

· 研究进展 ·

啮齿类动物毒性实验死亡原因分析推荐方法简介

吕建军¹, 屈哲¹, 霍桂桃¹, 林志¹, 杨艳伟¹, 张颀¹, 张硕¹, 李波^{2*} (1.中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京100176; 2.中国食品药品检定研究院, 北京100050)

摘要: 毒性病理学是药物非临床安全性评价的重要组成部分, 组织病理学评价结果是毒性实验重要指标之一, 对毒性实验的结果和结论非常关键。啮齿类动物尤其是大鼠和小鼠是非临床毒性实验常用的实验动物。死亡原因分析是啮齿类动物毒性实验组织病理学评价的一个重要内容, 有助于毒性病理学家更好地理解病变的生物学意义, 进一步提高对啮齿类动物毒性实验的评价和结果的解释。本文简要介绍了啮齿类动物濒死终点指标的判断标准, 老年啮齿类动物大体和组织学病变的分类, 不同种属啮齿类动物死亡原因, 动物品系、性别和数量对死亡原因分析的影响, 以及啮齿类动物毒性实验死亡原因分析推荐方法等内容。以期为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析死亡原因及进一步提高啮齿类动物毒性实验的组织病理学评价和结果解释提供一定参考。

关键词: 啮齿类动物; 非临床; 毒性实验; 毒性病理学家; 死亡原因

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0312-010

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.014

Brief Introduction to a Proposed Method of Cause of Death Assignment in Rodent Toxicity Studies

Lv Jianjun¹, Qu Zhe¹, Huo Guitao¹, Lin Zhi¹, Yang Yanwei¹, Zhang Di¹, Zhang Shuo¹, Li Bo^{2*} ((1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Toxicologic pathology is an important part of the nonclinical safety evaluation of drugs. Histopathological assessment result is one of the key end-points of a toxicity study and contributes substantially to the outcome and conclusion of the toxicity study. Rodent animals, especially rats or mice, are commonly used in nonclinical toxicity studies. One of the key contents of the histopathological assessment of rodent toxicity studies is cause of death assignment, which may help toxicologic pathologists to better understand the biological significance of the lesions, to further improve the evaluation of the rodent toxicity studies and to have a much clearer of the results. The paper briefly introduced the end-point criteria for moribundity of rodents, categories of gross and histological lesions of aged rodents, cause of death of different species of rodents, effects of animal strain, sex, and number on the cause of death assignment, as well as a proposed method of the cause of death

基金项目: 十二五国家科技重大专项课题“符合中药特点的有毒中药安评关键技术”(编号 2015ZX09501004-002); 十二五国家科技重大专项课题“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004)

作者简介: 吕建军, 主任药师, 从事药物安全性评价毒性病理学诊断工作; Tel: (010) 67872233-8210; E-mail: lujianjun@nifdc.org.cn

通信作者: 李波, 研究员, 教授, 从事临床前药物安全性评价工作; Tel: (010) 67095790; E-mail: libo@nifdc.org.cn

assignment in rodent toxicity studies. The purpose of the paper is to provide some references for toxicologic pathologists to better analyze the cause of death and to further improve the histopathological evaluation of the rodent toxicity studies as well as interpretation of the results during nonclinical safety evaluation of drugs in China.

Keywords: rodent animals; nonclinical; toxicity study; toxicologic pathologist; cause of death

毒性病理学是药物非临床安全性评价的重要组成部分,组织病理学评价结果是毒性实验重要指标之一,对毒性实验的结果和结论非常关键。组织病理学评价一个重要内容是死亡原因分析,死亡动物死亡原因分析也是致癌性实验进行Peto检验的前提^[1],有助于毒性病理学家更好地理解病变的生物学意义,更好地解释啮齿类动物毒性实验和致癌性实验的结果^[2]。啮齿类动物尤其是大鼠和小鼠由于其品系众多,遗传模型及背景资料丰富,而且繁殖或饲养成本与非啮齿类动物相比较低,因此,非临床毒性实验常使用啮齿类动物^[3-4]。尽管美国毒性病理学会(Society of Toxicologic Pathology, STP)于2004年发表了指导判定毒性实验动物死亡原因的建议,目的是为毒性实验和致癌性实验的死亡原因分析提供指导^[5]。但是,目前国内外药物非临床安全性评价领域动物死亡原因分析方法尚未统一,有时不能准确判断动物的死亡原因,严重影响了啮齿类动物实验的组织病理学评价和结果解释。本文简要介绍了啮齿类动物濒死终点指标的判断标准,老年啮齿类动物大体和组织学病变的分类,不同种属啮齿类动物死亡原因,动物品系、性别和数量对死亡原因分析的影响,以及啮齿类动物实验死亡原因分析推荐方法等内容。以期为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析死亡原因及进一步提高啮齿类动物实验的组织病理学评价和结果解释提供一定参考。

