

平成 20 年度内閣府食品安全委員会委託調査事業

化学物質の発達神経毒性評価手法に関する 情報収集調査報告書

平成 21 年 3 月

財団法人 残留農薬研究所
茨城県常総市内守谷町 4321 番地

はじめに

この報告書は、内閣府食品安全委員会から財団法人残留農薬研究所（茨城県常総市内守谷町 4321 番地）に委託された平成 20 年度調査事業「化学物質の発達神経毒性評価手法に関する情報収集調査」の調査結果を取りまとめたものである。

発達神経毒性は、米国等において、神経毒性/遅発性神経毒性試験及び繁殖/発生毒性試験で神経系の症状、病理変化、奇形等が見られた場合に、胎児、新生児への影響を見るために行われており、国際的にも評価項目として重要視されており、食品安全委員会においても適切に評価すべき項目である。

農薬の発達神経毒性試験に関するテストガイドラインは、米国 EPA では 1998 年 (OPPTS 876.6300) に、OECD では 2007 年 (TG#426) に制定されているが、現在、日本国内においては制定されていない。

化学物質の食品健康影響評価を行う上で、諸外国における発達神経毒性試験に関する知見、情報を把握することが必要不可欠であるが、米国 EPA、OECD 双方のガイドラインには、少なからず相違点があり、比較検討等を行う必要がある。

また、試験により得られた結果をどのように評価・判定し、ヒトにおける食品健康影響評価に用いるのかということは大きな課題である。

加えて、発達神経毒性に関する用語等を整理し、試験実施から食品安全委員会における評価に至るまで、共通化を図ることも必要である。

本調査は、上記の点を考慮して、神経毒性が疑われる化学物質の食品健康影響評価を行う上で必要な発達神経毒性評価手法に関する知見、情報を収集、整理し、取りまとめ、発生から哺育段階の神経系の発達に及ぼす化学物質の影響を評価する手法の策定に活用することを目的とした。

報告書作成及び調査分担担当者

報告書作成者：

原田孝則 財団法人残留農薬研究所 理事（毒性部担当）

ガイドライン翻訳担当者：

首藤康文 財団法人残留農薬研究所 毒性部神経毒性研究室長

靱島淳子 財団法人残留農薬研究所 毒性部神経毒性研究室研究員

米国現地調査担当者：

原田孝則 財団法人残留農薬研究所 理事（毒性部担当）

疫学的文献調査担当者：

桑原真紀 財団法人残留農薬研究所 毒性部病理研究室主任

高橋尚史 財団法人残留農薬研究所 毒性部病理研究室研究員

富田真理子 財団法人残留農薬研究所 毒性部病理研究室研究員

報告書校閲者：

鈴木勝士 日本獣医生命科学大学獣医生理学教室教授

成田正明 三重大学大学院医学系研究科教授

目次

	頁
表紙 -----	1
はじめに -----	2
報告書作成及び調査分担担当者 -----	3
目次 -----	4
1. 調査の概要 -----	5
2. 米国環境保護庁 (EPA) の発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳 -----	9
3. 経済協力開発機構 (OECD) の発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳 -----	22
4. 米国 EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの比較 -----	52
5. 米国 EPA での発達神経毒性試験に関する現地調査 -----	59
6. 化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査 -----	69
7. 参考文献・資料 -----	90

1. 調査の概要

調査の要約

本調査では、米国環境保護庁 (EPA) 及び経済協力開発機構 (OECD) の発達神経毒性 (Developmental neurotoxicity, DNT) 試験に関するテストガイドラインを翻訳するとともに両ガイドラインの違いについて比較検討した。加えて、米国 EPA を訪問し、ガイドラインに準拠して過去に実施された DNT 試験数及び化合物名を確認し、これらの化合物のリスクアセスメントにおける問題点、例えば DNT 試験の感受性、DNT 検出のための信頼性の高い有効なパラメーター、DNT 試験の一日摂取許容量 (ADI) 及び安全係数 (Safety factor) 設定への影響等について、意見交換を行った。また、化学物質による発達神経毒性に関する最新の疫学的文献調査も行った。以下に本調査結果の概要を述べる。

EPA (OPPTS 870.6300) と OECD (TG 426) の DNT 試験ガイドラインの比較では、OECD のガイドラインは、基本的に EPA のガイドラインを踏襲しているが、最終化されたのは 2007 年であり、EPA のガイドラインの制定時期 (1998 年) に比べ 10 年近く開きがあり、その間に実施された数多くの DNT 試験に関する試験方法・技術・評価法について国際的バリデーションを通じ見直されたことから、細部にわたり改善が加えられている。この改善点の中でも、投与期間が延長されたことと新生児に対する各検査項目のサンプル数 (検索例数) が増えたことの意義は大きく、試験の信頼性及び再現性に大きく寄与している。従って、現時点では化学物質の発達神経毒性を検出する試験法としては EPA ガイドラインよりも OECD ガイドラインの方がより優れていると判断される。EPA も同様な認識で、近い将来 OECD ガイドラインに準じた EPA のガイドライン (OPPTS 870.6300) の修正版を出すべく準備を進めている。ただし、OECD ガイドラインは細部にわたり改善された分、試験方法が複雑になり、煩雑な側面を有し、試験実施機関の現場にとっては多大な労力が要求されることは否めない。

過去に米国 EPA (OPPTS 870.6300) あるいは OECD (TG 426) の DNT 試験ガイドラインに準拠して実施された DNT 試験数は 110 試験あり、対象被験物質の数は 103 物質 (医薬、農薬、産業化学物質、溶媒等を含む) に及ぶ。これらの試験結果の評価において、再現性及び信頼性という観点からは EPA ガイドラインよりも OECD ガイドラインに準拠した試験の方がより優れており、特に各検査項目のサンプル数が増えたことにより統計学的信頼性が高まり、計測病理学的解析においてもサンプル数が各群各性あたり 6 例から 10 例に増えたことによる効果大きい。DNT 試験における毒性評価のエンドポイントとしては、神経機能学的あるいは神経病理学的観点から様々なパラメーターが設定されており、無毒性量 (NOAEL) の設定根拠として採択された変化は自発運動量、学習・記憶能力、聴覚性驚愕、

コリンエステラーゼ阻害、脳重量、脳計測病理など様々で化合物によって異なるが、計測病理学的解析結果は信頼性の高い指標のひとつとして評価されている。また、有機リン剤あるいはカーバメート系農薬の場合ではコリンエステラーゼ (ChE) 活性阻害が有力な指標として挙げられている。

米国 EPA ガイドラインに準拠し DNT 試験が実施され、その試験成績が EPA (Office of Pesticide Programs) に提出された農薬の数は 2006 年 8 月段階で 69 剤あり、今までに他の試験成績を含め総合的に評価が完了したものは 58 剤で、その中で DNT 試験結果が ADI あるいは急性参照量 (ARfD) に反映されたものは 8 剤 (8/58)、ADI 設定に影響を及ぼしたものは 4 剤 (4/58) であった。元来 DNT 試験は成人に比べ感受性が高いとされる乳幼児・子供への影響を考慮した試験であるが、この結果から判断すると、DNT 試験の感受性は他の既存の試験に比べ必ずしも高いとは言えない。この点について EPA は、「試験目的と用量設定の異なる試験間で単に無毒性量 (NOAEL) の値を比較することにより感受性を論じるのは、不適切であり、他の反復投与試験に比べ曝露期間が短いことを考慮すれば、むしろ感受性は高いと言える」という見解を示している (Dr.Makris)。ただし、DNT 試験における NOAEL はあくまでも母動物に対する曝露量で決定されており、胎児あるいは新生児に対する実際の曝露量 (経胎盤あるいは経母乳曝露量) に基づいたものではないことが問題点として挙げられる。この点 (経胎盤あるいは経母乳曝露量の算出) については DNT 試験の実施根拠とされる発生毒性試験 (催奇形性試験) 及び繁殖毒性試験においても同様な問題として残されており、今後の検討課題であろう。特に被験物質に対する幼若動物と成熟動物との感受性の差を比較する場合には、この経胎盤及び経母乳曝露量 (体重 kg 当たりの曝露量) の算出は、極めて重要な評価指数となり得る。

米国 EPA では、食品中の残留農薬の乳幼児・子供への健康影響を配慮した食品品質保護法 (FQPA) に基づき 1996 年 8 月 3 日付けで有効であった農薬の許容値及び規制免除を見直すべく既存のデータの再評価を進めている。その結果、発生毒性 (催奇形性) 試験や繁殖毒性試験データにより乳幼児・子供への影響が示唆された場合には、DNT 試験の追加実施を要求し、そのようなデータがない段階では通常的安全係数 (Safety factor) 100 倍に加え、さらに 10 倍の不確実係数 (Uncertainty factor) を掛け 1000 倍としている。ただし、DNT 試験データやその他の信頼できる科学的データが新たに入手され、ヒトへの安全性 (特に乳幼児・子供に対する安全性) が担保できると判断される場合には、その内容に応じケースバイケースで 3 倍あるいは 1 倍に追加係数が軽減される方向にある。

DNT 試験結果のヒトへの外挿性に関しては、同じ被験物質でも動物種間で結果が異なり、また、ヒトと実験動物では神経行動発達の次元が機能的あるいは構造的（形態的）にも著しく異なることから、現時点では未だ外挿性を評価するに十分な科学的データは得られていない。特にヒトでみられる注意欠陥多動性障害、学習障害あるいは自閉症などの発達障害は実験動物モデルにおいて再現することは極めて困難であると言われている。しかしながら、米国 EPA では乳幼児・子供への影響が懸念される環境化学物質は可能な限り排除しようとするスタンスで DNT 試験の実施を推奨している。

疫学的調査では、種々の環境化学物質（水銀、PCB、カドミウム、ヒ素、農薬等）と乳幼児・子供の発達神経障害との因果関係について調査が進められており、有機水銀、PCB、鉛については発達神経系への影響を示唆する所見が得られている。農薬においても有機リン剤、カーバメート、ピレスロイドなど殺虫剤を主体に調査が進められているが、調査内容によって結果が異なり、発達神経障害との因果関係については未だ確証は得られていない。

2. 米国環境保護庁 (EPA) の発達神経毒性試験 ガイドライン OPPTS 870.6300 (1998) の翻訳

米国 EPA の発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳

翻訳対象：EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, EPA712—C-98-239, August 1998

緒言

このガイドラインは、米国環境保護庁 (EPA) の the Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances によって開発された一連のテストガイドラインのひとつであり、農薬と毒性物質の試験に使用するため、且つ連邦条例に基づく審査（レビュー）を受けるため当局に提出されなければならない試験データを作成するためのものである。

The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS) は、the Office of Prevention, Pesticides and Toxic (OPPT) 及び the National Technical Information Service (NTIS) で出版されている the Office of Pesticide Programs (OPP) の 40, Chapter I, Subchapter R of the Code of Federal Regulations (CFR) 及び経済協力開発機構 (OECD) によって公開されているガイドライン及び要求の融和過程を通してこのガイドラインを開発してきた。

これらのガイドラインを一連の OPPTS ガイドラインにおいて調和させる目的は、the Toxic Substances Control Act (15 U.S.C. 2601) 及び the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (7 U.S.C. 136, et seq.) に基づいた米国環境庁の要求データに適合する必要がある試験実施方法の間のばらつきを最小限にするためである。

最終ガイドラインの公開：本ガイドラインは、ディスクあるいは印刷物で、the U.S. Government Printing Office, Washington, DC 20402 on disks or paper copies: call (202) 512-0132 より入手可能である。本ガイドラインは、また、EPA のウェブサイト (<http://www.epa.gov/epahome/research.htm>) の Researchers and Scientists/Test Methods and Guidelines/OPPTS Harmonized Test Guidelines からでも PDF (portable document format) 電子ファイルで入手できる。

OPPTS 870.6300 発達神経毒性試験ガイドライン

(a) 範囲

(1) 適用性

このガイドラインは、the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) (7 U.S.C. 136, et seq.) 及び the Toxic Substances Control Act (TSCA) (15 U.S.C. 2601) 双方の試験要求に適合するように意図されている。

(2) 背景

この調和された OPPTS テストガイドラインの開発に用いられた元資料は、OPP 83-6 Developmental Neurotoxicity Study (Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F--Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals, Addendum 10, EPA report 540/09-91-123, March 1991) である。

(b) 目的

ある化学物質あるいは混合物（被験物質）の毒性学的特徴を評価し検索する場合、発達神経毒性への潜在的な影響を明らかにすることは重要である。この試験は、妊娠期と授乳期の母動物への曝露の結果、その児動物に生じる神経系に対する潜在的な機能及び形態上の障害に関するデータを示すために計画されている。

(c) 試験方法の原則

被験物質は妊娠期及び哺乳初期の間、1 群につき 1 用量を設定した数群の妊娠動物に投与される。児動物は神経毒性評価のために産児（腹）の中から無作為に選抜される。評価には、肉眼的神経学及び行動学的異常を検出するための観察を含む評価、運動量の測定、聴覚性驚愕反応、学習の判定、神経病理学的評価、及び脳重量を含む。この試験計画は、独立した試験として標準的な発達毒性試験及び/または成獣の神経毒性試験の補足 (follow-up) に、もしくは二世世代繁殖試験の一部として第二 (F2) 世代の児の評価に用いてもよい。

(d) 試験手順

(1) 試験動物の選択

(i) 動物種と系統

試験はラットで実施すべきである。Fischer344 系は、他の発達及び繁殖毒性試験におい

てより一般的に用いられる系統と比較して、発達指標に時期的違いがあるため使用しない方がよい。委託者が Fischer344 ラット、あるいはラット以外の哺乳類の使用を希望した場合には、この選択に対する十分な正当性・理由づけが必要である。

(ii) 日齢

使用動物は若齢成獣（未経産の雌）を使用する。

(iii) 性

用量毎に妊娠雌を使用する。

(iv) 使用動物数

(A) 神経毒性評価にとって十分な数の児動物の産出を保証するために、十分な数の妊娠ラットに被験物質を曝露することが目的である。用量毎に、少なくとも 20 腹を推奨する。

(B) 生後 4 日に、各腹の児の数を、できる限り、雄 4 匹、雌 4 匹になるように哺乳児を無作為に選抜して間引くことによって調整する。腹ごとの各性の哺乳児の数が 4 匹ずつにならない場合は、多少の修正を許可する（例えば、雄 5 匹及び雌 3 匹）。1 腹の哺乳児の数が 7 匹以下の場合は検査に適しない。小さい児だけを除くことは適切ではない。腹あたりの児動物数の標準化後に、各哺乳児の個体識別をする。識別に用いる方法については、本ガイドラインの (f)(1) 項に示す。

(v) 行動学的試験、脳重量、神経病理学的検索への動物配分

腹あたりの児動物数の標準化後に、各腹から雄 1 匹あるいは雌 1 匹の哺乳児（各用量につき合計雄 10 匹、雌 10 匹）を、離乳時及び成獣における次の検査のうち一つに無作為に割り当てる：運動量、聴覚性驚愕、学習及び記憶。

生後 11 日に、各腹から雄 1 匹あるいは雌 1 匹（各用量につき合計雄 10 匹、雌 10 匹）を屠殺する。これらの全哺乳児の脳重量を測定し、そのうち 6 匹/性/用量を神経病理学的検索に選択する。試験終了時に、各腹から雄 1 匹あるいは雌 1 匹（各用量につき合計雄 10 匹、雌 10 匹）を屠殺し、脳重量を測定する。別の 6 匹/性/用量（1 腹につき雄 1 匹あるいは雌 1 匹）を神経病理学的検索のために、試験終了時に屠殺する。

(2) 対照群

同時に設定する対照群を要求する。この群は処置対照群もしくは、被験物質投与に際して溶媒を使用する場合は溶媒対照群となる。溶媒は発達毒性及び繁殖に及ぼす作用を持たないものとする。対照群の動物は検査群の動物と同一の方法で扱う。

(3) 用量及び投与の選択

- (i) 少なくとも 3 用量の被験物質に加えて対照群 (溶媒を用いる場合は、溶媒対照群) を用いる。
- (ii) 標準的な発達毒性試験あるいは予備試験で発達毒性が認められた被験物質の場合、最高用量は、神経毒性の意味のある評価を不可能にするのに十分な、子宮内あるいは新生児死亡または奇形を生じない最大用量とする。
- (iii) 標準的な発達毒性試験が実施されていなかった場合、その物質の物理化学的性質または生物学的特性による制限がない限り、最高用量は、母動物にある程度明らかな毒性を引き起こすものの妊娠期と授乳期において 20%を越える体重の減少を生じてはならない。
- (iv) 最低用量は、母動物あるいは発達神経毒性いずれについても、肉眼的に観察できるいかなる所見も生じさせてはならない。
- (v) 中間用量は、設定した最高用量及び最低用量の間が等間隔でなければならない。

(4) 投与期間

妊娠 0 日は、腔栓及び/あるいは精子が観察された日である。投与期間は妊娠 6 日から生後 10 日に及ぶ。児動物を完全に分娩していない動物について、分娩日に投与を行ってはならない。

(5) 被験物質の投与

被験物質または溶媒は経口的に投与する。その選択に十分な正当性/理由付けがあれば、場合によって他の投与経路も容認する。直近の体重値に基づいて、被験物質あるいは溶媒を投与する。

(6) 母動物の観察

- (i) 母動物の肉眼的検査は、少なくとも 1 日 1 回毎日の投与前に実施する。
- (ii) 各群につき 10 匹の母動物は、妊娠中の投与期間 (6 日-21 日) に少なくとも 2 回、哺乳中の投与期間 (1 日-10 日) に 2 回、ホームケージの外で毒性症状を観察する。動物は、投与内容について知らされていない訓練された専門家によって、観察者間の信頼性を最大にするために標準化した手順を用いて観察される。可能であれば、1 つの試験において動物を評価する観察者は、同じ人物であることが望ましい。不可能であれば、何らかの形で、観察者間の信頼性を示すことが要求される。
- (iii) (d)(6)(ii) 項の投与及び観察期間中の観察に含む：
 - (A) 自律神経機能の症状の評価は以下を含むが、これらに限定しない：

- 1) 症状なしから重度までの範囲の尺度スコアを用いて、流涙及び流涎の度を順位付けする。
 - 2) 立毛及び眼球突出の有無。
 - 3) 多尿と下痢を含む、排尿と排糞の順位付けあるいは回数。
 - 4) 光に対する瞳孔の収縮あるいは瞳孔径の測定のような、瞳孔機能。
 - 5) 眼瞼閉鎖の度、例；眼瞼下垂。
- (B) 痙攣、振戦あるいは異常な動きの記述、頻度及び程度。
- (C) 姿勢及び歩行異常の記述及び頻度。
- (D) あらゆる奇妙あるいは異常な行動、反復動作 (常同)、削瘦、脱水、筋緊張低下あるいは筋緊張亢進、被毛の変化、眼、鼻あるいは口周囲の赤色もしくは固形状の付着物、及びデータの解釈を容易にする可能性があるその他の観察の記述及び頻度。
- (iv) 毒性症状は、出現時期、程度、及び持続期間を含め、観察された通りに記録する。
- (v) 少なくとも毎週、及び分娩日と生後 11 日と 21 日 (離乳日) に動物の体重を測定し、その値を記録する。
- (vi) 産児の分娩日を記録し、生後 0 日とする。

(7) 試験の実施

(i) 児動物の観察

- (A) 全ての児動物は、少なくとも毎日ケージサイドで死亡あるいは瀕死など病的状態の有無について肉眼的に検査する。
- (B) 各群につき合計雄 10 匹、雌 10 匹の児動物について、生後 4、11、21、35、45 及び 60 日にケージ外での毒性症状を検査する。児動物は、投与内容について知らされていない訓練された専門家によって、観察者間の信頼性を最大にするために標準化した手順を用いて観察される。可能であれば、1 つの試験において動物を評価する観察者は、同じ人物であることが望ましい。不可能であれば、何らかの形で、観察者間の信頼性を示すことが要求される。最低限、このガイドラインの (d)(6)(iii) 項で概説された評価項目 (end point) は、観察している発達段階に対して適正に調査する。
- (C) 児動物におけるあらゆる肉眼的症状は、出現時期、程度、及び持続期間を含め、観察された通りに記録する。

(ii) 発達指標 (Developmental landmarks)

出生児あるいは直後及び生後 4、11、17、及び 21 日と、その後は少なくとも 2 週に 1 回、生存哺乳児数を数えて、同腹の各哺乳児の体重を個体別に測定する。臍開口と包皮分離の時期を判定する。これらの判定のための一般的な手順は、本ガイドライン (f)(1) 及び

(f)(11) 項に示す。

(iii) 自発運動量

自発運動量は、生後 13、17、21、及び 60 日 (± 2 日) に特に計測する。自発運動量は自動記録装置で計測されなければならない。その装置は活動性の増加と減少の双方を検出する能力がなくてはならない (すなわち、その装置で測定した基礎運動量は、運動量減少の検出が妨げられるほど低くてはならないし、また運動量の増加の検出が妨げられるほど高くてはならない)。各装置は、可能な範囲で、装置間及び各装置における測定日間の操作の信頼性を保証するため、標準的手順によって検査されなければならない。さらに、処置群間では装置間における均衡をとらなければならない。各動物は個別に検査する。検査期間は、無処置対照動物の検査期間において、運動量が最終的に 20%レベルの漸近に達するのに十分な長さとする。全ての検査期間は、同一の継続時間とする。処置群間は検査時間の均衡をとる。運動量のカウント数は、10 分間を越えない同じ時間間隔で集積する。検査条件のばらつきを最小にし、処置に対して意図的な関連がないことを保証するように努める。自発運動量に影響する変数の中には、騒音レベル、検査用ケージの大きさと形状、室温、相対湿度、照明条件、臭気、ホームケージ又は別の新しい検査用ケージの使用、環境の変化等が含まれる。自発運動試験の実施についての追加情報は OPPTS 870.6200 において入手できる。

(iv) 聴覚性驚愕検査

聴覚性驚愕馴化検査は、離乳前後の哺乳児及び 60 日前後に実施する。実施日には、処置群及び対照群を通して均衡をとる。本検査実施の詳細については、本ガイドライン (f)(1) 項において入手できる。聴覚性驚愕の課題の実施において、10 試行から成る各ブロック (各検査日におけるセッションにつき 10 試行を 5 ブロック) の平均反応強度を算出する。前刺激抑制 (prepulse inhibition) は要求しないが、強く推奨する。本検査実施の詳細については、本ガイドライン (f)(10) 項において入手できる。

(v) 学習及び記憶検査

連合学習及び記憶検査は、離乳前後及び 60 日前後に実施する。実施日には、処置群及び対照群を通して均衡をとる。これらの発達の 2 段階で同一あるいは別個の検査を用いることができる。離乳時と成熟ラットにおける学習及び記憶検査の選択については、ある程度の柔軟性が許される。しかしながら、検査は 2 つの基準を満たすように計画されなければならない。第 1 に、訓練経験の非連合作用について制御する条件に基づいて、何回かの反復学習試行またはセッションにわたる変化としてあるいは単回試行を含む検査においてのいずれかで、学習を評価する。第 2 に、検査は、本来的な学習(獲得)に加えて、

記憶(短期あるいは長期)の何らかの測定を含む。学習及び記憶検査で被験物質の影響が示された場合は、感覚、情動、及び/あるいは運動能力の変化に基づく変化の説明を排除するための追加検査実施が、委託者の最高の利益になるだろう。上記の 2 基準に加えて、調査している化合物類に対して感受性を示すという文献がある場合には、それに基づく学習及び記憶検査の選択を要求する。このような情報がない場合の上記基準を満たす検査例：位置遅延見本合わせ、成熟ラットについて (本ガイドライン (f)(3) 項参照) 及び幼若ラットについて (本ガイドライン (f)(9) 項参照) 記載；嗅覚条件付け、成熟ラットについて本ガイドライン (f)(13) 項に記載；スケジュール制御行動の獲得及び維持(本ガイドライン (f)(4) 及び (f)(5) 項参照)。追加検査は、離乳ラットに対しては本ガイドラインの (f)(20) 及び (f)(12) 項、成熟ラットに対しては本ガイドラインの (f)(16) 項に示す。

(vi) 神経病理学的検査

神経病理学的検索は、生後 11 日及び試験終了時の動物で実施する。11 日齢では、全ての腹から取り出した児動物を合わせて雄雌同数になるように、各腹から雄あるいは雌の哺乳児を 1 匹取り出す。これらのうち、各群につき雄 6 匹及び雌 6 匹の哺乳児を、神経病理学的解析のために屠殺する。哺乳児は炭酸ガス曝露によって屠殺し、その直後に脳を摘出して秤量し、適切なアルデヒド系固定液を用いて浸漬固定する。残りの動物は、同様に屠殺し、その直後に脳を摘出して秤量する。試験終了時に、各腹から雄 1 匹あるいは雌 1 匹を炭酸ガス曝露によって屠殺し、その直後に脳を摘出して秤量する。さらに、各群各性 6 匹の動物(各腹から雄あるいは雌 1 匹)を神経病理学的検索のために、試験終了時に屠殺する。試験終了時に屠殺した動物の神経病理学的解析は OPPTS 870.6200 に準じて実施する。生後 11 日及び試験終了時に屠殺した動物の神経病理学的検索には、定性的解析及び半定量的解析と共に簡単な形態計測を含む。

(A) 生後 11 日の動物の組織標本の固定と処理

摘出直後に脳を秤量し、適切なアルデヒド系固定液を用いて浸漬固定する。脳は、本ガイドラインの (f)(6)、(f)(14)、(f)(17) 及び (f)(21) 項に基づいて標準化して公表された組織学的手順に従って後固定及び処置をする。パラフィン包埋も認めるが、プラスチック包埋が望ましく推奨する。組織ブロック及びスライドは、保管時に適切な識別をする。組織切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは、本ガイドラインの (f)(2)、(f)(18) 及び (f)(23) 項に基づいて標準化して公表された手順に従って同様の染色を行う。試験終了時の屠殺動物に対する組織標本の固定及び処理方法は、OPPTS の (e)(4)(v)(A) 項に規定する。

(B) 定性的解析

定性的検査の目的は 3 つある—神経病理学的変化の徴候を示す神経系内の部位を同定すること、被験物質曝露の結果としての神経病理学的変化の種類を同定すること、及び神経病理学的変化の程度の範囲を決定することである。組織標本からの代表的な組織切片は、神経組織学的変化の徴候について適切に訓練された病理学者によって、顕微鏡学的に検査される。定性的解析のために、次の段階的な手順を推奨する。初めに、高用量群からの切片を対照群の切片と比較する。高用量群の動物に神経病理学的異常の徴候が認められない場合は、更なる解析は求めない。高用量群の動物に神経病理学的異常の徴候が認められる場合は、中用量群及び低用量群の動物についても検査する。専門的な判断及び観察された神経病理学的変化によっては、神経病理学的変化が認められる最低用量を決定するために、より標準的な染色法と組み合わせてボディアーンあるいはビールン・ヨースキー銀染色、及び/あるいはグリア線維性酸性タンパク (glial fibrillary acid protein) に対する免疫組織化学法の使用を推奨する。生後 11 日の哺乳児の検索については、本ガイドラインの (d)(7)(vi)(B)(1) 及び (d)(7)(vi)(B)(2) 項に記載する。試験終了時の屠殺動物についての検査する部位及び変化の種類は、OPPTS870.6200 の (e)(4)(iv)(B) 項を確認して評価する。

