

## 急性神経毒性試験 (2 - 1 - 7)

## 1. 目的

本試験は、農薬の単回暴露による神経系への毒性の特徴を明確にし、その毒性変化の認められない最高投与量（無毒性量）に関する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等を目的とする。

## 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の動物、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

- (1) 被験物質の投与は、必要に応じて投与経路（経口、経皮又は吸入）を選択し行う。
- (2) 方法は急性経口毒性試験、急性経皮毒性試験又は急性吸入毒性試験に準じて行う。

## 4. 観察期間

被験物質を単回暴露後、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

試験に用いる動物数は、詳細な症状観察及び機能検査のために必要な各群雌雄各 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各群雌雄各 5 匹以上を得ること。

各群への動物の割付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。

最終的には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 対照群の他に少なくとも 3 段階の用量設定により投与群を設ける。

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こと。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 2,000mg/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 対照群としては、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条件の群を設ける。

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。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)～(4)の項目について実施する。

### (1) 一般状態の観察

全動物について、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。

全動物について投与開始前及び投与開始後少なくとも週1回、体重を測定する。

### (2) 詳細な状態の観察

対象となる各群雌雄各10匹以上の動物について、投与開始前、投与後8時間以内で最も影響が現れることが予想される時間、投与7日後及び14日後に行う。観察は、飼育ケージ内及び観察台上で行う。

観察は、項目毎に明確な判断基準と尺度基準を定めた採点法を用い、標準化された手順に従って行う。

検査は、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各10匹以上の動物について、投与開始前、投与後8時間以内で最も影響が現れることが予想される時間、投与7日後及び14日後に行う。

検査は、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、固有受容器刺激等)に対する感覚運動反応、握力及び自発運動量(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、学習・記憶に関する試験を実施する。

### (4) 病理学的検査

対象となる各群雌雄各5匹以上について、病理組織学的検査を行う。

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か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、他の毒性試験成績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。

まず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。

検査は、通常、以下の組織について行う。

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、  
脊髄の頸膨大と腰膨大、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）と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、横断面と縦断面の両方を含める。