

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ×××××—××××

农药神经毒性试验指南

Guidance on Neurotoxicity Study of Pesticide

(征求意见稿)

xxxx - xx - xx发布

xxxx - xx - xx实施

中华人民共和国农业部

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

农药神经毒性试验指南

1 范围

本标准规定了农药神经毒性试验的术语和定义、基本原则、方法和要求。

2 规范性引用文件

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

GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

毒副作用 **Adverse effect**

任何处理引起的机体生存、生育或环境适应能力的减弱或降低。

3.2

剂量 **Dose**

所给受试物的量, 以实验动物单位体重所接受受试物的质量 (mg/kg 体重) 表示或以染毒用的饲料中受试物的浓度 (ppm) 表示。

3.3

给药量 **Dosage**

由给药剂量、频率和持续时间所组成的术语。

3.4

神经毒性 **Neurotoxicity**

由于接触化学、生物或物理因素而产生的神经系统结构或功能的有害变化。

3.5

神经毒物 **Neurotoxicant**

能够诱发神经毒性的任何化学、生物或物理因素。

3.6

未观察到有害作用剂量水平 **no observed adverse effect level, NOAEL**

在规定的试验条件下, 用现有技术手段和检测指标, 未观察到与染毒有关的有害效应的受试物最高剂量或浓度。

4 试验概述

实验动物分为若干个剂量组，各组动物每天经口染毒一定量的受试物，连续染毒 28d、90d、1 年或更长。本试验方法同样适用于急性神经毒性试验。实验动物将在每个观察周期进行神经行为学检测，试验结束时在每组每性别动物中进行灌流固定，组织病理学检测应包括脑、脊髓以及外周神经等。

当单独进行神经毒性的筛选试验时，不做灌流及组织病理学检查的各组动物（见附录 A）可用于特殊的神经行为、神经病理、神经化学或电生理的检查以补充相关神经毒性资料。

当本试验与其他毒性试验结合进行时，需要有足够动物的数量，以满足两个试验的需要。

5 试验方法

5.1 试验动物

5.1.1 动物品系的选择

实验动物首选大鼠，使用其他种类的啮齿类动物应说明理由。选用常用动物品系的健康青年动物，雌性动物应使用未生育过和未受孕的。一般断乳后即开始染毒，染毒开始时动物不超过 6 周龄。若与其他毒性试验合并进行时，鼠龄的要求可适当调整（一般不迟于 9 周龄）。在试验开始时动物体重变化范围不超过每种性别动物平均体重 $\pm 20\%$ 。当短期重复剂量毒性试验作为长期毒性试验的预试验时，预实验与长期试验要使用同一品系和来源的动物。

5.1.2 数量与性别

每个剂量组或对照组至少 20 只动物（雌雄各半），进行临床观察和行为功能测试。试验结束时每组每性别至少 5 只动物进行灌流，用作神经系统组织病理学检查。当某个剂量组仅个别动物出现神经毒性改变时，必须选取该动物灌流进行组织病理学检查。与重复染毒毒性试验合并进行时，动物数量应满足两个试验需要，各组最少的动物数见附录 A。如果设有中期处死或恢复期组观察毒效应的可恢复性、持久性或迟发性毒性时，应增加动物数量，以确保用于组织病理观察的动物数。

5.1.3 饲养条件

动物饲养条件应符合 GB14925 的有关规定。在染毒前和染毒后，动物按性别及剂量分笼饲养，每笼的动物数以不干扰对每只动物的观察为宜。

5.1.4 实验动物准备

开始染毒前动物饲养观察至少 5 天以适应实验室环境。动物按体重随机分组编号，每只动物单独编号。在开始染毒前，将动物随机分配到各染毒组和对照组中。笼具的安放应尽量减少对试验的影响。

5.2 受试物配制

如果受试物不能使用原液，应优先使用水溶液或水混悬液，其次可考虑油剂（例如玉米油）或油混悬液，最后考虑使用其他溶媒制成溶液或混悬液。溶媒本身应是无毒、不与受试物产生化学反应且不影响受试物的吸收。

5.3 剂量及分组

通常至少选用 3 个染毒剂量组和 1 个对照组。剂量间隔一般组间考虑 2-3 倍（若各剂量组间相差 10 倍以上，需要添加第 4 个染毒剂量组）。高剂量组需引发动物神经毒效应或明显全身系统毒性（对