1) 検査部位

脳については、投与関連の神経病理学的変化のいかなる徴候についても検査し、完全な検査を保証するために全ての主要な脳領域から十分な標本を採取する (例、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)、脳幹及び小脳)。

2) 変化の種類

脳への発達障害の徴候に対する神経組織学的検索のガイダンスは、本ガイドラインの (f)(8) 及び (f)(22) 項で見ることができる。更により典型的な種類の細胞変化 (例えば、神経の空胞化、変性、壊死) 及び組織変化 (例えば、星状膠細胞の増殖、白血球浸潤、及びのう胞形成) に加えて、以下を含む発達障害を示唆する構造的変化に注意を払うことが特に重要だが、これらに限定しない：

- i) 例えば大脳半球の大きさあるいは小脳の正常な葉化パターンの変化のような、脳領域の大きさや形の肉眼的変化。
- ii) 核濃縮細胞や異所性ニューロン (ectopic neuron) で示されるような神経前駆細胞 (neuronal precursors) の死滅、異常増殖、あるいは異常な細胞移動、あるいは増殖活性化及び移動層の部位における肉眼的変化、過渡的な発達構造の変化 (例えば、小脳の

外顆粒層、本ガイドラインの (f)(15)項参照)。

iii) 異常な細胞分化は、特殊染色下でより明白になるが、細胞体の収縮及び変形によっても示される。

iv) 水頭症、特に脳室の拡大、大脳水道の狭窄及び全般的な大脳半球の菲薄化。

(C) 主観的診断

定性的検査において何らかの病理組織学的変化の徴候が認められた場合は、用量-反応関係の評価を目的として主観的診断を実施する。本解析には、神経病理学的変化を示す全ての脳部位が含まれる。全用量群からの各部位の切片を処置についてコード化し、無作為順で検査する。各種類の頻度及び各病変の程度を記録する。全ての部位を含む全ての用量群からの全ての切片を評価した後に、コードを解いて用量-反応関係の評価するために統計的解析を実施する。認められた用量関連の各種病変について、重篤度の範囲の差違の例を記述する。その例は、病変部位が極軽微～極重度までの重篤度の程度に対して 1+、2+、及び 3+の様な評価尺度で表して供する。

(D) 単純な形態計測解析

発達過程の攪乱は、時には特定の脳部位の成長の割合あるいは長さにおいてより明確に反映されるため、脳の構造的発達を評価するために、生後 11 日及び試験終了時に幾つかの形状の形態計測解析を実施する。最低限これは、新皮質、海馬及び小脳の代表的な位置における主要な層の厚さの確実な評価から成る。このような計測に関するガイドラインは、本ガイドラインの (f)(19) 項における Rodier and Gramann を参照のこと。

(e) データ収集、報告及び評価

以下の特有情報を報告する：

(1) 試験系と試験方法の記述

全般的な実験計画を規定する。これには以下が含まれる：

- (i) 使用された観察と手法の標準化に加えてスコアリングの操作定義について手順の詳細。
- (ii) 使用している手法の感受性を示す、試験を実施している機関からの陽性対照データ。これらのデータは出生前に曝露した試験からのものである必要はない。しかしながら、その試験機関は、周産期に化学物質の曝露を受けた新生児における影響評価の能力を示し、適切な日齢群に対する検査基準を確立しなければならない。
- (iii) 装置の較正と同等性を保証する手順及び検査手順における投与群間の均一化。
- (iv) 専門的判断を含むあらゆる判定を説明する簡潔な理由。

(2) 結果

以下の情報は、各投与群及び対照群毎に整理しなければならない：

(i) 以下に示す各動物のデータを表形式で備えなければならない：

- (A) 識別番号及び生まれた腹。
- (B) 各観察時点における体重と各発達指標のスコア。
- (C) 各測定日におけるセッション合計運動量及びセッション内での小計。
- (D) 各測定日におけるセッション合計聴覚性驚愕反応強度及びセッション内での強度。
- (E) 各測定日における獲得及び維持スコアが示す学習及び記憶検査の各反復試行（あるいはセッション）に対する適切なデータ。
- (F) 死亡時期及び死因（可能なら）；観察されたあらゆる神経学的症状；構造検査の一覧に加えて病変の位置、性質、頻度、及び程度；及び脳重量。

(ii) 妥当であれば、以下のデータも供する。

- (A) 観察された神経病理学的変化の種類及び程度の典型例を示す顕微鏡写真の添付を推奨する。
- (B) 自然発生性の疾患あるいは状態を含む、神経学的症状及び病変から派生したあらゆる診断も記録する。

(iii) 各投与群と対照群の要約データを含まなければならない：

- (A) 検査開始時の動物数。
- (B) 妊娠及び哺乳中の母動物の体重。
- (C) 産児数と出生時の平均体重。
- (D) 各観察時点における各症状の異常を示した動物の数。
- (E) 各観察時期における各症状の異常を示した動物のパーセンテージ。
- (F) 各観察時点における各連続性の評価項目に対する平均値及び標準偏差。これらには、体重、自発運動量、聴覚性驚愕反応、学習及び記憶試験の成績、局所の脳重量及び全体の脳重量（絶対と相対いずれも）が含まれる。
- (G) 病変が認められた動物数。
- (H) 各種異なった病変毎の発症動物数、各動物に対する各種病変の位置、頻度及び平均重篤度。
- (I) 投与群にリストされた各動物に対して実施した全ての形態計測値。

(3) データの評価

試験結果の評価を行わなければならない。評価には、被験物質の用量とあらゆる神経毒性作用の発現あるいは欠如、頻度、及び程度との関連性を含む。評価には、適切な統計解析

を含む。解析法の選択は、試験計画に適した検定法及び多重比較に対する調整の必要性を考慮する。認められる場合には、評価には、観察された神経病理学的変化と行動学的変化間の関連性を含む。

(f) 参考文献

以下の文献はこのテストガイドラインにおけるさらなる背景情報を供与する。

- (1) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H. A., and Nelson, B.K. Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedures. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 7:579–586 (1985).
- (2) Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., and McNeil, J.H. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology* 51:71–97 (1976).
- (3) Bushnell, P.J. Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 10:237–244 (1988).
- (4) Campbell, B.A. and Haroutunian, V. Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *Journal of Gerontology* 36:338–341 (1981).
- (5) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., and Cox, C. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 71:342–352 (1983).
- (6) Di Sant Agnese, P. A. and De Mesy Jensen, K.L. Dibase staining of large epoxy tissue sections and application to surgical pathology. *American Journal of Clinical Pathology* 81:25–29 (1984).
- (7) U.S. Environmental Protection Agency. Neurotoxicity Screening Battery. In: *Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F, Addendum 10*. EPA 540/09-91–123. NTIS PB 91–154617. (1991).
- (8) Friede, R. L. *Developmental Neuropathology*. Springer-Verlag, New York. pp. 1–23, 297–313, 326–351. (1975).
- (9) Green, R.J. and Stanton, M.E. Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behavioral Neuroscience* 103:98–105 (1989).
- (10) Ison, J.R. Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 6:437–445 (1984).
- (11) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., and Weiner, R.I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction* 17:298–303 (1977).
- (12) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., and Smotherman, W.P. (eds.) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando. pp. 11–37, 145–167. (1987).
- (13) Kucharski, D. and Spear, N.E. Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Developmental Psychobiology* 17:465–479 (1984).

- (14) Luna, L. G. (editor). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. (Third Edition). McGraw-Hill, New York. pp. 1–31. (1968).
- (15) Miale, I. L. and Sidman, R.L. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Experimental Neurology*. 4:277–296 (1961).
- (16) Miller, D.B. and Eckerman, D.A. Learning and memory measures. In: *Neurobehavioral Toxicology*, Z. Annau (ed). Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp. 94–149 (1986).
- (17) Pender, M.P. A simple method for high resolution light microscopy of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*. 15:213–218 (1985).
- (18) Ralis, H.M., Beesley, R.A., and Ralis, Z.A. *Techniques in Neurohistology*. Butterworths, London. pp. 57–145. (1973).
- (19) Rodier, P.M. and Gramann, W.J. Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehavioral Toxicology* 1:129–135 (1979).
- (20) Spear, N.E. and Campbell, B.A. (eds.) *Ontogeny of Learning and Memory*. Erlbaum, New Jersey. pp. 101–133, 157–224. (1979).
- (21) Spencer, P.S., Bischoff, M.C., and Schaumburg, H.H. Neuropathological methods for the detection of neurotoxic disease. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 743–757. (1980).
- (22) Suzuki, K. Special vulnerabilities of the developing nervous system to toxic substances. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 48–61 (1980).
- (23) Luna, L.G. (Editor). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. (Third Edition). McGraw-Hill, New York. pp. 32–46. (1968).

3. 経済協力開発機構 (OECD) の発達神経毒性 試験ガイドライン TG 426 (2007) の翻訳

OECD 発達神経毒性試験ガイドラインの翻訳

翻訳対象：OECD/OCDE,

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG 426) :

Developmental Neurotoxicity Study

緒言

1. 1995 年 6 月コペンハーゲンにて、繁殖及び発達毒性に関する OECD 作業部会は、繁殖及び発達毒性のために既存の OECD 試験ガイドライン更新の必要性について話し合った、そして評価項目に向かう新しいガイドラインの開発は未だに整備されていない (1)。作業部会は、発達神経毒性に対する試験ガイドラインは、その後改訂された米国 EPA ガイドラインを基準にして記載するべきと勧告した (2)。1996 年 6 月コペンハーゲンにおいて、第 2 回検討会では、発達神経毒性における次の主要な要素 (例：動物種選択に関する詳細、投与期間、試験期間、評価される項目、結果を評価する基準) を含む、新しいテストガイドラインの概要に関するガイダンスの事務局を準備するため開催された。米国神経毒性危険評価ガイドラインは、1998 年に公表された (3)。2002 年 10 月に OECD 専門家検討会及び ILSI Risk Science Institute Workshop は相次いで開催され、専門家検討会は 2005 年に東京で開催された。現試験ガイドラインと会議の勧告 (4)(5)(6)(7) に関連する科学的及び技術的問題点について話し合うために開催されたこれらの会議は、本テストガイドラインの開発において考慮された。本テストガイドラインの実施、解説及び専門用語に関する追加情報は “Reproductive Toxicity Testing and Assessment” (繁殖毒性試験と評価) に関する Guidance Documents No. 43 (8) 及び、“Neurotoxicity Testing” (神経毒性試験) における No.20 (9) を参照すること。

序説

2. いくつかの化学物質はヒト及びその他の動物種に発達神経毒性影響を及ぼすことが知られている (10)(11)(12)(13)。発達神経毒性誘発ポテンシャルの有無を決定するためには、化学物質または混合物 (“被験物質”) の毒性学的特性を検索し、確認する必要がある。発達神経毒性試験は、子宮内及び発育初期に化学物質に曝露された児動物の発達神経系における機能学的及び形態学的変化を検索し、用量相関性を含め、被験物質の毒性学的特徴を把握するのに必要なデータを提供することを目的にデザインされている。

3. 発達神経毒性試験は、通常個別の試験として実施されるが、繁殖毒性試験や成獣の神経毒性試験 (例 試験ガイドライン 415 (14), 416 (15), 424 (16)) あるいは胎児期の発達毒性試験 (例 試験ガイドライン 414 (17)) に組み込んだ併合試験としても実施できる。ただし、併合試験として実施する場合には、組み込まれた各試験の目的を十分に達成し得る内容の試験デザインが不可欠である。全ての試験は、実験動物の使用に対する適用可能な政府及び試験施設の倫理規定 (指針) に従う必要がある (例 18)。

4. 試験施設は、試験実施前に被験物質に関する全ての有効な情報を入手する必要がある。この情報には次のような物質の特性及び化学構造が含まれる；物理化学的性質；物質によるその他の *in vitro* または *in vivo* 毒性試験結果；化学構造に関連する物質による毒性データ；及び物質の予想される用法。この情報は、試験がヒトの健康保護に対して適切であるように、全ての配慮を満たすため必要であり、適切な開始用量の選択における手助けとなる。

試験の原則

5. 被験物質は母動物に対し妊娠及び授乳期間に投与される。母動物は妊娠期及び授乳期の投与影響を評価するために試験され、児動物への毒性影響との比較情報も提供する (母動物対児動物)。児動物は神経毒性評価のために産腹の中から無作為に選抜される。検索項目は、身体発達の評価、行動発生、自発運動、運動及び感覚機能、学習と記憶を含む総体的な神経及び行動学的異常を検出するための観察から成る；加えて生後の発達及び成熟期間における脳重量と神経病理学的評価を含む。

6. 個別の試験として本試験方法が実施される場合、各群における追加可能な動物は特定の神経行動、神経病理、神経化学または電気生理学的処置に供することができ、本ガイドラインで推奨された検査から得られたデータを補うことができる (16)(19)(20)(21)。経験的観察、予期された効果あるいは機序/行動様式が特定のタイプの神経毒性を示す場合、追加処置は特に有用である。これらの追加処置は、児動物同様、母動物について用いてもよい。加えて、これらの処置が完全な *in vivo* の処置を変更しない限り、*ex vivo* あるいは *in vitro* での処置を用いても良い。

試験の実施

動物種の選択

7. 試験動物はラットが好ましい；適切な場合には他の動物種を使用できる。ただし、本試

験ガイドラインにおける妊娠期間及び出生後の日は一般的に用いられる系統のラットで特有である。従って、異なる動物種あるいは特殊な系統を用いる場合には、対比できる日を選択する。他の動物種の使用には、毒性学、薬物動態学及び/またはその他のデータに基づく根拠が示されなければならない。正当であるという理由には、種特有の出生後の神経行動及び神経病理学的評価を含む。もしも試験初期に問題発生があったならば、問題が発生した動物種/系統について考慮する。異なる系統のラットでは反応特性が異なるので、供試した系統の適切な生産性及び反応性を有する証拠がなくてはならない。発達神経毒性を検出するために、他種の信頼性及び感受性について文書化する。

飼育管理条件

8. 実験動物室の温度は $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ とする。相対湿度は少なくとも 30% 及び動物室の洗浄時を除いて 70% を超えてはならず目標は 50-60% である。照明は人為的に、連続 12 時間の明期及び 12 時間の暗期とする。動物が通常は活動的な時刻として (22)、暗期 (赤色照明の下) に機能及び行動項目の評価を行う目的での交配前及び試験期間中の照明サイクルの逆転は可能である。明暗サイクルにおけるいかなる変更においても、新しいサイクルに動物が適応するための適切な馴化期間を含まなくてはならない。給餌には、通常の実験動物用飼料を不断給水と共に用いる。餌及び水の種類を報告し、いずれも汚染物質についての分析をする。

9. 動物は個別収容あるいは少数の同性で群飼する。交配処置はその目的に適したケージ内で行う。交配確認の後あるいは遅くとも妊娠 15 日以降は、交配動物を分娩あるいは妊娠用ケージに個別に収容する。ケージはケージ位置による影響の可能性が最小限になるような方法で配置する。分娩間近には、交配した雌に適切なそして規定された巣材を提供する。妊娠期間中における不適切なハンドリングまたはストレスが、胎児損失、胎児及び出生後の発達の変化を含む有害な結果を招く可能性があることは良く知られている。処置に無関係な要因による胎児損失を防ぐために、妊娠中の動物は注意深く取り扱い、過剰な外部の騒音のような外部因子からのストレスを避ける。

供試動物

10. 試験が他試験への組み込みでなければ (3 項参照)、施設環境に馴化させた以前に検査処置に供試していない健康な動物を使用する。試験動物は、種、系統、由来、性別、体重及び性別に関して特徴付ける。各動物には個体識別番号を割り当て標識する。全ての試験群の動物は、実行可能な程度で同一の体重及び年齢とし、試験における種及び系統の正常

範囲内でなければならない。未経産の若齢雌動物を各用量で使用する。兄妹交配をしてはならず、それを保証するために注意する。妊娠 (Gestation Day ; GD) 0 日は膣栓及び/または精子が観察された日である。妊娠動物を供給業者から購入する場合には、十分な馴化期間 (例 2-3 日) を考慮する。交配した雌は、偏りのない方法によって対照群及び処置群に割り当て、可能な限り群間で均一に配分する (例えば、体重値に基づくような、全ての群間へ均一に配分するための無作為化法を推奨する)。同じ雄によって受精された雌は、各群にわたって均等にする。

試験方法

動物数及び性別

11. 各試験群及び対照群には、神経毒性検索に適切な児動物数を確保するために、被験物質に曝露される十分な数の妊娠した雌を含む。各用量につき計 20 腹を推奨する。1 群あたりの産腹の合計数が達成された場合、繰り返し及び互い違い-群 (staggering-group) 投与の設計が可能になり、適切な統計学モデルが繰り返しに対する計算に用いられる。

12. 生後 (Postnatal Day ; PND) 4 日 (出生日は PND 0) あるいはそれ以前に、全ての腹が同一の同腹児数になるように、無作為選抜によって余剰哺乳児を除外して、各腹の匹数を調整する (23)。同腹児数は、使用するげっ歯類の系統における平均同腹児数を超えてはいけない (8-12)。産腹について雌雄の哺乳児を同数にすることはほぼ可能である。例えば体重に基づくような、児動物の選択的な除外は適切ではない。産腹の標準化 (淘汰) 以降、機能評価についての検査以前に、離乳前または離乳後の検査が予定されている個々の哺乳児は、児動物の識別のための適切な人道的方法を用いて、個体別に識別する (例 24)。

機能及び行動検査、脳重量、及び神経病理学的評価に対する動物の配分

13. ガイドラインは機能及び行動検査、性成熟、脳重量の測定、及び神経病理学的評価 (25) に対する子宮内及び経乳汁曝露された動物の配分については様々な手段を許容する。元来要求されている検査の完全性が損なわれない限り、神経行動機能 (例 社会行動)、神経化学または神経病理の他の検査をケース バイ ケースの原則に基づいて追加出来る。

14. 生後 4 日またはそれ以降に、哺乳児は各用量群から選抜され、評価項目の検索のために割り当てられる。哺乳児の選抜は、可能な範囲で、各用量群について各腹から両性を全検査において等しく提示されるように行う。同一ペアの雌雄の哺乳児の自発運動量を検査するために、全て離乳前の日齢で検査する (35 項参照)。全てのほかの試験について、同一

または別々の雌雄動物のペアを、異なる行動検査に割り当てることができる。これらの測定において年齢と以前の訓練による影響の混同を避けるために、離乳時と成熟期の認知機能検査については、異なる児動物を割り当てることが必要だろう (26)(27)。離乳時 (PND21) に、検査に選抜されなかった児動物は人道的に処分することができる。配分された哺乳児におけるいかなる変化も報告する。測定の統計学上の単位は腹 (または母動物) であり、哺乳児ではない。

15. 離乳前及び離乳後の検査、認知検査、病理検査などに対して児動物を割り当てるには異なる方法がある (図 1 一般的な計画及び付表 1 配分例参照)。離乳前及び離乳後検査のために各用量群について推奨される最小の動物数は以下の通りである。

臨床症状観察及び体重	全ての動物
詳細な臨床観察	20/性 (1/性/腹)
脳重量 (固定後) 生後 11-22 日	10/性 (1/腹)
脳重量 (未固定) ～生後 70 日	10/性 (1/腹)
神経病理 (浸漬固定または灌流固定) 生後 11-22 日	10/性 (1/腹)
神経病理 (灌流固定) ～生後 70 日	10/性 (1/腹)
性成熟	20/性 (1/腹)
その他の発達指標 (任意)	全ての動物
行動発生	20/性 (1/腹)
自発運動	20/性 (1/腹)
運動及び感覚機能	20/性 (1/腹)
学習及び記憶	10/性 ^{a)} (1/腹)

a) 認知機能検査の感受性が依存しているため、より多数の動物での実験を考慮すべきである。例えば 1 腹あたり雌雄各 1 匹 (動物の割り当は付表 1 参照)、さらに標本数についてのガイダンスは the Guidance Document 43 (8) に提供されている。

投与用量

16. 少なくとも 3 用量と同時に 1 つの対照を用いる。投与用量は毒性影響の変化を示すために、間隔をあける。被験物質の物理化学的性質または生物学的特性によって限定されなければ、最も高い用量はいくつかの母動物の毒性 (例 臨床症状、体重増加量抑制(10 %を超えない) 及び/またはある標的臓器における用量に限定した毒性徴候) の発現を目的として選択する。高用量は 1000 mg/kg 体重/day までに限定してよいが、いくつかの例外がある。例えば、ヒトにおいて予想される曝露が、高い用量を用いる必要性を示すかもしれない。

代わりとして、母動物に僅かな毒性を示す最高用量を決定するために、検討試験または予備的な用量設定試験を実施する。もしも被験物質が一般的な発達毒性試験または検討試験のいずれかにおいて発達毒性を示す場合、最高用量は、過剰な児動物の毒性、または子宮内あるいは新生児の死亡や奇形を誘発しない、神経毒性の意味のある評価を不可能にすることのない、最大の投与量とする。最低用量は、神経毒性を含む母動物または発達毒性のいずれにもいかなる所見も示さない。用量を下げる順は、いくつかの用量相関性の反応及び無毒性量 (No-Observed-Adverse Effect Level, NOAEL) を示すこと、またはベンチマーク用量の決定を可能にする検出限界に近い用量が認められることを見越して選択する。2-4倍の間隔は、下降する用量を設定するのにしばしば最適である、そして非常に大きな間隔(例えば、公比 10 を超える)を使用する際には 4 番目の用量の追加がしばしば望まれる。

17. 投与用量は、被験物質の代謝及び薬物動態または関連する資料に関する追加情報と同様に、全ての既存する毒性データを考慮に入れながら選択されるべきである。この情報は、投与計画の妥当性を示すことにおいてもまた手助けになる。哺乳児への直接投与は、曝露及び薬物動態の情報に基づいて考慮されるべきである (28)(29)。直接投与による試験実施前に、利点と欠点について注意深く考慮する (30)。

18. 同時設定の対照群は、処置対照群または被験物質を投与するために媒体を使用した場合には媒体対照群とする。通常、全ての動物に、体重に基づいて被験物質または媒体のいずれかを同じ容量で投与する。媒体または他の添加物が投与を容易にするために用いられる場合は、以下の特徴に考慮をあたえる：被験物質の吸収、分布、代謝、貯留における影響；毒性兆候を変化させる可能性のある被験物質の化学的性状における影響；動物の摂餌、摂水または栄養状態における影響。媒体は、神経行動毒性ないし繁殖または発達への作用のどちらもなく、試験の解釈を妨げる可能性のある影響の原因にはならない。新奇の媒体に対しては、処置対照群には媒体対照群を追加して含める。対照群における動物は、試験群動物と同一の方法で扱う。

投与液の投与

19. 被験物質または媒体は、ヒトでの曝露の可能性と最も関連性のある経路で、試験動物における有効な代謝及び分布情報に基づいて投与する。一般的な投与経路は経口である(例えば胃内、飼料、飲水経由)、しかし他の経路(例えば経皮、吸入)は特徴及び予想またはヒトの曝露経路としての知見によって使用を許可する(さらなる手順は the Guidance Document 43 の中で示す)。投与経路選択の正当性について示す。被験物質は毎日ほぼ同じ

時間に投与する。

20. それぞれの動物に対する投与量は、通常は直近の個体別の体重値に基づいて決定する。しかしながら、妊娠の最後の 3 日間における投与量を調整する場合、注意を払う。過剰な毒性が処置をした母動物で認められた場合、この動物は人道的に屠殺する。

21. 最小限の被験物質または媒体は、着床時 (GD6) から授乳期 (PND21) を通して交配した雌に対して毎日投与し、それによって哺乳児は出生前及び後の神経学的発達期間中、被験物質の曝露を受ける。知見がヒトの曝露により関連した実験計画をサポートする場合、投与開始の日齢、投与期間と回数は調整可能である。投与期間は、他の動物種に対しても全ての早期の脳発達期間 (すなわち、胎児期及び生後早期のヒトの脳発達に相当する) における曝露を確実にするように調整する。投与は妊娠開始 (GD0) から始めて構わないが、着床前の損失の原因となる被験物質作用の関与を考慮する。GD6 の投与開始はこの危険性を回避するだろう、しかし GD0 から GD6 の間の発達段階での処置はされない。試験施設が妊娠動物を購入するとき、GD0 で投与を始めることは実用的ではない、したがって GD6 は優れた開始日であろう。試験施設は、被験物質の作用、以前の経験及び論理的考慮についての関連情報に基づき投与計画を設定する；そしてこれは離乳を経過した投与の延期を含むであろう。投与は、児動物の出産を完了していない動物の分娩日に行ってはならない。一般的に、哺乳児への曝露は母乳を介して生じると考えられている；しかしながら児動物に対する継続曝露の証拠が欠如している際には、哺乳児への直接曝露を考慮する。継続曝露の証拠は、例えば薬物動態情報、児動物の毒性または生物学的指標の変化から検索できる (28)。

観察

母動物の観察

22. 全ての母動物を、少なくとも一日一回、瀕死及び死亡を含む健康状態に注目して注意深く観察する。

23. 投与及び観察期間中、さらなる詳細な臨床症状の観察を定期的に (少なくとも、妊娠期の投与期間中に 2 回及び授乳期の投与期間中に 2 回) 1 用量あたり少なくとも 10 匹の母動物について実施する。動物は、動物のストレスと観察の偏りを最小限にし、観察者間における信頼性を最大限にするために標準化された手順を用いて、動物の処置について知らされていない訓練された技術者によって、ホームケージ外で観察される。可能であれば、所

与の試験の観察は同一の技術員によって実施されることが望ましい。

24. 観察された症状の発現を記録する。可能な時はいつでも、観察された症状の程度もまた記録する。臨床症状の観察では以下を含むがこれに限定しない、皮膚、被毛、眼、口、粘膜、分泌物及び自律神経活性（例 流涙、立毛、瞳孔径、異常な呼吸状態及び/または口呼吸、そして異常な排尿または排糞の症状）。

25. 体位、活動量（例えば、探索行動の低下または増加）及び運動協調性に関連するあらゆる異常な反応もまた記録する。歩行（例 動揺歩行、運動失調）、体位（例 円背位）及び取扱に対する反応、位置または他の環境刺激に対する変化と同様に、間代性あるいは強直性の動作、痙攣、振戦、常同行動（例 過剰な身づくろい、異常な頭の運動、旋回の繰り返し）、異常行動（例 自咬または過剰に舐める、自傷、後ずさり、発声）、または攻撃性の発現に関して記録する。

