

中华人民共和国国家标准

GB/T 21770—2008

化学品(有机磷化合物) 急性染毒的迟发性神经毒性试验方法

Chemicals(organophosphorus substances)—Test method of delayed neurotoxicity following acute exposure

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 (有 机 磷 化 合 物) 急 性 染 毒 的 迟 发
性 神 经 毒 性 试 验 方 法
GB/T 21770—2008

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号
邮 政 编 码 : 100045

网 址 www.spc.net.cn

电 话 : 68523946 68517548

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

*

开 本 880×1230 1/16 印 张 0.5 字 数 10 千 字
2008 年 7 月 第 一 版 2008 年 7 月 第 一 次 印 刷

*

书 号 : 155066 · 1-32178

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换
版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话 : (010)68533533

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 418(1995年)《有机磷化合物急性染毒的迟发性神经毒性试验》(英文版)。

本标准作了下列编辑性修改:

- 增加了范围部分;
- 计量单位改成我国法定计量单位;
- 删除了 OECD 的参考文献部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位:宁波出入境检验检疫局、国家环境保护总局化学品登记中心、中国环境科学研究院、沈阳化工研究院安全评价中心。

本标准主要起草人:李涛、孙金秀、龙再浩、李涛、马中春、陈小青、林振兴。

OECD 引言

1. OECD 会根据科学发展和动物福利的考虑要定期修改其化学品测试指南。本更新的指南采用修改过的方法,包括测量神经疾病靶酯酶(NTE;以前称神经毒性酯酶)来测定足够高剂量时的效应,并不再要求进行 21 d 的重复染毒。染毒后 24 h~48 h 内脑和脊髓中 NTE 的抑制与 10 d~20 d 后看到的迟发性神经毒性的临床和形态学效应有很好的相关性。已发现 NTE 试验模型对所有已知能引起人体迟发性神经病变的有机磷酸酯类物质都有效。因此,NTE 抑制的定量数据,对有时在行为或组织病理学中见到的一些模棱两可的结果是否表明是潜在的迟发性神经毒性物质方面,明显提高了判断能力。

2. 本化学品测试指南 418 更新版本来源于 1992 年 2 月在巴黎召开的专家工作组关于系统性短期和(迟发)神经毒性的协调会议。这一更新版本主要是依据 1990 年 3 月 OECD 在华盛顿举行的有关神经毒性试验的特别会议上讨论形成的初稿和从各成员国收到的意见的基础上进行修订的。

3. 在评估和评价化学物质的毒性效应时,要考虑到某些种类的化学品具有引起特定类型的神经毒性的潜在可能性,而这是在其他毒性研究中可能检测不到的毒性效应,这一点是很重要的。现在已经观察到某些有机磷化合物能够引起迟发性神经毒性,因此,这类化学品应当作为候选物质用本指南进行评估。此外,可以使用体外筛选试验来识别那些能导致迟发性多神经病变的化学品。然而,从体外研究获得的阴性结果不能提供足够的证据来说明受试化学品不是神经毒性物质。

4. 在本测试指南中选择的毒性终点(生化、组织病理学和行为观察)获得的阴性结果,在正常情况下不要求进行进一步的迟发性神经毒性试验。对于那些终点为可疑或非结论性的结果,则需要进行进一步的评估。

化学品(有机磷化合物) 急性染毒的迟发性神经毒性试验方法

1 范围

本标准规定了化学品有机磷化合物急性染毒的迟发性神经毒性动物试验的范围、术语定义和缩略语、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测有机磷化合物急性染毒后的迟发性神经毒性效应。

2 术语和定义、缩略语

2.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1.1

迟发性神经毒性 **delayed neurotoxicity**

指一组神经系统综合征,主要表现为延迟出现的共济失调、脊髓和外周神经远端轴突病,以及神经组织中神经疾病靶酯酶的抑制和老化。

2.1.2

有机磷化合物 **organophosphorus substance**

包括不带电荷的有机磷酸酯、硫代磷酸酯或有机磷酸酐、有机膦酸、有机膦酸-酰胺或有关的硫代磷酸、硫代膦酸或硫代亚磷酰胺酸,或其他可引起迟发性神经毒性的某些物质。

2.2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

AChE(acetylcholinesterase) 乙酰胆碱酯酶

NTE(neuropathy target esterase) 神经疾病靶酯酶

TOCP(tri-o-cresylphosphate) 磷酸三甲苯酯

3 试验基本原则

受试物一次剂量经口染毒家养母鸡,但要预先保护家养母鸡避免急性胆碱能化作用。观察动物 21 d,包括行为异常、共济失调和麻痹。从每组中随机挑选动物进行生化检测(通常在染毒后 24 h 和 48 h),特别是 NTE 检测。染毒后第 21 天,将存留动物处死,选取神经组织进行组织病理学检查。

