

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.23—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 23 部分：迟发性神经毒性试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 23: Delayed neurotoxicity test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：急性经口毒性试验；
- 第 3 部分：急性经皮毒性试验；
- 第 4 部分：急性吸入毒性试验；
- 第 5 部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第 6 部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第 7 部分：皮肤致敏试验；
- 第 8 部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第 9 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 10 部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第 12 部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第 14 部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第 15 部分：亚急性经口毒性试验；
- 第 16 部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第 17 部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第 19 部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第 21 部分：致畸试验；
- 第 22 部分：两代繁殖毒性试验；
- 第 23 部分：迟发性神经毒性试验；
- 第 24 部分：慢性经口毒性试验；
- 第 25 部分：慢性经皮毒性试验；
- 第 26 部分：慢性吸入毒性试验；
- 第 27 部分：致癌试验；
- 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第 29 部分：毒物代谢动力学试验；
- 第 30 部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第 31 部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第 32 部分：酵母菌基因突变试验；
- 第 33 部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第 34 部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第 35 部分：体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验；
- 第 36 部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 23 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:山东省职业卫生与职业病防治研究院、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:陶玉珍、李斌、孙金秀、林铮。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 23 部分:迟发性神经毒性试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物迟发性神经毒性试验的目的、试验概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于有机磷化合物的迟发性神经毒性测定。若某些受试样品的化学结构式与迟发性神经毒性阳性物质相似,也需进行此项试验。试验分为急性和亚急性迟发性神经毒性试验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 1 部分:总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

有机磷引起的迟发性神经毒性 organophosphorus induced delayed neurotoxicity, OPIDN

一种神经综合征,主要的临床症状为四肢无力、上位运动神经元损伤性痉挛,其相关的病理学症状是周围神经和脊髓远端轴突病,生化作用是神经组织中的神经病靶酯酶(neuropathy target esterase, NTE)抑制和老化。暴露引起的 NTE 抑制和随后的老化,其临床体征和病理改变首先见于第 1 周~2 周间。

3.2

神经病靶酯酶 neuropathy target esterase, NTE

又称神经毒性酯酶(neurotoxic esterase)是膜结合蛋白,催化戊酸苯酯水解。该酶与有机磷共价结合发生磷酸化后,即被抑制或老化,与 OPIDN 之间有着密切关系。并不是所有抑制 NTE 的有机磷都能引起 OPIDN,但是所有引起 OPIDN 的有机磷都能抑制 NTE。

4 试验目的

检测和评价受试样品是否具有迟发性神经毒性作用。迟发性神经毒性作用主要表现为运动性共济失调和瘫痪,在组织病理学上神经组织呈脱髓鞘变化。

5 试验概述

在急性迟发性神经毒性试验中,高剂量采用最大耐受剂量,一次给药后观察 21 d。在亚急性神经毒

性试验中,连续给药 28 d 后,继续观察 14 d。

试验期间需对动物全面观察,内容包括:行为异常、运动失调、瘫痪等,试验中定期进行生化检验,特别是 NTE 测定,并于试验结束时进行神经组织的病理学检查等。

6 试验方法

6.1 急性迟发性神经毒性试验

6.1.1 实验动物

选用 8 个月~12 个月健康成年母鸡,无用药史、无步态异常,体重 1 500 g~2 000 g。受试样品组和介质对照组每组至少 12 只,阳性对照组至少 6 只。试验前置于试验环境中观察适应 3 d。

6.1.2 饲养条件

单笼饲养,饲养的笼子应足够大,允许母鸡自由行动,并可观察其步态。如果是人工照明,应 12 h 照明,12 h 黑暗,适当饮食,不限制饮水。

6.1.3 试验分组

6.1.3.1 一般设 3 个~4 个剂量组,每一剂量组动物要保证至少有 6 只动物用于生化指标检验,6 只动物用于病理解剖。

6.1.3.2 先求出受试样品对母鸡的急性经口半数致死量(LD₅₀)。

6.1.3.3 剂量范围可在半数致死量和 NOAEL 之间设定,应包括人类实际接触量及其 100 倍剂量。

6.1.3.4 当受试样品剂量达每日 1 000 mg/kg 体重,动物未出现毒性效应,更高的剂量则不予考虑,但当人的实际接触剂量较大时,可考虑适当加大剂量。

6.1.3.5 介质对照组除不给受试样品外,其他与受试样品组完全一致。

6.1.3.6 阳性对照组要保证至少有 6 只母鸡(3 只用于生化检验,3 只用于病理解剖)给予迟发性神经毒性阳性物,如三邻甲苯磷酸酯(tri-o-cresylphosphate, TOCP),剂量为 500 mg/kg 体重。也可采用近期的阳性对照数据。

6.1.4 试验步骤

6.1.4.1 动物准备

试验前动物隔夜禁食,但不限制饮水。

6.1.4.2 受试样品的配制

受试样品采用水溶液、混悬液或油溶液。灌胃量可根据各组不同剂量按 5 mL/kg 体重给予。如采用注射给药,一般按 1 mL/kg 体重给予。

6.1.4.3 染毒

通常采用一次经口灌胃给药,也可采用胶囊或母鸡翅膀下注射给药。

给予受试样品前 10 min~15 min 应大腿肌肉注射硫酸阿托品作保护处理,用量为 10 mg/kg 体重,以对抗急性副交感神经中毒症状,同时肌肉注射解磷定 25 mg/kg 体重,以防止对胆碱酯酶的不可逆抑制。