26. 毒性症状は発現日、時間、程度及び持続期間を含めて記録する。

27. 試験期間を通して少なくとも週 1 回投与時に、分娩日または分娩日間近、及び PND21（離乳）に、動物の体重を測定する。胃内投与試験の母動物については少なくとも週 2 回体重を測定する。各体重値が決定した時点で、適宜、投与量を調整する。妊娠期及び授乳期間中に、最小限で週 1 回、摂餌量を測定する。混水曝露の場合、少なくとも週 1 回、飲水量を測定する。

児動物の観察

28. 全ての児動物は、少なくとも一日一回、毒性症状及び瀕死及び死亡について注意深く観察する。

29. 投与及び観察期間中、児動物のより詳細な臨床症状観察を実施する。児動物は（少なくとも 1 匹/性/腹）、動物のストレスと観察の偏りを最小限にし、観察者間における信頼性を最大限にするために標準化された手順を用いて、動物の処置について知らされていない訓練された技術者によって、ホームケージ外で観察される。可能であれば、観察は同一の技術員によって実施されることが望ましい。最小限、24 項及び 25 項に記載された評価項目は、観察する発達段階に適して観測する。

30. 児動物における全ての毒性症状は発現日、時間、程度及び持続期間を含めて記録する。

身体的発達指標

31. 発達の離乳前指標 (例 耳介開展、眼瞼開裂、切歯萌芽) の変化は体重と良く相関する (30)(31)。体重は身体発達の一番の指標であろう。発達指標の測定は、そのためにこれらの評価項目が追加情報を提供するという知見が事前に存在する場合にのみ推奨される。これらの指標の評価におけるタイミングは Table 1 に示す。予想される影響、及び初期の測定結果によっては、さらなる時点の追加、または他の発達段階における測定の実施が望ましい。

32. 身体の発達を評価する場合、出生後の日齢の代わりに交尾後の日齢を使用することが望ましい (33)。哺乳児が離乳日に検査される場合、離乳に関連したストレスによる混乱の影響を避けるために、その検査は実際の離乳に先だって実施することを推奨する。加えて、哺乳児のいかなる離乳後の検査も離乳後 2 日間は実施すべきではない。

Table 1: 身体及び発達指標と機能/行動の評価項目の測定時点 (a)

日齢 評価項目	離乳前 (b)	成長期 (b)	若齢期 (b)
身体及び発達指標			
体重及び臨床観察	週 1 回 (c)	少なくとも 2 週に 1 回	少なくとも 2 週に 1 回
脳重量	PND 22 (d)		試験終了時
神経病理	PND 22 (d)		試験終了時
性成熟	—	適切な時期	—
その他の発達指標 (e)	適切な時期	—	—
機能/行動評価項目			
行動発生	少なくとも 2 種の検査		
自発運動 (慣れを含む)	1-3 回 (f)	—	1 回
運動及び感覚機能	—	1 回	1 回
学習及び記憶	—	1 回	1 回

a) 上の表では、検査を実施する際の最小限の回数を示す。予測される影響及び初期の測定結果によっては、時点の追加または他の発達段階での実施が望まれるであろう。

b) 離乳後 2 日間は、哺乳児は検査しないことが推奨される (32 項参照)。成長期の検査に対して推奨される日齢：学習及び記憶=PND25±2；運動及び感覚機能=PND25±2。若齢期の検査に対して推奨される日齢：PND60-70

c) 哺乳児に直接投与する場合、体重増加が急激な時期には投与量の調整のために少なくとも週 2 回、体重を測定する。

- d) 適切な場合には、脳重量及び神経病理は、ある早い時期（例えば、PND11）に評価される（39 項参照）。
- e) 体重に加えて他の発達指標（例えば、眼瞼開裂）は、適切な時点で記録する（31 項参照）。
- f) 35 項参照

33. 例えば目視による検査または肛門性器の距離の測定によって（34）（35）、生存哺乳児を数えて雌雄別にする、そして腹内の各哺乳児は、出生時またはその直後、授乳期間中は少なくとも週 1 回、その後は少なくとも 2 週に 1 回、個体別に体重を測定する。性成熟を評価す際には、腹あたり少なくとも雌雄各 1 匹について膣開口（36）または包皮分離（37）が生じた日齢及び体重を判定する。

行動発生

34. 選択された行動発生は、全ての行動評価に対して全ての検査日に使用する同一哺乳児を用いて、少なくとも 1 匹/性/腹について適切な齢期中に計測する。測定日は、その行動発生における正常または投与に関連した変化のいずれかを明確にするための期間にわたって等間隔に置く（38）。以下はその発生を評価する行動のいくつかの例である：正向反射、背地走性及び自発運動（38）（39）（40）。

自発運動

35. 自発運動は、離乳前及び成熟期の間、観測する（41）（42）（43）（44）（45）。離乳時の検査については 32 項を参照。検査実施時間は、無処置対照について実施中に慣れを示すのに十分な長さとする。行動発生評価のための自発運動の使用を強く推奨する。行動発生検査として使用する場合、全ての離乳前検査期間について同一動物を検査に用いる。検査は、期間内馴化の発生評価のために十分な頻度とする（44）。これは離乳に先立って 3 回またはそれ以上、及び離乳日を含めて要求されるであろう（例えば PND13、17、21）。同じ動物または同腹子の検査は、試験終了間近の成熟期でも実施する（例えば、PND60-70）。追加日程の検査は必要によって行われるであろう。自発運動は、増加及び減少の両方を検出することが可能な自動活動性記録装置によって観測される（すなわち、その装置で測定した基礎運動量は、運動量減少の検出が妨げられるほど低くてはならないし、また運動量の増加の検出が妨げられるほど高くてはならない）。各装置は、可能な範囲で、装置間及び測定日間の操作の信頼性を保証するため、標準的手順によって検査されなければならない。各動物は個別に検査する。処置群間は、活動性の日周リズムによる混乱を避けるために検査時間の均衡をとる。検査条件のばらつきを最小にし、処置に対して意図的な関連がないことを保証す

るように努める。自発運動を含む多くの行動計測に影響する変数の中には、騒音レベル、検査用ケージの大きさと形状、室温、相対湿度、照明条件、臭気、ホームケージを使用するか新奇な検査用ケージを使用するか、及び環境の混乱がある。

運動感覚機能

36. 運動及び感覚機能は成長期 (adolescent) 及び若齢期 (PND60-70) に少なくとも 1 回は詳細に検査する。離乳時の検査については、32 項を参照する。感覚の様相 (例えば、体性感覚、前庭) 及び運動機能 (例えば、強度、強調性) の適切な定量的サンプリングを確実にするため、十分な検査を実施する。運動及び感覚機能検査の幾つかの例は、伸筋スラスト反応 (46)、正向反射 (47)(48)、聴覚性驚愕馴化 (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) 及び誘発電位 (55) である。

学習及び記憶検査

37. 連合学習及び記憶の検査は、離乳後 (25±2 日) 及び若齢期 (PND60 及びそれ以降) に実施する。離乳時の検査については、32 項を参照する。同一または別々の検査を、これらの 2 つの発達段階で用いることができる。離乳期及び成熟期のラットにおける学習及び記憶検査の選択に関して、ある程度の柔軟性が認められる。しかしながら、検査は 2 つの基準を満たすように計画されなければならない。第 1 に、訓練経験の非連合作用について制御する条件に基づいて、何回かの反復学習試行またはセッションにわたる変化としてあるいは単回試行を含む検査においてのいずれかで、学習を評価する。第 2 に、検査には本来的な学習 (獲得) に加えて、記憶 (短期あるいは長期) の何らかの測定を含むが、この記憶の計測では同一の検査から得られる獲得の計測なしには報告できない。学習及び記憶検査で被験物質の影響が示された場合は、感覚、情動、及び/あるいは運動能力に基づく変化の説明を排除するための追加検査実施を考慮する。上記の 2 基準に加えて、調査している化合物類に対して感受性を示すという文献がある場合には、それに基づく学習及び記憶検査の選択を要求する。このような情報がない場合の上記基準を満たす検査例：受動回避 (43)(56)(57)、成熟ラットについて (58) 及び幼若ラットについて (59) の位置遅延見本合わせ、嗅覚条件付け (43)(60)、モーリス水迷路 (61)(62)(63)、ビールあるいはシンシナティ迷路 (64)(65)、放射状迷路 (66)、T 型迷路 (43)、及びスケジュール制御行動の獲得及び維持 (26)(67)(68)。追加検査は、離乳ラットについて (26)(27) 及び成熟ラットについて (19)(20) 記載がある。

屠殺後検査

38. 児動物の離乳後、母動物は安楽死させることができる。

39. 児動物の神経病理学的検索は PND22 あるいはより早い時期で PND11 と PND22 の間、そして同様に試験終了時に安楽殺した動物からの組織を用いて行う。PND22 の間に屠殺された動物に対して、脳組織を検索する；試験最終日に屠殺された動物に対して、中枢神経系 (CNS) 組織と末梢神経系 (PNS) 組織の両方について検索する。PND22 あるいはより早く屠殺した動物は浸漬または灌流のいずれかによって固定されるだろう。試験終了時に屠殺した動物は灌流によって固定する。組織標本の切り出し、組織の処置、及びスライド標本の染色を通して、灌流した動物からの組織標本試料の全ての局面は、各バッチに各用量群からの代表的な標本を含むように均衡が取れた設計を用いる。神経病理学に関する追加のガイダンスは、Guidance Document No. 20 (9) あるいはまた文献 (103) を参照すること。

組織標本処理

40. 剖検時に認められた全ての肉眼的異常は記録する。採取された組織標本は、神経系の全ての主要部位を代表する。組織標本は、標準化して公表された手順 (69)(70)(71)(103) に従って、適切な固定液中で保存し、処理する。パラフィン包埋は CNS 及び PNS 組織について容認されるが、さらに高度な分析が要求される場合 (例えば、末梢神経障害が疑われる場合及び/または末梢神経の形態学的解析のための末梢神経について)、オスミウム後固定及びエポキシ包埋の使用が適している。形態計測解析のために採集された脳組織は、固定液中での保存の延長に関する収縮によるアーティファクトを避けるために、同時に全ての用量群を適切な媒体中に包埋する (6)。

神経病理学的検査

41. 定性的な試験の目的は、

- i) 神経病理学的変化の徴候を示す神経系内の部位を同定すること、
- ii) 被験物質曝露の結果としての神経病理学的変化の種類を同定すること、及び
- iii) 神経病理学的変化の程度の範囲を決定すること、である。

組織標本からの代表的な組織切片は、神経組織学的変化の徴候について適切に訓練された病理学者によって、顕微鏡学的に検査される。全ての神経病理学的変化は、重篤度を示す主観的な程度を割り当てる。ヘマトキシリン・エオジン染色は、PND22 あるいはそれ以前に安楽殺した動物からの脳切片を検索するためには十分だろう。しかしながら、ミエリン染色 (例えば、ルクソールファーストブルー及びクレシルバイオレット) 及び銀染色 (例え

ば、ビールジョースキーまたはボディアン染色) は、試験終了時に屠殺された動物からの CNS 及び PNS 切片に対して推奨される。病理学者の専門的な判断及び観察された変化の種類によって、変性の区別及び特有なタイプの特徴づけに適している他の染色法、例えば、星状膠細胞あるいは小膠細胞の変化を評価するためのグリア線維性酸性タンパク (Glial fibrillary acidic protein ; GFAP) またはレクチン組織化学 (72)、壊死を検出するためのフルオロ-ジェイド (73)(74)、または神経細胞変性に対して特異的な銀染色 (75) が考慮される。

42. 形態計測 (定量的) の評価は、これらのデータが投与に関連した影響の検出を補助し、脳重量または形態計測における投与に関連した差違の解釈に有用な可能性があるため実施する (76)(77)。神経組織は形態計測の検索が可能ないように採取及び処置する。形態計測の評価は、例えば、脳特定部位の長さまたは面積の測定を含むであろう (78)。長さまたは面積の測定は、信頼性のある光学顕微鏡的指標に基づいて注意深く選択された相同する切片の使用が要求される (6)。立体解析学は、特定の神経解剖学的部位における容積または細胞数のような指標において、投与に関連する影響を見極めるために使用される (79)(80)(81)(82)(83)(84)。

43. 脳については、投与関連の神経病理学的変化のいかなる徴候についても検査し、完全な検査を保証するために全ての主要な脳領域から十分な標本を採取する (例えば、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)、脳幹及び小脳)。全ての動物における切片を同一面で採取することが重要である。試験終了時に安楽殺した成獣において、脊髄と PNS の代表的な切片を採取する。検査領域には、視神経及び網膜を含む眼球、頸部及び腰部膨大部脊髄、背部及び腹部神経根、近位坐骨神経、近位脛骨神経 (膝部) 及び脛骨腓腹筋分岐部を含む。脊髄と末梢神経の切片は、交差または横断及び縦断切片の両方を含む。

44. 神経病理学的検索は、細胞変性 (例えば、神経の空胞化、変性、壊死) 及び組織変化 (例えば、神経膠症、白血球浸潤、のう胞形成) に加えて、神経系における発達障害の指標についての検査を含む (6)(85)(86)(87)(88)(89)。この点について、投与に関連した影響を、屠殺時期に相関する発達段階に生じることが知られている正常な発生学的事象から区別することが重要である (90)。以下を含む発達障害を示唆する明らかな変化の例を示すが、これらに限定しない：

- 嗅球、大脳または小脳の肉眼的大きさまたは形の変化；
- 細胞集団あるいは軸索突起の正常な移動の消失あるいは残存に起因する部位の大きさの

増加あるいは減少（例えば、小脳の外顆粒層、脳梁）を含む、様々な脳部位における相対的なサイズの変化；

- 過剰なアポトーシスまたは壊死、異所性の集簇あるいは散在、皮質構造の様々な層の相対的なサイズにおける混乱あるいはニューロン形態異常の領域によって示されるような、増殖、移動、及び分化における変化；
- 全体的なサイズの縮小あるいはミエリン構造の染色性の変化を含む、髄鞘形成パターンの変化；
- 水頭症の徴候、特に脳室の拡大、大脳水道の狭窄及び大脳半球の菲薄化。

神経病理学的変化における用量相関性の解析

45. 定性的解析のために、次の段階的な手順を推奨する。初めに、高用量群からの切片を対照群の切片と比較する。高用量群の動物に神経病理学的異常の徴候が認められない場合は、更なる解析は求めない。高用量群の動物に神経病理学的異常の徴候が認められる場合は、中用量群及び低用量群の動物についても検査する。高用量群が死亡または他の毒性との交絡によって終了した場合、高用量と中用量について神経病理学的変化を解析する。低用量群において何らかの神経毒性徴候が認められる場合には、これらの群について神経病理学的解析を実施する。定性的あるいは定量的検査において何らかの投与に関連した神経病理学的変化が認められた場合は、発現率、病変の頻度及び重篤度の程度あるいは形態学的変化の用量依存性を、全用量群からの全動物の評価に基づいて決定する。何らかの神経病理学的変化の徴候が示された全ての脳部位をこの評価に含む。各病変のタイプについて、各程度の区分に用いた特徴を示している、各重篤度の程度の定義に使用するための判定を記述する。病変の各タイプの頻度とその重篤度の程度を記録し、用量相関性の性質を評価するために統計学的解析を実施する。コード化したスライドの使用が推奨される (91)。

データ及び報告

データ

46. データは各試験群について、変化のタイプ及び母動物数、性別の児動物数、各タイプの変化を示した腹を示す個別及び要約した表形式で報告する。児動物が直接出生後曝露された場合は、経路、曝露時期及び期間を報告する。

結果の評価及び解釈

47. 発達神経毒性試験は、子宮内及び出生後早期の発達期間における被験物質の反復曝露影響に関する情報を提供するだろう。強調すべきは、試験結果は一般毒性と発達神経毒性

の評価項目の両方に位置づけられるため、母動物の一般毒性が存在しない中で生じた神経発達影響と、母動物の毒性も存在するレベルでのみ認められる神経発達影響の区別を考慮に入れることであろう。試験設計、統計解析、及びデータの生物学的有意差の間の複雑な相互関係によって、発達神経毒性データの適切な解釈は専門的な判断を必要とするだろう (107)(109)。試験結果の解釈には、証拠の重み付けアプローチを用いる (20)(92)(93)(94)。行動または形態学的所見のパターンは、存在するのであれば、用量反応性の証拠と共に考察する。ヒトの疫学的研究あるいは症例報告、及び実験動物による研究 (例えば、毒物動態学データ、構造活性情報、他の毒性試験からのデータ) を含む、発達神経毒性の評価に関連する全ての試験からのデータを、この評価の中に含む。これには被験物質の用量と、発現あるいは不発現、発現率、そして各性に対するあらゆる神経毒性影響の程度との関連性を含む (20)(95)。

48. データの評価は、生物学的及び統計学的有意差の両方の考察を含む。統計学的解析はデータの解釈を決定するよりも、むしろ基準とする道具として検討すべきである。統計学的有意差の欠如を投与に関連した影響が無いと結論付ける唯一の根本的理由にすべきではない、同様に、統計学的有意差を投与に関連した影響であると結論付ける唯一の根拠にすべきではない。特に投与と無関係である場合には、偽陰性所見及び「陰性であることの立証」の固有の困難さに備えるために、信頼できる陽性及び背景データについて考察する (102)(106)。偽陽性の可能性は、データの全体的な統計評価の観点から考察する (96)。もしあれば、評価には、観察された病理組織学的及び行動学的変化の関連性を含む。

49. 全ての結果は実験計画に適した統計学的モデルを用いて解析する (108)。パラメトリックまたはノンパラメトリック解析の選択は、選択された統計解析の相対的な頑健さと同様に、データの性質 (変換有または無し) 及びそれらの分布のような考慮すべき要因によって正当化される。試験の目的と計画は、第1種 (偽陽性) 及び第2種 (偽陰性) の過誤を最小化するように統計学的解析の選択を案内する (96)(97)(104)(105)。1腹あたり多数の児動物で試験される多産の動物種を使用する発達試験は、第1種の過誤の確率の増大に備えるために、統計モデルに腹を含める (98)(99)(100)(101)。測定の統計学的単位は腹であって、哺乳児ではない。検査は、同腹児が独立した観察として扱われないように計画する。同じ検査の中で繰り返し測定されたいかなる評価項目も、これらの測定値が非独立として扱われる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に示す情報を含める。

被験物質：

- 物理学的性状、関連する物理化学的性状；
- 供給元を含む識別データ；
- 製剤の純度と既知及び/または予想される不純物。

媒体 (適用した場合には)

- 水または生理食塩水を除く、媒体の選択についての正当性。

試験動物：

- 使用した動物種及び系統、及びラットを除く正当性；
- 試験動物の供給元；
- 動物の数、開始時の齢期、及び性別；
- 由来、飼育環境、飼料、水など；
- 試験開始時における動物の個体別体重。

試験条件：

- 投与用量選択に対する理由；
- 投与経路及び投与期間についての理由；
- 媒体、容量及び投与した物質の物理的形状の詳細を含む、投与実施の説明；
- 被験物質の処方/飼料調製、達成濃度、調製物の安定性及び均一性の詳細；
- 母動物と児動物の個体識別に使用した方法；
- 投与群への母動物の分配、淘汰するための児動物選抜、及び試験群への児動物の分配に用いた無作為化手順の詳述；
- 被験物質投与の詳細；
- 適用可能な場合には、飼料/水または吸入の被験物質濃度 (ppm) から実質の用量 (mg/kg body weight/day) への換算；
- 環境条件；
- 飼料及び水 (例えば、上水、蒸留) の品質の詳細；
- 試験開始及び終了の日付。

観察及び検査手順：

- スコアリングによる観察における操作の定義づけと共に、観察及び手順の標準的のために使用した手順書の詳述；
- 使用した全ての検査手順のリスト、及びそれらの使用についての正当性；

- 自動化された装置に関する情報と詳細を含む、使用した行動/機能、病理学、神経化学あるいは電気生理学的手順の詳細；
- 装置の較正と同等性の保証及び検査手順における試験群の均一化についての手順；
- 専門的な判定を含むあらゆる決定を説明する簡潔な理由。

結果（適切な場合には平均値と分散を含めた、個体表及び総括表）：

- 試験開始時における動物数及び試験終了時における数；
- 各検査法に使用した動物及び腹の数；
- 各動物の識別番号及びその個体が由来した腹；
- 性別の出生時における同腹児数及び平均体重；
- 摂餌量データ、及び適切な場合には飲水量データ（例えば、飲料水を介して化学物質を投与した場合）；
- 毒性症状あるいは死亡を含む、性及び用量別の毒性反応データ、適切な場合には、死亡の時間及び原因を含む；
- 詳細な症状観察の性質、重篤度、持続時間、発現日、時間、及び経過；
- 各観察時点における、各発達指標のスコア（体重、性成熟及び行動発生）；
- 対照群からの増加及び減少の両方を含む、性別による全ての行動、機能、神経病理、神経化学、電気生理学的所見の詳述；
- 剖検所見；
- 脳重量；
- 自然発生性の疾患あるいは健康状態を含む、神経学的症状及び病変から得られたあらゆる診断；
- 典型的な所見の画像；
- 形態計測に使用した切片の相同性を評価するための低倍率画像；
- 適切な場合には、別の毒物動態試験からの補足的なデータを含む、吸収及び代謝データ；
- データ解析に使用した統計モデル及び有意差の有無に関らずその結果を含む、検定処理の結果；
- 専門的な訓練を含む、試験従事者のリスト。

結果の考察：

- 性別及び群による、用量反応の情報；
- 性別及び群による、被験物質の神経毒性活性についての結論についてのあらゆる他の毒性影響との関連性；
- 結論におけるあらゆる毒物動態情報の影響；

- あらゆる既知の神経毒性物質における作用との類似性；
- 検査方法の信頼性及び感度を裏付けるデータ（例えば、陽性及び背景対照データ）；
- 認められる場合には、神経病理学的影響と行動影響の関連性；
- 性別及び群による、母動物及び児動物に対する NOAEL またはベンチマーク用量。

結論：

- 化学物質が発達神経毒性の原因であるか否か及び NOAEL を含む、結果に基づくデータの総合的解釈の考察。

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., Miles, 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., Miles, 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 Pharmaceuticals for Human Use. Available:

[http://www.ich.org/UrlGrpServer.jsr?@_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.

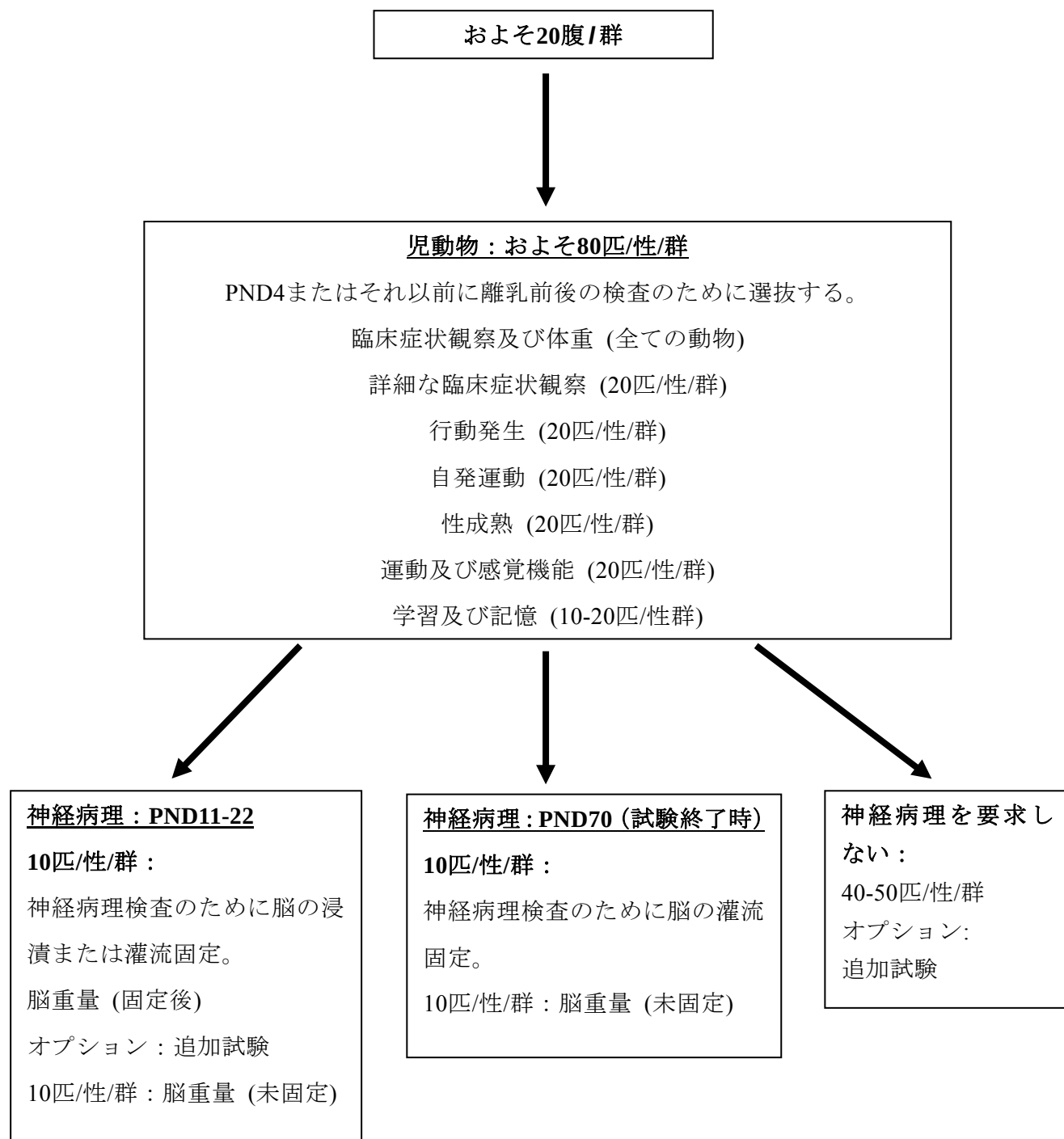
42. Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.
43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental 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'Hooze, 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-cupric-silver 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., Stefovskaja, 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., Stefovskaja, 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. Lett.*, 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).

