げる器官及び組織を保存する。

すべての肉眼的病変部、皮膚、脳、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、肺(気管を含む)、鼻咽頭、心臓、胸骨、唾液腺、肝臓(及び胆嚢)、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、生殖腺、子宮及び性器付属器、乳腺、筋肉、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、膀胱、リンパ節、末梢神経、脊髄、眼、大動脈

病理組織学的検査

次の動物等を対象として病理組織学的検査を実施する。

ア 対照群及び最高投与群のすべての動物

イ 試験期間中に死亡及び屠殺したすべての動物

ウ すべての動物における肉眼的病変部

エ すべての動物における標的臓器

オ すべての動物における気道、肝臓及び腎臓

なお、その他の投与群の病理組織学的検査は、最高投与群で作用が発現した部位について必ず行う。

【論点】

- ・追加すべき検査項目として、試験終了後、脳、赤血球及び血漿中におけるアセチルコリンエステラーゼ活性を測定し、対照群に対する低下率を測定することとしてよいか？
- ・神経毒性及び遅発性神経毒性について、別添のテストガイドラインに定める「観察及び検査」の項目を実施すべきか？
- ・その他、追加すべき観察・検査項目はあるか？
- ・器官及び組織の保存期間については、本事業の実施予定期間を考慮し、試験終了後3年間とすることでよいか？

・結果の解析について

得られた成績を表又は図で示し、考察を加える。表示方法としては、全群の成績を概括する総括表を作成するほか、群ごとに個々の動物のデータを記した表も作成し、必要に応じて参照できるようにしておく。

観察結果は、適切な統計方法によって解析する。統計方法は、試験の計画段階で選択する。

・報告書について

報告書には原則として以下の内容が記載されていること。

(1) 被験物質に関する情報

被験物質の名称、略称又はコード番号、化学名、CAS番号(既知の場合)、純度及び安定性等の物理化学的性質

溶媒等を用いた場合には、名称及び選択理由

(2) 供試動物に関する情報

動物種、系統、年齢、性、供給源、1群当たりの匹数、開始時の個体別体重、飼育条件(飼育環境、飼料の品質及び水質)等

(3) 試験条件に関する情報

被験物質の調製方法、用量設定理由、暴露方法、暴露装置及び測定装置、濃度測定(実測濃度及び名目濃度の算出)、吸入装置内温湿度測定、吸入装置内の気流に関する情報(流量、換気回数等)、粒子径分布(MMAD、GS)、呼吸可能な粒子の割合等

(4) 試験結果

一般状態の種類・程度・持続時間、体重、摂餌量、性・用量ごとの死亡を含む毒性反応データ、可逆的又は非可逆的、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼

科学的検査、剖検所見、臓器重量、病理組織学的所見、その他検査所見、統計処理
方法・結果等

(5) 考察及び結論

(6) 参考文献

【論点】

- ・被検物質は純品とし、純度は原則として98%以上又は入手可能な最高純度の純品を用いることとしてよいか？（ただし、純品の入手が困難な場合は、農薬として製造された原体を用いることとする。）
- ・不純物の組成についても分析の上、報告を求めることとしてよいか？

(別添)

反復経口投与神経毒性試験

<引用元>

農薬の登録申請に係る試験成績について(平成12年11月24日付け12農産第8147号) 網掛け部分は、神経毒性の観察及び検査に係る項目を示す。

1. 目的

本試験は、被験物質を反復経口投与したときに生じる神経系に対する毒性変化を明確にするとともに毒性変化の認められない最高投与量(無毒性量)を求めることを目的とする。

なお、神経毒性と一般毒性を関連付けて評価するために、反復投与毒性試験と併合して行ってもよい。

2. 供試動物

(1)げっ歯類(通常、ラット)を用いる。

(2)離乳後、馴化期間を経てできるだけ早い時期の同一週齢(通常5~6週齢)の動物を用いる。

(3)原則として、雌雄の動物を同数用いる。なお、雌は未経産で非妊娠のものを用いる。

3. 投与方法

経口による連続投与とし、通常、混餌投与又は飲水投与により行う。ただし、混餌又は飲水投与が困難な場合は、強制投与を行ってもよい。

4. 投与期間

必要に応じて90日間又は1年間試験を実施する。

5. 動物数及び試験群の設定

(1)動物数の設定

詳細な状態の観察及び機能検査のために必要な数を設定するものとし、各群雌雄ごとに10匹以上とし、その中から神経病理組織学的検査に必要な動物数を各群雌雄ごとに5匹以上を得る。

各群への動物の割り付けは、体重層別等による適切な無作為抽出法により行う。

他の試験と併合で実施する場合は、それぞれの試験の目的を踏まえ、動物数は適宜、調整するものとする。また、中間屠殺群及び回復群を設ける場合は、必要な数を追加設定する。なお、試験結果の評価を行うのに十分な動物数が確保できていなければならない。