1 啮齿类动物濒死终点指标的判断标准

啮齿类动物死亡后几小时即可出现组织自溶而影响随后的组织病理学诊断^[3],即使实验人员或饲养人员每天观察1次或者2次,并且在发现动物死亡后立即进行剖检,约10%~15%的小鼠组织可出现自溶,以至于无法进行组织学评价^[6-8],美国国

立卫生研究院《实验动物管理和使用指南》定义了人道化实验终点指标,并强调了在实验动物死亡之前实施安乐死以减轻动物的疼痛和痛苦。濒死是动物死亡之前状态,可代替死亡作为实验终点^[9-10]。濒死终点的判断标准包括以下内容:①体重降低;②体温降低;③明显不活动或保持不动;④弓背姿势;⑤毛发污浊;⑥肿瘤破溃和出血;⑦呼吸困难^[3,8,10-11]。需要注意在动物出现肿瘤或腹水时体重可能会增加而不是降低,在这种情况下,除了体重降低以外,还可使用身体状况评分作为濒死终点^[12]。

组织病理学评价来确定死亡原因时,毒性病理学家还需考虑正常老龄啮齿类动物的临床表现和老龄动物的病理学特征包括:①毛发稀疏或变色;②粘膜苍白;③呼吸频率轻度增加;④身体一般状况下降;⑤轻度骨关节炎导致活动缓慢^[13]。伴有疾病的老龄啮齿类动物更容易出现毛发污浊,虽然随着年龄增长可能出现肌肉萎缩和体重降低,但自由进食的啮齿类动物体重可增加。因此,需要仔细观察老龄啮齿类动物的表现,根据濒死终点的判断标准和正常老龄啮齿类动物的临床表现和老龄动物的病理学特征进行综合分析来判断是否处于濒死状态^[14]。

2 老年啮齿类动物大体和组织学病变的分类

老年啮齿类动物大体和组织学病变分为三类:偶发性病变、可实施安乐死但不引起死亡的病变、最可能引起死亡的病变。

2.1 偶发性病变

偶发性病变是指老龄啮齿类动物常见但通常与死亡原因无关的病变,包括老龄啮齿类动物的变性和炎症性病变,随着年龄的增加发病率增加的增生性和肿瘤性病变,例如不影响器官功能体积较小的良性肿瘤(详见表1)^[10,15-25]。

表1 老龄啮齿类动物的偶发性病变

器官或系统	小鼠	大鼠
眼睛	白内障	白内障
	角膜溃疡 [#]	睫状体组织细胞浸润
	慢性角膜炎 [#]	
	哈氏腺腺瘤 [#]	
中枢神经系统	脑矿化、脂褐素聚集	脂褐素聚集
皮肤和皮下组织	脱毛	脱毛
	轻度皮炎 [#]	轻度皮炎 [#]
		纤维瘤 [#]
生殖系统	精囊、凝固腺和包皮腺扩张	精囊和凝固腺扩张
	睾丸变性/萎缩	睾丸间质细胞增生/肿瘤
	囊性子官内膜增生	睾丸萎缩和脂褐素沉积
	子宫息肉	囊性子官内膜增生
	卵巢萎缩	卵巢萎缩
	卵巢囊肿	卵巢囊肿
内分泌系统	甲状腺囊肿	甲状腺囊肿
	肾上腺包膜下梭状细胞增生	
肝脏	巨大核肝细胞和肝巨细胞	胆管增生
	胆管增生	胆管(肝)囊肿
	肝囊肿	
	胆囊上皮轻度玻璃样变性	
心脏	心内膜/心肌/心外膜矿化	
呼吸系统	轻度呼吸道上皮玻璃样变性	轻度呼吸道上皮玻璃样变性
	轻度肺泡巨噬细胞聚集	轻度肺泡巨噬细胞聚集
		肺动脉壁灶性矿化
胃肠道	轻度胃肠道上皮玻璃样变性	
	轻度急性直肠脱垂 [#]	

