



中华人民共和国国家标准

GB/T 21759—2008

化学品 慢性毒性试验方法

Chemicals—Test method of chronic toxicity

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 慢 性 毒 性 试 验 方 法
GB/T 21759—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

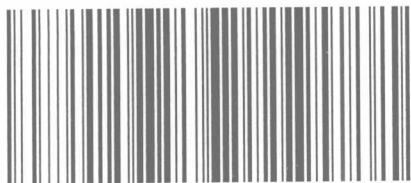
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

*

书号:155066·1-32208 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 21759-2008

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 No. 452(1981 年)《慢性毒性试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改:

- 文本格式按 GB/T 1.1—2000 做了编辑性修改;
- 增加“OECD 引言”部分,把 OECD 化学品测试方法 No. 452 中的试验目的纳入“OECD 引言”中;
- 增加了“范围”一章;
- 删除了 OECD 化学品测试方法 No. 452 的“参考文献”部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:深圳出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位:上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李英、刘丽、余淑媛、陈向阳、孙小颖、刘贤杰、张伟亚、吴景武、刘宇泓、陈相、蒋伟。

OECD 引言

引言

慢性经口毒性试验的必备资料

- 固体或液体受试物；
- 受试物化学性质；
- 受试物的纯度和杂质；
- 溶解性；
- 稳定性,包括在饲料或水中的稳定性；
- 一定 pH 值下的水解情况；
- 形成络合物的能力；
- 熔点/沸点。

慢性吸入毒性试验的必备资料

- 气体、挥发性物质或气溶胶/颗粒受试物；
- 受试物化学性质；
- 受试物的纯度和杂质；
- 液体:蒸气压、沸点；
- 气溶胶/颗粒物:颗粒大小、形状和分散度；
- 闪点；
- 爆炸性。

试验目的

慢性毒性试验的目的是反映某一物质对哺乳动物物种长时间和重复暴露所产生的影响。除了瘤样病变外,对慢性毒性的试验期限仍存在广泛争议。在本试验条件下,潜伏期长或者累积性的作用可能不明显,如致癌作用和缩短生命的非特异作用。除此之外,依照本指导原则能得到主要的慢性毒性的数据,并能显示剂量反应关系。理论上,实验设计和执行应考虑到包括神经、生理、生化、血液的主要毒性检测 and 与暴露相关的形态学(病理)影响。

化学品 慢性毒性试验方法

1 范围

本标准规定了化学品慢性毒性试验方法的范围、试验方法、数据和报告。

本标准适用于化学品慢性毒性试验。

2 试验方法

2.1 受试物及其测试混合物的特性

开始毒理研究之前,应该了解受试物的特性。化学品特性和结构的信息有时可以用于基于构效关系的分析,以表明可能的生物或毒理活性。受试物的物理化学性质为染毒途径的选择,试验的设计、受试物的处理和储存提供了重要依据。

在任何毒性研究开始前,必须了解受试物的组成,包括主要杂质。

在慢性毒性试验前,还必须了解受试物的相关理化特性,包括受试物稳定性。

在开始长期研究前应先建立受试物(可能的情况下包括主要杂质)在赋形剂和生物材料中的定性和定量分析方法。

2.2 实验动物

2.2.1 动物种类的选择

原则上,慢性毒性试验推荐选用啮齿类与非啮齿类两类哺乳动物。

应该选用遗传背景明确、通常使用、具有抵抗疾病能力且无先天缺陷的动物。啮齿类动物一般选用大鼠;非啮齿类动物一般选用犬或灵长类,由于它们个体较大,便于临床和生化检测,而且犬或灵长类动物也比较容易获得。但国际上对使用这类动物有诸多限制。如果仅有啮齿类动物的资料,将资料外推到人时敏感性降低。

这样的情况不能采用通常的方式解决。虽然建议从啮齿类和非啮齿类动物中获得慢性作用结果,但长期试验动物种类的选择应该根据实际情况和以往的实验结果。在一些情况下,使用单一种属动物就可以为评价化学品危险性提供足够的数据。

