



中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准 神经发育毒性试验

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

食品安全国家标准

神经发育毒性试验

1 范围

本标准规定了神经发育毒性的基本试验方法和技术要求。
本标准适用于评价受试物的神经发育毒性作用。

2 术语和定义

2.1 神经发育毒性

个体在发育过程中暴露于受试物后引起的神经系统结构和功能的异常改变，这种改变可以发生在生命周期的任何阶段。

2.2 母体毒性

受试物引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应，表现为增重减少、功能异常、中毒体征，甚至死亡等。

2.3 未观察到有害作用剂量（NOAEL）

通过动物试验，以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物有关的毒性作用的最大剂量。

2.4 最小观察到有害作用剂量（LOAEL）

在规定的条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

3 试验目的和原理

神经发育毒性试验用于评价亲代雌性（F0 代）在妊娠期和哺乳期暴露于受试物导致子代（F1 代）发育过程中出现的神经系统结构和/或功能的异常改变。该试验可评价受试物对 F1 代动物神经系统发育过程中功能和/或形态学的潜在影响，确定受试物是否具有神经发育毒性及其 NOAEL 和/或 LOAEL。

4 仪器和试剂

4.1 仪器/器械

大鼠跳台仪、大鼠避暗仪、大鼠穿梭箱、大鼠 Morris 水迷宫、音叉、天平、前肢悬挂仪、热板仪、大鼠跑步机、翻正反射仪、实验室常用解剖器械、电子天平、生物显微镜、检眼镜、血生化分析仪、血液分析仪、凝血分析仪、尿液分析仪、离心机、病理切片机等。

4.2 试剂

甲醛、二甲苯、乙醇、苏木素、伊红、石蜡、血球分析仪稀释剂、血生化分析试剂、凝血分析试剂、尿液分析试剂（或试纸）等。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应尽量使用原始样品，若不能使用原始样品，应按照《受试物试用前处理方法》（GB 15193.21）对受试物进行适当处理。

5.2 实验动物

5.2.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB14922 的有关规定。选择已有资料证明对受试物敏感的动物，一般首选啮齿类动物大鼠，避免选用生殖率低或发育缺陷发生率高的品系。本标准中的妊娠和哺乳天数均指常用品系大鼠，如使用其它种属动物，应当选用相对应的天数，并根据相应的毒理学、毒代动力学和/或其它资料说明其合理性。实验动物应标明动物种属、品系、来源、实验动物的微生物级别、性别、体重和周龄。

5.2.2 动物数量和性别

为了获得满足统计学要求的基本试验数据，正确地评价受试物对动物神经发育过程的毒性作用，需保证每个剂量组和对照组均至少获得20窝F1代动物。出生后（Postnatal Days, PND）4 天内（出生当日为PND 0），进行窝标准化，按照随机原则剔除每窝多余F1代动物，使每窝F1代动物数量尽可能一致，且不应超过所选动物品系每窝F1代动物数量的平均数（8~12只）。每窝F1代雌性和雄性动物数量尽可能一致。不能选择性地剔除F1代动物，如不能按照体重的大小剔除F1代动物。正式试验前，应确定哪些F1代动物用于断乳前试验，哪些用于断乳后试验。

5.2.3 动物准备

使用健康、未被使用过的实验动物（合并试验除外）。试验前，动物在实验动物房至少应进行 3~5 天的环境适应和检疫观察。实验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ ，且体重应在该动物品系的正常值范围内。如购买的是妊娠动物，应保证其适应 2~3 天。与同只雄性交配的孕鼠尽可能平均分配到各组，每一只动物进行唯一性标识。

5.2.4 动物饲养环境

实验动物饲养条件、饮水和饲料应符合 GB 14925、GB 14924 的有关规定。实验动物自由进食、饮水。交配应在适宜的笼具中进行，动物交配成功后，于妊娠期 15 天内转移至分娩笼或孕鼠笼单独喂养，合理摆放笼具以减少位置影响。为临近分娩的孕体提供适当可筑窝的材料。动物孕期内必须谨慎小心处置，避免流产，并减少噪声等外界因素刺激。

5.3 剂量及分组

试验至少设三个剂量组和一个对照组。在受试物的理化和生物特性允许的条件下，最高剂量应能够诱导出一些母体毒性，如临床体征、体重增重下降（不超过 10 %）和/或靶器官毒性出现剂量—反应关系等，但不引起动物死亡；中间剂量可引起轻微的毒性反应；低剂量应不引起任何毒性反应。剂量组间距以 2~4 倍为宜。如需增设第四个剂量组，可选择较大的组间距（如 >10 倍）。