注：#表示可实施安乐死的病变。

2.2 可实施安乐死但不引起死亡的病变

小鼠可出现一些可实施安乐死，但不引起死亡的病变，例如：直肠脱垂、眼部异常（眼眶周围脓肿、角膜溃疡）以及皮肤异常（伴或不伴溃疡的慢性皮炎）^[10, 22, 26]。在一些大鼠实验良性和恶性皮肤和皮下肿瘤是引起死亡的常见原因^[2]，啮齿类动物如果出现较大的皮下肿瘤或破溃的皮肤肿瘤，出于人道原因可实施安乐死，尽管这些肿瘤是局限性和良性的病变^[10]。哈氏腺的肿瘤通常是良性的肿瘤，在笼旁观察或给药时发现眼部异常可实施安乐死^[10, 27]（如表1所示）。

2.3 最可能引起死亡的病变

毒性病理学家需结合临床表现、实验室检查结果、大体病理学检查和组织病理学检查的结果，对可能引起动物死亡的年龄相关病变以及给药诱导的病变进行综合分析，包括：严重的肾脏或肺脏疾病、转移性肿瘤或损害重要器官功能的肿瘤和败血症，这些病变通常较严重并影响啮齿类动物机体内稳态^[28-31]。表2列出了实验室啮齿类动物的主要死亡原因，不同品系大鼠和小鼠的死亡原因差别很大；即使同一品系的大鼠或小鼠，例如C57B6小鼠和F344大鼠在不同的实验其死亡原因也有差异；雄性Wistar大鼠与雌雄Wistar大鼠合并的主要死亡原因也有差异。但是需要注意，老龄大鼠和小鼠的牙齿病变降低了动物的摄食能力以及神经和肌肉骨骼疾病导致动物的活动能力下降，一般不认为是病理

性死亡原因^[4, 9, 21, 32-38]。

3 不同种属啮齿类动物死亡原因

啮齿类动物死亡原因分析有多种方法：一种方法是列出一个主要死亡原因及肿瘤或其它系统性疾病的发生率^[39-40]；另一种方法是将致癌性实验死亡动物的肿瘤分为致死性、可能致死性、偶发性和可能偶发性，以进行致癌实验的Peto检验^[2]。美国国家毒理研究中心（National Center for Toxicological Research, NCTR）将死亡原因分为4种：①可能性（probable）：如果毒性病理学家认为某一特定的肿瘤（或其它病理状态）是动物死亡最可能的原因，则确定为可能性死亡原因，每只动物只有1个可能性死亡原因；②促成性（contributory）：如果没有确定可能性死亡原因，毒性病理学家认为某一肿瘤（或其它病变）有助于动物的死亡，但不是唯一的原因，则确定为促成性死亡原因，每只动物可有1个以上促成性死亡原因；③可疑性（equivocal）：毒性病理学家认为对动物的死亡可能有影响的病变确定为可疑性死亡原因；④未知性（unknown）：如果毒性病理学家不能将肿瘤或其它病变确定为可能性、促成性或可疑性死亡原因，那么该动物的死亡原因未知^[41]，未知性死亡原因比例为1%~12%。在Snyder等^[42]人对啮齿类动物实验的死亡原因调查发现未知的死亡原因比例为7%~17%，见表2。

表2 实验室啮齿类动物的主要死亡原因

病变 死亡原因	小鼠					大鼠				
	CD-1	C57B6	C57B6	B6, 129*	129S4/SvJae	F344	F344	Wistar	Wistar*	SD
肿瘤										
造血系统	2	1	1	2	NA	1	1	NA	NA	NA
垂体	NA	5	8	NA	NA	2	2	1	2	1
生殖系统	7	7	NA	NA	5	5	4	4	NA	3
其它	3	2	5	1	1	3	3	2	3	4
肾病	4	4	3	NA	NA	4	NA	3	1	2
炎症	NA	3	4	NA	NA	NA	6	NA	4	NA
心脏血栓	6	6	NA	NA	NA	NA	5	NA	5	NA

续表 2

病变	小鼠					大鼠				
	CD-1	C57B6	C57B6	B6, 129*	129S4/SvJae	F344	F344	Wistar	Wistar*	SD
心脏病	NA	NA	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
动脉炎	8	NA	9	NA	5	NA	NA	NA	5	NA
脓肿/感染	NA	NA	NA	3	4	NA	NA	NA	NA	NA
食管扩张	NA	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA
巨噬细胞肺炎	NA	NA	2	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
尿路梗阻	1	NA	7	NA	6	NA	NA	NA	NA	NA
淀粉样变性	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
未确定	NA	9%	NA	17%	9%	7%	NA	17%	7%	NA