Figure 1. 機能/行動検査、神経病理検査、及び脳重量に対する、一般的な検査計画。この図は 13-15 項における記述に基づいている (PND=生後日数)。動物の割り当て例は Appendix 1 に示す。



APPENDIX 1

1. 可能な割り当て例は、以下に記述し表にしている。これらの例は、様々な試験の枠組みに対する試験動物の割り当ては多くの異なる方法で目的を果たせることを説明するために提供する。

Example 1

2. 1組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、離乳前検査の行動発生のために用いる。これらの動物から、10 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を PND22 で安楽殺する。脳を摘出し、重量を測定して神経病理検査の為に処理する。さらに、脳重量のデータは残りの 1 用量あたり雄 10 匹と雌 10 匹の未固定の脳を用いて採取する。

3. もう 1 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、離乳後の機能/行動検査 (成長期の詳細な臨床症状観察、自発運動、聴覚驚愕及び認識機能検査) 及び性成熟の日齢を評価するために用いる。これらの動物から、10 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を、試験終了時 (およそ PND70) に麻酔をかけて灌流固定する。In situ で追加固定後、脳を摘出して神経病理検査のために処理する。

4. 若齢期 (PND60-70) における認知機能検査のために、第 3 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を使用する。これらの動物のうち、10 匹/性/群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を、試験終了時に屠殺し、脳を摘出して重量を測定する。

5. 残りの 20 匹/性/用量は、追加検査が可能なように予備とする。

Table 1

哺乳児番号 a)		検査に割り当てられる児動物数	試験/検査
雄	雌		
1	5	雄：20 匹 + 雌：20 匹	行動発生
		雄：10 匹 + 雌：10 匹	生後 22 日：脳重量/神経病理/形態計測
		雄：10 匹 + 雌：10 匹	生後 22 日：脳重量
2	6	雄：20 匹 + 雌：20 匹	詳細な臨床症状
		雄：20 匹 + 雌：20 匹	自発運動
		雄：20 匹 + 雌：20 匹	性成熟
		雄：20 匹 + 雌：20 匹	運動及び感覚機能
		雄：20 匹 + 雌：20 匹	学習及び記憶 (生後 25 日)
		雄：10 匹 + 雌：10 匹	若齢期の脳重量/神経病理/形態計測 ～生後 70 日
3	7	雄：20 匹 + 雌：20 匹	学習及び記憶 (若齢期)
		雄：20 匹 + 雌：20 匹	若齢期の脳重量 ～生後 70 日
4	8	—	代替あるいは追加検査のための予備動物

a) この例では、1 腹につき雄 4 匹と雌 4 匹に淘汰される；雄の哺乳児には 1 から 4、雌の哺乳児には 5 から 8 の番号を付す。

Example 2

6. 1組の20匹/性/用量群 (すなわち1腹あたり雄1匹及び雌1匹) の哺乳児を、離乳前検査の行動発生のために用いる。これらの動物から、10匹/性/用量群 (すなわち1腹あたり雄1匹あるいは雌1匹) をPND11で安楽殺する。脳を摘出し、重量を測定して神経病理検査の為に処理する。

7. もう1組の20匹/性/用量群 (すなわち1腹あたり雄1匹及び雌1匹) の哺乳児を、離乳後の検査 (詳細な臨床症状観察、自発運動、性成熟の日齢評価及び感覚運動機能) に用いる。これらの動物から、10匹/性/用量群 (すなわち1腹あたり雄1匹あるいは雌1匹) を、試験終了時 (およそPND70) に麻酔をかけて灌流固定する。*In situ* で追加固定後、脳を摘出して重量を測定し、神経病理検査の為に処理する。

8. 成長期及び若齢期における認知機能検査のために、10匹/性/用量群 (すなわち1腹あたり雄1匹あるいは雌1匹) を使用する。異なる動物をPND23及び若齢期に認知機能検査についての検査に使用する。試験終了時に、成獣として検査した10匹/性/群を屠殺し、脳を摘出して重量を測定する。

9. 検査に選ばれなかった残りの20匹/性/用量は、離乳時に屠殺して廃棄する。

Table 2

哺乳児番号 a)		検査に割り当てられる児動物数	試験/検査
雄	雌		
1	5	雄: 20匹 + 雌: 20匹 雄: 10匹 + 雌: 10匹	生後11日行動発生 生後11日: 脳重量/神経病理/形態計測
2	6	雄: 20匹 + 雌: 20匹 雄: 20匹 + 雌: 20匹 雄: 20匹 + 雌: 20匹 雄: 20匹 + 雌: 20匹 雄: 10匹 + 雌: 10匹	詳細な臨床症状 自発運動 性成熟 運動及び感覚機能 若齢期の脳重量/神経病理/形態計測 ~生後70日
3	7	雄: 10匹 + 雌: 10匹 b)	学習及び記憶 (生後23日)
3	7	雄: 10匹 + 雌: 10匹 b)	若齢期の脳重量 ~生後70日 若齢期の脳重量
4	8	—	動物は生後21日に屠殺して廃棄する。

a) この例では、1腹につき雄4匹と雌4匹に淘汰される；雄の哺乳児には1から4、雌の哺乳児には5から8の番号を付す。

b) PND23と若齢期における認知検査では異なる動物を用いる(例えば、合計20匹から偶数または奇数の腹)。

Example 3

10. 1 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、PND11 における脳重量及び神経病理検査に用いる。これらの動物から、10 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を PND11 で安楽殺して、脳を摘出し、重量を測定して神経病理検査の為に処理する。さらに、脳重量のデータは残りの 1 用量あたり雄 10 匹と雌 10 匹の未固定の脳を用いて採取する。

11. もう 1 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、行動発生 (自発運動)、離乳後の検査 (自発運動及び性成熟の日齢評価)、及び成長期の認知機能検査に用いる。

12. もう 1 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、運動及び感覚機能検査 (聴覚性驚愕) 及び詳細な症状観察に用いる。これらの動物から、10 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を、試験終了時 (およそ PND70) に麻酔をかけて灌流固定する。In situ で追加固定後、脳を摘出して重量を測定し、神経病理検査の為に処理する。

13. もう 1 組の 20 匹/性/用量群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹及び雌 1 匹) の哺乳児を、若齢期の認知機能検査に用いる。これらの動物から、10 匹/性/群 (すなわち 1 腹あたり雄 1 匹あるいは雌 1 匹) を、試験終了時に屠殺し、脳を摘出して重量を測定する。

Table 3

哺乳児番号 a)		検査に割り当てられる児動物数	試験/検査
雄	雌		
1	5	雄：10 匹 + 雌：10 匹 雄：10 匹 + 雌：10 匹	生後 11 日：脳重量/神経病理/形態計測 生後 11 日：脳重量
2	6	雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：20 匹 + 雌：20 匹	行動発生 (自発運動) 自発運動 性成熟 学習及び記憶 (生後 27 日)
3	7	雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：10 匹 + 雌：10 匹	聴覚性驚愕 (成長期及び若齢期) 詳細な症状観察 若齢期の脳重量/神経病理/形態計測 ~PND70
4	8	雄：20 匹 + 雌：20 匹 雄：10 匹 + 雌：10 匹	学習及び記憶 (若齢期) 若齢期の脳重量

a) この例では、1 腹につき雄 4 匹と雌 4 匹に淘汰される；雄の哺乳児には 1 から 4、雌の哺乳児には 5 から 8 の番号を付す。

4. 米国 EPA と OECD の発達神経毒性試験 ガイドラインの比較

EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの比較

EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの比較・対比表を以下に示す。

[EPA/OECD DNT TG 比較・対比表]

EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study	OECD guideline 426 Developmental Neurotoxicity
【母動物】 供試動物：ラット (F344 系統を除く)* 動物数：20 腹/群 投与用量：対照群 (sham-operated/媒体投与) 低用量 中用量 高用量 -計 4 用量 投与方法：経口投与 投与期間：妊娠 6 日**～出産後 10 日 観察手順： <u>肉眼的観察：</u>1 日 1 回、投与前に実施 <u>ホームケージ外における毒性徴候：</u> 10 匹/群 妊娠 6 日**～21 日の間に 2 回 哺育 1 日～10 日の間に 2 回 <u>毒性徴候の発現時期、程度、持続期間を記録</u> <u>体重：</u>投与期間中は週 1 回 さらに出産日、出産後 11 日、 21 日 (離乳日)	【母動物】 供試動物：ラット* 動物数：20 腹/群 投与用量：対照群 (sham-operated/媒体投与) 低用量 中用量 高用量 -計 4 用量 公比 2-4 になるよう設定 投与方法：経口投与 ・胃管内経口投与 ・混水/混餌 投与期間：妊娠 6 日**～出産後 21 日 観察手順： <u>肉眼的観察：</u>1 日 1 回 <u>詳細な症状観察：</u>10 匹/群 妊娠 6 日**～21 日の間に 2 回 哺育 1 日***～21 日の間に 2 回 <u>毒性徴候の発現時期、程度、持続期間を記録</u> <u>体重^{a)}：</u>投与期間中は週 1 回 出産日または出産間近、さらに出産 後 哺育 21 日 a) 胃管内投与の場合、週 2 回 <u>摂餌量および飲水量測定</u> 混餌投与または混水投与の場合、妊娠期間 中 及び授乳期間中、摂餌量または飲水量を週 1 回計測する

[EPA/OECD DNT TG 比較・対比表 (つづき)]

EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study	OECD guideline 426 Developmental Neurotoxicity
【児動物】 供試動物数 (同腹児数調整) : ♂4 + ♀4 匹/腹 (場合によっては♂5+♀3 匹/腹) 観察手順 : 基本的に各試験項目に使用する児動物数は ♂10+♀10 匹/群 <u>肉眼的観察</u> : 観察は毒性徴候、死亡の有無を含む ケージサイドから毎日実施 <u>ホームケージ外における毒性徴候</u> : ♂10+♀10 匹/群 PND 4、11、21、35、45、60 <u>発達指標</u> : ♂10+♀10 匹/群 ・体重…出生直後、PND4、11、17、21 離乳後は2週に1回 ・膣開口、包皮解裂 <u>自発運動</u> : ♂10+♀10 匹/群 出生後 13、17、21、60±2 日に実施 <u>聴覚驚愕試験</u> : ♂10+♀10 匹/群 離乳時 (PND21) 及び PND60 前後	【児動物】 供試動物数 (同腹児数調整) : ♂4 + ♀4 匹/腹 (場合によっては♂5+♀3 匹/腹) 観察手順 : 基本的に各試験項目に使用する児動物数は ♂20+♀20 匹/群 <u>肉眼的観察</u> : 観察は毒性徴候、死亡の有無を含む ケージサイドから1日1回実施 全ての児動物 (♂4+♀4 匹/腹) <u>詳細な症状観察</u> : ♂1+♀1 匹/腹 (♂20+♀20 匹/群) 離乳前…週1回 思春期・若齢期…2週に1回 <u>発達指標</u> : 全ての児動物 (♂4+♀4 匹/腹) ・耳介開展、眼瞼開裂、切歯萌芽 ・体重…離乳前は週1回、離乳後は2週に1回 <u>性成熟指標</u> : 全ての児動物 (♂4+♀4 匹/腹) 膣開口、包皮解裂 <u>行動発生</u> : ♂1+♀1 匹/腹 (♂20+♀20 匹/群) 離乳前に実施 立ち直り反射、正向反射、自発運動 <u>自発運動</u> : ♂1+♀1 匹/腹 (♂20+♀20 匹/群) 出生後 (PND)13、17、21、60-70 日に実施 <u>運動及び感覚機能</u> : ♂1+♀1 匹/腹 (♂20+♀20 匹/群) 思春期・若齢期 (PND60-70)に実施 伸筋スラスト反応、立ち直り反射、 聴覚性驚愕馴化、誘導電位

[EPA/OECD DNT TG 比較・対比表 (つづき)]

EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity	OECD guideline 426 Developmental Neurotoxicity
【児動物】 学習及び記憶試験：♂10+♀10 匹/群 離乳時(PND21)、PND60 前後に実施 神経病理学的検査：♂10+♀10 匹/群 PND11、PND60±2 (試験終了日) 脳重量測定：♂10+ ♀10 匹/群 病理組織学的検査：♂6+ ♀6 匹/群**** • HE 染色 • 特殊染色 - Bielschowsky's、Bodians 鍍銀染色 • 免疫染色 - GFAP 染色 • 形態計測	【児動物】 学習及び記憶試験： ♂1+♀1 匹/腹 (♂20+♀20 匹/群) 離乳後(PND25±2)、PND60-70 に実施 受動回避、位置遅延見本合わせ、 嗅覚の状態、モーリスの水迷路、 ビール迷路、シンシナティ迷路、 放射状迷路、T 型迷路 神経病理学的検査：♂10+♀10 匹/群 PND22、60-70 脳重量測定 病理組織学的検査 • HE 染色 • 特殊染色 - Luxol fast blue/Cresyl violet 染色 (ミエリン染色) - Bielschowsky's、Bodians 鍍銀染色 (中枢及び末梢神経) • 免疫染色 - GFAP (星状膠細胞) - レクチン組織化学 (小膠細胞) - Fluoro-jade (壊死検出) • 形態計測

*：F344 系統のラット、またはラット以外の哺乳類を用いる場合、その系統または種を選択した理由を記載

**：交配翌日、膣栓または精子が確認された場合を妊娠 0 日とする

***：出生児が認められた日を記録、またこのときを出生 0 日とする

****：PND11 における神経病理学的検査では、脳重量測定に使用した児動物から雌雄各 6 匹を選抜しこれを病理組織学的検査に用いる。但し、PND60±2 における病理組織学的検査では脳重量測定の動物と同一でなくて良い。

EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの相違点

上記のガイドライン比較・対比表に示す如く、米国 EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの基本的内容については大きな違いはないが、被験物質の投与期間あるいは病理組織学的検査対象動物数など若干の違いが認められる。両ガイドラインにおける相違点について以下に要約する。

1) 投与期間及び投与方法における相違点

OECD では妊娠 6 日から出産後 21 日（離乳日）までであるのに対し、EPA では妊娠 6 日から出産後 11 日までである。ラットの神経板形成は妊娠 8 から 9 日（ヒトは妊娠 3 週）、brain growth spurt period（脳成長期間）は出生後 0 から 30 日であり、さらに cessation of cell proliferation in whole brains（全脳における細胞増殖休止）は出生後 17 から 20 日と報告されている（U. Hass / Reproductive Toxicology 22 (2006) pp.148-156）。発達神経毒性試験実施目的は化学物質の経胎盤・経乳汁曝露が児動物の神経系に対する影響を評価とするならば、投与期間は OECD 案が適していると判断できる。

投与方法は EPA では強制経口投与を前提としているのに対し、OECD では強制経口投与のほか混餌投与もしくは混水投与の記載がある。この場合、摂餌量または飲水量の測定を実施しなければならない。

2) 試験手順における相違点

母動物：OECD では母動物に対する詳細な観察を要求している一方で、EPA では毒性徴候の観察という記述であるが、検査項目としてほぼ一致した内容と考える。発達神経毒性試験は被験物質の母動物に対する直接作用、さらに経胎盤・経乳汁曝露を受けた児動物への作用を評価することにより、母児動物相関性の有無を検討することが可能である。但し、成獣に対する神経毒性学的評価と重複した内容であるため（神経発生学概論，谷村孝・木原隆英 著，2003 年）、検査項目あるいは評価基準（数値化=スコア）を参考して問題ないかを慎重に検討をしなければならない。

児動物：

〔動物の割り当て〕

検査に用いる児動物数は基本的に EPA では各群雌雄 10 匹に対し、OECD では各群雌雄 20 匹（1 腹あたり雌雄各 1 匹）である。EPA では複数の試験に同一の児動物が用いられないよ

うになっているが、OECD では複数の試験で同一の児動物が用いられる。運動及び感覚機能検査、または学習及び記憶試験など先行する試験が後の検査に影響を及ぼす可能性が考えられる。また一方で、同じ児動物で複数の試験を実施することの有効性も考えられる。被験物質の特性ならびに試験目的を明確にし、適切な動物の割り当てを考える必要性があると考えた。

病理組織学的検査、脳重量及び形態計測にはいずれのガイドラインも各群雌雄 10 匹を採用する。但し、EPA では組織学的検査及び形態計測には、そのうちの各雌雄 6 匹を用いている。

[検査項目]

OECD ガイドラインでは各検査項目についての概要や該当する検査例が詳細に記載されているのに対し、EPA ガイドラインでは学習及び記憶検査以外では検査例を含む詳細な記載はない。また、OECD で設けている運動及び感覚機能検査は EPA ではなく、OECD で検査例として掲げている自発運動、聴覚驚愕反応検査を検査項目として記載されている。

OECD または EPA ガイドラインにおける検査項目やそれに該当する種々の検査について、被験物質の特性や予測される神経毒性学的変化を考慮して、適切に選択されることが望まれると考える。

病理学組織学的検索の内容として OECD では EPA より多くの特殊染色に加え免疫染色などの実施を考慮するように求めている。

[検査実施時期]

大きく異なる点は、病理組織学的検査の実施時期である。EPA ガイドラインは出生後 11 日及び 60±2 日 (試験終了) であるのに対し、OECD ガイドラインでは基本的に出生後 22 日、60-70 日に実施する。出生後 11 日の脳は水分が多く脆弱である。また、この頃は海馬の歯状回と同様に小脳の形成時期でもあり髄鞘形成が不十分であり、脳の大きさは個体ごとに様々である。さらに出生後 22-60 日の間で分化、シナプス発生、髄鞘形成が起こることから、離乳期である出生後 21 日頃では脳の形状は本質的に成熟動物と変わらないが、脳の大きさや髄鞘が不十分であると考えられている。これらのことから、出生後 11 日における病理組織学的検査、脳重量及び形態計測は正しい評価は困難と考え、OECD ガイドラインに基づく検査時期が適切であると考えた (Garman, RH /Environ Health Perspectives 109 (2001) pp.93-100, W.Kaufmann, S. Groters/Reproductive Toxicology 22 (2006) pp.196-213, U. Hass/Reprductive Toxicology 22 (2006) pp.148-156)。

児動物における検査時期を EPA では定めているのに対し、OECD では発達指標、性成熟ならびに行動発生試験の実施時期を明確に定めてはいない。いつ（日齢）どのような身体または行動に変化が起きるかについて、様々な文献を参考にして計画を立てる必要がある（第 21 回 神経行動毒性研究会講演 2008 年）。離乳までの間は脳の発達と同様、個体ごとに身体の発育や行動発生の開始時期は異なるため、EPA のように各時点でのみの観察では正しく評価できないことが予測される。そこで、1 日 1 回の観察の際に記録を採取することが望ましいと考える。

[OECD ガイドラインのみに記載]

OECD ガイドラインでは追加検査として、*in vivo* あるいは *in vitro* の検査の実施が可能であるとの記載がある。

相違点の総括

OECD ガイドラインは、基本的に EPA ガイドラインに沿った内容であるが、いくつかの点で異なる。さらに検査の概要や該当する種々の検査例は詳細であるが、非常に繁雑すぎる面がある。また一つの試験に供する児動物数も多く、また同一の動物で複数の試験を実施する場合もあるため、先行する試験が後の試験の評価に影響を及ぼすか否かを検討すべきと考える。OECD ガイドラインと EPA ガイドラインの内容を精査し、また各ガイドラインに従った試験報告あるいは文献、テキスト等を参照し、それぞれぞれの矛盾を解決すること。さらに、ガイドラインに従ったパイロット試験または陽性対照試験を実施してデータを収集し、最も適した試験計画、検査項目や実施時期を構築することが必要と考える。

5. 米国 EPA での発達神経毒性試験に関する 現地調査

米国 EPA での発達神経毒性試験に関する現地調査

1. 調査担当者

財団法人 残留農薬研究所 原田孝則

2. 調査日時

平成 21 年 2 月 11-12 日

3. 調査場所

Environmental Protection Agency (EPA)
National Center for Environmental Assessment
Office of Research and Development
1200 Pennsylvania Ave., NW
Washington, DC
U.S.A.

4. 調査協力者

- ① Susan L. Makris, Toxicologist, Office of Research and Development,
National Center for Environmental Assessment, EPA, Washington DC, USA
- ② Kathleen C. Raffaele, PhD, Senior Toxicologist, Office of Research and
Development, National Center for Environmental Assessment, EPA,
Washington DC, USA
- ③ Brenda May, Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, EPA,
Washington DC, USA
- ④ Jess Rowland, Chief, Science Information Management Branch, EPA,
Washington DC, USA
- ⑤ Kevin M. Crofton, PhD, Neurotoxicologist, Neurotoxicology Division, EPA,
Research Triangle Park (RTP), NC, USA
- ⑥ Robert H. Garman, Consultants in Veterinary Pathology Inc, Murrysville,
PA, USA

5. 調査内容及び結果

5.1. 発達神経毒性試験 (DNT 試験) が要求されるに至った背景

全米科学アカデミーの調査 (NRC, 1993) によれば、米国の 18 才以下の少年・子供の約 12% に多動症など何らかの精神障害がみられ、その原因として胎児期及び出生後の化学物質 (神経毒性物質) の曝露が疑われている。特に既知の神経毒性物質である鉛、PCB、アルコール、有機リン剤等は、成人の神経系よりは乳幼児・子供の発達神経系に及ぼす影響力が強いことが示唆されている。これらのことを考慮して、米国では食品中の残留農薬の乳幼児・子供への健康影響を配慮した食品品質保護法 (FQPA) が 1996 年 8 月 3 日付けで制定された。この FQPA (Food Quality Protection Act) に従い、EPA はその時点で有効であった農薬の許容値及び規制免除を見直すべく既存のデータの再評価を進め、その評価に必要な試験法のひとつとして 1998 年に DNT 試験ガイドライン (OPPTS 870.6300) を農薬のテストガイドラインに導入した。

5.2. DNT 試験の実施基準

米国 EPA では、DNT 試験実施基準について、主として繁殖毒性試験及び催奇形性試験 (発生毒性試験) において以下に示す変化がひとつ以上認められた場合に実施するように勧めている¹⁾。

- ① 繁殖毒性試験において、新生児の脳重量に被験物質投与に起因すると考えられる有意な変化あるいは神経系への影響を疑わせる機能的異常が継続して認められた場合
- ② 催奇形性試験において胎児の神経組織に被験物質投与に起因すると考えられる奇形が認められた場合
- ③ 成獣を用いた試験において被験物質投与に起因すると考えられる神経機能学的あるいは神経病理学的異常が観察された場合
- ④ 既知の発達神経毒性物質と類似した作用機序を示す化学物質
- ⑤ 疫学的調査により農薬の曝露と子供の発達障害に関連性が示唆された場合

ただし、上記の判断基準のうち催奇形性試験及び繁殖毒性試験結果の評価 (NOAEL の判定) は、あくまでも母動物に対する曝露量で決定されており、胎児あるいは新生児に対する実際の曝露量 (経胎盤あるいは経母乳曝露量) に基づいたものではないことが問題点として挙げられる。この点については DNT 試験そのものにおいても同様な検討問題として残されており、今後は胎児・新生児に対する経胎盤あるいは経母乳曝露量の算出方法を検討

する必要がある。特に被験物質に対する幼若動物と成熟動物との感受性の差を比較する場合には、この経胎盤及び経母乳曝露量 (体重 kg 当たりの曝露量) の算出は、極めて重要な評価指数となり得る。

5.3. DNT 試験実施件数

米国 EPA (OPPTS 870.6300) 及び OECD (TG 426) の DNT 試験ガイドラインに準拠して実施された発達神経毒性試験数及び被験物質の種類を以下に示す²⁾。

被験物質の種類	実施試験数
産業化学物質	8
農薬	73
医薬	3
溶媒	7
陽性対照物質	15
その他*	4

*:食品添加物、タバコ煙、制限給餌、母・仔分離飼育

これらの DNT 試験の内、米国 EPA ガイドラインに準拠し DNT 試験が実施され、その試験成績が EPA (Office of Pesticide Programs) に提出された農薬の数は 2006 年 8 月段階で 69 剤あり、今までに他の試験成績を含め総合的に評価が完了したものは 58 剤で、その中で DNT 試験結果が ADI あるいは急性参照量 (ARfD) に反映されたものは以下の 8 剤 (8/58)あった。

Carbaryl, Chlorpyrifos, Flufenacet, Lindane, Molinate,
Spirodiclofen, Tebuconazole, Zeta-cypermethrin

このうち慢性曝露評価に基づく ADI 設定に影響を及ぼしたものは 4 剤 (chlorpyrifos, flufenacet, spirodiclofen, tebuconazole) であった。これらの毒性評価に用いられたエンドポイントは、FOB、コリンエステラーゼ活性阻害、聴覚性驚愕、自発運動量、学習・記憶、脳重量、脳の計測病理等である。

なお、上記の DNT 試験 (110 試験) に供した被験物質 (103 化合物) 名は以下の如くである。

	chemicals and other stressors	用途	No. of studies
1	Abamectin アバメクチン	農薬 (殺虫剤)	1
2	Acephate アセフェート	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
3	Acetamiprid アセタミプリド	農薬 (ネオニコチノイド系殺虫剤)	1
4	Acibenzolar-s-methyl	農薬 (殺菌剤)	1
5	Acrylamide アクリルアミド *	産業 (ポテトチップス等に含有)	1
6	AE-0172747	農薬 (除草剤)	1
7	Aldicarb アルジカルブ	農薬 (カーバメート系殺虫剤)	1
8	Alitame アリテーム	その他 (人工甘味料)	1
9	Amicarbazone アミカルバゾン	農薬 (除草剤)	1
10	Atorvastatin アトルバスタチン	医薬 (高脂血症剤)	1
11	Azinphos methyl アジンホスメチル	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
12	BAS 510F	農薬 (殺菌剤)	1
13	BAS 670H	農薬 (除草剤)	1
14	Bifenthrin ビフェントリン	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
15	Carbaryl カルバリル	農薬 (カーバメート系殺虫剤)	1
16	Carbofuran カルボフラン *	農薬 (カーバメート系殺虫剤)	1
17	Chlorfenapyr クロルフェナピル	農薬 (殺ダニ剤)	1
18	Chlorite, sodium 亜塩素酸 Na	産業	1
19	Chlorpyrifos クロルピリホス *	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
20	CI-943	医薬 (向精神薬)	1
21	Cigarette smoke タバコ煙	その他	1
22	Clodinafop propargyl クロジナホッププロパルギル	農薬 (除草剤)	1
23	Clothianidin クロチアニジン	農薬 (ネオニコチノイド系殺虫剤)	1
24	Coumaphos クマホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
25	Cyclohexanemethanol シクロヘキサ ンメタノール	産業 (溶媒)	1
26	λ -Cyhalothrin シハロトリン	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
27	β -Cyfluthrin シフルトリン	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
28	Cymoxanil シモキサニル	農薬 (殺菌剤)	1
29	Zeta-Cypermethrin シペルメトリン	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
30	Decamethylcyclopentasiloxane	産業 (溶媒)	1
31	p,p-DDT *	農薬 (有機塩素系殺虫剤)	1
32	DEET(N,N-diethyl-meta-toluamide)	農薬 (虫除け剤)	1
33	Deltamethrin デルタメトリン *	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
34	Diazepam ジアゼパム	医薬 (向精神薬)	1
35	Diazinon ダイアジノン *	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
36	Dichlorvos ジクロルボス *	農薬 (有機リン系殺虫剤)	2