于吸入或皮肤给药,受试物的理化性质可能限制其最大暴露水平)。低剂量组设为不诱发神经毒效应或全身系统毒性的 NOAEL 值。在高、低剂量之间选取出现轻度神经毒效应或全身系统毒性的中剂量。如果已有毒性资料表明 1000 mg/kg 剂量不会诱发毒效应,可减少剂量组数。对于单次经口染毒,限度试验中剂量水平至少应达到 2000 mg/kg。如果没有合适的参考剂量,可进行剂量探索的预试验,以便确定染毒剂量。对照组动物除不给予受试物处理外,其他处理条件应与染毒组动物相同。如果在染毒时使用赋形剂,赋形剂对照组溶剂体积应该与最高染毒剂量组一致。如溶剂毒性已知,可仅设溶剂对照组,否则应增设空白对照组。

5.4 试验步骤

5.4.1 染毒途径

推荐经口染毒途径,例如:灌胃、拌饲、拌水。也可选择其他染毒途径(例如经皮或吸入染毒),染毒途径的选择取决于人体接触受试物的方式、现有毒理学或毒代动力学资料。

5.4.2 染毒频率与期限

急性神经毒性试验采用单次染毒,若急性毒性试验中单次染毒无法满足染毒剂量需要时,可采用 24h 内多次染毒。

重复染毒试验中,动物应每天染毒,每周染毒 7d,至少连续染毒 28 d。灌胃采用灌胃针或套管每天单次染毒,一次染毒体积原则上不超过 10 ml/kg 体重,水溶液可增大至 20 ml/kg 体重。尽量调节刺激和腐蚀性物质的浓度使染毒量的变动范围最小,保证各剂量组等体积染毒。当受试物拌饲或拌水染毒时,受试物的含量不能干扰动物正常饮食。采用饲料恒定的受试物浓度(ppm)或以动物体重为单位的一致剂量进行染毒;如采用其他剂量单位的染毒方法时应加以说明。

5.4.3 观察频率与期限

急性神经毒性试验染毒后连续观察 14 d。重复染毒试验中,整个染毒期间均需进行观察。

在染毒后出现预期毒效应的高峰期进行观察,且每天在同一时间范围内进行观察。临床观察和功能测试的频率见附录 B。当实际试验中需要有不同时间点的观察、测试或采用不同的染毒观察时间,允许改变观察时间表并说明理由。

一般健康情况检查每天至少 1 次,对于发病或濒死动物,每天至少检查 2 次。

5.4.4 详细临床观察

首次染毒前,应对所有试验动物进行详细临床观察(见附录 A),并根据试验周期(见附录 B)按不同时间间隔进行观察。

详细临床观察应在动物笼外操作台上进行,每天在同一时间进行。详细记录所观察到的改变,按照实验室制定的统一标准对各指标进行打分。应按照盲法操作,避免系统误差。

观察的指标应包括但不限于以下方面的改变:皮肤、被毛、眼睛、粘膜、口鼻分泌物情况、尿粪排泄情况、自主神经活动(如:流泪、竖毛、瞳孔大小、呼吸类型异常及尿粪排泄异常和尿液颜色异常)。也应观察记录体位姿势的异常改变,如:活动量(旷场地内探索反应的增加或减少)及运动的协调性、步态变化(如步态蹒跚、共济失调)、姿势(如弓形背)、对抓取或外来刺激的反应状况、阵挛性或强直性活动、抽搐或震颤、刻板运动(如过度梳理、头部异常活动及重复的转圈活动)或行为异常(如咬啃或过度舔、自残、后退、异常发声)或攻击行为。可通过动物的功能组合试验(Functional observational battery,FOB)进行观察(见附录 C)。

5.4.5 功能测试

功能测试与详细临床观察频率一致,染毒前需测试1次(见附录A)。除了附录A所述的观察周期外,也应在处死前对观察恢复期的动物进行同样的功能测试。

功能测试项目应包括:运动功能(常用试验方法有:自发行为测试、肢体抓力、转棒协调试验、步态分析试验),对不同刺激(如听觉、视觉和本体感受器的刺激)的感觉反应(常用试验方法有:甩尾试验、眼刺激试验、躯体感觉测试等)。如果有其他资料(如构效关系、流行病学资料及其他毒理学研究资料)提示受试物存在潜在神经毒性效应,应考虑追加感觉和运动功能或学习记忆测试(主动回避试验、被动回避试验、位置偏爱试验、Morris水迷宫试验等)。

对于出现毒性表现但干扰功能测试结果的动物可以不进行上述测试,但需说明理由。

5.4.6 体重、摄食量及饮水量测定

急性神经毒性试验应分别在染毒前、染毒后(每周一次)和处死前称量并记录体重。

在染毒周期不长于90d(包括90d)的毒性试验中应对全部动物至少每周称量体重1次,同时至少每周测定食物消耗量(当受试物掺入饮水中染毒时,也应测定饮水量)1次。对于染毒周期长于90d的毒性试验,前13周至少每周对全部动物称量体重1次,以后至少每4周称体重1次。对于摄食量(当受试物掺入饮水中染毒时,也应测定饮水量),前13周至少每周测定1次,以后至少每4周测定1次。当动物健康状况出现异常或体重出现变化时,可增加测量频率。