注：*代表雄性动物，其它动物为雌雄动物合并；SD代表Sprague-Dawley大鼠；NA代表不适用；表中阿拉伯数字代表死亡原因排序；表中百分率代表未确定死亡原因动物的比例；C57B6小鼠、F344大鼠及Wistar大鼠不同列代表不同文献报道的死亡原因。

4 动物品系、性别和数量对死亡原因分析的影响

不同品系大鼠和小鼠的死亡原因差别很大，即便是同一品系的啮齿类动物，疾病的发生率差异也很大^[10, 14, 18, 24, 40, 43-44]（如表2所示），因此，每个毒性实验必须设置对照组，动物无特定病原体（specific pathogen free, SPF）状态随着时间的推移和不同的设施条件而发生改变。当实验机构购入某一品系的SD大鼠后，有报道发现其寿命逐渐缩短，某些恶性肿瘤的发病率逐渐上升^[4]。除了小鼠死亡后组织严重自溶不能用于组织病理学检查外，必须要考虑由于实施安乐死的实验组和对照组动物的数量，在一个592只小鼠的终生实验中，仅139只小鼠进行了组织病理学检查，269只小鼠由于组织严重自溶不能用于组织病理学检查，184只小鼠实施了安乐死^[45]。

由于疾病的发病率和死亡原因有性别差异，应该使用足够数量的雄性和雌性动物进行实验，以便分别分析雌雄动物的死亡原因^[10, 18]，例如淋巴瘤在雌性小鼠的发病率可高达30%~50%，而雄性小鼠肺脏肿瘤更常见^[18]。死亡原因还因动物死亡时年龄的不同而有所不同^[46-47]，例如在20周龄时，没有发现雌性CD-1小鼠死于肿瘤性疾病；但是，到50

周龄时，发现40.6%CD-1雌性小鼠死于肿瘤性疾病^[47]；因此，毒性实验各组动物的周龄应该相同，所有小鼠均应该进行剖检。如果只对某组部分小鼠进行剖检和组织病理学检查，将不能确定疾病的发病率和真正的死亡原因。

5 啮齿类动物实验死亡原因分析推荐方法

啮齿类动物实验病理学家组织病理学诊断一致性较好^[7, 41]，Ikeno等^[7]人于2009年报道2个病理学家对某一实验主要死亡原因的诊断一致性超过90%，如果病理学家不能就死亡原因达成共识，或病变不足以引起死亡，则死亡原因定为未知性。

死亡原因分析需要良好的大体病理学检查、系统地收集组织和规范的组织取材^[48]，组织病理学诊断是关键^[49-51]。进行大体病理学检查的工作人员应当接受毒性病理学家的培训，典型的病变应拍照记录以便进行组织病理学诊断时参考^[48, 52]，大体病变有助于死亡原因分析，尤其是肿瘤例如垂体腺瘤如果直径超过一定大小，则认为可对相邻神经组织造成压迫从而引起死亡^[2]。除了要观察并记录大体病变，还要对一套标准化组织进行组织病理学检查，造血系统肿瘤一般无大体病变，但可以通过组织病理学进行诊断^[53]，组织病理学还需要区分具有相似的大体病变的疾病，诊断促成死亡原因的大体

表现不明显的系统性疾病，如关节炎、炎症和淀粉样变性等^[54]。此外，对一套标准化组织进行组织病理学检查能提高不同实验中病变发生率和严重程度的可比性。目前，有多篇文章报道了组织病理学检查组织的列表和评估组织数量^[39-40, 53]，表3列出了对小鼠进行组织病理学检查的25个组织，包括：

头骨的软组织（肌肉）、骨和骨髓、皮肤、眼睛和相关附件、牙齿、脑、耳和相关的附件、唾液腺、肺脏、心脏、胸腺、淋巴结、肝脏、胆囊、肾脏、胰腺、肾上腺、脾脏、胃、小肠、大肠、脂肪组织、生殖系统、乳腺（雌性）或附属腺（雄性）、膀胱。可以根据具体情况增加或减少检查组织^[42]。见表3。