37	Dicrotophos ジクロトホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
38	Dietary restriction 制限食	その他	1
39	Dimethoate ジメトエート	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
40	Disulfoton ジスルホトン	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
41	Emamectin エマメクチン	農薬 (マクロライド系殺虫剤)	1
42	Epidermal growth factor *	医薬 (抗がん剤)	1
43	s-Ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC)	農薬 (除草剤)	1
44	Ethoprophos エトプロホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
45	Ethylbenzene エチルベンゼン	溶媒 (合成樹脂原料)	1
46	Etofenprox エトフェンプロックス	農薬 (合成ピレスロイド系殺虫剤)	1
47	Fenamidon フェナミドン	農薬 (殺菌剤)	1
48	Fenamiphos フェナミホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
49	Fentin hydroxide フェンチン	農薬 (殺菌剤)	1
50	Fipronil フィプロニル	動物薬 (フェニルピラゾール系殺虫剤)	1
51	Flubendiamide フルベンジアミド	農薬 (殺虫剤)	1
52	Flufenacet フルフェナセット	農薬 (除草剤)	1
53	Glufosinate ammonium グルホシネート	農薬 (除草剤)	1
54	Glyphosate trimesium グリホセート	農薬 (有機リン系除草剤)	1
55	GN1180 (MN rgp120/HIV-1)	医薬 (抗エイズワクチン)	1
56	Hydrogen sulfide 硫化水素	産業	1
57	Imidacloprid イミダクロプリド	農薬 (ネオニコチノイド系殺虫剤)	1
58	Iminodipropionitrile イミノジプロプリオニトリル *	神経毒性物質	1
59	Indoxacarb インドキサカルブ	農薬 (殺虫剤)	1
60	Isopropanol イソプロパノール	溶媒	1
61	Isoxaflutole イソキサフルトール	農薬 (除草剤)	1
62	Lead nitrate 酢酸鉛 *	産業	1
63	Lindane リンデン	農薬 (殺虫剤)	1
64	Malathion マラソン	農薬 (有機リン・硫黄系殺虫剤)	1
65	Maternal separation 母子分離	その他	1
66	Methamidophos メタミドホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
67	p-Methane-3,8-diol	生物農薬	1
68	Methimazole メチマゾール	医薬 (抗甲状腺薬)	6
69	Methyl bromide メチルブロマイド	農薬 (殺虫剤)	1
70	Methyl parathion メチルパラチオン	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
71	Methylazoxymethanol メチルアゾキシメタノール *	発がん性色素	2
72	Methylmercury 有機水銀 *	産業	1

73	n-Methylneodecanamide メチルネオデカナミド	農薬 (殺虫剤)	1
74	Molinate モリネート	農薬 (チオカーバメート系除草剤)	1
75	Naled ナレド	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
76	Nelfinavir ネルフィナビル	医薬 (抗エイズ治療薬)	1
77	Nitrous oxide 亜酸化窒素	産業	1
78	Octamethylcyclotetrasiloxane	産業	1
79	Perchlorate パーコレート	医薬・産業	1
80	Phorate ホレート	農薬 (有機リン系殺虫剤)	2
81	Prochloraz プロクロラズ	農薬 (有機塩素系殺菌剤)	1
82	Profenofos プロフェノホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
83	Propylthiouracil プロピルチオウラシル	医薬 (抗甲状腺薬)	2
84	Pymetrozine ピメトロジン	農薬 (ピリジンアゾメタン系合成殺虫剤)	1
85	Pyrasulfotole ピラスルホトール	農薬 (除草剤)	1
86	Spirodiclofen スピロジクロフェン	農薬 (殺ダニ剤)	1
87	Prothioconazole プロチオコナゾール	農薬 (殺菌剤)	1
88	Styrene スチレン *	産業 (合成樹脂原料)	1
89	Tetrabromobisphenol A ビスフェノール A	産業	1
90	Tebuconazole テブコナゾール	農薬 (殺菌剤)	1
91	Terbufos テルブホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
92	Tetrachlorvinphos テトラクロルビンホス	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
93	Thiamethoxam チアメトキサム	農薬 (ネオニコチノイド系殺虫剤)	1
94	Thiacloprid チアクロプリド	農薬 (ネオニコチノイド系殺虫剤)	1
95	Thiram チラム	農薬 (ジチオカーバメート系殺菌剤)	1
96	Triallate トリアレート	農薬 (チオカーバメート系除草剤)	1
97	Tribufos トリブホス	農薬 (有機リン系成長調節剤)	1
98	Trichlorfon トリクロルホン *	農薬 (有機リン系殺虫剤)	1
99	1,1,1-Trichloroethane トリクロロエタン	溶媒	1
100	Trichloroethylene トリクロロエチレン	溶媒	1
101	Triethylene glycol monomethyl ether	溶媒	1
102	Trimethyltin トリメチルスズ *	産業 (殺菌剤、不妊化剤)	1
103	Ziram ジラム	農薬 (チオカーバメート系殺菌剤)	1

*：陽性対照物質^{3,4)}、産業：産業化学物質

5.4. EPA と OECD の DNT 試験ガイドラインの比較

前項「4. 米国 EPA と OECD の発達神経毒性試験ガイドラインの比較」において示したように、内容を精査すると両ガイドラインの間には種々の違いはあるが、最も大きな相違点は被験物質の投与期間と各検査項目に対するサンプル数（検索例数）である。EPA では、投与期間は妊娠 6 日から生後 10 日までとし、胎児・新生児が被験物質に曝露される経路を胎盤及び母乳経路に限定している。一方、OECD では曝露期間を妊娠 6 日から生後 21 日の離乳時までとし、投与方法（混餌投与方法を採択した場合）によっては新生児は経母乳以外に経口経路からも曝露される可能性が残るが、供試動物ラットの脳・神経系の発達段階を考慮すると、生後 11 日の剖検（EPA）よりは生後 22 日の離乳時の剖検（OECD）の方が個体差も小さく、被験物質の影響を判定するには有利といえる。一方、各検査項目に対するサンプル数に関しては OECD ガイドラインの方がより多くのサンプル数を要求しており、統計学的解析結果に対する信頼性は高い。例えば、病理組織学的検査では EPA の各群各性 6 例に対し OECD は各群各性 10 例を要求しており、特に統計解析を伴う計測病理学的評価において信頼性の高いデータが得られる。OECD の DNT 試験ガイドライン (TG 426) は、基本的に EPA のガイドラインを踏襲しているが、最終化されたのは 2007 年であり、EPA のガイドラインの制定時期 (1998 年) に比べ 10 年近く開きがあり、その間に実施された数多くの DNT 試験に関する技術・評価法のバリデーションを通じ改善が加えられている。従って、現時点では被験物質による発達神経毒性を検出する試験法としては OECD ガイドラインの方がより優れていると判断される。EPA も上記の点については既に認識しており、近い将来 OECD ガイドラインに準じた EPA DNT 試験ガイドライン (OPPTS 870.6300) の修正版を出す予定であることを言及している (Dr. Makris)。

5.5. DNT 試験における信頼性の高い有効なパラメーター

DNT 試験では神経機能学的及び神経構造的変化を捉えるために多数のパラメーターが使用されているが、過去に実施された DNT 試験結果の評価から、無毒性量 (NOAEL) の設定根拠 (エンドポイント) として採択された変化は、脳重量、自発運動量、学習・記憶能力、聴覚性驚愕、コリンエステラーゼ阻害、脳重量、脳計測病理など様々で化合物によって異なる。その中でも信頼性が高く有効な検索指標のひとつとして計測病理学的解析が挙げられている (Dr. Raffaele)。この計測病理学的解析では、得られた数値データを統計学的に解析するため、サンプル数の多い OECD ガイドラインに準じた試験の方がより信頼性の高いデータが得られる。これに対し通常の形態病理学的手法により被験物質投与に関連付けられる組織学的変化が検出された症例数は少ないことが指摘されている。また、有機リン剤やカーバメート系農薬の DNT 試験では、コリンエステラーゼ活性阻害が有力な指標として

評価されている。

5.6. DNT 試験の感受性

DNT 試験の感受性に関しては、単純に ADI 設定のための無毒性量 (NOAEL) を他の試験系と比較した場合、DNT 試験における NOAEL (mg/kg/day) はむしろ高値を示す傾向にあり、ADI 設定に採択されたケースは少ないことが指摘されている (Troy Seidle, DNT Symposium, Virginia, 2006)。これに対し、EPA は「各試験系において得られる無毒性量 (NOAEL) は、各試験の目的に応じた用量設定に依存しており、目的の異なる用量設定から得られた NOAEL で試験の感受性を判定するのは誤っている」と反論している (Dr.Makris)。加えて、EPA は「短期間の曝露期間 (妊娠 6 日から生後 10 日あるいは 21 日) を考慮すれば、繁殖毒性試験など他の反復投与毒性試験に比べ、その感受性はむしろ高いと言える」と付け加えている。ただし、DNT 試験における NOAEL はあくまでも母動物に対する曝露量で決定されており、胎児あるいは新生児に対する実際の曝露量 (経胎盤あるいは経母乳曝露量) により評価されていないことが問題点として挙げられる。この点 (経胎盤あるいは経母乳曝露量の算出) については DNT 試験の実施根拠とされる発生毒性試験 (催奇形性試験) 及び繁殖毒性試験においても同様な問題として残されており今後の検討課題であろう。特に被験物質に対する幼若動物と成熟動物との感受性の差を比較する場合には、この経胎盤及び経母乳曝露量 (体重 kg 当たりの曝露量) の算出は、極めて重要な評価指数となり得る。

5.7. DNT 試験の安全係数 (Safety factor) への影響

米国 EPA では、発生毒性 (催奇形性) 試験や繁殖毒性試験データにより乳幼児・子供への影響が示唆された場合には、DNT 試験の追加実施を要求し、そのようなデータがない段階では通常的安全係数 (Safety factor) 100 倍に加え、さらに 10 倍の不確実係数 (Uncertainty factor) を掛け 1000 倍としている。ただし、DNT 試験データやその他の信頼できる科学的データが新たに入手され、ヒトへの安全性 (特に乳幼児・子供に対する安全性) が担保できると判断される場合には、その内容に応じ 3 倍あるいは 1 倍に追加係数が軽減される⁵⁾。現在では、乳幼児・子供への影響が示唆されるケースでは DNT 試験データも併せて提出される傾向にあるので、提出された全試験データから単純に最も低い NOAEL を求め、それに基づき ADI が設定される。

5.8. DNT 試験結果のヒトへの外挿性

DNT 試験結果のヒトへの外挿性に関しては、同じ被験物質でも動物種間で結果が異なり、また、ヒトと実験動物では神経行動発達の次元が機能的あるいは構造的 (形態的) にも著

しく異なることから、現時点では未だ外挿性を評価するに十分な科学的データは得られていない。特にヒトでみられる注意欠陥多動性障害、学習障害あるいは自閉症などの発達障害は実験動物モデルにおいて再現することは極めて困難であると言われている。しかしながら、米国 EPA では乳幼児・子供への影響が懸念される環境化学物質は可能な限り排除しようとするスタンスで DNT 試験の実施を推奨している。

参考文献：

- 1) EPA: Pesticides; Data Requirements for Conventional Chemicals
(<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2007/October/Day-26/p20826.htm>)
- 2) Makris SL, Raffaele K, Allen S, Bowers WJ, Hass U, Alleva E, Calamandrei G, Sheets L, Amcoff P, Delrue N, and Crofton KM: A retrospective performance assessment of the developmental neurotoxicity study in support of OECD Test Guideline 426. Environmental Health Perspectives 117(1): 17-25, 2009.
- 3) Andersen HR, Nielsen JB, and Grandjean P: Toxicological evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. Toxicology 144: 121-127, 2000.
- 4) Bjorling-Poulsen M, Andersen HR, and Grandjean P: Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. Environmental Health 7:50, 2008.
- 5) US EPA: Determination of the appropriate FQPA safety factors in the organophosphorous pesticide cumulative risk assessment: susceptibility and sensitivity to the common mechanism, acetylcholinesterase inhibition. FIFRA Scientific advisory panel meeting, June 2002.

なお、米国 EPA スタッフによる最新のレビューペーパーである上記の文献 2) を参考資料として末尾に添付する。

6. 化学物質による発達神経毒性に関する 疫学的文献調査

化学物質による発達神経毒性に関する疫学的文献調査の概要

疫学的研究に関する文献調査では、近年行われた環境化学物質の発達神経系に及ぼす影響に関する研究論文 18 報について調査を行った。その 18 報における研究対象物質の内訳は以下の如くである。

文献番号	対象物質	研究項目	年
1	PCB	胎児・乳幼児の神経行動機能障害	1996
2	PCB	乳幼児の神経発達異常 (内分泌系との関連性)	2002
3	PCB/有機水銀	胎生期曝露による神経行動障害	2002
4	PCB/有機水銀	乳幼児・子供の認知発達障害	2003
5	有機水銀	子供の認知・視覚・運動機能への影響	2000
6	有機水銀	子供の発達障害 (自閉症) との関連性	2006
7	有機水銀	胎生期曝露の神経行動機能への影響	2006
8	有機水銀	魚介類摂取による胎生期曝露の影響	2007
9	有機水銀	メチル水銀の発達神経毒性	2008
10	有機水銀	魚介類摂取による発達障害	2008
11	鉛	子供の発達障害 (メキシコ)	2006
12	ヒ素	森永粉ミルク中毒患者 (幼児) の追跡調査	2006
13	カドミウム	子供の運動、知覚、免疫機能への影響	2006
14	有機リン剤	子供の神経行動発達への影響	2008
15	殺虫剤	子供の発達神経への影響 (欧州)	2008
16	有機リン剤	経母乳曝露の影響	2009
17	環境汚染物質	乳幼児・子供の行動発達への影響	2005
18	有機リン剤	子供の記憶・運動機能への影響	2004

上の表に示す様に、近年では欧米先進諸国を中心に有機塩素系化合物 (PCB)、有機水銀、鉛、農薬 (リン剤、カーバメート、ピレスロイド等) などの環境化学物質の周産期曝露と乳幼児・子供の神経系の発達との関連性についてコホート研究が進み、新たに疫学的研究知見が集積されつつある。例えば、PCB では複数のコホート研究において小児の認知機能や思春期の発達障害との関連性が報告されている。また、有機リン剤のパラチオン曝露と子供の記憶や運動機能の低下との関連性が指摘されている。しかしながら、コホート研究

における曝露指標としての測定物質は研究間でかなり異なっており、また、小児の神経発達指標などアウトカムの実測も研究により違いがあることから、明確な因果関係を示唆する十分な証拠が未だ得られておらず、今後の幅広い緻密な研究が待たれる。

以下に今回調査した 18 報の各文献の要旨を掲載する。

文献 1.

Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity.

Seegal RF.

Crit Rev Toxicol. 1996 Nov;26(6):709-37.

Abstract

この総論は以下に述べる内容を示唆するような疫学的及び実験的に得られた重要な知見からクリティカルなものを選択して評価することを目的とする。

- (1) ポリ塩化ビフェニル (PCB) 及び関連ハロゲン化芳香族炭化水素類の曝露は、ヒト及び実験動物において、特に妊娠期及び授乳期の曝露により顕著な神経及び行動学的機能障害を引き起こす。
- (2) PCBs の神経化学的作用は、PCB 類の構造及び曝露時における動物の発達状態に依存する。
- (3) これらの変化に関する作用機序は、基本的な細胞シグナリングの変化及び重要な中枢神経系の神経伝達物質の合成及び活性、発達過程の脳の構築及びこれらの環境汚染物質に対する行動反応に影響する内分泌機能の変化に関与している可能性がある。

文献 2.

PCB-induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction.

Winneke G, Walkowiak J, Lilienthal H.

Toxicology. 2002 Dec 27;181-182:161-5.

Abstract

ポリ塩化ビフェニル (PCBs) は母親の体内蓄積物が胎盤を経由することにより、胎児に曝露される。さらに、母乳で育てられた乳児は出生後に母乳中の PCBs に曝露される。広範な生物学的影響のうち、内分泌器官との相互作用及び発達神経毒性がこれら化学物質混合物の顕著な特徴である。神経発達遅延と出生前もしくは出生後早期における環境中濃度での PCBs 曝露との関連性は、いくつかのコホート研究で報告されている。各試験間で、交絡、PCB 成分中の有害因子、毒性影響のスペクトラム及び持続性などの点について相違が認められるものの、初期発達過程での PCB 曝露に関連して有害作用が起こることが示された。これらのコホート研究のみでは、神経発達異常の誘引となる PCBs の役割はまだ証明されたとはいえないが、実験結果からは PCBs が発達神経毒性を有することは明らかとなった。この作用の発現機序はいまだに不明であるが、エストロゲン/アンドロゲン系や特に甲状腺ホルモン系などの内分泌系との相互作用が PCB 誘発神経発達毒性を説明する上で考察されている。この点におけるいくつかの知見について概説する。

文献 3.

Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies.

Nakai K, Satoh H.

Tohoku J Exp Med. 2002 Feb;196(2):89-98.

Abstract

出生前のメチル水銀曝露に伴う健康への悪影響は、魚を食べている人口集団で行われたいくつかの前向きコホート研究により明らかとなっている。フェロー諸島バース・コホートの前向き研究では、以前に安全だと考えられていた出生前のメチル水銀曝露量においても、いくつかの機能的な領域におけるわずかな障害が起こることが実証された。近年の更なる研究においては、メチル水銀とポリ塩化ビフェニル (PCBs) 併用曝露に関連した神経行動学的障害が認められた。一方、セイシエルの前向き研究では、このようなメチル水銀曝露と神経発達障害との相関は認められなかった。メチル水銀を出生前及び出生後に曝露された高濃度曝露群では、低濃度曝露群よりもいくつかの発達試験においてよい点数を示した。両研究におけるこの矛盾した相違をここに要約する。ヒトがメチル水銀に曝露される主要源は魚類である。ポリ塩化ビフェニル (PCBs) や農薬を含むかなりの数の汚染物質は魚類中に存在し、また PCBs を含むいくつかの有機化学物質は疫学的調査により発達過程の脳に神経毒性を引き起こすという裏づけがあることから、これらの汚染物質の複合影響は、メチル水銀の神経毒性を議論するうえで考慮しなければならない。従って本稿では、PCBs 曝露に焦点を当てた主要な前向きコホート研究について再検討した。

文献 4.

Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg.

Stewart PW, Reihman J, Lonky EI, Darvill TJ, Pagano J.

Neurotoxicol Teratol. 2003 Jan-Feb; 25(1): 11-22.

Abstract

いくつかの疫学的研究において、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の出生前曝露と就学前までの幼少期におけるわずかな認知発達障害との関係が予測されている [Child Dev. 56 (1985) 853; J. Pediatr. 116 (1990) 38; J. Pediatr. 134 (1999) 33; Toxicol. Lett. 102-103 (1998) 423; Neurotox. 21 (6) (2000) 1029-1038]。しかしながら、全ての研究がこれらの関連を示しているわけではないため (J. Pediatr. 119 (1991) 58-63)、認知発達における出生前の PCB 曝露の影響に関する議論は継続されている。本研究はこの問題を解決するための追加データを示すために計画された。オスウィーゴ新生児・幼児発達プロジェクトに登録された 212 人の子供たちを生後 38 ヶ月齢に McCarthy Scales of Children's Abilities を用いて評価した。また、生後 54 ヶ月齢にも再度評価を行った。認知発達の予測において重要な判断材料となる社会経済的地位 (SES)、母親の IQ、母親の教育状況、家庭環境、喫煙、その他の様々な条件を最初に調整後、両年齢における PCBs の出生前曝露 (臍帯血 PCBs) と McCarthy Scales の成績との関連性を評価した。臍帯血 PCBs を測定することにより、生後 38 ヶ月齢の McCarthy Scales の成績におけるわずかだが検出可能な障害を統計学的有意に予測可能であった。さらに、臍帯血 PCBs と母親の毛髪中の水銀 (MeHg) レベルとの間に有意な相互関係がみられ、出生前に高レベルの PCB に曝露された患者では、出生前のメチル水銀曝露レベルと McCarthy Scales の成績には関連性がなかった。約 1.5 年後 (生後 54 ヶ月齢) に再評価した際には、PCBs またはメチル水銀と McCarthy Scales の成績には関連が認められなかった。McCarthy Scales の成績の年齢による推移を調査したところ、より多く曝露された子供たちは、最も少なく曝露された子供たちと 54 ヶ月で同じ成績になることが示された。今回のデータは部分的に Jacobson et al., Patandin et al., and Walkowiak et al.らの調査結果 [J. Pediatr. 116 (1990) 38; J. Pediatr. 134 (1999) 33; Lancet 358 (2001) 1602] を再現しているが、ここで報告した結果は機能的回復が起こった可能性を示している。さらに、これ以降の調査で再現性が取れるまで、PCBs とメチル水銀の相互関係は確定的ではないと考えられる。

文献 5.

Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children from the pilot cohort at 108 months following prenatal exposure to methylmercury from a maternal fish diet.

Davidson PW, Palumbo D, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Wilding GE, Clarkson TW.

Environ Res. 2000 Sep;84(1):1-11.

Abstract

セイシェル共和国子供の発達スタディ (SCDS) では、妊娠中の母親へのメチル水銀曝露と発達への悪影響との間にいかなる関連も確認できていない。この報告では、試験的なコホートからの 87 人の子供たちについて 9 歳時に評価を行った。各子供には、標準化された精神測定及び神経精神的テストを用いて、特別な認知・視覚運動・運動能力のバッテリー試験を実施した。これらの結果、母親のメチル水銀曝露と発達の結果判定との間に悪影響を示す関連性はないことが示唆された。3 つの評価項目 (Boston Naming Test 及び 2 つの視覚運動協調性テスト) について、男児での能力の向上は出生前のメチル水銀曝露の増加と関連した。このコホートの約 35% で出生後の毛髪が欠如していたが、出生前及び出生後の両方のメチル水銀曝露量を含む 2 回目の分析を実施した。出生前曝露に関する 2 回目の分析結果は、初回の分析結果を完全にではないが反映していた。この研究の結果は、SCDS の主要なコホートにおける 66 ヶ月時の評価から得られた以前の調査結果と一致している。メチル水銀は神経毒性を有するため、この影響は魚の摂取と関連した他の要因により起こると考えられる。

文献 6.

Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas.

Palmer RF, Blanchard S, Stein Z, Mandell D, Miller C.

Health Place. 2006 Jun;12(2):203-9.

Abstract

テキサス教育局と米国環境保護庁のデータを用いて、テキサスにおける環境中に放出された水銀、特殊教育、自閉症率との関連性を調査した。学区域人口の規模、経済的及び人口統計学的要因の補正には、ポアソン回帰分析を用いた。環境中に放出された水銀の増加と関連して、特殊教育生徒率と自閉症率は有意に増加した。平均では環境中に放出された水銀 1000 ポンド毎に特殊教育施設率が 43%増加し、自閉症率は 61%増加した。環境中に放出された水銀及び特殊教育率の関連性は、自閉症率の増加と高度に相関した。この地域相関研究により、環境中に放出された水銀と自閉症のような発達障害との関連性に関する更なる研究の必要性が示唆される。政策計画や費用検討が必要である。

文献 7.

Benchmark concentrations for methyl mercury obtained from the 9-year follow-up of the Seychelles Child Development Study.

van Wijngaarden E, Beck C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW.

Neurotoxicology. 2006 Sep;27(5):702-9.

Abstract

メチル水銀は発達過程の神経系に対して非常に有毒である。全ての魚に少量存在するため、ヒトへの曝露は主に魚類の摂取により起こる。出生前に高濃度のメチル水銀が曝露された際の発達神経毒性試験の結果から、妊娠中にバックグラウンドレベルの汚染がある魚を摂取した母親から生まれた子供において神経機能障害がもたらされる危険性が高まるか否かという疑問が生じた。ニュージーランド、フェロー諸島、セイシェル諸島での研究から決定されたベンチマーク用量は、母親の毛髪から測定された 4-25 ppm の用量においても乳児への危険性が引き起こされるということを示唆している。しかしながら、ベンチマーク用量の算出に影響を及ぼすと考えられる不確実な要因が多数存在するため、安全な摂取レベルを算出するのにもっとも適した方法の調査の継続が大変重要である。以前に、我々はセイシェルにおいて 66 ヶ月追跡調査したメインコホート研究で集められたデータにベンチマーク分析を適用した結果を発表した。ここでは、26 の異なる神経行動異常を示した 643 人のセイシェル諸島の 9 歳の子供たちについて、母親の毛髪中のメチル水銀のベンチマーク用量 (BMD) を算出することによりメインコホート分析を拡大して実施した。これらの連続した神経行動症状に対し、様々な共変量を用い、K-力モデル・ワイブルモデル・ロジスティックモデルを含む用量反応モデルを適用した。26 種の神経行動症状の BMD の 95% 信頼限界 (BMDL) は、ロジスティックモデルの 20.1 ppm (range = 17.2 – 22.5) から、K-力モデルの 20.4 ppm (range = 17.9 – 23.0) まではばらついた。これらの測定値は、66 ヶ月の追跡調査で得られた値よりも若干低い値である。セイシェル共和国子供の発達スタディは、メチル水銀の安全摂取量の算出に対する確固たる科学的な基礎を提供するために継続している。

文献 8.

Separation of risks and benefits of seafood intake.

Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, Weihe P.

Environ Health Perspect. 2007 Mar;115(3):323-7.

Abstract

背景：魚介類には重要な栄養素が含まれているが、メチル水銀などの有毒な汚染物質も含まれている。従って汚染物質防御勧告は、食事に関する勧告と矛盾する場合がある。この矛盾を解決しようとしても、ほとんどの疫学的研究では栄養面の有益性か水銀の毒性についてかどちらか片方のみが調べられており、その両方にかかわるものは少ない。

目的：同じ食物に由来する二つの曝露物質によって結果的には同様な健康への影響が示されるという事象は、交絡の古典的な例である。このバイアスの程度を調べるために、著者らはフェロー諸島におけるメチル水銀を用いた発達神経毒性の前向き研究で得られたデータについて構造方程式モデルを適用した。

結果：妊娠期に魚類を摂取した際に得た利益 (benefit) を補正すると、補正しない場合に比較して胎生期のメチル水銀曝露の影響は増加した。食事についての聞き取り調査における回答は、魚介類の栄養分の胎児への供給を推測するには曖昧なものであるように考えられ、この曖昧さが交絡によるメチル水銀の影響評価にバイアスをもたらすと考えられた。我々は、誤差変動の範囲を特定するための感度分析を用いてこのバイアスの大きさを調べた。現実的に許容しうると考えられる正確さのレベル (Realistic imprecision) では、水銀に伴う不利益 (deficit) は補正前の影響に比較して2倍まで増加した。

結論：これらの結果から、beneficial パラメーターにおける制御不能な交絡及びこの交絡の曖昧さが毒物曝露の影響の把握に相当な過小評価をもたらす原因となることが示唆された。したがって魚介からのメチル水銀曝露の毒性影響は、観測的な研究から得られた補正していない結果により過小評価されると考えられる。そしてそのバイアスの程度は試験に依存するものとなるであろう。

文献 9.

Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers.

Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M, Ceccatelli S, Manzo L.

Regul Toxicol Pharmacol. 2008 Jul;51(2):201-14.