2.2.2 实验动物的性别及起始周龄

雌雄两种性别都应使用。

试验应用年轻、健康的实验动物。啮齿类动物应该在断奶和适应环境之后的快速生长期开始试验。

2.2.3 试验规模

应使用足够数量的动物,确保试验结束时每组有足够的动物满足详尽的生物学研究。特别重要的是要使用随机选择程序合理分配试验组和对照组的动物。

如用啮齿类动物,每个剂量组和其对照组中每种性别应至少各 20 只,非啮齿类动物则每种性别至少各 4 只。如果考虑到中途会有死亡,则应增加相应数量。

2.2.4 动物饲养管理、饮食、供水

为了保证试验结果的高度可靠,环境条件的严格控制和合适的动物管理方法都是重要的先决条件。动物设备也应得到有效监控,以避免意外事故的发生。

动物房条件、疾病、药物治疗、饮食、空气、水中的杂质、垫料、主要的动物护理设施等因素都能对动物实验结果产生巨大影响。

如果啮齿类动物繁殖或被饲养在无特殊致病原的环境下,这将有助于对并发症传染疾病或寄生虫的控制。长期实验中使用的垫料应消毒。动物饲养室应安静,通风良好,能控制照明、温度和湿度。动

物饲养一段时间,适应了环境条件或者用于试验的外部来源的动物经过足够的隔离期才可以开始实验。

不同种群的动物应当避免饲养在同一个房间里。一个房间一般仅饲养染毒一种受试物的动物,以避免发生交叉污染。在同一个房间饲养的作为对照组的实验动物也是同样要求。如果对照组动物被饲养在不同的房间,可能会出现数据评价的其他问题。

笼子,实验架和其他设备应能经常定期清理,并易于清洗。但不应使用消毒剂和杀虫剂,特别是在动物能接触到的地方,因为这些生物活性物质对试验结果可能产生影响。更多的动物饲养操作可以在科学文献、动物福利出版物和良好实验室规范的官方文件,包括 OECD 的文件中找到。

饲料应当满足实验动物的营养需要,且不含可能会影响实验结果的杂质,因为膳食污染物和各种营养成分水平可以改变实验动物的生理过程。啮齿类动物自由进食与饮水,每周至少更换饲料一次。当采用非啮齿类动物如犬时,必须注意每天都要喂食。目前,可以使用三类饲料:常规(标准)、人工合成和各种公开配方饲料。前两项广泛使用于致癌性生物测定。无论选择哪种饲料,应该通过检测基础饮食中污染物含量来定期监测营养物质量。以期获得饮食对动物新陈代谢及寿命的影响。

当受试物本身也是一种营养物质(如工业处理过的蛋白质或淀粉;单细胞蛋白;辐照食物产品)时,特别要注意饲料的组成。因为这些物质在饲料中高达 20%至 60%,替代了相应的营养物质(如改良的与非改良淀粉,单个细胞蛋白质和大豆粉)。

全世界工业和农业化学品使用模式的改变妨碍了 OECD 对饲料污染物列表的协调工作。虽然事实如此,常见的能影响毒性作用的饲料成分(如抗氧化剂,不饱和脂肪酸,硒)不应超出规定浓度。必须特别关注几种常见污染物对慢性毒性评估产生的潜在影响,它们包括农药残留、氯化芳烃和多环芳烃、雌激素、重金属、亚硝胺、真菌毒素等。

此外,实验室可以定期地对基础饲料中的营养和无意带人的污染物,包括致癌物质进行分析,分析结果应该予以保留,并列入每种物质的最终报告中。

当受试物通过饮水或饲料给予时,必须进行稳定性测试。慢性研究之前受试物稳定性和均一性的检测有利于决定饮食处方配制的频率和需要的监督。

当饲料需要灭菌时,应该清楚该步骤对受试物和饮食成分的影响。应该适当调整营养水平。化学杀菌剂(如环氧乙烷)对活体鉴定的影响也应该明确。

慢性研究中,研究者应该知道水中潜在的污染物。虽然人类用水的情况总的来说是令人满意的,但也应该确知饮用水的成分。

2.3 试验条件

2.3.1 剂量组和染毒频率

在慢性毒性试验中,希望得到剂量反应关系以及最大未观察到毒性作用剂量(NOTEL)。因此,除了相应的对照组外,至少还应该选用三个剂量组。最高剂量组会引起一些中毒迹象但不至于造成过度的损害。低剂量应不会产生毒性作用。与饲料形成混合物的,除了营养物之外,最高浓度不应超过 5% (见饮食部分)。

染毒的频率一般为每天一次,但可以根据选择的途径稍作改变。如果化合物是通过饮用水或饲料给予的,则应该为连续染毒。染毒频率可以根据受试物的毒物代谢动力学性质进行调整。