表3 对小鼠进行组织病理学检查的25个组织

蜡块号	组织名称
1	脱钙后含原位脑的颅骨横截面（3个水平：颅鼻部、鼻部中间、尾鼻部含嗅叶）包括皮肤、触须和门齿
2	脱钙后含原位脑的颅骨横截面（2个水平：海马/丘脑、小脑/脑干和垂体）包括眼睛和眼周组织、耳廓和中耳、内耳、口腔、白齿、门齿、鼻咽部、甲状腺，颈淋巴结和喉
3	全部肺脏、纵隔、胸腺、食管、纵隔淋巴结
4	心脏（纵切）、肝脏（3个切面包括胆囊）、肾脏、肾上腺
5	胰腺、脾脏、肠系膜、肠系膜淋巴结、唾液腺
6	生殖系统、附属腺（雄性）、乳腺（雌性）、膀胱
7	胃，小肠（十二指肠、空肠、回肠）
8	盲肠、回盲部、结肠、肛门
9	大体病变

标准化死亡原因分析方法要求对病变进行程度分级，啮齿类动物组织病理学有多种病变程度分级系统^[7, 30, 45, 55]，其中一个分级系统将肿瘤分为4级：①1级：仅原发部位1个肿瘤；②2级：原发部位及器官内或1个其它器官转移；③3级：2~3个器官出现肿瘤；④4级：4个器官出现肿瘤，或在2~3个器官出现肿瘤伴相关的病理改变，例如胸腔积液或腹水。3或4级的肿瘤性病变更认为是死亡原因^[6-7]。但是，Peto模型1将肿瘤分为4种：①在生命期观察到（与死亡率无关）；②偶发性（不促成死亡）；③快速致死性；④非迅速致死性。毒性病理学家负责区分快速致死性和非迅速致死性肿瘤，这种区分的主观性较强^[56]。

组织病理学评分用于反映病变对组织功能的影响，根据肿瘤的起源、区域结构和转移与否评为1~4分^[7]，非肿瘤及炎症性病变更严重程度分为正常（0分）、极轻度（1分）、轻度（2分）、中度（3

分）和重度（4分）^[7]。使用该评分方案，可以发现可能性死亡原因。促成性原因包括所有的肿瘤（不考虑评分）和评分3或4的系统性疾病^[45]。见表4。

Snyder等人^[41, 45]于2016年在其它人既往工作的基础上提出了啮齿类动物实验（尤其是衰老实验）死亡原因分析的推荐方法，包括一个主要死亡原因及多个促成性原因，主要死亡原因是引起死亡最显著的病变；促成性死亡原因（也称为合并症）定义为病变本身不会导致立即死亡，但有助于动物的发病^[41]，促成性原因被认为在机制上与死亡原因相关。在1个小鼠全生命周期研究中，只有22%的小鼠因1个死亡原因死亡，70%的小鼠有2~6个促成性原因^[45]，其余8%的动物不能判定其死亡原因则定为未知^[57]。

为了尽可能将临床表现和组织病理学检查相关联，应当监测动物整个生命周期的临床状态，包括：由合格的兽医每天进行巡查并记录动物所有的

临床症状, 定期进行血液和尿液的常规检查和生化分析、超声诊断、心电图检查、X线检查、血压测定、肺功能测定、排泄物细菌和病毒学检查, 以及死亡前功能性和生化参数的测定并将结果提供给毒性病理学家。非致死性病变, 包括: 皮炎、轻度脱肛、眼部异常或皮下肿瘤导致的动物安乐死, 如果动物反应仍活跃, 机体状况较好时, 这些动物应

不包括在死亡原因分析中; 如果动物伴中度到重度系统性疾病症状时, 这些动物应包括在死亡原因分析中^[45, 57]。毒性病理学家应掌握常用实验动物疾病的临床表现、病理生理学及病理形态学相关知识, 并对上述临床数据、大体病变、组织病理学检查结果、辅助检查结果进行综合分析, 以尽可能确定死亡动物的主要死亡原因及促成性原因。

表 4 不同种类病变的组织病理学评分

评分	良性肿瘤	恶性肿瘤	非肿瘤	动脉炎
0	NA	NA	正常	正常
1	①不影响器官功能(或影响非重要器官)的小肿瘤; 不影响活动的皮下肿瘤; ②鳞状上皮乳头状瘤; ③间质细胞瘤。	NA	极轻度: 偶发性(小、灶性)。	影响1个器官或系统, 轻度。
2	①重要器官的较大肿瘤, 轻度至中度压迫周围正常组织, 可影响器官功能; ②直径< 5 mm 的垂体腺瘤。	肿瘤局限于1个器官, 但不破坏器官正常结构或影响正常功能。	轻度: 偶发性多灶性或弥漫性病变。	影响2个器官或系统, 轻度。
3	①严重影响器官功能的大肿瘤或伴破溃和出血; ②直径> 5 ~ 7 mm 的垂体腺瘤。	肿瘤转移至1个器官或局限性肿瘤破坏器官正常结构或影响正常功能。	中度: 不是死亡的主要原因但影响正常功能。	影响2个以上器官或系统, 或累及内耳(小鼠)或伴出血/血栓形成。
4	NA	①肿瘤转移至2个以上器官或局限性肿瘤破坏器官正常结构并浸润邻近组织; ②多中心淋巴瘤; ③甲状腺癌局部浸润累及气管。	重度: 可引起疾病和死亡。	影响3个以上器官或系统, 伴出血/血栓形成。