Abstract

メチル水銀は、ヒト及び実験動物において神経発達に影響を及ぼすことが昔から広く知られている環境中及び食品中の毒性物質である。メチル水銀のリスク評価は、主に日本とイラクにおける広範囲に及ぶ中毒症状のヒトのデータ、及びさまざまな魚を食べる世界中の地域における子供の発達と神経毒性の子宮内曝露との関係を調査した広範囲な疫学的研究に基づいて行なわれている。多数の文献や研究がなされているにもかかわらず、メチル水銀の神経毒性作用の閾値、特にいつ神経行動にわずかな影響を及ぼすのかについては未だ不明である。本稿では、メチル水銀の発達神経毒性に関する臨床的及び疫学的調査結果を概説した。メチル水銀の毒性作用を修飾と思われる食品や栄養・性別・曝露方法・他の神経毒性物質との共曝露といった要因の潜在的影響に特に注目した。老化に伴い何らかの症状が起こるまたは悪化するという概念と共に、これらの要因は、発達過程の曝露における安全領域の確定においても問題のひとつとなると思われる。

文献 10.

Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy.

Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JM, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Clarkson TW.

Neurotoxicology. 2008 Sep;29(5):767-75.

Abstract

魚には脳の良好な成長と発達を促す栄養素が含まれているが、毒性作用を持つメチル水銀も含まれている。本研究では、魚の栄養素を選別して摂取する、または母親の栄養状態を測定することが、子供の発達に対して出生前のメチル水銀曝露の影響を推定する際の重要な交絡因子を指摘するという仮説を検証した。この研究は、魚の消費が多いインド洋列島のセイシェル共和国で行われた。この研究では、長期的コホート研究方式を用いた。合計 300 人の母親が妊娠初期に登録された。脳の発達に重要であると考えられている栄養素を妊娠中に測定し、また、出生前のメチル水銀曝露もともに測定した。子供については 30 ヶ月齢まで定期的に評価した。229 人の子供から解析のための共変動データを得た。評価は主に Bayley Scales of Infant Development-II (BSID-II) を用い、9 ヶ月齢及び 30 ヶ月齢で適用した。幼児の認識力及び記憶力の測定は、4 つの二次計測を併用し、5、9、25 ヶ月にも実施した。コホート対象の母親たちは、平均して一週間当たり 537 g の魚 (9 回の魚を含む食事) を摂取した。産前の母親の毛髪中の平均メチル水銀曝露量は、5.9 ppm であった。初回の解析では、メチル水銀、母親の栄養状態及び子供の BSID-II の得点との関連性について調査したところ、メチル水銀と 30 ヶ月における平均精神運動発達指数 (PDI) に逆相関が認められた。PDI とメチル水銀のみあるいは栄養状態のみとの関連を調べた二回目の解析では、メチル水銀と 30 ヶ月における PDI の関連性は有意境界であり、栄養状態とは関連性が認められなかった。試験的に実施した生後 5 ヶ月時における計測では、ヨウ素濃度と明らかに関連性が認められたが、出生前メチル水銀曝露とは関連性が認められなかった。これらのことから、出生前メチル水銀曝露と子供の発達結果との関連性を調査する試験において、母親の栄養状態が交絡を引き起こしている可能性が示唆される。

文献 11.

Longitudinal associations between blood lead concentrations lower than 10 microg/dL and neurobehavioral development in environmentally exposed children in Mexico City.

Téllez-Rojo MM, Bellinger DC, Arroyo-Quiroz C, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-García A, Schnaas-Arrieta L, Wright RO, Hernández-Avila M, Hu H.

Pediatrics. 2006 Aug;118(2):e323-30.

Abstract

目的：現在、疾病管理予防センターのガイドラインでは子供の血中の鉛の毒性影響を起こさない上限を 10 µg/dL としているが、近年の研究ではこれを疑問視する情報が増加している。我々は、メキシコシティ前向き鉛スタディのデータを用いて、血中鉛濃度と生後 12 または 24 ヶ月齢における神経発達との用量－効果関係について評価した。

方法：調査対象群は、生後 12 及び 24 ヶ月齢で血中鉛濃度が 10 µg/dL 以下であった 294 人の子供たちから構成された。血中鉛濃度は、グラファイト炉原子吸光分析法を用いて測定した。同じ時期に Bayley Scales of Infant Development II を実施した。精神発達指数と精神運動発達指数を評価した。

結果：共変量で補正すると生後 24 ヶ月齢における子供の血中鉛濃度と 24 ヶ月における精神発達指数及び精神運動発達指数には有意な逆相関が認められた。12 ヶ月齢における血中鉛濃度と同時期の精神発達指数または精神運動発達指数の得点及び 24 ヶ月齢における精神発達指数との間には関連性が認められなかったが 24 ヶ月における精神運動発達指数とは有意な相関が認められた。この相関は、臍帯血中鉛濃度、24 ヶ月での精神発達指数または精神運動発達指数の得点、12 ヶ月の調査での精神発達指数または精神運動発達指数の得点で補正しても変化しなかった。24 ヶ月齢の精神発達指数や精神運動発達指数の得点とその時点での血中鉛濃度との関連係数は、血中鉛濃度が 10 µg/dL 以上の子供たちよりも血中鉛濃度が 10 µg/dL 以下の子供たちで有意に大きかった。

結論：これらの分析から、子供の神経発達には 10 µg/dL 以下の血中鉛濃度においては逆相関することが示唆される。我々の調査結果は、血中鉛濃度と神経行動学的検索結果との supralinear (上比例性) 相関と一致した。

文献 12.

Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder.

Dakeishi M, Murata K, Grandjean P.

Environ Health. 2006 Oct 31; 5:31.

Abstract

ヒ素中毒は何百万人もの人々に影響を及ぼしている世界的な健康問題である。曝露の主因は、天然地質由来のヒ素により汚染された飲料水である。現在のリスク評価は、ヒ素に認められた発がん性に基づいているが、神経毒性のリスクについては見過ごされている。1955年に日本の幼児の間でヒ素中毒が発生し、100人以上が亡くなった。原因は、森永製菓の作った汚染粉ミルクであった。森永粉ミルク中毒の詳細は日本語のみで発表されているため、この中毒事故の要約及びその長期間にわたる継続事例について報告する。行われた分析から、森永粉ミルクから作られたミルクのヒ素濃度は約 4-7 mg/L と計算され、一日量に相当する 500 µg/kg 体重をわずかに上回る。ミルクは薄めて用いられたため、曝露量はより低いものと考えられる。臨床的な中毒例は、曝露後 2,3 週間で発生し、総曝露量は約 60 mg であった。この事件から発達神経毒性の有害性評価に関する明確な知見が得られた。現在 600 人以上の犠牲者が生存しており、彼らは 50 代になっているが、精神遅滞、神経学的疾病、その他の障害といった重度の後遺症に苦しんでいることが報告されている。環境中のヒ素に曝露された子供たちの近年の疫学的調査と共に、これらのデータは無機ヒ素曝露のリスクアセスメントにおいて、神経毒性が重要な指標であると考えられる必要があることを示している。

文献 13.

Cadmium and children: exposure and health effects.

Schoeters G, Den Hond E, Zuurbier M, Naginiene R, van den Hazel P, Stilianakis N, Ronchetti R, Koppe JG.

Acta Paediatr Suppl. 2006 Oct;95(453):50-4.

Abstract

カドミウムの体への曝露と蓄積は若い年齢から始まる。子供は主に食物、間接喫煙、ハウスダストを通じて曝露される。体内からの排泄は限られている。腎臓へのカドミウムの蓄積は、成人期で認められる腎毒性や骨粗しょう症などに関与している。呼吸器からのカドミウム曝露は、成人における肺がんにも関与している。胎盤及び母乳を通じての新生児への移行は限られてはいるが、実験動物においては催奇形性及び発達毒性が認められた。子供を含むヒトでの調査におけるデータベースは限られているが、子供たちの運動及び知覚的行動に対する影響は、子宮内カドミウム曝露の上昇と関連がある。学齢児童の尿カドミウム濃度は、免疫抑制影響と関連性があった。これらの結果を確かめるためには、更なる研究が必要である。*In vitro* と動物を用いた実験データでは、視床下部－下垂体軸のさまざまなレベルにおいてカドミウムが影響を与えることが示され、内分泌もしくは免疫系に障害を起こしうると考えられる。子供に対するカドミウムの直接的な影響とともに、成長後のみに見られる重篤な健康に対する影響を引き起こすようなカドミウムの蓄積を可能な限り防ぐため、若年期におけるカドミウム曝露は制限されなければならないものである。

文献 14.

Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: review of epidemiological studies.

Jurewicz J, Hanke W.

Int J Occup Med Environ Health. 2008;21(2):121-32.

Abstract

目的：従来の農薬は、害虫と認識される生物を滅ぼす、撃退する、抑制する事を目的とする物質の多種のグループからなる。鉛、水銀及び PCBs の研究と比較して、農薬の疫学的研究では発達神経毒性の評価がほとんどなされていない。

材料及び方法：農薬に曝露された子供たちの神経行動学的発達について焦点を当てた疫学的調査を、PubMed・Medline・EBSCO・Agricola・TOXNET のデータベースを調査することにより確認した。

結果：本研究の結果から、子供の農薬への曝露は、神経行動学的発達に障害をもたらす可能性があるということが示唆される。出生前及び幼児期に有機リン系農薬 (OP) に曝露された子供たちは、短期記憶を含む課題を行うことが困難であり、また反応時間の増加、精神的発達の障害、広範囲に及ぶ発達上の問題を示すと考えられた。有機リン系農薬曝露の影響は、新生児においては主に異常反射の増加、若年者では精神的や感情的な異常として示されている。有機塩素系農薬への曝露と神経発達に対する影響との関連性を調査している研究では、矛盾した結果を示している。ある研究では精神及び精神運動機能に障害を引き起こすと報告しているのに対し、他の研究では、上記の結果は得られなかったとしている。

結論：疫学的調査に基づく情報は、農薬に曝露される人々や子供たちの間で、農薬の使用と神経発達障害の関連性についての認識を増やす必要があることを示唆する。従って、principle of prudence すなわち慎重性の原則を規範とすべきである。

文献 15.

Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe.

Bjørling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P.

Environ Health. 2008 Oct 22;7:50.

Abstract

農業で用いられる農薬は、雑草や害虫、真菌といった好ましくない生物種から収穫物を保護する役割を持つ。多くの化合物は、害虫の神経系を標的としている。脳生化学的な類似性のため、このような農薬はヒトに対しても神経毒性を持つ可能性がある。発達過程の脳が特に神経毒性を示す農薬の有害作用に脆弱であるという懸念が高まっている。現在の安全性試験の要求事項には、発達神経毒性は含まれていない。そこで、我々は現在使用されている農薬の神経毒性について発表された知見について、特に初期発達時期のリスクに焦点をあてて系統的評価を行った。疫学的調査は神経発達障害も伴ってはいるものの、主には農薬の混合曝露について行われている。典型的な化合物を用いている実験では、近年ヨーロッパで使われている有機リン化合物、カルバメート、ピレスロイド、エチレンビスジチオカルバメート、クロロフェノキシ系除草剤などの多くの農薬が神経発達毒性を引き起こす可能性があることを示唆している。脳の発達に対する悪影響は、重篤であり不可逆的である。従って、予防することは公衆衛生の優先事項でなければならない。食物における残留や他の経路でのヒトへの曝露を防御するためには、神経毒性を有する殺虫剤類を把握しなければならない。その他の物質で、広範囲にわたり使用され、また発達中の脳に影響を及ぼすものについては、一般に発達神経毒性のデータが欠けているため、特に取り上げて検索する必要がある。より正確な知見が得られるまでは、現在詳細に調べられていない化合物については、その脳の発達に対する影響を防御するための予防策が必要であることを考慮すべきである。

文献 16.

Analysis and integration of developmental neurotoxicity and ancillary data into risk assessment: a case study of dimethoate.

DeSesso JM, Watson RE, Keen CL, Hazelden KP, Haws LC, Li AA.

J Toxicol Environ Health A. 2009;72(2):94-109.

Abstract

ジメトエートは、農作物や観賞植物につく多種多様な害虫を制御するために用いられる有機リン系殺虫剤 (OP) の 1 つである。ジメトエートの安全使用を確保するためには発達中の胎児、幼児、子供を含む全てのライフステージで悪影響を受けない曝露量を求めることが重要である。発達神経毒性試験 (DNT)、コリンエステラーゼ (ChE) 感受性試験、cross-fostering 試験 (継母試験)、1 世代もしくは数世代繁殖毒性試験の結果に基づき、ジメトエートの 2 つの重大なエンドポイントを特定した。すなわち、雌の脳における ChE 阻害 (ChEI) 及び離乳児における死亡である。最初の評価では、ジメトエートを強制経口投与で 3 mg/kg 以上投与した母動物から生まれた離乳児の死亡が増加するため、離乳児の死亡率を毒性のエンドポイントとして選択すると結論した。しかしながら、より詳細な実験から、離乳児の死亡は少数の腹に集中しており、母動物の出産後の状態が悪かったために児動物の育成が妨害されたものであることが明らかとなった。腹ごとに統計検定を実施した際には、死亡離乳児の腹ごとの平均値は母親に出産後 6 mg/kg のジメトエートを投与したときのみ有意に増加した。6 mg/kg のジメトエートを妊娠期のみ投与した場合には、離乳児の生存には影響がなかった。このことから、離乳児の死亡率に関与しているのは、哺乳期の母親への曝露であると結論した。さらに、以前設定された成獣におけるベンチマーク用量 (BMD) メタ分析法では、雌における ChEI の BMDL (10) (対象の項目が 10%減少する用量の幅の 95%下限) は離乳児の死亡率の BMDL (10) よりも 3 倍低かった (それぞれ 0.19 mg/kg、0.68 mg/kg)。以上のことから、この試験により、周産期に集められたデータを評価する際、統計学的有意差は腹単位での確認が重要であることが明らかとなった。また、成獣の脳 ChEI は、ジメトエート毒性の危険性を評価するための正確で重要な評価項目であると結論付けられる。

文献 17.

Assessing the effects of environmental toxicant exposure in developmental epidemiological studies: issues for risk assessment.

Rice DC.

Neurotoxicology. 2005 Aug;26(4):483-9.

Abstract

疫学的調査は幼児及び子供の行動発達期における環境化学物質の曝露影響を理解する上できわめて重要である。これらの調査の最終目的は、公衆衛生の保護に直接用いられる情報を提供することでなければならない。エンドポイントの評価は、評価する化学物質の影響を認識した上での領域を特化した試験、あるいはさまざまな機能をサンプリングする一般的な臨床機器を用いる事により行われる。エンドポイントを選択するための総合的な方法を考察することは各試験の比較をより直接的なものとする。試験集団と関連する一群の化合物を測定することが重要であるという認識は強まってはいるが、測定する化合物の決定や、その数、特に共線性が高いデータが得られた場合にはそれらに対してどのような統計解析を実施するかについては研究者によって異なる手法がとられている。“chemicals of interest (米国国土安全保障省により作られた問題の化学物質リスト中の化学物質)” に高い相同性を有する化学物質は時に統計検定からはずされ、そのため試験からの重要な情報を得る機会を失う。さらに、リスクアセスメントに重要であるにもかかわらず、疫学的試験では曝露と影響との関連形態は調査されないのが一般的である。研究者、統計学者及び risk assessor (リスクアセスメント専門家) が話し合う機会をもつことにより、ヒトにおける発達毒性試験が公衆衛生における問題の解決に非常に役立つものとなるであろう。

文献 18.

Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio.

Ruckart PZ, Kakolewski K, Bove FJ, Kaye WE.

Environ Health Perspect. 2004 Jan;112(1):46-51.

Abstract

メチルパラチオン (MP) は農業での使用のみ認可されている有機リン系農薬であり、米国ミシシッピ州やオハイオ州では害虫を制御するために違法に噴霧されていた。メチルパラチオン曝露と神経行動学的発達との関連を調査するため、メチルパラチオンが散布された時に 6 歳以下であった子供たちを曝露群とし、曝露されていない同じ地域の子供たちを対照群として Pediatric Environmental Neurobehavioral Test Battery (PENTB) を実施した。PENTB は、子供たちの日常に関する質問と (親に対するインタビューと質問)、能力に関する試験 (4 歳以上の子供に対する神経行動学的試験) で構成され、神経行動学的評価に必要な不可欠な認知力、運動能力、知覚能力、情動について評価する方法である。尿中パラニトロフェノール濃度及び環境中のメチルパラチオンの拭き取りサンプル (wipe samples) により、子供たちを対照群と曝露群に分類した。曝露群の子供たちは、短期記憶や注意に関する試験の成績が低下していた。さらに、曝露群の子供たちの親は、対照群の子供たちの親と比較して自分の子供たちがより行動や運動機能に問題があると報告していた。しかしながら、これらの結果は両地域で一貫して認められたわけではなかった。また、一般的知能、視覚と運動機能の統合、多段階の処理においては両者の違いはまったく認められなかった。以上のことから、メチルパラチオンは短期記憶及び注意に対して微妙な変化を引き起こし、運動機能やいくつかの行動に寄与している可能性が示唆されるが、この結果は決定的ではないと考えられる。

7. 参考文献・資料

A Retrospective Performance Assessment of the Developmental Neurotoxicity Study in Support of OECD Test Guideline 426

Susan L. Makris,¹ Kathleen Raffaele,² Sandra Allen,³ Wayne J. Bowers,⁴ Ulla Hass,⁵ Enrico Alleva,⁶ Gemma Calamandrei,⁶ Larry Sheets,⁷ Patric Amcoff,⁸ Nathalie Delrue,⁸ and Kevin M. Crofton⁹

¹Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, and ²Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA; ³Syngenta CTL, Cheshire, UK; ⁴Environmental Health Science Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada; ⁵Department of Toxicology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark; ⁶Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; ⁷Bayer CropScience LP, Stilwell, Kansas, USA; ⁸Environment, Health, and Safety Division, Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France; ⁹Office of Research and Development, National Health and Environmental Effects Research Laboratories, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina, USA

OBJECTIVE: We conducted a review of the history and performance of developmental neurotoxicity (DNT) testing in support of the finalization and implementation of Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD) DNT test guideline 426 (TG 426).

INFORMATION SOURCES AND ANALYSIS: In this review we summarize extensive scientific efforts that form the foundation for this testing paradigm, including basic neurotoxicology research, interlaboratory collaborative studies, expert workshops, and validation studies, and we address the relevance, applicability, and use of the DNT study in risk assessment.

CONCLUSIONS: The OECD DNT guideline represents the best available science for assessing the potential for DNT in human health risk assessment, and data generated with this protocol are relevant and reliable for the assessment of these end points. The test methods used have been subjected to an extensive history of international validation, peer review, and evaluation, which is contained in the public record. The reproducibility, reliability, and sensitivity of these methods have been demonstrated, using a wide variety of test substances, in accordance with OECD guidance on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard characterization. Multiple independent, expert scientific peer reviews affirm these conclusions.

KEY WORDS: children's health, developmental neurotoxicity, guideline, hazard assessment, Organisation of Economic Co-operation and Development, risk assessment, U.S. Environmental Protection Agency. *Environ Health Perspect* 117:17–25 (2009). doi:10.1289/ehp.11447 available via <http://dx.doi.org/> [Online 12 August 2008]

The purpose and intent of this retrospective performance assessment was to review the history of developmental neurotoxicity (DNT) testing. This review demonstrates the extensive scientific efforts, including basic neurotoxicology research, interlaboratory collaborative studies, expert workshops, and validation studies, that form the foundation for this testing paradigm. We also review the relevance, applicability, and use of the DNT study in human health risk assessment and the historical performance of the DNT study. This analysis was developed by an OECD expert group [Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD) 2008a] in support of drafting the OECD DNT Test Guideline 426 (TG 426; OECD 2007) that satisfies current OECD validation criteria.

OECD validation criteria are described in Guidance Document 34 (GD34; OECD 2005a), which addresses the validation and regulatory acceptance of new or updated test methods for hazard characterization. They are based on the "Solna Principles" for validation and regulatory acceptance (OECD 1996b), but additionally emphasize the importance of flexibility and adaptability in the validation process without compromising scientific rigor.

GD34 (OECD 2005a) also provides concise definitions of related concepts such as accuracy, concordance, performance standards,

predictivity, relevance, reliability, repeatability, reproducibility, sensitivity, and specificity. The terminology and definitions presented in GD34 (Annex 1) were used in the DNT review process; however, individual studies may have varied slightly in the definition of terms.

The first DNT guideline was developed by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and has been subjected to numerous validation studies and rigorous peer reviews over the years. The U.S. EPA has deemed the method validated for its regulatory purposes. As described herein, extensive supportive materials for the relevance, reliability, and overall performance of the DNT study are available. Until recently, only the U.S. EPA DNT guideline has been available for testing laboratories. The new OECD TG 426 (OECD 2007) DNT guideline will fill a regulatory gap for OECD member countries. This review summarizes the considerable work that has been performed in the development of the DNT study and provides the rationale for the regulatory acceptance of TG 426 as a new OECD test guideline.

The U.S. EPA DNT guideline (U.S. EPA 1998), the prototype for TG 426, was founded upon an extensive scientific database. This includes interlaboratory validation studies, such as the Collaborative Behavioral

Teratology Study (CBTS), which was conducted in the mid-1980s. A separate group of experts at the Williamsburg Workshop (Kimmel et al. 1990) agreed that the methods in the DNT study are sensitive to known human developmental neurotoxins. An expert consultation meeting conducted in 2000 (OECD 2003) discussed issues on validation, especially of individual test components versus the whole DNT test method. In doing so, they reviewed the extensive history of international validation, peer review, and evaluation of DNT methods contained in the public record. Experts agreed that individual assays of the DNT test method have been shown to be relevant, reliable, and sensitive and that extensive information demonstrates the validity of individual components of the DNT test method (OECD 2003).

The field of developmental neurotoxicology evolved from the disciplines of neurotoxicology, experimental and development psychology, and developmental toxicology, through an extensive history of scientific research and regulatory consideration. Developmental toxicity is defined in GD43 (OECD 2008b), which states that effects may result from either prenatal or postnatal exposure, may manifest at any life stage, and may be expressed as functional deficits.

The DNT study is a specialized type of developmental toxicity study designed to screen for adverse effects of pre- and postnatal exposure on the development and function of the nervous system and to provide dose-response characterizations of those outcomes. The U.S. EPA and OECD DNT guidelines recommend administration of the test substance during gestation and lactation. Cohorts of offspring (typically rat) are randomly

Address correspondence to S. Makris, U.S. EPA, ORD, NCEA, Mail code: 8623P, 1200 Pennsylvania Ave. NW, Washington, DC 20460-0001. Telephone: (703) 347-8522. Fax: (703) 347-8592. E-mail: makris.susan@epa.gov

The views expressed in this document are those of the authors and do not necessarily reflect the views or policies of the U.S. Environmental Protection Agency.

The authors declare they have no competing financial interests.

Received 5 March 2008; accepted 12 August 2008.

selected from control and treated litters for evaluations of gross neurologic and behavioral abnormalities during postnatal development and adulthood (OECD 2007; U.S. EPA 1998). These include assessments of physical development, behavioral ontogeny, motor activity, motor and sensory function, learning and memory, and postmortem evaluation of brain weights and neuropathology.

History of DNT Test Guideline Development

The evolution of DNT studies has its roots in scientific publications that began to appear in the early 1960s; the science has continued to develop over the past four decades.

An extensive scientific literature, composed of studies evaluating the potential for physical, pharmaceutical, and environmental agents to affect the development and function of the nervous system after prenatal and early postnatal exposure, provides a strong foundation for guideline development, implementation, and validation. Table 1 lists some of the key contributions to the development of the DNT guidelines. Table 2 briefly summarizes the history of U.S. EPA and OECD DNT guideline development. Although prenatal developmental toxicity test guidelines have existed for some time (e.g., OECD 1983), the first regulatory protocol designed to evaluate DNT was developed and implemented by the U.S. EPA

in support of hazard evaluation for specific solvents (U.S. EPA 1986), and a DNT guideline applicable to the evaluation of both toxic substances and pesticides was finalized in 1991 (U.S. EPA 1991). In 1998, it was revised (U.S. EPA 1998) as part of a broader U.S. effort to harmonize testing guidelines within U.S. EPA program offices and with the OECD.

In 1995, the OECD initiated the development of the DNT TG 426 (OECD 1995). The first draft of TG 426 was prepared after an expert consultation meeting (OECD 1996a), using the U.S. EPA DNT guideline as the design template, and addressed a number of important issues and recommended improvements. The draft TG 426

Table 1. Historical contributions to the DNT guideline.

Date	Event	Summary	References
1960s–1980s	Published research on DNT and behavioral testing	Evidence that developmental exposure to chemicals and drugs can alter behavioral function in young and adult animals	Irwin 1968, Spyker and Smithberg 1972, Barlow and Sullivan 1975, Butcher et al. 1979, Butcher and Vorhees 1979, Vorhees et al. 1979, Butcher and Nelson 1985, Adams 1986
1978–1984	CBTS	Study to examine intra- and interlaboratory reliability and sensitivity of behavioral test methods	Buelke-Sam et al. 1985, Kimmel and Buelke-Sam 1985, Kimmel et al. 1985
1984	Cincinnati Test Protocol	Within-laboratory comparison of CBTS test protocol with the Cincinnati Test Protocol	Vorhees 1985a, Vorhees 1985b, Vorhees 1985c
1982–1985	Collaborative studies of the Japanese Teratology Society	Interlaboratory methods evaluations and assessment of six reference chemicals	Tanimura 1986, Tanimura 1992
1985–1988	European Interlaboratory Collaborative Study	Interlaboratory study to assess sensitivity of behavioral test procedures to detect neurotoxicity of methylmercury	Elsner 1986, Elsner et al. 1986, Suter and Schon 1986
1989	Williamsburg Workshop	Workshop to evaluate the qualitative and quantitative comparability of animal and human data for DNT	Francis et al. 1990, Kimmel et al. 1990
1993–1997	Collaborative studies of the Japanese Teratology Society	Three interlaboratory studies using behavioral teratogens comparability a core battery of tests	Tachibana et al. 1996, Tachibana et al. 1998, Fukunishi et al. 1998, Nishimura et al. 2001
1995	IPCS	Interlaboratory study using neurotoxic chemicals to evaluate test validity, reliability, and measurement variability	Catalano et al. 1997, MacPhail et al. 1997, Tilson et al. 1997
2000	ILSI workshop on DNT testing	Workshop to review U.S. EPA DNT behavioral test methods, pharmacokinetics, and neuropathology	Cory-Slechta et al. 2001, Dorman et al. 2001, Garman et al. 2001, Milesen and Ferenc 2001
2003	Japanese Interlaboratory Study	Interlaboratory study using neurotoxic chemicals to determine sensitivity of behavioral measures	Okazaki et al. 2003
2003	Behavioral Test Methods Workshop	Expert workshop to address design, conduct, and analysis of behavioral tests for neurotoxicity evaluation	Slikker et al. 2005
2004–2008	ILSI RSI Working Group	Working group focused on variability, statistical analyses, positive controls, identification and analyses, interpretation of treatment-related effects, and application of DNT testing to public health protection	Fenner-Crisp et al. 2005, Crofton et al. 2008, Holson et al. 2008, Raffaele et al. 2008, Tyl et al. 2008

Table 2. History of the DNT guideline.

