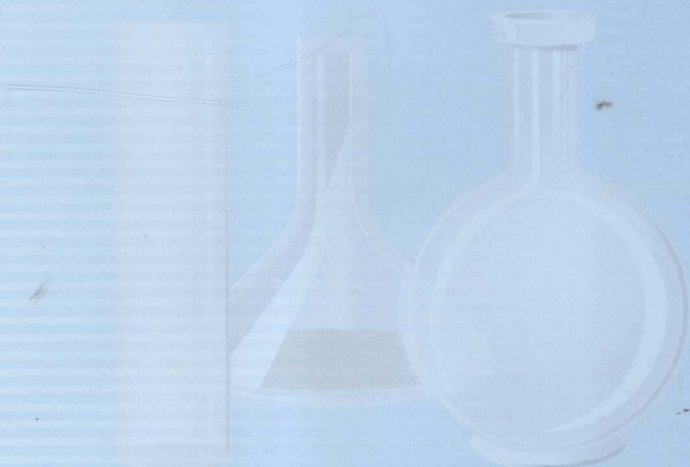


兽医常见 毒物检验技术

SHOUYI CHANGJIAN DUWU JIANYAN JISHU

路浩 主编



西北农林科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

兽医常见毒物检验技术 / 路浩主编. —杨凌:西北农林科技大学出版社,2010.5
ISBN 978-7-81092-613-3

I. ①兽… II. ①路… III. ①兽医学—毒物—医学检验 IV. ①S859.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 151434 号

兽 医 常 见 毒 物 检 验 技 术

主 编 路 浩

出版发行 西北农林科技大学出版社

地 址 陕西杨凌杨武路 3 号 邮 编: 712100

电 话 总编室: 029—87093105 发行部: 87093302

电子邮箱 press0809@163.com

印 刷 陕西龙源印务有限公司

版 次 2010 年 10 月第 1 版

印 次 2010 年 10 月第 1 次

开 本 787 mm×1092 mm 1/16

印 张 13

字 数 299 千字

ISBN 978-7-81092-613-3

定价: 22.00 元

本书如有印装质量问题, 请与本社联系

编写委员会

主 编：路 浩(西北农林科技大学)

编 者：(按姓氏笔画排列)

马小军(甘肃农业大学)

王庆华(西南大学)

王 林(山东农业大学)

达剑森(江苏省扬州市邗江区畜牧兽医站)

刘学忠(扬州大学)

刘俊栋(江苏畜牧兽医职业技术学院)

李 蓉(西北农林科技大学)

李勤凡(西北农林科技大学)

吴培福(西南林业大学)

何生虎(宁夏大学)

何高明(石河子大学)

卓丽琳(枣庄学院)

贺秀媛(河南农业大学)

姜国均(河北农业大学)

胡俊杰(甘肃农业大学)

莫重辉(青海大学)

倪小敏(青海大学)

耿果霞(西北农林科技大学)

顾建红(扬州大学)

曹随忠(四川农业大学)

路 浩(西北农林科技大学)

董 强(西北农林科技大学)

鞠辉明(扬州大学)

主 审：(按姓氏笔画排列)

王建华(西北农林科技大学)

刘宗平(扬州大学)

赵宝玉(西北农林科技大学)

前 言

动物中毒病学是临床兽医学学科的重要组成部分。随着我国畜牧业生产向集约化和产业化发展,动物中毒病已成为危害动物健康的主要疾病之一,给养殖业造成的损失也越来越受到人们的关注,并直接影响动物源性食品的质量和安。近年来,我国毒理学工作者在饲料、有毒植物、农药、重金属、霉菌毒素等方面进行了深入研究,从而使得毒物检验技术有了一定程度的丰富和发展。为了全面总结引起动物中毒的常见毒物的实验室检验方法和技术,我们组织编写了这本《兽医常见毒物检验技术》。

全书共三章,内容包括毒理学实验基础、毒物检验的一般知识和常见毒物检验方法与技术。毒理学实验基础系统阐述了毒理学实验的目的、原则、设计要点、结果分析及实验动物的选择、染毒与取材等;毒物检验的一般知识系统阐述了毒物检验的步骤、材料的选取、保存和运送、检验前的准备、检验方法的确定及毒物的提取与分离等;毒物检验方法和技术部分按照毒物的来源分为饲料毒物检验、农药检验、灭鼠药检验、矿物类物质检验、霉菌毒素检验、有毒植物检验、化肥检验等。检验技术以实验室常用的简便易行的检验方法为主,同时又增加了一些新的检验技术,可满足不同条件的需要。

全书结构合理,图文并茂,方法简便易行,可供从事畜牧兽医、食品卫生、毒理学等相关学科的实验室检验人员参考,亦可作为高等农业院校动物医学和动物科学专业本科生的实习指导书。由于动物中毒病近年来的研究进展十分迅速,虽然我们尽了很大努力,但限于作者的水平和经验,书中疏漏不当之处在所难免,恳请专家与读者提出宝贵的意见和建议。