注: NA 代表不适用。

6 结语和展望

毒性病理学是毒理学中最为重要的组成部分, 也是临床前安全性评价工作中最基本的环节, 病理学评估结果对毒性实验的结论至关重要。毒性病理学家负责确定死亡或濒死动物的死亡原因, 并应尽可能明确一个主要死亡原因及促成性原因, 但并不是所有的动物都能明确死亡原因, 如果现有的

数据不能确定死亡原因, 应记录为死亡原因未知。毒性病理学家还应当确定总死亡率和组间死亡率的差别是否与供试品相关。确定死亡原因需要毒性病理学家熟练掌握常用实验动物的系统病理学, 常用实验动物疾病的临床表现、病理生理学及病理形态学相关知识以及专业判断, 毒性病理学家还应获得并综合分析每个动物所有的信息以确定其

死亡原因, 包括: 临床症状观察、临床病理学以及组织病理学数据等。本文简要介绍了啮齿类动物濒死终点指标的判断标准, 老年啮齿类动物大体和组织学病变的分类, 不同种属啮齿类动物死亡原因, 动物品系、性别和数量对死亡原因分析的影响, 以及啮齿类动物实验死亡原因分析推荐方法等内容。希望能够为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析死亡原因及进一步提高啮齿类动物毒性实验的组织病理学评价和结果解释提供一定参考。

参考文献:

- [1] Peto analysis Working Group of STP. Draft Recommendations on Classification of Rodent Neoplasms for Peto Analysis [J]. *Toxicol Pathol*, 2001, 29 (2): 265-268.
- [2] Ettlin RA, Stirnimann P, Prentice DE. Causes of Death in Rodent Toxicity and Carcinogenicity Studies [J]. *Toxicol Pathol*, 1994, 22 (2): 165-178.
- [3] Ray MA, Johnston NA, Verhulst S, et al. Identification of Markers for Imminent Death in Mice Used in Longevity and Aging Research [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2010, 49 (3): 282-288.
- [4] Spangler EL, Ingram DK. Utilization of the Rat as A Model of Mammalian Aging: Impact of Pathology on Behavior [J]. *Gerontology*, 1996, 42 (6): 301-311.
- [5] Long G. Recommendations to Guide Determining Cause of Death in Toxicity Studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32 (2): 269-270.
- [6] Ikeno Y, Bronson RT, Hubbard GB, et al. Delayed Occurrence of Fatal Neoplastic Diseases in Ames Dwarf Mice: Correlation to Extended Longevity [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003, 58 (4): 291-296.
- [7] Ikeno Y, Hubbard GB, Lee S, et al. Reduced Incidence and Delayed Occurrence of Fatal Neoplastic Diseases in Growth Hormone Receptor/Binding Protein Knockout Mice [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64 (5): 522-529.
- [8] Miller RA, Harrison DE, Astle CM, et al. Rapamycin, But Not Resveratrol or Simvastatin, Extends Life Span of Genetically Heterogeneous Mice [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66 (2): 191-201.
- [9] Blair J. Bumblefoot: A Comparison of Clinical Presentation and Treatment of Pododermatitis in Rabbits, Rodents, and Birds [J]. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2013, 16 (3): 715-735.
- [10] Brayton CF, Treuting PM, Ward JM. Pathobiology of Aging Mice and GEM: Background Strains and Experimental Design [J]. *Vet Pathol*, 2012, 49 (1): 85-105.
- [11] Flurkey K, Astle CM, Harrison DE. Life Extension by Diet Restriction and N-acetyl-L-cysteine in Genetically Heterogeneous Mice [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65 (12): 1275-1284.
- [12] Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice [J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49 (3): 319-323.
- [13] Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, et al. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2012, 2: 145-165.
- [14] Nohynek GJ, Longeart L, Geffray B, et al. Fat, Frail and Dying Young: Survival, Body Weight and Pathology of the Charles River Sprague-Dawley-Derived Rat Prior to and Since the Introduction of the VAFR Variant in 1988 [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1993, 12 (2): 87-98.
- [15] Creasy D, Bube A, de Rijk E, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40 (6): 40S-121S.
- [16] Dixon D, Alison R, Bach U, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System [J]. *J Toxicol Pathol*, 2014, 27 (3-4): 1S-107S.
- [17] Greaves P, Chouinard L, Ernst H, et al. Proliferative and Non-Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Soft Tissue, Skeletal Muscle and Mesothelium [J]. *J Toxicol Pathol*, 2013, 26 (3): 1S-26S.
- [18] Haines DC, Chattopadhyay S, Ward JM. Pathology of Aging B6; 129 Mice [J]. *Toxicol Pathol*, 2001, 29 (6): 653-661.
- [19] Kaufmann W, Bolon B, Bradley A, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Central and Peripheral Nervous Systems [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40 (4): 87S-157S.
- [20] Mahler JF, Stokes W, Mann PC, et al. Spontaneous