2.3.2 对照组

必须设置对照组,除不接触受试物外,对照组的其他条件与测试组完全一致。

在特殊情况下,例如在涉及气溶胶的吸入试验或在经口试验中使用非特征生物活性的乳化剂,应当采用阴性对照组加以对比。

阴性对照组除不接触受试物或任何赋形剂外,其他各方面都应和测试组采用同样的处理方式。

2.4 试验步骤

2.4.1 染毒途径

主要的染毒途径有经口、经皮和吸入三种。染毒途径的选择取决于受试物的物理和化学特性以及

与人类相似的接触方式。

一般来说,根据所选的路线和染毒途径不同,暴露的频率可能会有所变动,如果可能的话,应根据受试物的毒物代谢动力学特性予以调整。

2.4.2 经口试验

如果受试物是通过胃肠道吸收,经口途径是首选。在长时间研究过程中,可将受试物混入饲料或饮水中,或采用灌胃法或者胶囊法染毒。如果受试物是混在饮水或饲料中,那么染毒是连续的。如果受试物混于饲料中,则除营养物质外,最高的测试浓度不超过5%(见2.2.4饮食部分)。理论上,一个星期染毒7d,因为在灌胃或用胶囊法研究中发现每周染毒5d动物会在染毒停顿后得到一定程度的恢复,从而影响到结果和最后评价。但是,考虑到实际工作方便,也可考虑每周染毒5d。

2.4.3 经皮试验

皮肤暴露可被选作为模拟人类暴露的一种主要途径以及作为诱导皮肤病变的一种模式。

2.4.4 吸入试验

在技术问题上,吸入染毒试验比其他试验更复杂,该条提供了一些关于吸入试验的具体操作。不过,在某些的情况下,气管灌输可以成为此方法的有效替代。

模仿职业接触方式,染毒时间为每天6h,每周5d(称间歇暴露方式);按环境污染物接触方式为每天22h~24h,留下约1h给动物喂食和清理染毒柜,每周7d(称连续暴露方式)。染毒时间从染毒柜达到预定浓度开始计算。这两种情况,动物都暴露在固定受试物浓度条件下。这两种暴露方式主要不同点是间歇暴露的动物每天有17h~18h的恢复期,而且在周末恢复时间更长。

根据研究目的和模仿人类主要的接触方式选择间歇性或者连续性暴露。但应考虑技术上的困难。如连续暴露方式模仿环境暴露条件有优势,但对设备的要求高,如提供饮水和饲料设置、气溶胶发生装置、浓度监测装置等。间歇暴露方式的染毒柜要求较低,且在染毒过程可不必提供饮水和饲料。

2.4.4.1 染毒柜

染毒柜的设计必须保证换气次数能达到12次/h~15次/h;柜内氧含量大于或等于19%;柜内受试样品浓度均匀;对照组与测试组染毒柜在结构和设计上应一致;应减少室内动物数,使得受试物暴露最大化。动物所占体积不超过室内体积的5%;染毒柜应保持一定的负压,以防受试样品意外漏出。

2.4.4.2 物理测量

以下测量应谨慎操作,以避免气体浓度波动过大或染毒柜操作偏离较大:

- 气流。通过室内的气流速度最好应该连续监测。
- 柜内受试物浓度:尽量保持恒定。
- 柜内温湿度:对于啮齿动物,保持温度在 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度30%~70%(水性受试物染毒时除外),应连续监测。
- 颗粒物大小的测量:颗粒物包括染毒柜中的液体或固体气溶胶,气溶胶颗粒物应该是实验动物可吸入的颗粒物。染毒柜气体样品应在动物的呼吸水平下获取。动物暴露的空气样品应具有颗粒分布的代表性,并且应考虑在重力的作用下所有的悬浮气溶胶,即使大部分的气溶胶是不会被吸入。粒度分析在气溶胶发生时要频繁进行,以确保气溶胶的稳定,此后暴露过程中也要经常进行颗粒物分布连续性的检测。

2.5 研究期限

染毒期限至少应为12个月。

3 数据和报告

3.1 观察

试验期内每天至少仔细观察一次,另外,增加观察次数并采取适当的措施可以减少动物损失,如对死亡动物进行解剖或冻存,对虚弱或濒死动物进行隔离或处死。仔细观察毒性作用的开始时间及其发

展情况,尽可能减少因疾病、自溶或被自相残杀造成的动物损失。

应记录所有动物的临床症状,包括神经系统,视觉变化以及死亡率。毒性症状的发生和发展情况,包括可疑肿块,应作相应的记录。

所有动物的体重在试验的前13周每周记录一次,此后至少每4周记录一次。摄食量在前13周每周记录一次,此后如动物健康状况或体重无异常改变可3个月记录一次。

3.1.1 血液学检查

血液学检查可包括血红蛋白浓度、红细胞压积、红细胞计数、白细胞计数及分类、血小板数、凝血功能等指标。在染毒开始后第3、6个月各检查一次,此后每隔约6个月检查一次,试验结束时所有非啮齿类动物的血样进行检测,大鼠则每组每性别各10只,如有可能,每次检查的动物最好相同。此外,应从非啮齿类动物中采集试验前的血样。