(2) 試験群の設定

被験物質投与群

- ア 少なくとも3段階の用量設定による被験物質投与群を設ける。
- イ 用量段階は、被験物質の毒性の徴候を明らかにし、無毒性量を推定できるように設定する。最高用量は多数例の死亡を引き起こすことなく毒性影響が認められる用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ、用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。
- ウ 用量設定に当たっては、本試験に先だって実施した毒性試験の結果等を参考とする。また、用量設定の根拠を示すこと。
- エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000mg/kg 体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

対照群

- ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒の投与を行うこと。
- ウ 毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6. 観察及び検査

次の(1)～(6)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

すべての動物について、一般状態を毎日注意深く観察する。

観察は全身状態、異常行動の有無及び死亡の有無を観察する。

体重及び摂餌量(飲水投与の場合にあっては摂水量も測定する。以下同じ。)

- ア 90日間の試験では、すべての動物について投与開始前に1回、投与開始後は少なくとも週1回の割合で体重及び摂餌量を測定する。
- イ 1年間の試験では、すべての動物について投与開始前に1回、投与開始後3か月までは少なくとも週1回、それ以降は少なくとも4週に

1 回、体重及び摂餌量を測定する。

ウ 被験物質の摂取量を算出する。

(2) 詳細な状態の観察

対象となる各群雌雄それぞれ 10 匹以上の動物について行う。

検査の頻度は別表のとおりとする。

回復群を設ける場合は、回復期間終了時に行う。

観察は、飼育ケージ内及び観察台の上で行う。観察は、項目ごとに明確な判断準と尺度基準を定めた採点法を用い、標準的な手順により行う。

通常、次の項目について行う。

外観（皮膚、被毛、眼・眼球及び粘膜等の変化、分泌物の有無等）、体位、姿勢（円背位等）、自律神経系機能（流涙、立毛、瞳孔径、呼吸状態、排泄状態等）、運動協調性、歩行の異常、動物の取扱操作及び環境刺激に対する反応、神経系（振戦、痙攣、筋収縮性等）、探索行動の変化、常同行動（身づくろいの変化、くびふり、旋回等）、異常行動（自咬、後ずさり、異常発声等）、攻撃性等

(3) 機能検査

対象となる各群雌雄それぞれ 10 匹以上の動物について行う。

検査の頻度は別表のとおりとする。

回復群を設ける場合、可能な限り試験終了時に近い時点で行う。

通常、次の項目について行う。

種々の刺激（聴覚刺激、視覚刺激及び固有受容器刺激等）に対する感覚運動反応、握力、自発運動量（自動記録装置を用いる。）

他の毒性試験等で神経毒性が疑われた場合、疑われた神経毒性の精査に適した感覚機能、運動機能及び学習・記憶に関する試験を実施する。

(5) 眼科学的検査

少なくとも高用量群及び対照群について、投与開始前及び試験終了時に行う。被験物質投与による異常が発見された場合には、すべての動物について行う。

(6) 病理組織学的検査

対象となる各群雌雄それぞれ 5 匹以上について行う。

症状観察及び機能検査で特定の動物に異常が認められた場合は、その動物を検査する。

組織は、灌流固定その他の適当な方法により固定する。観察された肉眼的病理学的変化は、すべて記録する。

通常、組織標本はパラフィン包埋され、ヘマトキシリン・エオジン染色等の一般的な染色が施されるが、末梢神経系に神経障害が認められる

場合又は疑われる場合には、末梢神経系組織の樹脂包埋標本を作製し検査する。

症状観察等から、適宜、検査部位の追加及び特殊染色を実施する。

神経病理組織学的所見は、他の毒性試験及び行動学的影響と関連付けて評価する。

中枢神経系と末梢神経系の代表的な切片について、段階的に検査する。

はじめに最高用量群と対照群の切片を比較し、最高用量群に神経病理組織学的変化が認められなければ、それ以降の検査は必要ない。最高用量群に変化が認められた場合は、中間用量と最低用量の切片を順次検査する。

通常、以下の組織について行う。

前脳及び海馬を含む大脳中心部、中脳、小脳、橋、延髄、視神経及び網膜を含む眼球、脊髄の頸膨大及び腰膨大、脊髄神経節、神経線維の前根及び後根、近位の坐骨神経、近位の脛骨神経（膝部）及び脛骨神経の腓腹筋分岐部、骨格筋（特に腓腹筋）。

脊髄及び末梢神経の切片は、横断面及び縦断面の両方を含める。

試験終了後も必要に応じて病理組織学的検査が実施できるように器官及び組織を保存する。

別表 詳細な状態観察と機能検査の頻度

検査の種類	対象動物	90日間試験	1年間試験
一般状態の観察	すべての動物	毎日	毎日
詳細な状態の観察	詳細な状態の観察のために選んだ動物	(1)投与開始前 (2)投与開始第1週又は第2週に1回 (3)投与開始後1か月ごと	(1)投与開始前 (2)投与開始1か月後に1回 (3)投与開始後3か月ごと
機能検査	機能検査のために選んだ動物	(1)投与開始前 (2)投与開始第1週又は第2週に1回 (3)投与開始後1か月ごと	(1)投与開始前 (2)投与開始1か月後に1回 (3)投与開始後3か月ごと