Date	Event	Reference
1986	U.S. EPA OPPTS published first draft DNT protocol for peer review and public comment	U.S. EPA 1986
1991	U.S. EPA OPPTS published final DNT guideline (§83-6)	U.S. EPA 1991
1995	OECD Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity (Copenhagen) recommended development of OECD Developmental Neurotoxicity Test Guideline	OECD 1995
1996	OECD expert consultation meeting (Copenhagen) provided recommendations for design of Draft OECD 426	OECD 1996a
1998	U.S. EPA OPPTS issued minor revisions and harmonization of DNT guideline (OPPTS 870.6300)	U.S. EPA 1998
1998	Draft TG 426 submitted to National Coordinators for expert review and comment	
2000	OECD expert consultation meeting (Washington) held to review technical issues	OECD 2003
2003	Draft TG 426 submitted to National Coordinators for expert review and comment	
2005	OECD expert consultation meeting (Tokyo) convened to respond to remaining comments on Draft TG 426	OECD 2005b
2007	OECD TG 426 approved by WNT; guideline finalized	OECD 2007

WNT, the working group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme.

was distributed for comment in 1998, and significant technical issues identified by this review (e.g., the optimal duration of treatment, direct dosing of preweaning rodents, and conduct of morphometric evaluations) were further discussed at an expert consultation meeting in 2000 (OECD 2003). A revised draft was subsequently circulated for review, and comments from OECD member countries were addressed at a 2005 expert consultation meeting (OECD 2005b). The final version of TG 426 was adopted by the OECD Council in 2007 (OECD 2007).

In the context of toxicologic screening and testing to support human health risk assessment and chemical regulatory activities, the DNT study fills an information requirement that is not satisfied by other OECD test guidelines. Notably, it is the only test guideline that includes functional, behavioral, and anatomical evaluations of the nervous system at multiple time points, in test subjects that were exposed to test substance during critical pre- and early postnatal periods of nervous system development. This test method has been used extensively in the past two decades on a wide variety of chemicals (Table 3).

Scientific Basis of DNT Guideline

The test methods recommended in the DNT guideline have been extensively reviewed and evaluated over the last 25 years. This has included the conduct of a number of meetings and collaborative studies involving experts from academic, industry, regulatory, and public interest groups. Pivotal influences and key events in the history of the development of the DNT guideline (Table 2) include both research on test methods development and efforts to characterize and document the sensitivity, reliability, and performance of the test methods, including a number of intralaboratory collaborative efforts. In the 1970s, a series of studies were conducted in which rats were developmentally exposed to a variety of xenobiotics and subsequently tested during postnatal development using a battery of neurobehavioral tests (Butcher and Vorhees 1979; Vorhees et al. 1979). Other laboratories used behavioral and histologic batteries, focusing on sensory and motor function, in adult rodents exposed to a wide variety of neurotoxicants (Pryor et al. 1983; Tilson et al. 1979). A large body of research has provided an immense database on the ability of the functional observational battery to detect and characterize the effects of drugs and environmental chemicals in adult and developing animal models (Gad 1982; Irwin 1968; Moser et al. 1988). This early work was followed by wide-ranging efforts to characterize the specificity of these test methods and the impact of both organismal

and experimental factors (e.g., noise, species, strain, gender, test history) (Gerber and O'Shaughnessy 1986; Levine and Butcher 1990; MacPhail et al. 1989; Spencer et al. 1993). Ultimately, the result of more than 30 years of work in this area is a consensus opinion of neurotoxicologists that proper use and interpretation of the data derived from these test methods provide unique insight into the impact of xenobiotics on the developing and adult nervous system [Cory-Slechta et al. 2001; International Programme on Chemical Safety (IPCS) 2001; Tyl et al. 2008].

The development of test methods in neurotoxicology also includes a long history of efforts to characterize the interlaboratory reliability and sensitivity of the test methods now included in the DNT study design. An article comparing a learning and retention method among three laboratories (Butcher et al. 1979) was followed by the CBTS (Buelke-Sam et al. 1985; Kimmel and Buelke-Sam 1985) and the "Williamsburg Workshop" on qualitative and quantitative comparability of human and animal DNT (Kimmel et al. 1990). These efforts addressed various aspects of DNT study design and conduct, providing a sound scientific basis for the test method and its use in hazard evaluation. Since the publication of the U.S. EPA DNT guideline (U.S. EPA 1991), a continued scientific effort has reviewed and updated methodologies, for neurotoxicology in general and for developmental neurotoxicology in particular. Examples of such reviews include the IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methodologies (MacPhail et al. 1997), an International Life Sciences Institute (ILSI) Risk Science Institute (RSI) workshop on Developmental Neurotoxicity and Risk Assessment (Milesen and Ferenc 2001), a collaborative study on neurobehavioral screening in 11 Japanese laboratories (Okazaki et al. 2003), and a Behavioral Test Methods Workshop (Slikker et al. 2005). Descriptions of each of these efforts and their contributions to the scientific basis for DNT testing follow.

The CBTS. Several of the test procedures developed in early behavioral teratology studies underwent validation in a large interlaboratory effort, the CBTS. This project characterized the performance of a standardized neurodevelopmental test battery in six different laboratories after *in utero* and lactational exposure to two known neurotoxicants, methylmercury and amphetamine. The study examined the intra- and interlaboratory reliability and sensitivity of several behavioral test methods and the effects of a number of other litter- and gender-related variables. The peer-reviewed publications that resulted from the CBTS included descriptions of the background and overview (Kimmel

and Buelke-Sam 1985), protocol and test procedures (Adams et al. 1985b), data entry and test systems (Adams et al. 1985c), preliminary research (Adams et al. 1985a), statistical approach (Nelson et al. 1985), results (Buelke-Sam et al. 1985), and implications, current applications, and future directions (Kimmel et al. 1985). Additionally, the results of a workshop held to review the CBTS data were published (Butcher and Nelson 1985; Geyer and Reiter 1985; Kutscher and Nelson 1985; Sobotka and Vorhees 1985; Tilson and Wright 1985). In a corollary study, many end points in the CBTS study were compared within one laboratory to an additional set of behavioral end points, named the Cincinnati Test protocol, using both methylmercury and D-amphetamine (Vorhees et al. 1985a, 1985b). The conclusion was that the effects of methylmercury were detected by both the CBTS end points and some of the additional end points in the Cincinnati Test protocol (Vorhees 1985c). The CBTS showed that replicability of data among laboratories using a standardized protocol was excellent and that both positive effects (e.g., with methylmercury exposure) and the lack of effects (e.g., after low-level amphetamine exposure) were replicable. The CBTS also demonstrated that the DNT test procedures were sufficiently sensitive; no more than a 5–20% change from control values was required to detect an effect.

The European Interlaboratory Collaborative Study. In the 1980s, the European Interlaboratory Study Group on Behavioural Teratology conducted a study of behavioral test methods (Alder et al. 1986; Elsner 1986; Elsner et al. 1986; Schreiner et al. 1986; Suter and Schon 1986). Three laboratories, one each from industry, academia, and government, tested animals perinatally exposed to methylmercury. The results indicated that behavioral tests were more sensitive than reproductive end points and that automated procedures and measures aimed at specific functional capacities were more sensitive than nonspecific behavioral measures (Elsner et al. 1986, 1988).

The Williamsburg Workshop. In 1989, the U.S. EPA held a workshop on the Qualitative and Quantitative Comparability of Human and Animal Developmental Neurotoxicity

Table 3. Number of chemicals studied using the U.S. EPA DNT guideline or draft OECD DNT guideline.

Chemical class	No. of studies
Industrial chemicals	8
Miscellaneous agents ^a	4
Pharmaceuticals	3
Pesticides	73
Positive control chemicals	15
Solvents	7

^aFood additives, cigarette smoke, dietary restriction, and maternal separation.

(also known as the "Williamsburg Workshop") to provide scientific input into DNT protocol design and to evaluate its appropriateness for use in risk assessment (Kimmel et al. 1990). Expert scientists from government, industry, public interest groups, and academia reviewed a range of representative chemicals and environmental exposures, including drugs (cannabis, cocaine, methadone, and phencyclidine) (Hutchings 1990), ethanol (Driscoll et al. 1990), the anticonvulsant phenytoin (Adams et al. 1990), and environmental contaminants such as methylmercury (Burbacher et al. 1990), lead (Davis et al. 1990), polychlorinated biphenyls (Tilson et al. 1990), and ionizing radiation (Schull et al. 1990). Based on data available for these known human developmental neurotoxicants, the workshop participants concluded that DNT methodologies were adequate for detecting DNT. A number of specific issues directly relevant to design and usefulness of DNT studies were extensively evaluated by participants (Buelke-Sam and Mactutus 1990; Levine and Butcher 1990; Stanton and Spear 1990; Tyl and Sette 1990). Additionally, workshop participants addressed the relationship between biologic end points specified by DNT guidelines and adverse findings observed in humans after exposure to the developmental neurotoxic agents under consideration. A major conclusion of the workshop was that the DNT protocol would have identified each of the agents presented at the workshop as a potential developmental neurotoxicant (Francis et al. 1990), although the critical effects and the dose at which the effects were observed could vary across species. The workshop participants also concluded that the laboratory animal is an adequate surrogate for humans because many of the biologic and behavioral mechanisms underlying these neurologic functions are shared between humans and laboratory animals. The predictive power of DNT guideline studies was attributed largely to the scope of neurobehavioral and neuropathologic tests used that can evaluate neurologic functions across multiple domains (i.e., sensory, motivational/arousal, cognitive, and motor).

Collaborative studies of the Japanese Teratology Society. The Japanese Teratology Society established the Behavioral Teratology Meeting as a satellite meeting of the Japanese Teratology Society in 1982. This group sponsored a number of collaborative studies conducted primarily by pharmaceutical industry, and contract laboratories (Tanimura 1985). The first effort involved 21 institutions that investigated the effects of parametric variables (water temperature, number of trials) on performance in a water T-maze and two-way shuttle box (Mizutani 1984). This was followed by a larger study involving 46 laboratories that investigated the effects of six

chemicals (chlorpromazine, ethanol, hydroxyurea, methylazoxymethanol, phenylalanine, and vitamin A) (Mizutani 1985). These studies demonstrated that the T-maze test was reliable, but possibly not as sensitive as needed, and suggested the need for more complicated learning paradigms for this method (Tanimura 1986). Workshops were then held between 1988 and 1990, with three subgroups: reflexes and sensory function, activity and emotionality, and learning (Tanimura 1992). Subsequently, a core battery test draft for behavioral developmental toxicity was proposed. Its utility was examined with three positive behavioral teratogens during 1993–1997: phenytoin (Fukunishi et al. 1998; Tachibana et al. 1996), retinoic acid (Nishimura et al. 2001), and nicotine (Tachibana et al. 1998). The numbers of participating laboratories were 32, 28, and 18, respectively. It was concluded that the proposed core battery of tests is useful as a method to detect postnatal developmental disorders, including behavioral dysfunction, in rats.

The IPCS Study. The IPCS collaborative study was an interlaboratory evaluation of neurobehavioral screening methodologies used in adult and DNT studies (MacPhail et al. 1997; Moser et al. 1997e). A total of eight laboratories participated in proficiency studies (Moser et al. 1997a), and the full study evaluated seven neurotoxic positive control chemicals [triethyl tin, acrylamide, parathion, *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), toluene, *N,N'*-methylene bisacrylamide, and lead acetate] in adult male rats (Moser et al. 1997b, 1997c). The study examined variability associated with the test methods and reasons for differences. The overall conclusion of this extensive study was general "agreement across laboratories in terms of their ability to detect dose-related changes in behavioral end points with prototypic neurotoxic agents" (Catalano et al. 1997). The study results were also reviewed at a workshop held in 1995 in Capri, Italy (Tilson et al. 1997) and were presented in a symposium at the 1996 meeting of the Society of Toxicology (Moser et al. 1997d).

ILSI workshop on DNT testing. In 1999, ILSI established a working group of scientists from government, industry, academia, and nonprofit nongovernmental organizations (Miles and Ferenc 2001) that was charged with evaluating revisions to the published U.S. EPA DNT guideline that were also included in the draft OECD TG 426. Some of these changes were implemented by the U.S. EPA Office of Pesticide Programs (OPP) when it issued Data Call-In notices for organophosphate pesticides with tolerances (U.S. EPA 1999b). The revisions included extension of the offspring dosing period through to the age of weaning, ensuring that the pups are exposed to the test substance, increasing the

number of offspring evaluated neuropathologically, and collecting chemical-class-specific biomarker data. The extension of the dosing period during the lactation period raised several issues, specifically in the areas of pharmacokinetic/toxicokinetic data needs, behavioral testing, and neuropathologic evaluation. Overall, the working group agreed that the current DNT test protocol was based upon solid scientific principles and experience, that there were opportunities to revise and improve some aspects of the U.S. EPA guideline study, and that further research would be valuable in providing the scientific basis for development of TG 426 (Cory-Slechta et al. 2001; Dorman et al. 2001; Garman et al. 2001; OECD 2003). Further considerations of methodologic issues related to the conduct of the DNT study include an ILSI workshop on the direct dosing of preweaning mammals. This workshop culminated in a monograph on direct dosing that has broad application to study design for many areas of research, for example, pharmaceuticals, environmental pollutants, and academic research (Moser et al. 2005; Zoetis and Walls 2003).

The Japanese Interlaboratory Study. An interlaboratory evaluation of neurobehavioral screening methodologies (used in DNT studies as well as adult neurotoxicity studies) was carried out by 11 safety research laboratories in Japan (Okazaki et al. 2003). The study examined technical problems in evaluating the neurotoxic potential of chemicals, conducting a variety of neurobehavioral tests on rats after either acute or repeated (28-day) exposure to acrylamide or 3,3'-iminodipropionitrile. All laboratories detected neurotoxicity of both chemicals. The report identified interlaboratory differences in test method sensitivity and concluded that it is important to standardize the methods and criteria and to improve observers' skills (Okazaki et al. 2003).

The Behavioral Test Methods Workshop. In 2003, a workshop was conducted to discuss experimental procedures and practices that could help enhance the utility of behavioral data as a reliable index of neurotoxicity and in the safety evaluation of chemical substances (Slikker et al. 2005). Workshop participants included individuals from all sectors of the neuroscience community: academia, government, testing laboratories, industry, and nonprofit nongovernmental organizations. Overall conclusions from the workshop were that consensus can be reached on the fundamentals of behavioral assessment and that aspects such as experimental design, test method selection, training of technical staff, validation, control of confounding factors, data variability, data analysis, and data interpretation should be carefully considered in the planning and conduct of behavioral safety assessment (Slikker et al. 2005).

In summary, the scientific basis of the DNT test method has been subjected to an extensive history of international validation, peer review, and evaluation that is contained in the public record. Through the various collaborative efforts and workshops that have been conducted, a number of important conclusions have been drawn. The individual test methods used in the DNT study have been found to be highly relevant for characterizing health risks of neurotoxic chemicals and to be based on solid scientific principles and experience. Using exposures to known human developmental neurotoxicants, the DNT study has been shown to adequately identify the potential for adverse effects of chemical exposure on neurologic development. The intra- and interlaboratory reproducibility, reliability, and sensitivity of the DNT test method has been established, using a variety of test substances.

Use of the DNT Study in Risk Assessment

There is a regulatory need for DNT testing to support risk assessments in OECD member countries. Many pesticides and other chemicals are known to affect the adult nervous system, and there are concerns regarding the potential for DNT after early-life exposures to these substances [National Research Council (NRC) 2000]. This is particularly important because unique behaviors and activities of children place them at greater risk for increased exposure to xenobiotics by multiple routes (Brent et al. 2004; Weiss et al. 2004). The call for a more rigorous assessment of the potential for DNT has been issued by scientists from multiple and diverse sectors with an interest in public health protection.

An examination of the historical and potential uses of the DNT study in risk assessment is critical to an overall evaluation of its value in protecting human health. Currently, the largest collection of DNT guideline studies resides with the U.S. EPA OPP, which has obtained information on DNT for specific pesticides to satisfy regulatory mandates (Food Quality Protection Act of 1996). The U.S. EPA has furthermore engaged in an ongoing scientific analysis and discourse regarding the conduct of DNT studies, the interpretation of the data from these studies, and their regulatory impact.

A review of 12 DNT studies (Makris et al. 1998) evaluated by the U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS) in support of the registration and/or use of nine pesticides and three solvents was presented to a Scientific Advisory Panel in 1998 (U.S. EPA 1999a). For the nine pesticides examined, the analyses demonstrated that the DNT study includes sensitive end points that are not examined in any other test

guideline, including prenatal developmental, reproduction, and neurotoxicity studies (OECD 1983, 1997, 2001), thereby enhancing detection of neurobehavioral and neuropathologic effects in offspring after exposure during sensitive periods of neurologic development. As a result, the DNT study, when present in a chemical database, is often identified as a sensitive study and an important source of quantitative and qualitative information for risk assessment.

DNT data have been shown to be valuable in the selection of end points and doses for risk assessment (Makris et al. 1998; Rowland et al. 2007). As might be expected of a study that uses short-term exposures (~25–40 days) during development, where a single exposure during a critical period may result in developmental insult (Rice and Barone 2000; Rodier 1980, 1986, 1994), the predominant use of the DNT study in pesticide risk assessment has been for acute (single dose) reference doses (RfDs) and for short-term (1–30 days) and intermediate-term (1–6 months) nonoccupational exposures, which are especially applicable to risk assessments for children. Results from DNT studies have also been used in calculating a chronic RfD for lifetime exposure to a toxicant when it has been shown to be the most sensitive study in the toxicology database.

A survey of the use and value of neurobehavioral assessment in safety evaluation was also conducted by Middaugh et al. (2003). This survey included the results of multinational studies conducted since 1990 on 174 compounds, including pharmaceutical (81%), agricultural (7%), industrial (1%), or undefined (10%) substances. Notably, the neurobehavioral screening conducted for pharmaceuticals is generally composed of developmental and behavioral assessments of second-generation (F_1) offspring but does not address all of the end points assessed in a guideline DNT study. Nevertheless, this review found that F_1 behavioral parameters along with other parameters defined the chronic no observed effect level (NOEL) in 17 of 113 (15%) and solely defined the NOEL in 3 of 113 (2.6%) of the studies examined. The conclusion was that F_1 behavioral parameters sometimes improved on the standard toxicologic measures of hazard identification, providing information on outcomes not addressed by other standard measures of toxicity.

By early 2006, a review of regulatory and published sources revealed that approximately 114 DNT studies had been completed using either the U.S. EPA guideline or the draft OECD guideline (Table 4). The list of agents in Table 4 demonstrates the extensive history and experience regarding the conduct and interpretation of DNT studies. The outcomes of these efforts do not comprise a focused

attempt to validate the study protocol or specific end points. In fact, a few of these studies did not include all the end points recommended by U.S. EPA or OECD guidelines.

As of August 2006, approximately 75 DNT studies had been submitted to the U.S. EPA OPP in support of pesticide registration. A preliminary survey of the use of DNT studies in risk assessment in OPP was conducted in March 2007 (Rowland et al. 2007). For 58 of the 75 pesticide chemicals, a DNT study had been considered in the weight-of-evidence review of the toxicology database. The DNT study was used to select end points and doses for risk assessments for eight of those chemicals. Importantly, for four of the eight DNT studies, the critical effects either included or were solely based upon offspring behavioral and neuropathologic parameters that are not evaluated in other guideline studies (i.e., motor activity, auditory startle habituation, learning and memory, and morphometric analysis). This is consistent with the conclusions of the earlier retrospective analysis (Makris et al. 1998) and provides further evidence of the sensitivity of the DNT study in identifying adverse effects in the young and the important role of DNT studies in human health risk assessments.

In addition to using DNT data for regulatory decisions, some regulatory agencies have also, on a case-by-case basis, incorporated an additional database uncertainty factor into their regulatory decisions because of the absence of DNT data. This approach reflects regulator views that DNT data are valuable in refining permissible exposure levels and that the absence of these data can increase the uncertainty about the toxicity of the chemicals (U.S. EPA 2002a, 2002b).

Recent reviews have examined specific end points across multiple guideline DNT studies, to demonstrate the value of current methods in hazard characterization and explore further opportunities for methodologic refinement. U.S. EPA scientists have conducted cross-laboratory comparisons of methodologies and results from DNT studies submitted to OPP (Crofton et al. 1991, 2004; Makris et al. 2005, 2006; Raffaele et al. 2003, 2004, 2005, 2006; Sette et al. 2004). Kaufmann and Groters (2006) reviewed the neuropathologic assessments in DNT studies, summarized practical aspects in planning neuropathologic assessments, and highlighted the value of morphology data in reference to both the concurrent behavioral assessments and use in assessing risk. A multisector ILSI RSI workshop examined the evaluation and interpretation of neurodevelopmental end points for human health risk assessment and addressed public health considerations, data interpretation, data variability, positive control data, and statistical analysis (Crofton et al. 2008;

Fenner-Crisp et al. 2005; Holson et al. 2008; Raffaele et al. 2008; Tyl et al. 2008).

These various review efforts and resulting publications provide transparent decision criteria for the analysis and interpretation of DNT test results, in accordance with the principles described in GD34 (OECD 2005a). Additionally, they demonstrate test method reliability, reproducibility, and relevance, which is attributable in part to the high level of standardization of the test methods that are recommended in the test guideline.

Future Activities

Although the overall performance of the DNT test method and its ability to detect effects of concern from a regulatory perspective have been well established, the recent increase in the number of regulatory DNT studies being conducted has refocused attention on this test method. Although some argue that specific tests are insensitive (e.g., assessment of cognitive and sensory dysfunction), others suggest that the tests are overly sensitive and have a high rate of false positives (U.S. EPA 1995; Claudio et al. 1999, 2000; Cory-Slechta et al. 2001; U.S. EPA 2006). Diverse groups have advocated increased testing for DNT (Andersen et al. 2000;

Grandjean and Landrigan 2006; NRC 1992, 1993; Nelson 1986; Office of Technology Assessment 1990; Stein et al. 2002; Vorhees 1986). There have also been calls to include evaluations of end points not currently assessed, such as social behavior (Cory-Slechta et al. 2001), pharmacokinetics and neurochemistry (Andersen et al. 2000; Dorman et al. 2001), and changes during senescence (Cory-Slechta et al. 2001). In addition, there have been criticisms of the complexity of the study, accompanied by calls for deleting some test components from the protocol (Li 2005) or using screening approaches that incorporate DNT testing into other testing protocols (Cooper et al. 2006; Ladics et al. 2005). Critics also claim that variability of some end points (e.g., motor activity, morphometrics) is too great to be useful (Chemical Manufacturers Association 1987; Nolen 1985; York et al. 2004) and that this *in vivo* test is not necessary to detect DNT (Balls and Combes 2005). These diverse opinions do not invalidate the DNT study but rather highlight the need for ongoing scientifically based evaluation of this test method and the incorporation of appropriate revisions as scientific knowledge advances and as experience with the DNT study warrants.

A number of efforts are currently under way to review data from existing DNT studies, identify ways to refine the DNT test, and, if possible, reduce the number of animals used. It has been proposed that a reduction in animal use can be achieved by applying certain statistical approaches to the behavioral analysis (Chiarotti and Puopolo 2000; Puopolo 2004). Reviews of historical and positive control data have demonstrated the need for more standardized reporting requirements (Crofton et al. 2004, 2008). Further retrospective reviews of control data have identified differences among laboratories in data quality and variability, suggesting methods to decrease variability (Crofton et al. 1991, 2004; Raffaele et al. 2003, 2004; Sette et al. 2004). Conversely, a review of various neuropathology assessments (e.g., brain weight, standard histopathology, and morphometric assessments) identified low variability for these measures (Crofton et al. 2001), concluding that no one postmortem measure is more sensitive, with each providing important data (Raffaele et al. 2005). The outcome of this continuing effort will allow better data interpretation, help refine requirements for future testing, and guide new methods development.

In addition to the goal of refinement of the current approach to DNT testing, there is another and more pressing driver of change in the science arena of DNT. Currently, thousands of chemicals lack even simple, basic toxicologic data (e.g., high-production-volume chemicals, pesticide inert ingredients, antimicrobial pesticides) but have a high potential for human exposure (NRC 1984). Assessing potential neurotoxicologic effects for these chemicals is a major challenge confronting the chemical industry, international and national regulatory agencies, and associated stakeholders (Dix et al. 2007; Kavlock et al. 2008; NRC 2007). New tools and methods are required to move toward a more sustainable risk assessment paradigm for these types of chemicals. Although the current DNT guidelines generate useful data for risk assessment purposes, this *in vivo* test is costly and time-consuming and uses a relatively large number of naive animals when conducted as a stand-alone study (compared with incorporating the DNT testing into other protocols, e.g., as proposed in Cooper et al. 2006 and U.S. EPA 2002b). A pressing goal of future research is to develop a validated true first-tier screening paradigm (e.g., a high-throughput *in vitro* screening battery) that can rapidly screen large numbers of chemicals for their potential to cause DNT (Coecke et al. 2007; Lein et al. 2007; NRC 2007; U.S. EPA 2006). Coupled with development of decision frameworks (e.g., Combes et al. 2003), data from these high-throughput screens may

Table 4. Examples of chemicals and other stressors tested using the U.S. EPA DNT guideline or OECD TG 426.^a

Abamectin	Dichlorvos (2)	Methyl parathion
Acephate	Dicrotophos	Methylazoxymethanol (2)
Acetaminophen	Dietary restriction	Methylmercury
Acibenzolar- <i>s</i> -methyl	Dimethoate	<i>n</i> -Methylneodecanamide
Acrylamide	Disulfoton	Molinate
AE-0172747	Emamectin	Naled
Aldicarb	Epidermal growth factor	Nelfinavir
Alitame	<i>s</i> -Ethylpropylthiocarbamate	Nitrous oxide
Amicarbazone	Ethoprophos	Octamethylcyclotetrasiloxane
Atorvastatin	Ethylbenzene	Perchlorate
Azinphos methyl	Etofenprox	Phorate (2)
BAS 510F	Fenamidone	Prochloraz
BAS 670H	Fenamiphos	Profenofos
Bifenthrin	Fentin hydroxide	Propylthiouracil (2)
Carbaryl	Fipronil	Pymetrozine
Carbofuran	Flubendiamide	Pyrasulfotole
Chlorfenapyr	Flufenacet	Spirodiclofen
Chlorite, sodium	Glufosinate ammonium	Prothioconazole
Chlorpyrifos	Glyphosate trimesium	Styrene
CI-943	GN1180 (MN rpg120/HIV-1)	Tetrabromobisphenol A
Cigarette smoke	Hydrogen sulfide	Tebuconazole
Clodinafop propargyl	Imidacloprid	Terbufos
Clothianidin	Iminodipropionitrile	Tetrachlorvinphos
Coumaphos	Indoxacarb	Thiamethoxam
Cyclohexanemethanol	Isopropanol	Thiocloprid
λ-Cyhalothrin	Isoxaflutole	Thiram
β-Cyfluthrin	Lead nitrate	Triallate
Cymoxanil	Lindane	Tribufos
δ-Cypermethrin	Malathion	Trichlorfon
Decamethylcyclotetrasiloxane	Maternal separation	1,1,1-Trichloroethane
<i>p,p</i> -DDT	Methamidophos	Trichloroethylene
DEET (<i>N,N</i> -diethyl- <i>meta</i> -toluamide)	<i>p</i> -Methane-3,8-diol	Triethylene glycol monomethyl ether
Deltamethrin	Methimazole (6)	Trimethyltin
Diazepam	Methyl bromide	Ziram
Diazinon		

^aNumbers indicate the number of studies conducted for that chemical.

facilitate prioritization of any further testing *in vivo*, for example, as for substances identified as potentially hazardous under the European regulation on Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemical Substances (REACH) (European Commission 2006). Data generated by the current DNT test method will be vital in the validation of these high-throughput *in vitro* methods, providing information on their utility and limits, as well as guidance on the potential use of data from these alternative methods in a risk assessment context.