编 者

2010 年 6 月

目 录

第一章 毒理学实验基础	(1)
第一节 毒理学实验的原则和局限性	(1)
第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的	(3)
第三节 动物实验的职业道德	(4)
第四节 实验动物的选择和管理	(5)
第五节 毒理学试验设计要点	(10)
第六节 实验动物的染毒和处置	(13)
第七节 毒理学实验结果处理和分析	(24)
第二章 毒物检验的一般知识	(31)
第一节 毒物检验的步骤	(31)
第二节 毒物检验材料的采取、保存及运送	(32)
第三节 检验前的准备	(33)
第四节 毒物检验的方法	(34)
第五节 毒物的提取与分离	(38)
第六节 薄层层析法在毒物检验中的应用	(42)
第七节 检验结果的判断	(46)
第三章 常见毒物检验方法与技术	(49)
第一节 常见饲料毒物检验	(49)
实验一 氢氰酸及氰化物的检验	(49)
实验二 亚硝酸盐的检验	(57)
实验三 硝酸盐的检验	(65)
实验四 硝基化合物的检验	(69)
实验五 棉酚的检验	(71)
实验六 食盐的检验	(77)
第二节 常见农药检验	(80)
实验七 有机磷农药的检验	(80)
实验八 有机氯农药的检验	(91)
实验九 氨基甲酸酯类农药的检验	(100)
实验十 拟除虫菊酯类农药的检验	(103)
实验十一 除草剂类农药的检验	(104)
第三节 灭鼠药中毒	(107)
实验十二 毒鼠强的检验	(107)
实验十三 溴敌隆的检验	(111)

实验十四	敌鼠及其钠盐的检验	(113)
实验十五	氟乙酰胺的检验	(115)
实验十六	磷化锌的检验	(120)
实验十七	安妥的检验	(124)
第四节	矿物类物质检验	(126)
实验十八	检样的采取与处理	(127)
实验十九	铅的检验	(128)
实验二十	镉的检验	(131)
实验二十一	钼的检验	(132)
实验二十二	铜的检验	(134)
实验二十三	硒的检验	(136)
实验二十四	汞化合物的检验	(140)
实验二十五	砷化合物的检验	(145)
实验二十六	氟化合物的检验	(150)
第五节	霉菌毒素检验	(155)
实验二十七	霉菌毒素的一般检验	(156)
实验二十八	黄曲霉毒素的检验	(158)
实验二十九	新茄病镰刀菌烯醇的检验	(163)
实验三十	丁烯酸内酯的检验	(164)
实验三十一	杂色曲霉毒素的检验	(165)
第六节	有毒植物检验	(166)
实验三十二	有毒植物化学成分预试验	(166)
实验三十三	生物碱的检验	(174)
第七节	化肥检验	(181)
实验三十四	尿素的检验	(181)
参考文献		(183)
附 录		(185)
附录 1	以当量浓度表示的酸、碱溶液稀释表	(185)
附录 2	以百分比浓度表示的酸、碱溶液稀释表	(185)
附录 3	饲料卫生标准	(186)
附录 4	毒理学网络信息资源	(187)

第一章 毒理学实验基础

毒理学主要研究外源化学物对机体的损伤作用及其机制。毒理学研究的主要手段是动物实验。体内实验是以实验动物为模型,最终目的是通过外源化学物对实验动物的毒性反应向人(原型)外推,以期评估外源化学物对人的危害及危险性。体外实验主要用于筛选和预测急性毒性和机制研究;人体实验和流行病学调查则可进一步深化和证实在动物实验中所得到的资料。实际上,毒理学作为一门实验科学是以动物实验为中心,而毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本内容。毒理学试验是对化学物安全性评价的主要手段,已被各国际组织或各国的行政部门所颁布的规程或指南列为常规试验,又称为常规毒理学试验(regulatory toxicology test)。这类毒理学试验是以筛查和描述外源化学物的毒性为目的,属于描述毒理学范畴。当受试物经过常规毒理学的研究,确定其危害、剂量反应关系和靶器官后,应进一步研究其靶器官毒理学及其毒作用机制。

第一节 毒理学实验的原则和局限性

一、毒理学实验的原则

在毒理学的试验中,有三个基本的原则。

(1)化学物对实验动物产生的作用,可以外推于人。其基本假设为:①人是最敏感的动物物种;②人和实验动物的生物学过程包括化学物的代谢与体重(或体表面积)相关。这两个假设也是全部实验生物学和医学的前提。以单位体表面积计算对人产生毒作用的剂量和实验动物通常很相似。而以体重计算则人通常比实验动物敏感,差别可能达10倍。因此可以利用安全系数来计算人的相对安全剂量。已知人致癌物都对某种实验动物具有致癌性。实验动物致癌物是否都对人有致癌性,还不清楚,但此已作为动物致癌试验的基础。一般认为,如果某一化学物对几个物种实验动物的毒性是相同的,则人的反应也可能是相似的。

(2)实验动物必须暴露于高剂量,这是发现化学物对人存在潜在危害的必需和可靠的方法。此原则是根据质反应的概念,随剂量或暴露增加,群体中效应发生率增加。毒理学试验中,一般要设3个或3个以上剂量组,以观察剂量—反应(效应)关系,确定受试化学物引起的毒效应及其毒性参数。毒性试验的设计并不是为了证明化学品的安全性,而是