6.1.5 观察指标

6.1.5.1 临床观察

6.1.5.1.1 给予受试样品后直到 21 d 每天至少观察一次,记录有无行为异常,运动性共济失调,瘫痪等症状。在开始给予受试样品的两天应每天至少观察 3 次~5 次。

6.1.5.1.2 详细记录包括出现中毒症状的时间、程度及持续时间。

6.1.5.1.3 每周至少两次将母鸡拿出笼子强迫活动,以观察有无迟发性神经毒性的最小反应。

6.1.5.1.4 每周测体温一次、称体重一次、记录食量一次。

6.1.5.1.5 出现濒死状态的鸡应立即处死,解剖检查。

6.1.5.1.6 共济失调按以下 5 级进行记录:

- 0 无反应;
- A 腿软、站立姿势和步态稍异常;
- B 步态严重异常,行走时不断跌倒;
- C 能勉强站立,但多以足站立;
- D 不能站立,通过扇动翅膀移动身体。

6.1.5.2 生化检验

给予受试样品 24 h、48 h 后分别从各剂量组和介质对照组中随机选择 3 只母鸡处死,阳性对照组随机选择 3 只母鸡于 24 h 处死,取脑和腰脊髓进行 NTE 测定,如果观察临床症状出现缓慢,可适当延迟测定时间处死动物。必要时可测定这些样品中的乙酰胆碱酯酶(AChE)。所有解剖的动物应仔细观察脑和脊髓的形态学改变情况。

6.1.5.3 病理组织学检查

6.1.5.3.1 观察期结束后将每组剩余的母鸡用空气栓塞法或颈动脉放血法,迅速解剖取材,或用原位灌注固定法处死。

6.1.5.3.2 主要对脑、脊髓及远端周围神经组织进行病理组织学检查:

- 脑:包括延脑、脑桥、小脑及大脑皮质;
- 脊髓:包括颈段、胸段中部及腰骶结合部;
- 周围神经:坐骨神经,胫骨神经及其侧支。

6.1.5.3.3 神经组织切片染色。除常规苏木精伊红(HE)染色外,同时要行髓鞘或轴索等特殊染色。

6.2 亚急性迟发性神经毒性试验

6.2.1 动物

同急性迟发性神经毒性试验(见 6.1.1)。

6.2.2 饲养条件

同急性迟发性神经毒性试验(见 6.1.2)。

6.2.3 试验分组

设 3 个剂量组和 1 个介质对照组。每组应有足够的母鸡数,保证至少有 6 只用做生化检验,6 只于末次给药后继续观察并于试验结束时进行病理形态学观察。

剂量选择应参考急性毒性测试结果和有关资料:

高剂量应引起明显的毒性效应,但不能引起死亡或严重伤害。中剂量应出现极轻微中毒变化。低剂量不应出现任何毒作用。

如果 1 000 mg/kg 体重未产生可观察到的毒性作用,则不必进行更高剂量的测试。但当预期的人接触量高于此剂量时则应加大剂量进行测试。

6.2.4 试验步骤

6.2.4.1 受试样品配制

首选灌胃或胶囊给药。受试样品采用水溶液、混悬液或油溶液。灌胃量可根据各组不同剂量按 5 mL/kg 体重给予。

6.2.4.2 染毒

每日一次经口给药,每周 7 d,连续 28 d,末次给药后继续观察 14 d。

6.2.5 观察指标

6.2.5.1 临床指标

给药期间和观察期间每天至少观察一次,记录有无行为异常,运动性共济失调,瘫痪等症状。具体观察和记录见 6.1.5.1。

6.2.5.2 生化检验

观察期间进行生化检验,分别于末次给药后 24 h 和 48 h 各从每个受试样品组和介质对照组随机选择 3 只母鸡进行 NTE 和 AChE 测定。

6.2.5.3 病理组织学检查

观察期满处死剩余母鸡,每组 6 只解剖取脑、脊髓及远端周围神经组织进行病理组织学检查。见急性迟发性神经毒性试验(见 6.1.5.3)。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

将受试样品组与阳性对照组、介质对照组做比较,进行统计分析,以确认是否有迟发性神经毒作用。

7.2 结果评价

7.2.1 评价内容包括临床神经毒性症状、生化检验和病理检查结果及可观察到的其他毒性效应。对发生率、严重程度及相关性作出评价。

7.2.2 阳性对照组应出现共济失调障碍,病理组织学证实有脱髓鞘改变,介质对照组无上述改变。

7.2.3 出现阳性时,需求得无作用剂量,进一步评价受试样品与神经毒性的反应关系、发生率和严重程度。

7.2.4 评价要列出以下简表,包括:

- a) 一般症状变化,出现神经毒性症状的类型、严重程度,计算出百分率、死亡率、体重变化、摄食量;

- b) 食物利用率: (每周平均增加体重/每周平均进食量) × 100%;
 - 生化检验结果;
 - 病理组织学检查结果及照片。

8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下内容:

- a) 体重的数据;
- b) 各剂量的毒性效应,数据包括死亡情况;临床症状的性质,严重程度和持续时间(无论是否可逆);
- c) 生化检验方法和结果:详细描述;
- d) 尸检结果;
- e) 所有病理组织学检查的详细结果;
- f) 结论。

9 结果解释

迟发性神经毒性试验能够提供受试样品急性或亚急性染毒的迟发性神经毒性作用资料。虽然其试验结果仅能有限地外推到人,但它可为确定人群接触的无作用水平和允许接触水平提供有价值的信息。