5.4.7 眼科检查

对于染毒周期28d以上的毒性试验,在给予受试物前及试验结束时,需利用眼底镜对高剂量组和对照组动物行眼科检查。若检出眼睛异常或临床症状提示有眼科变化时,应对全部动物进行眼科学检查。在长期试验中,眼科检查时间点还应包括给药后第13周。如果有相同试验期限和相同剂量的试验资料可提供相关信息,可免做眼科检查。

5.4.8 血液和临床生化检查

当神经毒性试验与其他重复染毒的毒性试验合并一起进行时,应参考全身毒性试验的有关准则进行血液和临床生化测定。采集动物血液样品时,应尽量将操作对神经行为潜在的影响降至最小。

5.4.9 组织病理学检查

急性神经毒性试验所有的试验动物应进行大体解剖。试验过程中因濒死而安乐死的动物、死亡动物应及时进行大体解剖,其他动物在观察期结束后安乐死并进行大体解剖。当组织器官出现体积、颜色、质地等改变时,应进行组织病理学检查。

当神经毒性试验与其他重复染毒试验合并进行时,组织病理学检查是重复染毒试验结果的补充和延伸。除了记录肉眼所见任何变化,需至少取5只动物/性别/组(见附录A),采用灌流固定,对全部组织标本进行石蜡包埋,作常规H.E染色后进行镜检。当临床表现提示其他受检部位可能存在病变时,需作特殊染色检查,用特殊染色法显示该类型病理变化。如神经毒性试验单独用于神经毒性筛选或对神经毒性作用进行定性,则剩余动物可进行特定的神经行为、神经病理、神经生化或电生理检测。如常规观察项目或预期出现的效应提示特异性神经毒性或其靶器官时,剩余动物应用于增加组织病理学检查的动物数。

中枢神经和周围神经系统需进行组织学检查(H.E染色)。受检器官包括:前脑、大脑中央(需含海马)、中脑、小脑、桥脑、延髓、眼球(含视神经和视网膜纤维)、脊髓的颈膨大和腰膨大部分、背根神经节、背侧和腹侧神经根纤维、坐骨神经近端、胫神经近端(膝关节)及胫神经的腓肠肌分支。脊髓和周围神经取材应包括横切面、纵切面。应注意检查神经组织附近的血管和骨骼肌,特别是腓肠肌。同时要关注神经毒物易侵犯的中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)的细胞和纤维结构部位。

组织标本检查可从高剂量组开始,如果与对照组相比高剂量组标本中未见到神经病理变化,不需要进行中、低剂量组的检查分析。否则需对所有可能受影响的各个标本切片进行依次检查。

如定性检查中发现神经病理变化,则须对出现上述变化的神经系统的所有部位进行检查。应对各剂量组的各个可能受影响部位的标本切片进行编号,并在未知编号的情况下作随机检查。记录各个病变的检出频率和严重程度,并进行统计分析来评价剂量-反应关系。最后应对各种病变的不同严重程度加以描述。

结合行为观察和功能测试结果,并参考已有的或同时进行的受试物全身毒性研究结果对神经病理结果进行评价。

6 试验数据和报告

6.1 数据

应给出每只动物的个体数据。以表格形式汇总所有的实验数据,包括:每组的动物数、试验期间死亡的或安乐死的动物数及每只动物的死亡时间、出现毒性反应的动物数,描述毒性作用的出现和持续时间、类型及其严重程度,并叙述出现病变的动物数,包括病变的类型及其严重程度。

6.2 结果评价

综合考虑毒性作用的发生率、严重程度、神经行为与神经毒效应(包括神经生化或电生理效应以及补充检查的结果)和所见的其他任何有害效应的试验结果,评价受试物染毒的神经毒性。用合适的统计学方法进行分析评价。统计分析方法应在试验设计期间确定。

6.3 试验报告

试验报告应包括下述内容:

6.3.1 受试物:

- a) 物理性状、纯度以及相关的理化性质(包括异构体);
- b) 质量检验报告

6.3.2 溶剂

说明需要使用溶剂的理由。

6.3.3 试验动物

- a) 动物的种属、品系;
- b) 动物的洁净程度等级;
- c) 动物的数量、周龄和性别;
- d) 动物来源、饲养条件、适应期、饲料等;
- e) 试验开始时每只动物的体重。

6.3.4 试验条件

- a) 详述受试物的制剂/饲料制备、所达到的浓度、稳定性及均一性;
- b) 对染毒剂量的说明,包括溶剂及其给药容量,受试物的理化性质;
- c) 受试物的给药过程;