为了了解化学品可能产生的毒作用。仅仅检测受试化学物在人的暴露剂量是否引起毒效应是不够的,尽管此剂量已超过人可能的暴露剂量。当引起毒效应的最低剂量(LOAEL)与人的暴露剂量接近时,说明该化学物不安全。当该剂量与人的暴露剂量有很大的距离(几十倍、几百倍或以上),才认为具有一定安全性,此距离越大,安全性越可靠。如果在研究中所用的一系列的剂量不能引起毒性效应,则认为所用剂量还不足够高,应增加剂量,以确定受试化学品的毒性。但如果在试验的最高剂量组的剂量与人可能的暴露剂量之间有足够的界限,则对于安全性评价来说未观察到毒效应的研究是可以接受的。在毒理学试验中实验模型所需的动物总是远少于处于危险中的人群。为了用少量实验动物得到有统计学意义的可靠结果,需要应用相对较高的剂量,以使效应发生的频率足以被检测到。因此,在毒理学试验中,对相对较少的实验动物必须以较高剂量进行试验,以保证毒作用不被漏检,然后根据毒理学原则外推估计低剂量的危险性。

(3)成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物和人可能的暴露途径是基本的选择。成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物是为了使实验结果具有代表性和可重复性。以成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物作为一般人群的代表性实验模型,而将幼年和老年动物、妊娠的雌性动物、处于疾病状态的动物作为特殊情况另作研究,这样可降低实验对象的多样性,减少实验误差。毒理学实验结果的敏感性取决于受试物处理引起毒效应强度和实验误差两个因素,处理引起的毒效应强,实验误差小,则实验结果的敏感性增加,反映受试物处理的真实效应,反之亦然。实验设计是要规定实验条件,严格控制可能影响毒效应的各种因素,保证实施质量,降低实验误差。只有这样,才能保证试验结果的准确性和可重复性。外源化学物从不同途径染毒实验动物所表现的毒性可有很大差异,这是由于染毒部位解剖生理特点不同,使得外源化学物吸收进入血液的速度和量不同,首先到达的器官和组织也不同。因此,毒理学试验中染毒途径的选择,应尽可能模拟人接触该受试物的方式。

二、毒理学实验的局限性

历史上,环境污染物及某些药物引起的人和动物中毒乃至死亡的事件多有发生,从而引起各国政府的高度重视,同时也推动了毒理学的发展。各国政府主管部门制订和多次修订了有关药品和各种化学品安全性评价的规范或准则,希望通过对啮齿类和非啮齿类动物的毒理学研究,为有关候选新药和各种化学品提供安全性依据,但以动物的资料预测人的毒性的预测价值尚有待于研究。

Lumley(1990)和 Igarashi (1994)根据有限的临床资料报告,发现对人的毒性约一半不能由临床前(动物)毒性研究预测。Heywood (1983)报告 27 个化学物(大多为药品)的靶器官毒性在大鼠和犬(或猴)之间的相符率仅 20%。Olson 等(1998)报告 131 种化学物对动物的毒性与人的毒性相符率,啮齿类为 6%,非啮齿类(犬和猴)为 28%,合并达 36%,所有的物种相符率可达 69%。按照目前的规范,进行毒理学安全性评价,可以在一定程度上提高新药和各种化学品的使用安全性,但仍不能完全排除对人健康危害的风险。WHO 在《临床前药物安全性实验原则》的文件中指出“虽然事先对生物活性物质进行了最仔细彻底的研究,但给人使用时总是不可避免地要冒一定的风险”。这就是利用动物实

验的局限性,即动物实验的结果外推到人的不确定性。

用实验动物的毒理学试验资料外推到人群接触的安全性时,会有很大的不确定性。这是因为,外源化学物的毒性作用受到许多因素的影响。

首先,实验动物和人对外源化学物的反应敏感性不同,有时甚至存在着质的差别。虽然在毒理学试验中通常用两种或两种以上的动物,并尽可能选择与人对毒物反应相似的动物,但要完全避免物种差异是不可能的。而且,实验动物不能述说涉及主观感觉的毒效应,如疼痛、腹胀、疲乏、头晕、眼花、耳鸣等,这些毒效应就很难或不可能发现。在动物实验中,可观察到体征(sign),而没有症状(symptom)。

第二,在毒理学试验中,为了寻求毒作用的靶器官,并能在相对少量的动物上得到剂量—反应或剂量—效应关系,往往选用较大的染毒剂量,这一剂量通常要比人实际接触的剂量大得多。有些化学物在高剂量和低剂量时的毒性作用规律不一定完全一致,如大剂量下出现的反应有可能是由于化学物在体内超过了机体的代谢能力,这就存在高剂量向低剂量外推的不确定性。

第三,毒理学试验所用动物数量有限,那些发生率很低的毒性反应,在少量动物中难以发现。而化学物一旦进入市场,接触人群往往会很大。这就存在小数量实验动物向大量人群外推的不确定性。

第四,实验动物一般都是实验室培育的品系,一般选用成年健康动物,反应较单一,而接触人群可以是不同的人种、种族,而且包括年老体弱及患病的个体,在对外源化学物毒性反应的易感性上存在很大差异。