4 试验方法

4.1 实验动物

4.2 动物种属

使用健康、初成年、8月龄~12月龄的家养产蛋母鸡(*Gallus gallus* 驯化种)。通常所用母鸡的大小、种属和品系要符合标准动物应在能自由活动的条件下饲养长大。

4.2.1 饲养环境

动物饲养笼或围栏要足够大,能允许母鸡自由运动以及便于观察动物步态。当饲养环境是人工光照时,要按照 12 h 光照/12 h 黑暗的顺序循环。要提供合适的饲料,自由饮水。

4.2.2 动物准备

使用健康、初成年母鸡,要确保没有感染过病毒性疾病、没有接受过药物治疗和没有步态异常,将其

随机分成对照组和染毒组。在试验开始前要至少适应检测实验室环境 5 d。

4.3 染毒途径和受试物制备

4.3.1 通常采用经口途径染毒,用灌胃、胶囊等方法。

4.3.2 如果受试物是液体,可以不稀释或者用合适的赋形剂进行稀释,如玉米油;如果受试物是固体,由于大剂量固体用胶囊形式可能会不被有效吸收,应当尽可能溶解在赋形剂中。如果使用的赋形剂不是水,应当了解它的毒性特征,如果不明确,应在试验前测定其毒性。

4.4 动物数量和分组

4.4.1 动物分组包括赋形剂对照组、阳性对照组和染毒组。

4.4.2 染毒组和赋形剂对照组要有足够数量的动物,确保有 6 只用于生化检测(两个时点,每个三只)和 21d 观察期结束时有 6 只存活用于病理检查。

4.4.3 赋形剂对照组除了不给予受试物外,其他处理方式与染毒组相同。

4.4.4 阳性对照可以是同步对照,也可以是最近的历史对照。用已知的迟发性神经毒物染毒的阳性对照组至少要包括 6 只动物(3 只用于生化和 3 只用于病理),广泛使用的迟发性神经毒物染毒有 TOCP。应当定期更新阳性对照的历史数据。而且当检测实验室对于试验中的一些关键要素(例如品系、喂养、饲养条件)发生改变时,就必须建立新的阳性对照数据。

4.5 预试验

预试验是用来确定正式试验时使用的母鸡数和剂量水平,它可通过使用适当数量的动物和剂量水平进行。由于急性试验的结果将被用于确定是否需要进行 28 d 试验,因此预试验的目标是确定正式试验的最大使用剂量。为了确定正式试验剂量,在预试验中设计一些动物死亡的剂量是必须的。但是为防止急性胆碱能效应导致的动物死亡,可以使用已知的不干扰迟发性神经毒性反应的保护性药物,如阿托品。母鸡的历史数据或其他毒理学信息也可以帮助剂量选择。

4.6 限量试验

使用本试验方法规定的程序进行试验,试验中受试物染毒剂量不低于 2 000 mg/(kg·d),没有观察到毒性效应,或根据结构相关化合物分析所得的数据也表明不会产生毒性,那么就没有必要进行更高剂量的试验。当人体暴露水平表明需要进行更高剂量试验时,不能采用限量试验。

4.7 正式试验

根据预试验结果和 2 000 mg/(kg·d)的上限剂量,在正式试验中设计的受试物剂量水平应当尽可能高。动物的死亡后所存活数应满足用于生化(6 只)和第 21 天病理(6 只)检测的需要。应当使用已知不干扰迟发性神经度反应的阿托品或其他保护性药物,来防止急性胆碱能效应导致的死亡。

4.8 观察

动物染毒后应当立即开始观察。在最初 2 d 内要每天仔细观察数次,此后每天至少观察 1 次,或直到按设计动物被处死。应当记录所有的中毒症状,包括临床行为异常出现的时间、类型、严重程度和持续时间。共济失调可通过至少由 4 级水平组成的评分量表来评价,同时要记录动物的麻痹现象。被选择进行病理检查的动物要每周至少 2 次放出笼子,进行强迫性活动,比如爬楼梯,来帮助观察动物的轻微毒性效应。取出并处死所有濒死动物并进行大体解剖检查。