- Lesions in Aging FVB/N Mice [J]. *Toxicol Pathol*, 1996, 24 (6) : 710–716.
- [21] McInnes EF, Scudamore CL. Review of Approaches to the Recording of Background Lesions in Toxicologic Pathology Studies in Rats [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 229 (1) : 134–143.
- [22] Mecklenburg L, Kusewitt D, Kolly C, et al. Proliferative and Non-Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Integument [J]. *J Toxicol Pathol*, 2013, 26 (3) : 27S–57S.
- [23] Renne R, Brix A, Harkema J, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Respiratory Tract [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37 (7) : 5S–73S.
- [24] Roth GS, Brennecke LH, French AW, et al. Pathological Characterization of Male Wistar Rats from the Gerontology Research Center [J]. *J Gerontol*, 1993, 48 (6) : B213–B230.
- [25] Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38 (7) : 5S–81S.
- [26] Sundberg JP, Taylor D, Lorch G, et al. Primary Follicular Dystrophy with Scarring Dermatitis in C57BL/6 Mouse Substrains Resembles Central Centrifugal Cicatricial Alopecia in Humans [J]. *Vet Pathol*, 2011, 48 (2) : 513–524.
- [27] Berg BN, Wolf A, Simms HS. Nutrition and Longevity in the Rat: IV. Food Restriction and the Radiculoneuropathy of Aging Rats [J]. *J Nutr*, 1962, 77: 439–442.
- [28] Frith CH, Ward JM, Chandra M. The Morphology, Immunohistochemistry, and Incidence of Hematopoietic Neoplasms in Mice and Rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1993, 21 (2) : 206–218.
- [29] Hoenerhoff MJ, Starost MF, Ward JM. Eosinophilic Crystalline Pneumonia As A Major Cause of Death in 129S4/SvJae Mice [J]. *Vet Pathol*, 2006, 43 (5) : 682–688.
- [30] Maeda H, Gleiser CA, Masoro EJ, et al. Nutritional Influences on Aging of Fischer 344 Rats: II. Pathology [J]. *J Gerontol*, 1985, 40 (6) : 671–688.
- [31] Solleveld HA, McConnell EE. The Value and Significance of Life Span and Scheduled Termination Data in Long-Term Toxicity and Carcinogenesis Studies [J]. *Toxicol Pathol*, 1985, 13 (2) : 128–134.
- [32] Anastasia JV, Braun BL, Smith KT. General and Histopathological Results of A Two-Year Study of Rats Fed Semi-Purified diets Containing Casein and Soya Protein [J]. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28 (3) : 147–156.
- [33] Bronson RT, Lipman RD. Reduction in Rate of Occurrence of Age Related Lesions in Dietary Restricted Laboratory Mice [J]. *Growth Dev Aging*, 1991, 55 (3) : 169–184.
- [34] Dostas IA, Tsolakis AI, Khaldi L, et al. Malocclusion in Aging Wistar Rats [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2010, 49 (1) : 22–26.
- [35] Duarte-Vogel SM, Lawson GW. Association Between Hair-Induced Oronasal Inflammation and Ulcerative Dermatitis in C57BL/6 Mice [J]. *Comp Med*, 2011, 61 (1) : 13–19.
- [36] Krinke G. Spinal Radiculoneuropathy in Aging Rats: Demyelination Secondary to Neuronal Dwindling? [J]. *Acta Neuropathol*, 1983, 59 (1) : 63–69.
- [37] Maekawa A, Onodera H, Tanigawa H, et al. Spontaneous Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Aging Donryu Rats [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1986, 77 (9) : 882–890.
- [38] Mitsumori K, Maita K, Shirasu Y. An Ultrastructural Study of Spinal Nerve Roots and Dorsal Root Ganglia in Aging Rats With Spontaneous Radiculoneuropathy [J]. *Vet Pathol*, 1981, 18 (6) : 714–726.
- [39] Blackwell BN, Bucci TJ, Hart RW, et al. Longevity, Body Weight, and Neoplasia in Ad Libitum-Fed and Diet-Restricted C57BL6 Mice Fed NIH-31 Open Formula Diet [J]. *Toxicol Pathol*, 1995, 23 (5) : 570–582.
- [40] Maita K, Hirano M, Harada T, et al. Mortality, Major Cause of Moribundity, and Spontaneous Tumors in CD-1 Mice [J]. *Toxicol Pathol*, 1988, 16 (3) : 340–349.
- [41] Kodell RL, Blackwell BN, Bucci TJ, et al. Cause-of-Death Assignment at the National Center for Toxicological Research [J]. *Toxicol Pathol*, 1995, 23 (3) : 241–247.
- [42] Snyder JM, Ward JM, Treuting PM. Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies [J]. *Vet Pathol*, 2016, 53 (2) : 233–243.
- [43] Lipman RD, Chrisp CE, Hazzard DG, et al. Pathologic Characterization of Brown Norway, Brown Norway x Fischer 344, and Fischer 344 x Brown Norway Rats with Relation