以上这些都构成了从毒理学动物试验结果向人群安全性评价外推时的不确定因素。

第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的

毒理学实验的常规部分是毒性评价或安全性评价试验。为了对受试物的毒性进行全面的测试,增强测试结果的可靠性,权威机构规定了评价程序,以保证毒性评价研究可以达到普遍能接受的最低要求和原则。毒理学家认为毒理学试验程序应该有一定的灵活性。对毒理学试验的原理和设计思路的深入理解,有助于研究者对评价程序的实施,在发现新的现象或线索时,可进行一些补充实验来证实,并可进一步研究其机制。

毒性评价或安全性评价方面的基本目的包括以下几点。

(1)受试物毒作用的表现和性质。在急性和慢性毒性试验中,观察受试物对机体的有害作用,对每个实验动物进行全面的逐项的观察和记录。发现有害作用是进行剂量—反应(效应)研究的前提。

(2)剂量—反应(效应)研究。剂量—反应(效应)研究是毒性评价和安全性评价的基础。通过对不同有害作用的剂量—反应(效应)研究,可以得到该受试物的多种毒性参数。在急性(致死性)毒性试验中,应该得到 LD_{50} ,也可以得到 LD_{01} 和 MTD。在急性非致死性毒性试验中,应该得到急性可观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)和未观察到有害作用

的剂量(NOEL)。在亚急性、亚慢性及慢性毒性试验中,应该得到相应的 LOEL 和 NOEL。在致突变、致癌和致畸等特殊毒性试验中,剂量—反应(效应)研究将为确定受试物是否具有这些特殊毒性提供依据。致畸试验也可得到 LOEL 和 NOEL;在致突变、致癌试验中,尽管认为是无阈值的,但也可得到表现的 LOEL 和 NOEL。

(3)确定毒作用的靶器官。确定受试物有害作用的靶器官,是毒理学研究的重要目的,以阐明受试物毒作用的特点,并为进一步的机制研究和毒性防治提供线索。

(4)确定损害的可逆性。一旦确认有害作用存在,就应研究停止接触后该损害是否可逆和消失,器官和组织功能是否能恢复,还是像化学致癌作用那样停止接触后损害继续发展。毒性的可逆性关系到对人的危害评价,如果受损的器官组织能够修复并恢复正常功能,则可以接受较高危险性的接触水平。

当然,毒理学研究还可能其他的目的和要求。例如毒作用的敏感检测指标和生物学标志、毒作用机制研究、受试物的毒物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。对这些要求,应扩展常规试验设计以便包括相关研究项目,或者另外设计和进行靶器官毒理学及机制毒理学研究。

第三节 动物实验的职业道德

实验动物(laboratory animal)是包括所有脱离自然环境而用于研究、教学和试验的脊椎动物。要预防和治疗人类的疾病、要认识生命过程,生物学实验是必不可少的。实验动物对医学的发展有不可忽视的贡献。所有研究人员应尊重生命,善待实验动物。

关于人类对待动物的伦理学争论由来已久。18 世纪哲学家 Jeremy Bethan 指出:“问题既不是它们能否思考,也不是它们会不会说话,而是它们痛苦不痛苦。”,并出版和发表了很多有关动物的伦理学的书籍和文章。19 世纪以来世界各国兴起了动物保护主义,各国相继成立各种动物保护组织,其中有一部分是主张绝对禁止动物实验的激进派。科学家和大多数民众则主张对动物实验加以规范,通过立法保障动物福利。英国 1822 年通过了马丁法,禁止虐待动物;1876 年通过了“禁止虐待动物法”;1986 年通过了“科学实验动物法”。美国 1873 年在联邦法中出现有人道地对待动物的条文;1966 年通过了“动物福利法”。我国《实验动物管理条例》规定“对实验动物必须爱护,不得戏弄或虐待”。

对于那些人为造成丧失独立生存能力的生物和那些用于研究、教学试验的动物,我们都负有道义上的责任。使用有知觉动物作研究时,其前提是该研究应对人类或动物健康有重大贡献。因此,须遵守以下原则:①给予人道主义的管理和处理;②使痛觉和不适感减少到最低限度;③避免不必要的使用实验动物。合适的建筑设备固然重要,但更重要的是管理体制和使用实验动物的各级人员的知识水平和对动物的关心程度。

在动物实验中,应贯彻英国 William Russell 和 Rex Brursh(1959)在 The Principles of Humane Experimental Technique 提倡的 3R 原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。替代是指应用无知觉材料的科学方法来代替使用活的有知觉

脊椎动物的方法。减少是指在能保证获取一定数量与精确度的数据信息的前提下,减少动物的使用数量。优化是指在必须使用动物时,要尽量减少非人道程序的影响范围和程度。

第四节 实验动物的选择和管理

毒理学的动物实验是以实验动物作为研究对象的,为获得可靠的研究结果,先决条件是正确地选用实验动物。

一、实验动物物种的选择

外源化学物的固有毒性往往在人和不同物种实验动物之间表现不同,物种差别可以表现在量和质的差别。因此,需要对实验动物物种进行选择。一般认为,从动物实验结果外推到人,定性外推的可靠性高于定量外推,毒效学预测优于毒动学预测。