如果在试验过程中,临床观察表明某动物的健康状况发生恶化,则对其应进行血细胞分类计数。

通常先对高剂量组和对照组进行血细胞分类计数。当高剂量组和对照组存在较大差异时,应对较低剂量组进行血细胞分类计数。

3.1.2 尿液检查

收集所有非啮齿类动物和每组每性别各10只大鼠的尿液进行检测。如有可能,每次检查的动物最好相同,时间间隔与血液学检查相同。以下的检查指标来源于单个动物,或者来源于啮齿类动物混合样本/性别/组别:

- 外观:每只动物的尿量和尿比重;
- 蛋白质、葡萄糖、酮类、潜隐血(半定量法);
- 沉淀物的镜检(半定量法)。

3.1.3 临床生化检查

大约每隔6个月及试验结束时采集所有非啮齿类动物以及每组每性别各10只大鼠的血样,如有可能,每次检查的动物最好相同。此外,应从非啮齿类动物中采集试验前的血样。提取血浆,对以下指标进行检测:

- 总蛋白质浓度;
- 白蛋白浓度;
- 肝功能测试(例如,碱性磷酸酶活性、谷氨酸氨基转移酶活性、天门冬氨酸氨基转移酶活性、 γ -谷氨酰转肽酶、鸟氨酸脱羧酶);
- 糖代谢,如空腹血糖浓度;
- 肾功能检验,如血尿素氮。

3.2 病理检查

病理检查是慢性毒性试验的基础,包括肉眼大体检查和镜检。因此必须予以足够的重视,并作好详细的描述,诊断和记录。

3.2.1 尸体解剖

大体剖检是病理检查重要的一环,如果做得好,对镜检有极大帮助。不管镜检进行的多么完美,也不能替代大体剖检。进行大体解剖时应有受过培训的动物病理学家在场指导。

所有动物,包括试验过程中死亡或濒死而被处死的动物皆应进行完整的大体剖检。处死动物前应采集血样进行血细胞分类计数。所有肉眼可见病变、肿瘤或可疑肿块都应保存。应分析大体剖检与镜检结果之间的联系。

所有的器官和组织都应保存下来以供镜检。一般包括下列器官和组织:脑*(髓/脑桥,小脑皮层,大脑皮层),垂体,甲状腺(包括甲旁腺),胸腺,肺(包括气管),心脏,主动脉,唾液腺,肝*,脾,肾*,肾上腺*,食管,胃,十二指肠,空肠,回肠,盲肠,结肠,直肠,子宫,膀胱,淋巴结,胰腺,性腺*,附属生殖器官,雌性乳腺,皮肤,肌肉,外周神经,脊髓(颈,胸,腰),胸骨(包括骨髓),股骨(包括关节)和眼睛。肺和

膀胱用固定剂填充能保存更好,在吸入研究中必须扩张肺以供组织病理学检查。在吸入染毒试验中,全部呼吸道包括咽、喉与鼻腔都应研究。

如果进行了其他的临床检查,则相应的信息应在镜检前得到,因为其可能对镜检提供重要的指导。

注:有*号者需称重,大鼠每组每一性别可称10只,非啮齿类动物包括甲状腺及甲状旁腺应全部称重。

3.2.2 组织病理学检查

所有肉眼可见肿瘤和其他的病变都应进行病理检查。并可循以下顺序检查:

- a) 对所有发现病变的组织器官进行镜检并详细描述:
 - 在试验中途死亡或处死的动物;
 - 所有高剂量组和对照组动物。
- b) 当器官和组织异常是由于受试物引起或可能由受试物引起时,则对低剂量组也要进行检查。
- c) 试验结果证明能明显改变动物正常寿命,或诱发能影响毒性反应的效应,则下一低剂量组也应进行如上描述的病理组织学检查。
- d) 各组动物(在同样的实验条件下)有共同病理损害时,历史对照数据在正确评价暴露组动物引起的可观察到的重要改变是必须的。

3.3 试验报告

试验报告必须包括以下内容:

- 3.3.1 实验室名称及地址;
- 3.3.2 全部原始数据;
- 3.3.3 试验和报告负责人;

此外,试验报告还必须包括所有必要的信息,并对试验过程和结果评价提供全面而准确的描述。报告应包括摘要、资料分析和结论等,摘要必须强调数据和观察现象以及任何与对照组相比预示毒性的作用。