- to Age [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1996, 51 (1): B54-B59.
- [44] Szymanska H, Lechowska-Piskorowska J, Krysiak E, et al. Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Aging Mice of Unique and Common Inbred Strains Contribution to Modeling of Human Neoplastic Diseases [J]. *Vet Pathol*, 2014, 51 (3): 663-679.
- [45] Treuting PM, Linford NJ, Knoblauch SE, et al. Reduction of Age-Associated Pathology in Old Mice by Overexpression of Catalase in Mitochondria [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008, 63 (8): 813-822.
- [46] Nadon NL, Strong R, Miller RA, et al. Design of Aging Intervention Studies: the NIA Interventions Testing Program [J]. *Age*: Dordr, 2008, 30 (4): 187-199.
- [47] Son WC. Factors Contributory to Early Death of Young CD-1 Mice in Carcinogenicity Studies [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 145 (1): 88-98.
- [48] Ladiges W, Ikeno Y, Liggitt D, et al. Pathology is A Critical Aspect of Preclinical Aging Studies [J]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2013, 3: doi: 10.3402/pba.v3i0.22451.
- [49] Adissu HA, Estabel J, Sunter D, et al. Histopathology Reveals Correlative and Unique Phenotypes in a High-Throughput Mouse Phenotyping Screen [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7 (5): 515-524.
- [50] Scudamore CL. Integrating Pathology into Human Disease Modelling: How to Eat the Elephant [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7 (5): 495-497.
- [51] Sundberg JP, Berndt A, Sundberg BA, et al. The Mouse as A Model for Understanding Chronic Diseases of Aging: the Histopathologic Basis of Aging in Inbred Mice [J]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2011, 1: doi: 10.3402/pba.v1i0.7179.
- [52] Brayton C, Justice M, Montgomery CA. Evaluating Mutant Mice: Anatomic Pathology [J]. *Vet Pathol*, 2001, 38 (1): 1-19.
- [53] Conover CA, Bale LK, Mader JR, et al. Longevity and Age-Related Pathology of Mice Deficient in Pregnancy-Associated Plasma Protein-A [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65 (6): 590-599.
- [54] Pettan-Brewer C, Treuting PM. Practical Pathology of Aging Mice [J]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2011, 1: doi: 10.3402/pba.v1i0.7202.
- [55] Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for Valid Histopathologic Scoring In Research [J]. *Vet Pathol*, 2013, 50 (6): 1007-1015.
- [56] Draft Recommendations on Classification of Rodent Neoplasms for Peto Analysis [J]. *Toxicol Pathol*, 2001, 29 (2): 265-268.
- [57] Manskikh VN. The Problem of Determination of Cause of Laboratory Animal's Death: A Critical Review of Definitions of "Fatal" and "Incidental" Lesions [J]. *Biochemistry*: Mosc, 2014, 79 (10): 1075-1080.

(收稿日期 2016年9月9日 编辑 范玉明)