实验动物物种选择的基本原则是:在代谢、生物化学和毒理学特征方面与人最为接近的物种;自然寿命较短的物种;易于饲养和实验操作的物种;经济并易于获得的物种。

在选择实验动物时存在固有的限制。可利用的物种不多,主要原因包括经济(购买和饲养的费用)、实验动物的寿命、行为和生活能力、处置,也许最重要的是对该物种“正常”生理和病理的资料,以及对所研究的毒性的敏感性。要利用对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征方面与人最接近的物种,就需要了解实验动物物种和人对受试化学物的吸收、生物转化等资料,但这往往并不切合实际,因为首先需要进行一系列的比较研究,而对人体的资料在动物试验之前是很难得到的。

在毒理学研究中常用的实验动物物种如下:大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬。其他可能用到的实验动物有地鼠、猕猴、小型猪、鸡等。其中,大鼠、小鼠、豚鼠和地鼠为啮齿类动物。常用实验动物生物学和生理学参数见表 1-1。

毒理学实验常用的各实验动物,实际上没有一种完全符合上述物种选择的原则,目前常规选择物种的方式是利用两个物种,一种是啮齿类,另一种是非啮齿类。系统毒性研究最常用的啮齿类是大鼠和小鼠,非啮齿类是犬。豚鼠常用于皮肤刺激试验和致敏试验,兔常用于皮肤刺激试验和眼刺激试验。遗传毒理学试验多用小鼠,致癌试验常用大鼠和小鼠,致畸试验常用大鼠、小鼠和兔。迟发性神经毒性试验常用母鸡。一般认为,如以与人相同的接触方式、大致相同的剂量水平,在两个物种有毒性反应,则人有可能以相同的方式发生毒性反应。当不同物种的毒性反应有很大的差异时,必须研究外源化学物在不同物种的代谢动力学及毒作用机制,然后才可将实验结果外推到人。

二、实验动物品系的选择

品系(strain)是实验动物学的专用名词,指用计划交配的方法,获得起源于共同祖先的一群动物。

实验动物按遗传学控制可分为:①近交系:指全同胞兄妹或亲子之间连续交配 20 代以上而培育的纯品系动物。如小鼠有津白 I、津白 II、615、DBA/1、DBA/2、BALB/C、C3H、C57B/6J、A 和 A/He 等。②杂交群动物(杂交 1 代, F1):指两个不同的近交系之间有目的进行交配,所产生的第一代动物。③封闭群:一个种群在 5 年以上不从外部引进新血缘,仅由同一品系的动物在固定场所随机交配繁殖的动物群。如昆明种小鼠、NIH 小鼠、LACA 小鼠、F344 大鼠、Wistar 大鼠、SD(Sprague-Dauley)大鼠等。

表 1-1 常用实验动物生物学和生理学参数

参 数	猴	狗	猫	兔	大 鼠	小 鼠	豚 鼠	地 鼠
成体体重(kg)	3.5	14	3.3	3.7	0.45	0.035	0.43	0.12
寿命(a)	16	15	14	6	3	1.5	31	
水消耗(ml/d)	450	350	320	300	35	6	145	30
饲料消耗 (成本 g/d)	150	400	100	180	10	5	12	10
成体代谢 (cal/kg·d)	158	80	80	110	130	600	100	250
体温(℃)	38.8	38.9	38.6	39.4	38.2	37.4	38.6	38.0
呼吸频率 (次/min)	50	20	25	53	85	160	90	83
	40~60	10~30	20~30	40~65	65~110	80~240	70~100	35~130
血压 mmHg (收缩/舒张)	159/127	148/100	155/100	110/80	130/90	120/75	77/50	108/77
出生体重(g)	500~700	100~200	125	100	5-6	1.5	75~100	2.0
断乳时体重(g)	4400	5800	3000	100~1500	40~50	10~12	250	35
开眼(d)	出生当天	8~12	8~12	10	10~12	11	出生当天	15
妊娠(d)	168	63	63	31	21	20	67	16
性周期(d)	28	22	15~28	15~16	4~5	4~5	16~19	4
动情期(d)	1~2	7~13	9~19	30	1	1	1	1
窝数量	1	3~6	1~6	1~13	6~9	1~12	1~5	1~12
断乳年龄(周)	16~24	6	6~9	8	3~4	3	2	3~4
生殖年龄(月)	54	9	10	6~7	2~3	2	3	2
生殖期(年)	10~15	5~10	4	1~3	1	1	3	1
生殖季节	任何时间	春,秋	冬季	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间
所需面积 (ft ²)*	6	8	3	3	0.4	0.4	0.7	0.34
环境温度(℃)	18~28	18~28	18~28	18~28	19~25	19~25	19~25	19~25
血容量 (ML/Kg)	75	79	60	53	65	80	75	85
凝血时间(s)	90	180	120	300	60	14	60	143
HCT (%红细胞)	42	45	40	42	46	41	42	50
Hb(g/dL)	12.5	16.0	11.8	13.6	14.8	16.0	12.4	12.0