Conclusions

The OECD DNT TG 426 (OECD 2007) represents the best available science for assessing the potential for DNT in human health risk assessment, and data generated by DNT studies are relevant and reliable for this assessment. The test methods used in the DNT have been subjected to an extensive history of international validation, peer review, and evaluation that is contained in the public record. The reproducibility, reliability, and sensitivity of these methods have been demonstrated, using a wide variety of test substances. Multiple, independent, expert scientific peer reviews affirm these conclusions, as described in this document. The OECD DNT TG 426 provides an outline of behavioral domains and morphologic end points, relevant to human neurodevelopment, that should be examined to assess potential DNT of a test compound. The results from DNT studies are used for hazard/risk assessment purposes, and in cases where data from a DNT study are not available, additional uncertainty factors may be employed by regulators to address the need for DNT data from a regulatory standpoint. This document shows that a variety of chemicals have been tested for DNT, constituting a sampled spectrum of the chemical universe that the test is proposed to investigate. Several published reports outlined herein show that the DNT study is robust and can be conducted in multiple laboratories with consistent performance.

REFERENCES

- Adams J. 1986. Methods in behavioral teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology* (Riley EP, Vorhees CV, eds). New York: Plenum Press, 67–97.
- Adams J, Buelke-Sam J, Kimmel CA, Nelson CJ, Miller DR. 1985a. Collaborative Behavioral Teratology Study: preliminary research. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:555–578.
- Adams J, Buelke-Sam J, Kimmel CA, Nelson CJ, Reiter LW, Sobotka TJ, et al. 1985b. Collaborative Behavioral Teratology Study: protocol design and testing procedures. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:579–588.
- Adams J, Oglesby DM, Ozemek HS, Rath J, Kimmel CA, Buelke-Sam J. 1985c. Collaborative Behavioral Teratology Study: programmed data entry and automated test systems. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:547–554.
- Adams J, Vorhees CV, Middaugh LD. 1990. Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. *Neurotoxicol Teratol* 12:203–214.
- Alder S, Candrian R, Elsner J, Zbinden G. 1986. Neurobehavioral screening in rats: validation study. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 8:279–289.
- Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. 2000. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* 144:121–127.
- Balls M, Combes R. 2005. The need for a formal invalidation process for animal and non-animal tests. *Altern Lab Anim* 33:299–308.
- Barlow SM, Sullivan FM. 1975. Behavioral teratology. In: *Teratology: Trends and Applications* (Berry CL, Poswillo DE, eds). New York: Springer-Verlag, 103–120.
- Brent R, Weitzman M, Balk S, Lanphear B, Landrigan P, Reigart R, eds. 2004. The vulnerability, sensitivity, and resiliency of the developing embryo, infant, child, and adolescent to the effects of environmental chemicals, drugs, and physical agents as compared to the adult. *Pediatrics* 113(suppl):933–1172.
- Buelke-Sam J, Kimmel CA, Adams J, Nelson CJ, Vorhees CV, Wright DC, et al. 1985. Collaborative Behavioral Teratology Study: results. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:591–624.
- Buelke-Sam J, Mactutus CF. 1990. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Work Group II report: testing methods in developmental neurotoxicity for use in human risk assessment. *Neurotoxicol Teratol* 12:269–274.
- Burbacher TM, Rodier PM, Weiss B. 1990. Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicol Teratol* 12:191–202.
- Butcher RE, Hoar RM, Nolan GA, Vorhees CV. 1979. Interlaboratory comparison of behavioral testing. *J Assoc Off Anal Chem* 62:840–843.
- Butcher RE, Nelson CJ. 1985. Design and analysis issues in behavioral teratology testing. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:659.
- Butcher RE, Vorhees CV. 1979. A preliminary test battery for the investigation of the behavioral teratology of selected psychotropic drugs. *Neurobehav Toxicol* 1:207–212.
- Catalano PJ, McDaniel KL, Moser VC. 1997. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: VI. Agreement and reliability of the data. *Neurotoxicology* 18:1057–1064.
- Chemical Manufacturers Association. 1987. Comments on proposed test rule for glycol ethers by the Chemical Manufacturers Association. *Fed Reg* 53(38):5935–5936.
- Chiarotti F, Puopolo M. 2000. Refinement in behavioral research: a statistical approach. In: *Progress in Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation* (Balls M, van Zeller AM, Halder ME, eds). Oxford: Elsevier, 1229–1237.
- Claudio L, Bearer CF, Wallinga D. 1999. Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part II: the developmental toxicity testing guideline. *Am J Ind Med* 35:554–563.
- Claudio L, Kwa WC, Russell AL, Wallinga D. 2000. Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 164:1–14.
- Coecke S, Goldberg AM, Allen S, Buzanska L, Calamandrei G, Crofton K, et al. 2007. Workgroup report: incorporating *in vitro* alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environ Health Perspect* 115:924–931.
- Combes R, Barratt M, Balls M. 2003. An overall strategy for the testing of chemicals for human hazard and risk assessment under the EU REACH system. *Altern Lab Anim* 31:7–19.
- Cooper RL, Lamb JC, Barlow SM, Bentley K, Brady AM, Doerrer NG, et al. 2006. A tiered approach to life stages testing for agricultural chemical safety assessment. *Crit Rev Toxicol* 36:69–98.
- Cory-Slechta DA, Crofton KM, Foran JA, Ross JF, Sheets LP, Weiss B, et al. 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. I: behavioral effects. *Environ Health Perspect* 109(suppl 1):79–91.
- Crofton KM, Foss JA, Hass U, Jensen K, Levin ED, Parker SL. 2008. Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicol Teratol* 30(4):266–287.
- Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, et al. 1991. Interlaboratory comparison of motor activity experiments: implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol Teratol* 13:599–609.
- Crofton KM, Makris SL, Sette WF, Mendez E, Raffaele KC. 2004. A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol Teratol* 26:345–352.
- Crofton KM, Sutton JL, Makris SL, Raffaele K, Sette WF. 2001. Developmental neurotoxicity testing guidelines: variability in morphometric assessments of neuropathology. *Toxicologist* 60:113.
- Davis JM, Otto DA, Weil DE, Grant LD. 1990. The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. *Neurotoxicol Teratol* 12:215–229.
- Dix DJ, Houck KA, Martin MT, Richard AM, Setzer RW, Kavlock RJ. 2007. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicol Sci* 95:5–12.
- Dorman DC, Allen SL, Byczkowski JZ, Claudio L, Fisher JE Jr, Fisher JW, et al. 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ Health Perspect* 109(suppl 1):101–111.
- Driscoll CD, Streissguth AP, Riley EP. 1990. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicol Teratol* 12:231–237.
- Elsner J. 1986. Testing strategies in behavioral teratology. III. Microanalysis of behavior. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8:573–584.
- Elsner J, Hodel B, Suter KE, Oelke D, Ulbrich B, Schreiner G, et al. 1988. Detection limits of different approaches in behavioral teratology, and correlation of effects with neurochemical parameters. *Neurotoxicol Teratol* 10:155–167.
- Elsner J, Suter KE, Ulbrich B, Schreiner G. 1986. Testing strategies in behavioral teratology: IV. Review and general conclusions. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8:585–590.
- European Commission. 2006. Registration Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH). Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union. Available: http://tsar.jrc.ec.europa.eu/documents/TSAR_REACH_corrected_2007_05_29.pdf [accessed 21 November 2008].
- Fenner-Crisp PA, Adams J, Balbus J, Bellinger D, Brimijoin S, Makris SL, et al. 2005. Application of developmental neurotoxicity testing to public health protection. *Neurotoxicol Teratol* 27:371.
- Food Quality Protection Act of 1996. Public Law 104-170.
- Francis EZ, Kimmel CA, Rees DC. 1990. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity: summary and implications. *Neurotoxicol Teratol* 12:285–292.
- Fukunishi K, Terada Y, Tachibana T, Tanimura T. 1998. Collaborative behavioral teratology study of phenytoin: a test battery for neurobehavioral developmental toxicity in rats. *Congenit Anom* 38:117–141.
- Gad SC. 1982. A neuromuscular screen for use in industrial toxicology. *J Toxicol Environ Health* 9:691–704.
- Garman RH, Fix AS, Jortner BS, Jensen KF, Hardisty JF, Claudio L, et al. 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. II: neuropathology. *Environ Health Perspect* 109(suppl 1):93–100.
- Gerber GJ, O'Shaughnessy D. 1986. Comparison of the behavioral effects of neurotoxic and systemically toxic agents: how discriminatory are behavioral tests of neurotoxicity? *Neurobehav Toxicol Teratol* 8:703–710.
- Geyer MA, Reiter LW. 1985. Strategies for the selection of test methods. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:661–662.
- Grandjean P, Landrigan PJ. 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368:2167–2178.
- Holson RR, Freshwater L, Maurissen JP, Moser V, Phang W. 2008. Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicol Teratol* 30(4):326–348.
- Hutchings DE. 1990. Issues of risk assessment: lessons from the use and abuse of drugs during pregnancy. *Neurotoxicol Teratol* 12:183–189.
- IPCS. 2001. Environmental Health Criteria 223: Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches. Geneva: International Programme on Chemical Safety, World Health Organization.
- Irwin S. 1968. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13:222–257.
- Kaufmann W, Groters S. 2006. Developmental neuropathology in DNT-studies—a sensitive tool for the detection and characterization of developmental neurotoxicants. *Reprod Toxicol* 22:196–213.

- Kavlock RJ, Ankley G, Blancato J, Breen M, Conolly R, Dix D, et al. 2008. Computational toxicology—a state of the science mini review. *Toxicol Sci* doi:10.1093/toxsci/kfm297 [Online 7 December 2007].
- Kimmel CA, Buelke-Sam J. 1985. Collaborative Behavioral Teratology Study: background and overview. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:541–545.
- Kimmel CA, Buelke-Sam J, Adams J. 1985. Collaborative Behavioral Teratology Study: implications, current applications and future directions. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:669–673.
- Kimmel CA, Rees DC, Francis EZ, eds. 1990. Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* 12:173–292.
- Kutscher CL, Nelson BK. 1985. Dosing considerations in behavioral teratology testing. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:663–664.
- Ladics GS, Chapin RE, Hastings KL, Holsapple MP, Makris SL, Sheets LP, et al. 2005. Developmental toxicology evaluations—issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies. *Toxicol Sci* 88:24–29.
- Lein P, Locke P, Goldberg A. 2007. Meeting report: alternatives for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect* 115:764–768.
- Levine TE, Butcher RE. 1990. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Work Group IV report: triggers for developmental neurotoxicity testing. *Neurotoxicol Teratol* 12:281–284.
- Li A. 2005. Regulatory developmental neurotoxicology testing: data evaluation for risk assessment purposes. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:727–733.
- MacPhail RC, Peele DB, Crofton KM. 1989. Motor activity and screening for neurotoxicity. *J Am Coll Toxicol* 8:117–125.
- MacPhail RC, Tilson HA, Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, et al. 1997. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening. I. Background and genesis. *Neurotoxicology* 18:925–928.
- Makris S, Raffaele K, Sette W, Seed J. 1998. A Retrospective Analysis of Twelve Developmental Neurotoxicity Studies. Available: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/1998/120898_mtg.htm#materials [accessed 21 November 2008].
- Makris SL, Crofton KM, Doherty J, Raffaele KC, Mendez E, Schumacher K. 2006. Retrospective review of developmental neurotoxicity studies utilizing gavage dosing of pre-weaning rats demonstrates no adverse consequences of dosing procedures on brain morphometry. *Toxicologist* 90:291.
- Makris SL, Mendez E, Raffaele KC. 2005. A retrospective review of studies utilizing gavage dosing of pre-weaning rats demonstrated no adverse consequences of dosing procedures. *Toxicologist* 84:77.
- Middaugh LD, Dow-Edwards D, Li AA, Sandler JD, Seed J, Sheets LP, et al. 2003. Neurobehavioral assessment: a survey of use and value in safety assessment studies. *Toxicol Sci* 76:250–261.
- Milesen BE, Ferenc SA. 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: overview. *Environ Health Perspect* 109(suppl 1):77–78.
- Mizutani M. 1984. Joint studies by 31 laboratories on some experimental conditions of water multiple-T-maze and active avoidance test. *Congenit Anom* 24:265.
- Mizutani M. 1985. Collaborative studies on behavioral teratology by 46 laboratories: effects of behavioral teratogenic chemicals on the learning behavior of the rat. *Congenit Anom* 25:197.
- Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, Kulig BM, MacPhail RC, et al. 1997a. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: III. Results of proficiency studies. Steering Group. *Neurotoxicology* 18:939–946.
- Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, Kulig BM, MacPhail RC, et al. 1997b. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: IV. Control data. Steering Group. *Neurotoxicology* 18:947–967.
- Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, Kulig BM, MacPhail RC, et al. 1997c. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: V. Results of chemical testing. Steering Group. *Neurotoxicology* 18:969–1055.
- Moser VC, Becking GC, MacPhail RC, Kulig BM. 1997d. The IPCS collaborative study on neurobehavioral screening methods. *Fundam Appl Toxicol* 35:143–151.
- Moser VC, McCormick JP, Creason JP, MacPhail RC. 1988. Comparison of chlormimeform and carbaryl using a functional observational battery. *Fundam Appl Toxicol* 11:189–206.
- Moser VC, Tilson HA, MacPhail RC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, et al. 1997e. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: II. Protocol design and testing procedures. *Neurotoxicology* 18:929–938.
- Moser VC, Walls I, Zoetis T. 2005. Direct dosing of pre-weaning rodents in toxicity testing and research: deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group. *Int J Toxicol* 24:87–94.
- Nelson BK. 1986. Developmental neurotoxicology of in utero exposure to industrial solvents in experimental animals. *Neurotoxicology* 7:441–447.
- Nelson CJ, Felton RP, Kimmel CA, Buelke-Sam J, Adams J. 1985. Collaborative Behavioral Teratology Study: statistical approach. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:587–590.
- Nishimura T, Iwase T, Hasimoto Y, Tanimura T. 2001. Evaluation of a core battery of tests for detecting behavioral dysfunction of rat offspring induced by retinoic acid: collaborative work II of the Japanese Behavioral Teratology Committee. *Congenit Anom* 41:156–168.
- Nolen GA. 1985. An industrial developmental toxicologist's view of behavioral teratology and possible guidelines. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:653–657.
- NRC (National Research Council). 1984. *Toxicity Testing: Strategies to Determine Needs and Priorities*. Washington, DC:National Academy Press.
- NRC (National Research Council). 1992. *Environmental Neurotoxicology*. Washington, DC:National Academy Press.
- NRC (National Research Council). 1993. *Pesticides in the Diets of Infants and Children*. Washington, DC:National Academy Press.
- NRC (National Research Council). 2000. *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*. Washington, DC:National Academy Press.
- NRC (National Research Council). 2007. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. Washington, DC:National Academies Press.
- OECD. 1983. Test Guideline 415. OECD Guideline for Testing of Chemicals. One-Generation Reproduction Toxicity Study. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: http://www.oecd.org/docuement/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html [accessed 6 August 2008].
- OECD. 1995. Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 1996a. Final Report of the OECD Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 1996b. Report of the OECD Workshop on "Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods" (Solna Report). ENV/MC/CHEM(96)9. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 1997. Test Guideline 424. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Neurotoxicity Study in Rodents. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: http://www.oecd.org/docuement/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html [accessed 6 August 2008].
- OECD. 2001. Test Guideline 414. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Prenatal Developmental Toxicity Study. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: http://www.oecd.org/docuement/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html [accessed 6 August 2008].
- OECD. 2003. Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington, DC, 23–25 October 2000. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 2005a. OECD Series on Testing and Assessment, Number 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. ENV/JM/MONO(2005)14. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 2005b. Report of the Expert Consultation Meeting for the Revision of Draft Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 2007. Test Guideline 426. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Developmental Neurotoxicity Study. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: [http://lysander.sourceoecd.org/vl=861182/cl=34/nw=1/rpsv/j/oecdjournals/1607310x/v1n4/s27/p1\[accessed 9 December 2008\].](http://lysander.sourceoecd.org/vl=861182/cl=34/nw=1/rpsv/j/oecdjournals/1607310x/v1n4/s27/p1[accessed 9 December 2008].)
- OECD. 2008a. OECD Series on Testing and Assessment, Number 89: Retrospective Performance Assessment of the Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity. ENV/JM/MONO(2008)15. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: <http://www.oecd.org/olis/2008doc.nsf/LinkTo/NT000035EA/FILE/JT03249260.PDF> [accessed 8 December 2008].
- OECD. 2008b. OECD Series on Testing and Assessment, Number 43: Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. ENV/JM/MONO(2008)16. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development. Available: <http://www.oecd.org/olis/2008doc.nsf/LinkTo/NT0000358A/FILE/JT03249193.PDF> [accessed 8 December 2008].
- Office of Technology Assessment. 1990. *Neurotoxicity: Identifying and Controlling Poisons of the Nervous System*. OTA-BA-438. Washington, DC:Office of Technology Assessment.
- Okazaki S, Takashima H, Yamaguchi M, Hamamura M, Yamashita K, Okada M, et al. 2003. Neurobehavioral toxicity of acrylamide and IDPN (3,3'-iminodipropionitrile) in rats by 28-day oral administration—problems encountered in collaborative study and a commentary on conducting neurobehavioral testing. *J Toxicol Sci* 28(suppl 1):1–14.
- Pryor GT, Uyeno ET, Tilson HA, Mitchell CL. 1983. Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5:91–117.
- Puopolo M. 2004. Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research [in Italian]. *Ann Ist Super Sanita* 40:157–163.
- Raffaele KC, Fisher JE, Hancock S, Hazelden KP, Sobrian SK. 2008. Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test. *Neurotoxicol Teratol* 30(4):288–325.
- Raffaele KC, Gilbert ME, Crofton S. 2004. Learning and memory tests in developmental neurotoxicity testing: a cross-laboratory comparison of control data. *Toxicologist* 78:276.
- Raffaele KC, Gilbert ME, Crofton KM, Mendez E, Doherty JD, Schumacher W, et al. 2006. Evaluation of learning and memory in developmental neurotoxicity studies: comparison of single-choice water maze across laboratories. *Toxicologist* 90:291.
- Raffaele KC, Sette W, Doherty JD, Makris SL, Crofton KM. 2005. Neuropathological findings in developmental neurotoxicity testing: comparison of qualitative and quantitative evaluations. *Toxicologist* 84:200.
- Raffaele KC, Sette W, Makris SL, Moser V, Crofton KM. 2003. Motor activity in developmental neurotoxicity testing: a cross-laboratory comparison of control data. *Toxicologist* 72:123.
- Rice D, Barone S Jr. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108(suppl 3):511–533.
- Rodier PM. 1980. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol* 22:525–545.
- Rodier PM. 1986. Time of exposure and time of testing in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 7:69–76.
- Rodier PM. 1994. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ Health Perspect* 102(suppl 2):121–124.
- Rowland J, Makris SL, Raffaele K, Schumacher K, Scarano L. 2007. A retrospective review of the use of the developmental neurotoxicity study in pesticide risk assessments. *Toxicologist* 96:369.
- Schreiner G, Ulbrich B, Bass R. 1986. Testing strategies in behavioral teratology: II. Discrimination learning. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8:567–572.
- Schull WJ, Norton S, Jensh RP. 1990. Ionizing radiation and the developing brain. *Neurotoxicol Teratol* 12:249–260.
- Sette WF, Crofton KM, Makris SL, Doherty JD, Raffaele KC. 2004. Auditory startle reflex habituation in developmental neurotoxicity testing: a cross-laboratory comparison of control data. *Toxicologist* 78:275.
- Slikker W Jr, Acuff K, Boyes WK, Chelonis J, Crofton KM, Dearlove GE, et al. 2005. Behavioral test methods workshop. *Neurotoxicol Teratol* 27:417–427.
- Sobotka TJ, Vorhees CV. 1985. Application of behavioral teratology testing procedures. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:665.
- Spencer PJ, Mattsson JL, Johnson KA, Albee RR. 1993. Neurotoxicity screening methods are sensitive to experimental history. *Int J Psychophysiol* 14:5–19.
- Spyker JM, Smithberg M. 1972. Effects of methylmercury on prenatal development in mice. *Teratology* 5:181–190.

- Stanton ME, Spear LP. 1990. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Work Group I report: comparability of measures of developmental neurotoxicity in humans and laboratory animals. *Neurotoxicol Teratol* 12:261–267.
- Stein J, Schettler T, Wallinga D, Valenti M. 2002. In harm's way: toxic threats to child development. *J Dev Behav Pediatr* 23:S13–S22.
- Suter KE, Schon H. 1986. Testing strategies in behavioral teratology: I. Testing battery approach. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8:561–566.
- Tachibana T, Narita H, Ogawa T, Tanimura T. 1998. Using post-natal age to determine test dates leads to misinterpretations when treatments alter gestation length: results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol Teratol* 20:449–457.
- Tachibana T, Terada Y, Fukunishi K, Tanimura T. 1996. Estimated magnitude of behavioral effects of phenytoin in rats and its reproducibility: a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Physiol Behav* 60:941–952.
- Tanimura T. 1985. Guidelines for developmental toxicity testing of chemicals in Japan. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:647–652.
- Tanimura T. 1986. Collaborative studies on behavioral teratology in Japan. *Neurotoxicology* 7:35–45.
- Tanimura T. 1992. Update on the Japanese Behavioral Teratology Meeting. *Congenit Anom* 32(suppl):S 7–S20.
- Tilson HA, Jacobson JL, Rogan WJ. 1990. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 12:239–248.
- Tilson HA, MacPhail RC, Moser VC, Becking GC, Cuomo V, Frantik E, et al. 1997. The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods: VII. Summary and conclusions. *Neurotoxicology* 18:1065–1069.
- Tilson HA, Mitchell CL, Cabe PA. 1979. Screening for neuro-behavioral toxicity: the need for and examples of validation of testing procedures. *Neurobehav Toxicol* (suppl 1):137–148.
- Tilson HA, Wright DC. 1985. Interpretation of behavioral teratology data. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:667–668.
- Tyl RW, Crofton KM, Moretto A, Moser V, Sheets LP, Sobotka TJ. 2008. Identification and interpretation of treatment-related effects in developmental neurotoxicity testing. *Neurobehav Toxicol* 30(4):349–381.
- Tyl RW, Sette WF. 1990. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Work Group III report: weight of evidence and quantitative evaluation of developmental neurotoxicity data. *Neurotoxicol Teratol* 12:275–280.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1986. Triethylene glycol monomethyl, monoethyl and monobutyl ethers: proposed test rule. *Fed Reg* 51(94):17883–17894.
- U.S. EPA. 1991. Developmental Neurotoxicity Study, Series 83-6, Addendum 10 (Neurotoxicity), Subdivision F: Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals. EPA 540/09-91-123. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.
- U.S. EPA. 1995. Positive Control Requirement for Neurotoxicity Testing. Letter from American Industrial Health Commission (AIHC) to Richard Hill, U.S. EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1998. Health Effects Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study. EPA 712-C-98-239. Available: http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-6300.pdf [accessed 8 December 2008].
- U.S. EPA. 1999a. FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, December 8, 1998, held at the Sheraton Crystal Hotel, Arlington, VA, II—A Set of Scientific Issues Being Considered by the Environmental Protection Agency Regarding: A Retrospective Analysis of Developmental Neurotoxicity Studies, U.S. EPA, FIFRA SAP Report No. 99-01B, January 22, 1999. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/1998/december/final.htm> [accessed 21 November 2008].
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1999b. Neurotoxic pesticides; availability of data call-in notice. *Fed Reg* 64:42945–42947.
- U.S. EPA. 2002a. Determination of the Appropriate FQPA Safety Factor(s) in Tolerance Assessment. Washington, DC:Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/oppead1/trac/science/determ.pdf> [accessed 6 August 2008].
- U.S. EPA. 2002b. A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency Risk Assessment Forum.
- U.S. EPA. 2006. Evaluation Report: Opportunities to Improve Data Quality and Children's Health through the Food Quality Protection Act. Report No. 2006-P-00009. Washington, DC:Office of the Inspector General, U.S. Environmental Protection Agency.
- Vorhees CV. 1985a. Behavioral effects of prenatal d-amphetamine in rats: a parallel trial to the Collaborative Behavioral Teratology Study. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:709–716.
- Vorhees CV. 1985b. Behavioral effects of prenatal methylmercury in rats: a parallel trial to the Collaborative Behavioral Teratology Study. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:717–725.
- Vorhees CV. 1985c. Comparison of the Collaborative Behavioral Teratology Study and Cincinnati Behavioral Teratology test batteries. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7:625–633.
- Vorhees CV. 1986. Methods for assessing the adverse effects of foods and other chemicals on animal behavior. *Nutr Rev* 44(suppl):185–193.
- Vorhees CV, Butcher RE, Brunner RL, Sobotka TJ. 1979. A developmental test battery for neurobehavioral toxicity in rats: a preliminary analysis using monosodium glutamate calcium carrageenan, and hydroxyurea. *Toxicol Appl Pharmacol* 50:267–282.
- Weiss B, Amler S, Amler RW. 2004. Pesticides. *Pediatrics* 113:1030–1036.
- York RG, Barnett J Jr, Brown WR, Garman RH, Mattie DR, Dodd D. 2004. A rat neurodevelopmental evaluation of offspring, including evaluation of adult and neonatal thyroid, from mothers treated with ammonium perchlorate in drinking water. *Int J Toxicol* 23:191–214.
- Zoetis T, Walls I. 2003. Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. Washington, DC:ILSI Press.