4.9 体重

所有母鸡在染毒前当时称重,以后每周至少称重 1 次。

4.10 生化

4.10.1 在染毒后的某几天中从每个染毒组和赋形剂对照组(当设同步阳性对照时)随机各选 6 只母鸡、从阳性对照组随机选 3 只母鸡,处死,取脑和腰部脊髓,测量其 NTE 活性。此外,制备和测量坐骨神经组织的 NTE 活性也是有用的。通常,染毒后 24 h 从对照组和每个染毒组取 3 只母鸡处死,48 h 再取 3 只处死,而阳性对照组的 3 只母鸡则在 24 h 处死。如果观察到的临床中毒症状时间(经常通过观察胆碱能症状出现的时间来评估)表明毒性物质在体内发挥毒性作用非常缓慢,那么神经组织的两次取

样时间最好选择在染毒后 24 h 和迟至 72 h 之间更为合适。

4.10.2 如果认为合适,也可以对上述神经组织进行 AchE 活性分析。但是, AchE 在体内可能发生自发复活,从而导致低估受试物抑制 AchE 的能力。

4.11 病理

4.11.1 大体解剖

要对所有的动物(包括按计划处死和濒死的动物)进行大体解剖,肉眼观察脑和脊髓的外观。

4.11.2 组织病理学

主要对动物的神经组织进行镜检,神经组织取材于观察期存活和未用于生化检测的动物。使用灌注技术对组织进行原位固定。组织切片必须包括小脑(中部纵向水平)、延髓、脊髓和外周神经。脊髓切片包括颈部上段、中胸段和腰骶部;外周神经切片部位包括坐骨神经、胫神经及其支配腓肠肌的分支远端区。切片要用合适的髓鞘和轴突特异性染色方法进行染色。

5 试验数据和报告

5.1 数据

必须提供包括个体数据,所有数据应以表格的形式表示,列出试验开始时各组的动物数,出现损伤、行为异常或生化改变的动物数,以及损伤或毒性效应的类型和严重程度,以及相应的百分率。

5.2 结果评价

5.2.1 试验结果要根据染毒组和对照组出现的临床行为、生化和组织病理学变化以及观察到其他效应之间的发生率、严重程度和相互关系进行评价。

5.2.2 计数资料要用合适的和一般都能被接受的统计方法进行评价,在试验设计时就应当选择统计方法。

5.3 试验报告

试验报告必须包括下列信息:

5.3.1 受试物

- a) 物理性状(包括异构体、纯度和理化性质);
- b) 名称和识别码。

5.3.2 赋形剂

如果使用的赋形剂不是水,要说明使用理由。

5.3.3 实验动物

- a) 动物的品系;
- b) 动物数量和年龄;
- c) 动物来源、以及饲养条件等;
- d) 试验开始每只动物体重。

5.3.4 试验条件

- a) 详细叙述受试物制备、稳定性和均匀度的资料;
- b) 详述受试物的染毒情况;
- c) 饲料和饮用水的质量;
- d) 剂量选择的理由;
- e) 详细说明受试物染毒的情况,包括赋形剂、给药体积和物理状态的资料;
- f) 所用保护性药物的种类和给药处理的详细描述。

5.3.5 结果

- a) 体重资料;
- b) 各剂量水平的毒性反应,包括死亡率;

GB/T 21770—2008

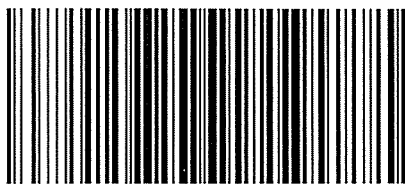
- c) 临床异常的性质、严重程度和持续时间(是否可逆);
- d) 详细描述生化检测方法和结果;
- e) 大体解剖检查结果;
- f) 详细描述所有组织病理学结果;
- g) 结果的统计处理。

5.3.6 结果讨论

5.3.7 结论

5.3.8 结果解释

如果试验结果(包括生化、组织病理学和临床异常表现)是阴性,那么在通常情况下不再要求进行进一步的迟发性神经毒性试验。对于可疑或不能得出结论性结果的则需要进一步评估。



GB/T 21770-2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-32178