* 所需面积(ft²),即为英尺,1 ft=30.48 cm。

根据实验动物遗传的均一性排序,近交系最高、杂交群次之、封闭群较低。不同品系实验动物对外源化学物毒性反应有差别,所以毒理学研究要选择适宜的品系,对某种外源化学物的系列毒理研究中应固定使用同一品系动物,以求研究结果的稳定性。

遗传毒理学一般利用啮齿类动物,主要是小鼠或大鼠。如果有合适的理由,其他物种也可接受。据报道,在小鼠骨髓微核试验中 MS/Ae 品系比 ddy、CD-1 或 BDF 品系更敏感。但现在尚不能证明某一品系对所有的遗传毒性物质比其他品系都敏感。在致癌试验中对实验动物的品系有一定的要求,特别重视有关病理损害的自发发生率。例如,某些大鼠品系垂体肿瘤发生率高,则不适用于靶器官为内分泌系统的毒性研究。又如 B6C3F1 雄性小鼠肝肿瘤发生率可能有碍于肝致癌反应的检测。

三、对实验动物微生物控制的选择

(一)实验动物的选择

按微生物控制可将实验动物分为四级,见表 1-2。对于毒性试验及毒理学研究应使用二级(或二级以上)动物,以保证实验结果的可靠性。

1. 普通动物(conventional animal,CVA)

是实验动物中在微生物控制上要求最低的动物。饲养在开放系统的动物室内。空气未净化,饲喂全价颗粒饲料,可饮自来水。房舍要求有防鼠和防止昆虫入内的设施。人员进入要穿工作服和专用鞋帽。

2. 悉生动物(gnotobiotic animal,GNA)

又称清洁动物。饲养在屏障系统中,空气要经过净化,饲养室要保持正压,进入室内的一切物品要经过消毒灭菌,工作人员进入要洗澡和穿灭菌工作服,动物饮用灭菌水。

3. 无特定病原体动物(specific pathogen free animal,SPF)

饲养在屏障或隔离系统中,通过无菌动物、悉生动物及 SPF 动物获得。笼具、饲料饮水要经过特殊处理,并有严格的检疫、消毒和隔离制度。

4. 无菌动物(germ free animal,GFA)

此种动物在自然界中并不存在,是在隔离器中经人工剖腹产取得仔体,用无菌母体代乳或人工哺乳,经净化培育得到。

表 1-2 实验动物微生物等级标准

	等级	饲养环境	要求
I 级	普通动物(CVA)	开放系统	应没有传染给人的疾病
II 级	悉生动物(GNA)	屏障系统	除 I 级标准外,种系清楚,没有该动物特有的疾病
III 级	无特定病原菌体动物(SPF)	屏障或隔离系统	除 II 级标准外,动物为剖腹产或子宫切除产、按纯系要求繁殖,在隔离器内或层流室内饲养,可有不致病细菌丛,没有致病病原体
IV 级	无菌动物(GFA)	隔离系统	在全封闭无菌条件下饲养员的纯系动物,动物体外不带有任何微生物和寄生虫(包括绝大部分病毒)

(二) 实验动物设施的分类

1. 开放系统(open system)

饲养环境与外界相同,有强力通风设施、饲料、饮水和垫料要求不被污染,有防鼠和防昆虫措施。

2. 屏蔽系统(barrier system)洁净度万级

饲养环境是密闭的,送入的空气需经过滤,饲料、饮水和垫料需要灭菌,饲养人员进入要经过淋浴、穿灭菌工作服、戴口罩和手套。

3. 隔离系统(isolation system)洁净度百级

是以一个隔离器(isolate)为主体及其附属装置组成的饲养系统,送入的空气需经百级以上洁净度过滤,一切物品都要经严格灭菌后经传递仓送入,饲养人员不得入内。

四、个体选择

实验动物对外源化学物的毒性反应存在个体差异,应注意实验动物的个体选择。

1. 性别

同一物种、同一品系的实验动物雌雄两性通常对相同外源化学物毒性反应类似,但雌雄两性对化学物的毒性敏感性存在差别。据报道,在 149 种外源化学物毒性反应中雌雄敏感性比值小鼠平均为 0.92,大鼠为 0.88,这种差别表现在实验动物发育成熟开始,直至老年期。可见雌雄两性动物的性激素性质和水平是关键因素,一般讲雄性动物体内微粒体细胞色素 P-450 酶系活性大于雌性动物,所以经该酶系降解解毒的外源化学物对雌性动物表现的毒性大,然而经该酶活化增毒的外源化学物却相反。

如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同,应选择敏感的性别。如对性别差异不清楚,则应选用雌雄两种性别。如实验中发现存在性别差异,则应将不同性别动物的实验结果分别进行统计学分析。

在遗传毒理学体内试验中,对性别的选择有几种建议:①对单个物种应用两种性别。②对单个物种应用两种性别,除非已在一个性别得到阳性反应,就不必对另一种性别进行试验。③对单个物种应用两种性别,除非经毒物代谢动力学研究证明受试物(和其代谢产物)在雄性和雌性之间无差别,或在确定剂量的预试验中证明有相等毒性。④对单个物种应用一种性别(雄性或雌性),除非证明存在性别差异。