5.4 受试物给予

根据受试物的特性或试验目的，可将受试物掺入饲料、饮水或灌胃给予实验动物。试验期间，所有动物应采用相同的方式给予受试物。

5.4.1 掺入饲料或水

受试物掺入饲料或饮水给予时，要将受试物与饲料（或饮水）充分混匀并保证该受试物配制的稳定性和均一性，以不影响动物摄食、营养平衡和饮水量为原则。受试物掺入饲料比例一般不超过质量

分数 5 %，最大不应超过 10 %。若超过 5 %、且受试物无热量或营养成分，对照组饲料应添加甲基纤维素等，掺入量与高剂量组相同，使其与剂量组饲料的营养素水平保持一致；也可根据受试物热量或营养成分的状况调整剂量组饲料的营养素水平，使其与对照组饲料的营养素水平保持一致。受试物剂量单位是每千克体重所摄入受试物毫克数或克数，即 mg/kg 体重或 g/kg 体重。当受试物掺入饲料时，其剂量单位亦可表示为 mg/kg 饲料或 g/kg 饲料，掺入饮水则表示为 mg/mL 水。当受试物掺入饲料或掺入饮水给予，要记录动物的摄食量和饮水量，实验结束时根据摄食量和饮水量计算受试物的实际剂量。

5.4.2 灌胃给予

受试物以灌胃方式给予时，要将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中。建议优先考虑使用水溶液或悬浮液，其次考虑使用植物油（如橄榄油、玉米油等）溶液或悬浮液，不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。溶媒或为增强受试物溶解性添加的助溶媒应考虑以下几点：是否影响受试物的吸收、分布、代谢和蓄积；是否影响受试物的化学特性，以致改变其毒性特征；是否影响动物对食物和水的消耗量及营养水平。另外，除水外必须清楚溶媒的毒性特征，避免使用本身具有潜在毒性的溶媒（如丙酮、二甲基亚砷）。受试物应现用现配，有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

受试物以灌胃方式给予，如溶媒为水时，灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重，最大灌胃体积不超过 20 mL/kg 体重；如为油性液体，灌胃体积应不超过 4 mL/kg 体重；各组动物灌胃体积应一致。每日应在同一时间灌胃，实验动物每周至少称重 2 次，根据体重调整灌胃体积。在分娩当天建议不对母体进行灌胃或其它处理。

5.5 试验方法

选用初成年期（PND 60~70）未孕雌性、雄性大鼠作为 F0 代，避免发生近亲（同窝）交配。查见雌鼠阴栓和/或阴道涂片发现精子的当日确定为孕期（Gestation Days, GD）第 0 天。F0 代动物从受孕着床（GD 6）到整个哺乳期（PND 21），每日按设计染毒量给予其受试物。F1 代断乳后，可对 F0 代雌性大鼠进行大体解剖和脏器系数的检测。根据检测目的将雌、雄仔鼠分配至各评价队列中，各队列的检测时间、用于检测的仔鼠数量及检测指标等有下列三种方案，可选择其中一种方案。各方案见表 1、表 2、表 3。

表 1 每窝 F1 代动物的分组和检测指标（方案一）

同窝仔鼠编号 ^a		用于检测的仔鼠数量	检测指标
雌	雄		
1	5	40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	个体行为发育 PND 22 脑重量/神经病理/形态学 PND 22 脑重量
2	6	40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	临床观察 运动能力 性成熟 感觉运动功能 PND 25 学习记忆 PND 70 脑重量/神经病理/形态学
3	7	40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	PND 70 学习记忆 PND 70 脑重量
4	8	--	用于替换试验中出现问题或其它附加试验保留的动物

注：a 此例中每窝剔除后保留 4 只雌性和 4 只雄性仔鼠；雌性仔鼠编号 1~4；雄性仔鼠编号 5~8。

表 2 每窝 F1 代动物的分组和检测指标（方案二）

同窝仔鼠编号 ^a	用于检测的仔鼠数量	检测指标
---------------------	-----------	------

雌	雄		
1	5	40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	个体行为发育 PND 11 脑重量/神经病理/形态学
2	6	40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	临床观察 运动能力 性成熟 感觉运动功能 PND 70 脑重量/神经病理/形态学
3	7	20 只（10 雌+10 雄） ^b	PND 23 学习记忆
3	7	20 只（10 雌+10 雄） ^b 20 只（10 雌+10 雄） ^b	PND 70 学习记忆 PND 70 脑重量
4	8	--	PND 21 处死