- d) 选择剂量水平的理由;
- e) 染毒途径及染毒期限的选择理由;
- f) 拌饲或拌水染毒需说明受试物在饲料或饮水中的浓度 (ppm), 如有可能换算成实际剂量 (mg/kg 体重/d) ;
- g) 详述饲料和饮水的质量。

6.3.5 观察与测试步骤

- a) 详述各组动物进行灌注分组的情况;
- b) 详述记分系统, 包括每个临床观察指标的标准和评分量表;
- c) 详述对不同刺激 (例如听觉、视觉和本体感觉) 引起感觉反应的功能测试; 肢体的抓力强度, 运动活动的评价 (包括检测活动的自动化设备) 以及所使用的其他测试方法;
- d) 详述眼科检查、血液检查、临床检查, 标明血液检查、临床检查及其相关的基础值;
- e) 详述特异神经行为、神经病理、神经生化或电生理的测试方法。

6.3.6 结果

- a) 体重及体重变化, 包括处死时的体重;
- b) 食物和饮水的消耗量;
- c) 毒性反应结果, 包括毒性表现或死亡率, 按动物性别和剂量水平描述;
- d) 临床症状 (包括可逆的或不可逆的) 的性质、严重程度和持续时间 (发病和病程) ;
- e) 详述各个功能测试的结果;
- f) 大体解剖及组织病理学检查的结果;
- g) 详述神经行为、神经病理、神经化学或电生理检查的全部结果 (如有) ;
- h) 吸收和代谢资料 (如有) ;
- i) 结果的统计处理。

6.3.7 结果讨论

- a) 剂量-反应资料;
- b) 受试物其他毒性作用与神经毒性的关系;
- c) NOAEL 值。

6.3.8 结论

对受试物的神经毒性作用进行全面评价。

附录 A
(规范性附录)

神经毒性试验独立进行或与其他研究联合进行时每组所需最少动物数

A.1 神经毒性试验独立进行或与其他研究联合进行时每组所需最少动物数, 见表 A.1。

表A.1 神经毒性试验独立进行或与其他研究联合进行时每组所需最少动物数

	神经毒性试验种类			
	单独进行 的试验	与 28 天试验结 合的试验	与 90 天试验结 合的试验	与慢性毒性试验 结合的试验
每组的动物总数	雌、雄各 10 只	雌、雄各 10 只	雌、雄各 15 只	雌、雄各 25 只
用于详细临床观察 与功能测试的动物 数	雌、雄各 10 只	雌、雄各 10 只	雌、雄各 10 只	雌、雄各 5 只
重复染毒/亚慢性/慢 性毒性试验时的临 床观察、血液、临床 生化、病理组织检查 等使用的最低动物 数, 参照各项相应准 则的要求。		雌、雄各 5 只	雌、雄各 10 只 [*]	雌、雄各 20 只 [*]
用于合适的增 补观察	雌、雄各 5 只			

*包括作为神经毒性研究部分的功能测试和详细临床观察所需的 5 只动物。

附录 B
(规范性附录)
临床观察和功能测试的频率

B.1 临床观察和功能测试的频率, 见表 B.1。

表 B.1 临床观察和功能测试的频率表

观察类型	试验期限			
	急性	28 天	90 天	慢性
全部动物	一般健康状况	每天	每天	每天
	死亡/发病	每天 2 次	每天 2 次	每天 2 次
详细的临床观察		首次观察前, 估计出现明显效应时染毒后的 8 小时内	首次观察前, 以后每周 1 次	首次观察前, 染毒第 1 个月末 1 次
		染毒后 7 天和 14 天各 1 次	染毒第 1 周或第 2 周内各 1 次	每 3 个月 1 次
功能测试的动物			染毒后每月 1 次	
	功能测试	首次染毒前, 在估算出现明显效应期内染毒的 8 小时内, 染毒后 7 天和 14 天各 1 次	首次染毒前, 在临近染毒结束期的染毒第 4 周期间	首次染毒前, 染毒第 1 个月末 1 次
			染毒第 1 周或第 2 周时 1 次	以后每 3 个月 1 次

附录 C
(规范性附录)
功能组合试验常用观察指标

C.1 功能组合试验常用观察指标, 见表C.1。

表C.1 功能组合试验常用观察指标

指标分类	具体观察指标
笼内观察	饮水、进食、睡眠、清醒、运动、竖毛、理毛、发生、攻击同类
开放观察	步态、自主活动排便、排尿、兴奋、跳跃、扭体、直立、抽搐、流泪、尾巴体位
手持观察	心率、身体张力、腹部张力、肢体张力、眼睑反射、泪液分泌
操作性观察	翻正反射、瞳孔反射、声音反射、夹尾反应、视觉定位、抓握、体温