一般来说,对于初次试验的受试物,应该采用两种性别。如实验中发现存在性别差异,则应将不同性别动物的实验结果分别进行统计分析。如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同,应选择敏感性别动物进行研究。

2. 年龄和体重

实验动物同人类一样,生命全程大体上可区分为三个阶段,即幼年期(从出生到性成熟之前)、成年期和老年期。在成年期,各种激素(包括性激素)、代谢酶都处于高峰稳定期,并对外源化学物的毒性反应差异较小,且有代表性。在幼年期和老年期,对外源化学物的生物转运和生物转化,靶器官和受体的敏感性均与成年期不同。据报道,外源化学物对成年动物的致死剂量(或 LD_{50})与新生动物比较,其比值在 0.002~16 之间,表明有的外源化学物对新生动物毒性低,而有的毒性反应强。毒理学试验选用实验动物的年龄取

决于试验的类型。急性试验一般选用成年动物;慢性试验因实验周期长,应选用较年幼的或刚断奶的动物,以使实验周期能覆盖成年期。实验动物的年龄应由其出生日期来定,但实际工作中常以动物的体重粗略地判断动物的年龄,并作为挑选适龄动物的依据。同一试验中,组内个体间体重差异应小于10%,各组间平均体重差异不应超过5%。

3. 生理状态

在毒理学试验中动物如出现妊娠,则影响体重及其他指标的检测结果,并且性激素对外源化学物代谢转化有影响,故应选用未产未孕的雌性动物。雌雄动物应分笼饲养。但在某些试验如显性致死试验、致畸试验及繁殖试验等,则需有计划地合笼交配。

4. 健康状况

实验动物的健康状态对毒理学试验结果有很大影响,因此应选用健康动物。健康动物应包括发育正常、体形健壮、无外观畸形,被毛浓密、有光泽、顺贴而不蓬乱,行动灵活、反应敏捷、眼睛明亮有神、表皮无溃疡和结痂,天然孔干净、无分泌物等。

为确保所选动物健康,一般在实验前观察5~7 d。对于大鼠和犬的亚慢性和慢性试验,可在实验前采血进行血液学和血液生化学检查,异常的动物应剔除;对犬还应驱除肠道寄生虫。

合理的全价营养饲料对维持实验动物健康和正常的生理活动至关重要。高温与低温时外源化学物的毒性一般比常温为高。气温升高而毒性增大,这种毒性变化可能是由于温度影响了毒物动力学所致。高温、高湿环境共存时更易于外源化学物经皮肤吸收。

人工昼夜周期,即使动物处于人工调整的12 h白昼(早6点至晚6点)及12 h黑夜(晚6点至次日早6点),以稳定其生物时间节律。在正常、健康的动物每天24 h的生理规律不尽相同,即存在着生物时间节律,对外源化学物的毒性反应也有昼夜性时间变化,因此出现毒理学新的分支学科,称为时间毒理学(chronotoxicology)。由于动物存在时间节律,外源化学物在不同时间表现的毒性反应有差别,所以在毒理学实际工作中,尤其在亚慢性和慢性染毒时,每日的染毒时间应保持一致,以避免由于时间不同而造成毒性上的差异。而且对动物生物样品(如血、尿等)进行各项指标的化验或一些生理功能的检查(如血压、体温等)也应固定时间。

五、实验动物的管理

我国实验动物的政府管理机构是在国家科技部和省(市)、自治区科技厅领导下的各行业或系统、各行政区域、各单位的实验动物管理委员会。自1988年国务院批准并颁布《实验动物管理条例》以来,发布了多项国家和地方法规,并制定了一系列国家标准,其中强制性国标为《GB 14922—2001 实验动物微生物学和寄生虫学监测等级(啮齿类的兔类)》、《GB 14923—2001 实验动物哺乳类动物的遗传质量控制》、《GB 14924—2001 实验动物全价营养饲料》、《GB 14925—2001 实验动物环境及设施》。在毒理学实验中所用的实验动物应有动物合格证、实验动物生产许可证、饲料合格证、实验动物使用许可证等。

对实验动物的管理除了应遵循上述法规和标准外,还须特别注意以下几点。

1. 动物的管理

动物的健康、动物的接收、适应、饲养、鉴别和记录。对所有实验动物都须记录每只或

每群动物的来源、处理以及其他有关资料。

2. 环境条件的控制

气候(温度、湿度、通风、光照),其他条件(噪音、气味、垫料、群体密度和空间限制)、饲料、饮水、运动等。

3. 设施的管理

清洁卫生、废弃物处理、害虫控制、节假日和突发事件的管理。

第五节 毒理学试验设计要点

一、体内毒理学试验设计

(一) 剂量分组

在毒理学试验中,最重要的是研究剂量—反应(效应)关系,也就是当外源化学物染毒剂量增加,实验动物的毒性反应(效应)随之而增强。剂量—反应(效应)关系的存在是确定外源化学物与有害作用的因果关系的重要依据,也可证明实验结果的可靠性。因此,在毒理学试验中,一般至少要设3个剂量组(即高剂量组、中剂量组、低剂量组),希望能得到满意的剂量—反应(效应)关系。