注：a 此例中每窝剔除后保留 4 只雌性和 4 只雄性仔鼠；雌性仔鼠编号 1~4；雄性仔鼠编号 5~8。
b PND 23 和 PND 70 选择不同窝仔鼠进行学习记忆测试（例如，根据奇偶数窝选择仔鼠进行学习记忆测试）。

表 3 每窝 F1 代动物的分组和检测指标（方案三）

同窝仔鼠编号 ^a		用于检测的仔鼠数量	检测指标
雌	雄		
1	5	20 只（10 雌+10 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	PND 11 脑重量/神经病理/形态学 PND 11 脑重量
2	6	40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄）	个体行为发育 运动能力 性成熟 PND 27 学习记忆
3	7	40 只（20 雌+20 雄） 40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	PND 23~25、PND 60~70 听觉惊吓反应 临床观察 PND 70 脑重量/神经病理学/形态学
4	8	40 只（20 雌+20 雄） 20 只（10 雌+10 雄）	PND 70 学习记忆 PND 70 脑重量

注：a 此例中每窝剔除后保留 4 只雌性和 4 只雄性仔鼠；雌性仔鼠编号 1~4；雄性仔鼠编号 5~8。

6 观察指标

6.1 F0 代和 F1 代动物观察指标

6.1.1 F0 代动物临床观察

所有 F0 代动物的健康状况至少每天观察一次，包括发病和死亡情况。除此之外，在受试物给与期和观察期应定期进行详细的临床观察（妊娠受试物给与期和哺乳受试物给与期至少分别观察两次），每个剂量组至少观察 10 只妊娠和哺乳期动物。盲法观察动物，减少动物应激与观测偏倚。同项研究做到专人专项。观察记录中毒体征。体征包括：被毛、皮肤、眼球、黏膜、分泌物，以及自主神经活动变化（如流泪、毛发直立、呼吸异常如张嘴呼吸、瞳孔大小异常和排便排尿异常等）。观察记录其它体位、活动水平（如探索活动改变）和运动协调等异常反应。记录异常步态（如步态蹒跚、共济失调）、姿势（如弓形背）、对触摸或环境变化的反应、痉挛或强直性运动、抽搐、震颤、呆滞、怪异行为（如啃咬、过度梳理毛发、头部异常活动、重复转圈、自残、后退和怪叫）或攻击性行为等。记录中毒体征的起始日期、时间、程度和持续时间。

在临近分娩或分娩当日以及断乳（PND 21）时应记录 F0 代动物体重。在妊娠期和哺乳期，记录每周的饲料消耗量。通过饮水受试物给与的 F0 代动物每周记录饮水量。记录 F0 代动物体重变化，染毒期每周至少记录体重一次。

6.1.2 F1 代动物临床观察

所有 F1 代动物的健康状况至少每天观察一次，包括发病和死亡情况。在受试物给与期和观察

期，应对 F1 代动物进行详细的临床观察，观察及记录要求同 5.1.1。

6.2 F1 代动物体格发育指标

根据表 4 记录体重，观察发育指标变化。根据预期效果和前期测量结果，可在其它发育期多次测量 F1 代动物体格发育指标。断乳后两天内不做测试，相关指标可提前检测。

表 4 体格发育和神经行为检测频率和时间点

检测终点 \ 年龄阶段	断乳前 (PND < 21)	青春期 (PND 22~30)	初成年期 (PND 60~70)
身体发育指标			
体重和临床观察	每周	每两周	每两周
脑重	PND 11-22		试验结束
神经病理、其它组织脏器 毒性	PND 22		试验结束
性成熟	—	每日观察 记录确切日期	—
其它发育指标	每日观察 记录确切日期	—	—
神经行为终点			
个体行为发育	2 次		
运动能力	2 次		1 次
运动和感觉功能		1 次	1 次
学习和记忆		1 次	1 次

记录 F1 代动物存活数量；根据肛门与生殖器间距区分性别；F1 代动物于出生时或出生后不久逐一称量体重；以阴道开放或包皮分离情况评估性成熟，确定周龄并记录体重。

6.3 F1 代动物个体行为发育

F1 代动物发育至一定周龄后每窝每性别至少选取 1 只动物进行个体行为发育测试，测试始终使用同一只 F1 代动物，不同指标的测试间隔时间一致。评价个体行为发育的方法包括：平面翻正反射、负趋地性和运动能力。