2 8 日間反復投与遅発性神経毒性試験

< 引用元 >

農薬の登録申請に係る試験成績について（平成12年11月24日付け12農産第8147号） 網掛け部分は、遅発性神経毒性の観察及び検査に係る項目を示す。

1．目的

本試験は、急性遅発性神経毒性試験で、その存在が確認されたか又は疑われる遅発性神経毒性をさらに検索するために、被験物質を28日間にわたって繰り返し投与した時に生じる毒性変化の内容及び毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）についての情報を得ることを目的とする。

2．供試動物

- (1) 一般的な品種及び系統の雌のニワトリを使用する。
- (2) 月齢8～12か月の標準的な大きさの若齢成鶏が望ましい。
- (3) 実験結果に影響を及ぼすようなウイルス性疾患や薬物処理がなく、歩行異常のない健康な動物を用いる。

3．投与方法

- (1) 経口による連続投与とし、通常、胃管、ゼラチンカプセル又はそれらに匹敵する方法を用いて強制的に投与する。
- (2) 液体は原液又は適切な溶媒に溶解し投与する。固体は可能な限り溶解し投与する。

4．投与期間及び観察期間

投与期間は28日間とする。
最終投与終了後も14日間の観察を行う。

5．動物数及び試験群の設定

(1) 動物数の設定

投与群、対照群とも、生化学的検査に必要な6羽及び試験終了時まで生存し、病理組織学的検査に用いることができる6羽を得るのに十分な数の動物を用いなければならない。

(2) 試験群の設定

被験物質投与群

- ア 少なくとも3段階の用量設定による投与群を設ける。
- イ 最高用量は毒性作用、可能な限り遅発性神経毒性がみられる用量で、かつ、動物が死亡したり著しい苦痛を示さない用量、最低用量は何ら毒性影響が認められない用量とし、かつ用量反応関係がみられるように各用量段階を設定する。
- ウ 用量設定に当たっては、急性遅発性神経毒性試験、その他の毒性試験の結果を考慮して設定する。また、用量設定の根拠を示すこと。
- エ 技術的に投与可能な最大量又は1,000mg/kg体重/日相当量で何ら毒性影響が認められない場合は、それ以上の投与量で実施する必要はない。

対照群

- ア 被験物質の投与を行わないこと以外、すべての点で被験物質投与群と同一の条件とする。
- イ 被験物質の投与に溶媒等を使用する場合には、投与溶媒量の最も多い用量群と同量の溶媒等の投与を行う。毒性に関する情報が十分に得られていない溶媒等を使用する場合には、さらに無処置対照群を加える。

6．試験動物の飼育上の注意

動物が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大きさの飼育ケージ又は柵を用いる。

7．観察及び検査

次の(1)～(3)の項目について行う。

(1) 一般状態の観察

すべての動物について投与直後から観察を始める。投与期間中及び最終投与終了後14日間又は計画屠殺されるまでの間、毎日少なくとも1回注意深く観察する。

すべての毒性徴候について、その種類、発現時期、程度及び持続期間を記録すること。運動失調は、4段階以上からなる判定基準に基づき評価するものとする。

病理学的検査に用いる動物は、少なくとも週2回ケージの外に出し、軽微な毒性影響が観察できるようにするため、一定時間の強制運動を行う。

瀕死動物は速やかに屠殺、剖検し、肉眼的病理学的検査を行う。

すべての動物について、初回投与前及び初回投与後は週に1回の割合で体重測定を行う。

(2) 生化学的検査

投与群及び対照群から無作為に選択した各6羽を、最終投与後72時間以内に屠殺し、脳及び腰脊髄を採取しNTE (neuropathy target esterase 又は neurotoxic esterase) 活性を測定する。

通常、投与群及び対照群の各3羽については、最終投与後24時間目及び48時間目に屠殺して、脳及び腰脊髄を採取する。

急性遅発性神経毒性試験又はその他の試験成績から、遅発性神経毒性誘発能を検出するのに、より適切な間隔が考えられる場合には、最終投与後の適切な時点で、2回、各3羽を屠殺して、脳及び腰脊髄を採取することが望ましい。

NTE活性測定に供した動物について、当該組織(脳及び脳脊髄)のアセチルコリンエステラーゼ活性を測定することは評価の助けとなる。

(3) 病理学的検査

計画殺及び切迫殺した全動物について、脳及び脊髄の外観観察を含む肉眼的病理学的検査を実施する。

試験終了時において生存する各群6羽以上の動物から採取した神経組織について病理組織学的検査を行う。

組織は、灌流固定その他適当な方法により固定する。

ア 切片には、小脳(中央縦断面)、延髄、脊髄及び末梢神経を含める。

イ 脊髄切片は、上頸部、中胸部及び腰仙部から採取する。

ウ 脛骨神経の近位部、遠位部及び分岐部並びに坐骨神経を採取する。

切片は、髄鞘及び軸索を適切な手法で染色する。