一般来说,高剂量组应出现明确的有害作用,或者高剂量组剂量已达到染毒的极限剂量(如大鼠或小鼠灌胃或注射的最大容量)。低剂量组应不出现任何可观察到的有害作用(即相当于NOAEL),但低剂量组剂量应当高于人可能的接触剂量,至少等于人可能的接触剂量。中剂量组的剂量介于高剂量组和低剂量组之间,应出现轻微的毒性效应(即相当于LOAEL)。高、中、低剂量组剂量一般按等比例计算,剂量间距应为2,低剂量组剂量一般为高剂量组剂量的 $1/10 \sim 1/20$ 。

急性毒性试验分组和剂量选择见下一章。亚慢性毒性试验的高剂量应该用急性毒性的 LD_{50} 的某个分数或 LD_{01} 。在长期或致癌试验中,最高剂量选择是由亚慢性毒性试验确定的最大耐受剂量(MTD),毒动学或代谢资料可能有助于决定剂量,特别是有受试物或其代谢产物的蓄积或有剂量依赖性解毒改变的证据。有人认为,在新药安全性评价中,试验期限等于或小于14 d,限度剂量每天为2 g/kg;如大于14 d限度剂量为每天1 g/kg。在无毒情况下,对限度剂量的要求是基于该途径的最大染毒容量。

毒理学试验常用的对照有4种。

1. 未处理对照组(也称为空白对照组)

即对照组不施加任何处理因素,不给受试物也不给以相应的操作。未处理对照组往往用于遗传毒理学试验中,确定指示生物的生物特征的本底值,以便进行质量控制。

2. 阴性(溶剂/赋形剂)对照

不给处理因素但给以必需的实验因素(溶剂/赋形剂),以排除此实验因素(溶剂/赋形剂)的影响,阴性对照作为与染毒组比较的基础。没有阴性对照组就不能说明受试物染毒

与有害作用之间的关系。例如,在实验中,染毒各剂量组实验动物出现某些异常、甚至死亡;如果阴性对照组没有发现异常,我们可以认为此种异常和死亡是由于受试物的毒作用;如果阴性对照组也出现同样的异常和死亡,则应考虑是由于实验动物患某种传染病或其他非实验因素所致,必须重新进行实验。

3. 阳性对照

用已知的阳性物(如致突变物)检测试验体系的有效性。阳性对照组最好与受试物用相同的溶剂、染毒途径及采样时间。在遗传毒理学试验、致畸试验和致癌试验中都使用了阳性对照组,阳性对照组是用已知的致突变物、致畸物或致癌物染毒,应该得到肯定的阳性结果(即致突变性、致畸性或致癌性)。这是由于这些试验,特别是遗传毒理学试验的变异较大,为了进行质量控制而设置阳性对照组。当同时进行的阴性(溶剂/赋形剂)对照组不能得到阴性结果,阳性对照组不能得到阳性结果,说明此次实验质量有问题,全部数据无效,必须重新实验。在遗传毒理学试验中,阳性对照与受试物应该用同样的途径和溶剂/赋形剂,但如有困难,则不同的染毒途径、不同溶剂/赋形剂也可以接受。

4. 历史性对照

由本实验室过去多次实验的对照组数据组成,上述三种对照都可构成相应的历史对照。历史对照的最好用途是通过同质性检验检查试验体系的稳定性,即进行实验室质量控制。由于实验毒理学的各种参数至今尚没有公认的参考值,因此历史性对照均值及其范围在评价研究结果时至为重要。

以上所述适用于大多数的毒理学体内试验。在急性毒性试验测定 LD_{50} 或 LC_{50} 时,剂量组数根据设计和统计学方法而定,可以是4组,也可以是5~7组。根据预实验结果,希望所设计的中间剂量组剂量与最后得到的 LD_{50} (LC_{50}) 接近。由于急性毒性试验的观察指标是死亡,并伴有严重的中毒症状,对于有经验的实验者可以不设阴性对照组。当然,如果使用了一种不常用的溶剂或者要测定某种其他的参数如 MTD、急性 LOAEL 和 NOAEL,则需要设置阴性对照组。

(二) 各组动物数

毒理学安全性评价试验各组动物数取决于很多因素,如实验目的和设计,要求的敏感度、实验动物的寿命、生殖能力,经济的考虑及动物的可利用性。各组动物数的设计一定要考虑到统计学的要求。

(三) 试验期限

某些试验(如致畸试验和多代生殖试验)的试验期限是由受试实验动物物种或品系决定的。而其他毒性试验的期限在某种程度上由定义所决定。如急性毒性是一次或1d内多次染毒观察14d,亚慢性毒性试验规定为染毒持续至实验动物寿命的10%,对大鼠和小鼠为90d,对狗应为1年。慢性毒性试验/致癌试验一般规定为持续至实验动物寿命的大部分。可分为两类,即规定试验期限的试验,或直到最敏感的组死亡率达到某一水平(通常为80%)的试验。

二、体外毒理学试验设计

此处简要讨论在遗传毒理学体外试验共同考虑的几个问题。