6.4 F1 代动物运动能力

断乳前和初成年期（PND 60~70）对 F1 代动物进行运动能力观察。断乳时运动能力试验原则参见 5.2 节第一段。始终使用同一只 F1 代动物评价个体运动能力发育。可在 3 个或更多时间段（如 PND 13、PND 17 和 PND 21）对 F1 代动物进行测试，以全面评价 F1 代动物运动能力。在初成年期试验结束前，选择同一只或同窝动物测试运动能力，必要时增加测试天数。选择能准确检测动物活动情况的自主活动记录仪。减少周围环境对动物的干扰，能够干扰行为测试（包括运动能力）的因素包括：噪声、温度、笼具大小和形状、相对湿度、光线、气味、饲养笼和测试笼的使用以及环境对注意力的干扰。

6.5 F1 代动物运动和感觉功能

F1 代动物在青春期和初成年期至少分别进行 1 次运动和感觉功能测试。断乳时运动和感觉功能试验原则参见 5.2 节第一段。根据所选择方案（表 1 或表 2 或表 3）对样本量的要求测试感觉功能（躯体感觉和前庭功能）和运动功能（力量和协调性）。运动与感觉测试方法包括：后肢撑力、翻正反射、听觉惊吓反应。要以足够的样本量进行充分的感覺功能（躯体感觉和前庭功能）和运动功能（力量和协

调性)测试。

6.6 F1 代动物学习和记忆测试

F1 代动物在断乳后 (PND 22~30) 和初成年期开展学习和记忆测试。断乳时学习和记忆测试原则参见 5.2 节第一段。这两个发育时期的测试方法可以相同也可以不同。测试设计应符合以下两个准则: 第一, 在多个阶段, 选择可多次重复测量的方法, 能够反映出学习和记忆能力的提高; 第二, 试验应包含对大鼠记忆 (短期或长期) 能力测试, 记忆和学习能力测试要联合进行。必要时可考虑附加试验, 以排除基于动物感觉、动机和运动能力变化所引起的干扰。除上述两准则外, 可参考同类受试物学习和记忆测试的试验方法。符合上述两项准则的试验包括: 避暗试验、Morris 水迷宫、跳台实验、穿梭箱实验 (双向回避实验) 等。

7 病理学检查

7.1 大体解剖

F1 代动物断乳后, 处死 F0 代动物。PND 22 或 PND 11 至 PND 22 之间较早时间点或试验结束时, 评估 F1 代动物的神经病理学和 PND 22 动物的脑组织病理学。试验结束时 (PND 60~70), 评估动物的中枢神经系统 (CNS) 和周围神经系统 (PNS) 组织病理学。PND 22 及以下的 F1 代动物经灌注固定后取材, 或处死动物后取材浸泡固定。试验结束时, F1 代 (PND 60~70) 经灌注固定后取材。采取均衡设计原则准备动物组织样本 (如对动物进行灌注固定、大体解剖、标本处理以及染色等), 保证每个批次的操作都含有来自各个剂量组的代表性样品。

7.2 F1 代动物组织样品处理

组织样本需包括神经系统主要区域。取材过程遵从病理学取材标准, 组织标本浸泡于固定液中, 标本固定时长要一致。CNS 和 PNS 组织包埋的最常见方法是石蜡包埋。使用含银环氧树脂包埋 (如当外周神经组织有可疑病变需要进行形态学分析时) 可使样本在高分辨率镜下观察更清晰。

7.3 F1 代动物神经病理学检查

对脑组织进行病理学检查, 包括定性检查和定量检查。

定性检查目的:

- 鉴别神经系统出现病理学变化的部位和区域。
- 鉴别受试物引起神经病变的类型。
- 确定神经病理学变化的严重程度。

方法: 选取代表性神经组织病理切片, 用于判断神经组织病变损伤程度。PND 22 或更早 F1 代动物脑组织切片可用苏木精和伊红染色。对特定脑区开展形态学 (定量) 评估以及体视学评估: 形态学评估包括对特定脑区的线性或区域测量。体视学评估可通过诸如神经解剖特定区域的体积或细胞数量等参数确定处理相关的毒性效应。

脑组织取材的主要部位有: 嗅球、大脑皮层、海马、基底神经节、丘脑、下丘脑、中脑 (顶盖、脚盖和大脑脚)、脑桥、延髓和小脑。脊髓和外周神经组织取材须包括: 带有视神经及视网膜的眼球、脊髓膨大处 (颈、腰)、背侧和腹侧神经根、近端坐骨神经、胫神经近端 (膝部) 和胫神经腓肠肌分支。脊髓和外周神经组织切片包括: 横向切片和纵向切片。神经病理学评价包括: 细胞形态改变 (神经细胞空泡、退行性改变和坏死)、组织学变化 (胶质增生, 白细胞浸润, 囊性形成) 和神经发育损伤指征的检查。神经发育过程中毒性病理学改变包括 (但不限于) 以下情况:

- 嗅球、大脑或小脑总体尺寸或形状的改变。
- 脑部各个区域相对尺寸的改变, 包括由于正常流动细胞群的丢失、停留、轴突投射 (例如, 小

脑的外胚层、腭胝体)造成的区域尺寸减小或增大。

c) 增殖、迁移和分化的改变,如:出现过度凋亡或坏死的神经元,神经元聚集和分布异常,来源不清和分化异常的神经元,大脑各层结构相对大小的改变。

d) 髓鞘外形改变,包括髓鞘总体尺寸变小或髓鞘结构变化。

e) 脑积水的迹象、特别是脑室增大、中脑水管狭窄和大脑半球萎缩。

7.4 F1 代动物神经病理学改变的剂量-反应关系分析

神经病理学的定性和定量分析步骤如下:

a) 高剂量组与对照组相比较,如果高剂量组的动物未出现神经病理学改变,则无需进行下一步分析。

b) 如果高剂量组的动物出现神经病理学改变,则中剂量组和低剂量组的动物需进一步做神经病理学检查。

c) 如果高剂量组的动物由于其它因素造成试验终止,则对高、中剂量组动物进行神经病理学检查。

d) 如果在定性和定量检查中出现任何与受试物相关的神经病理学改变,则应根据所有剂量组全部动物的评价,确定损伤或形态学改变频率和严重程度,以及剂量-反应关系。记录并评价的内容包括脑部所有区域出现的神经病理学的改变。确定损伤类型的严重程度,区分各等级的特征,并进行统计学分析,评价剂量-反应关系。

8 数据处理和结果评价

8.1 数据处理

将所有的数据和结果以表格形式进行总结,表中应显示受孕的雌性动物数、各性别 F1 代动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。

8.2 结果评价

神经发育毒性试验用于评价妊娠期宫内和产后、在神经发育早期重复暴露受试物产生的神经发育毒性效应。一般毒性和神经发育毒性终点是本试验的重点,可能出现两种试验结果,即: F1 代动物神经发育毒性效应与母体一般毒性同时发生,或各剂量组 F1 代动物发生神经发育毒性效应时母体不发生一般毒性。与神经发育毒性评价相关试验得出的所有数据,包括人群流行病学调查、病例报告和动物试验研究(毒代动力学数据、结构-活性信息和其它毒性研究的数据)应全部纳入毒性特征描述。统计分析应最大程度减少 I 类错误(假阳性)和 II 类错误(假阴性)。

9 试验报告

试验报告应包括以下信息:

9.1 试验名称、试验单位名称、联系方式、报告编号。

9.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

9.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。

9.4 试验摘要。

9.5 受试物:名称、批号、剂型、状态(包括感官、性状、包装完整性、标识)、数量、前处理方法、溶媒。

9.6 实验动物:物种、品系、性别、周龄、级别、数量、体重、来源(供应商名称、实验动物生产许可证号)、动物检疫、适应情况、饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号)、饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。

9.7 试验方法：试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限，受试物体积、物理形态、最终浓度、稳定性和均一性、溶媒，观察指标、实验仪器、统计方法。

9.8 试验结果（分列和汇总，若适用则列出均值和标准差）：

- a) 试验开始和结束时动物数；
- b) 每项测试方法所用动物数和窝数；
- c) 动物和出生后动物识别号码；
- d) 窝大小和各性别平均体重；
- e) 动物体重和体重变化，包括 F0 代和 F1 代动物终体重；
- f) 饲料摄食量、饮水量（通过饮水方式染毒）；
- g) 各剂量组不同性别动物的毒性反应，包括：中毒体征和死亡，死亡包括时间和死因；
- h) 中毒体征、严重程度、开始时间、持续时间和后续结果；
- i) 时间点对应的各项发育测试（体重、性成熟和个体行为测试）结果；
- j) 不同性别动物的行为、功能、神经病理测试结果；
- k) 大体病理变化；
- l) 脑重量；
- m) 神经体征和损伤诊断，包括自然发生的疾病或状态；
- n) 标本研究结果图片；
- o) 形态计量法评估切片同源性的低分辨率图片；
- p) 吸收和代谢数据，包括单独代谢动力学试验补充数据（如果有）；
- q) 数据的统计处理，包括数据分析的统计模型和结果，无论结果是否有统计学意义。

9.9 试验结论：

根据数据结果给出受试物是否能够引起神经发育毒性的结论，以及受试物的 NOAEL 和/或 LOAEL 及其依据。
