

急性遅発性神経毒性試験(2-1-8)

1. 目的

本試験は、急性毒性試験成績その他の毒性試験成績又は既知の遅発性神経毒性を示す物質との化学構造上の相関から遅発性神経毒性を有することが予想される農薬について、その毒性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) 一般的な品種及び系統の雌のニワトリを用いる。
- (2) 月齢8～12か月の標準的な大きさの若齢成鶏を用いることが望ましい。
- (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) 強制による単回経口投与とする。
- (2) 被験物質が液体の場合は、原液により、又は適切な溶媒に溶解した上で投与する。
- (3) 被験物質が固体の場合は、可能な限り溶解した上で投与する。

4. 観察期間

被験物質の投与後、21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

- ① 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るものとする。
- ② 陽性対照群は、生化学的検査に必要な3羽及び病理組織学的検査に必要な3羽を得るのに十分な数の動物を用いるものとする。

(2) 試験群の設定

① 被験物質投与群

予備試験で、死亡がみられない程度で可能な限り高い用量(最大非致死量)を定める。

被験物質は、2,000mg/kg体重/日相当量を上限として最大非致死量を投与する。

② 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ものとする。

③ 陽性対照群

既知の遅発性神経毒性物質(例えば、TOCP等)を用いて試験を実施する。最近の背景データがあれば、それを用いてもよい。

6. 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)の項目について実施する。

(1) 一般状態の観察

- ① すべての動物について、投与直後から観察を開始するものとし、最初の2日間は1日に数回、それ以降21日間又は計画屠殺されるまでの間は、毎日少なくとも1回注意深く観察する。
- ② あらゆる毒性徴候について、その種類、発現時期、程度及び持続期間を記録する。なお、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。
- ③ 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。
- ④ 瀕死動物は、排除・屠殺後、肉眼的病理学的検査を実施する。
- ⑤ すべての動物について、投与前及びそれ以降週1回、体重測定を行う。

(2) 生化学的検査

- ① 投与群及び対照群から無作為に選択した各6羽と陽性対照群の3羽を被験物質投与後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羽については被験物質投与後24時間目及び48時間目、陽性対照群の3羽については被験物質投与後24時間目に屠殺し、それぞれ脳及び腰脊髄を採取する。中毒症状から被験物質の排泄がきわめて緩徐であると判断される場合には、遅発性神経毒性誘発能を検出するのに最適な間隔を考慮し、投与後24時間目から遅くとも72時間目以内の間に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。
- ② 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活性の測定をすることが、評価の助けとなる。

(3) 病理学的検査

- ① 計画殺及び切迫殺したすべての動物について、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。
- ② 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実施する。
- ③ 組織は、灌流固定その他の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、遠位部及び分岐部と坐骨神経を採取する。
- ④ 切片は、髄鞘と軸索を適切な手法で染色する。