

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.18—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 18: Subchronic oral toxicity test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布



前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：急性经口毒性试验；
- 第 3 部分：急性经皮毒性试验；
- 第 4 部分：急性吸入毒性试验；
- 第 5 部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第 6 部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第 7 部分：皮肤致敏试验；
- 第 8 部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第 9 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 10 部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第 12 部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第 14 部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第 15 部分：亚急性经口毒性试验；
- 第 16 部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第 17 部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第 19 部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第 21 部分：致畸试验；
- 第 22 部分：两代繁殖毒性试验；
- 第 23 部分：迟发性神经毒性试验；
- 第 24 部分：慢性经口毒性试验；
- 第 25 部分：慢性经皮毒性试验；
- 第 26 部分：慢性吸入毒性试验；
- 第 27 部分：致癌试验；
- 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第 29 部分：毒物代谢动力学试验；
- 第 30 部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第 31 部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第 32 部分：酵母菌基因突变试验；
- 第 33 部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第 34 部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第 35 部分：体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验；
- 第 36 部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 18 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:广东省职业病防治院、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:黄建勋、孙金秀、高耘、刘海龙。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 18 部分:亚慢性经口毒性试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了啮齿类动物亚慢性经口毒性试验目的、试验概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品的亚慢性经口毒性。

2 规范性引用文件

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

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒性评价程序和试验方法 第 1 部分:总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

靶器官 target organ

化学物质在体内呈现毒作用,并引起典型病变的主要器官。

4 试验目的

确定一定时期内经口反复接触受试化学品引起的毒性作用,了解受试样品毒作用的靶器官,取得受试样品亚慢性经口的 NOAEL,为确定慢性毒性试验的剂量和初步计算人群接触的安全水平提供依据。

5 试验概述

各组实验动物每日经口摄入不同剂量的受试样品,连续染毒 3 个月(90 d),有时可根据需要染毒 6 个月(180 d),染毒期间每日观察动物的毒性反应。在染毒期间死亡、濒死的动物要进行大体解剖。染毒结束后所有存活的动物均要处死、剖检以及作适当的病理组织学检查。

6 试验方法

6.1 受试样品

6.1.1 在开始本试验之前,应尽量搜集受试样品现有的以下各种资料:

a) 受试样品的商品名和其他名称及 CAS 号。

- b) 受试样品的结构式、分子式和相对分子质量。
- c) 受试样品的理化性质(可包括:外观、沸点、熔点、折射率、密度、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、光化学性质、电离度、粒度等)。重要的参数还包括稳定性(包括在介质或饲料中)。
- d) 受试样品的分析方法。
- e) 受试样品的生产方法、合成路线、杂质、种类和含量。
- f) 受试样品(包括在介质或饲料中)要有长期储存的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。
- g) 人类每日可能接触的途径和水平。

6.1.2 接受样品的日期应登记。开始试验前应有适当数量的受试样品。样品来源和批号应相同,尽可能使用同一批生产的受试样品,否则,每一批受试样品的纯度和杂质要分别测定。

6.2 实验动物和饲养环境

6.2.1 实验动物

常规选择啮齿类动物,首选大鼠。动物断奶后尽早进行试验,尽量使动物在其体重快速增长期有更长的时间接触受试样品。大鼠6周龄最好,不可超过9周龄,但动物体重的变动范围按性别不应超出平均体重的20%。染毒开始前至少要有3d时间使实验动物适应相应的饲养环境,并在这段时间内观察实验动物的状态。

6.2.2 动物的性别和数量

实验动物随机分组,每组至少20只,雌雄各半。但是考虑到亚慢性试验的重要性,应适当增加每组雌雄动物数。若计划在试验过程中处死动物,需增加计划处死的动物数。试验结束时的动物数需达到能够有效评价受试样品毒性作用的数量。

6.2.3 环境设施

试验前动物应在符合国家相应规定的试验环境中适应3d,再随机分配到各试验组和对照组动物最好单笼饲养,大鼠群养时每笼不超过5只。

6.3 剂量设计

试验一般设三个染毒组和一个对照组。对照组动物不接触受试样品,其他处理条件均与染毒组相同。高剂量组剂量应使动物产生较明显的毒性效应,但不引起过多动物死亡(死亡率不应超过10%),以免影响结果评价。低剂量组应不出现任何毒性作用。若掌握人群接触水平,则低剂量组剂量应高于人群的实际接触水平。如剂量设计得当,中剂量组可出现较轻的毒性效应,若设多个中剂量组时,应产生不同程度的毒性效应。此外,可另设一附加组作追踪观察,选用20只动物(雌雄各半),给予高剂量受试样品,染毒90d,在全程染毒结束后继续观察一段时间(一般不少于28d),以了解毒性作用的持续性、可逆性或迟发毒作用;也可在试验设计时每组增加一定的动物数,试验结束时每组剖杀部分动物(数量应满足统计分析),部分动物继续作追踪观察。

6.4 受试样品处理

若为染毒目的加入其他溶剂或赋形剂,这些溶剂或赋形剂不应影响受试样品的吸收和毒性作用,必要时应设相应的溶剂或赋形剂对照组。

如果受试样品的毒性较低,则加入饲料的受试样品比例较大,应注意混入饲料中的受试样品不应超过5%,否则会对动物正常营养产生影响。必要时应定期监测饲料或饮水中的受试样品浓度,观察其均匀性和稳定性。

6.5 染毒方法

常用的方法是将受试样品混入饲料或饮水中,每周 7 d 染毒。若受试样品引起饲料和饮水的适口性不良,影响动物正常摄入量,或由于某种原因,受试样品不能加入饲料和饮水中,可采用灌胃法或药囊法,此时每周可染毒 5 d。若采用灌胃方式染毒,则每日染毒时点应相同,并定期(每周)按体重调整灌胃量,维持染毒剂量不变。其他的染毒方式要加以特殊说明。试验期间各组动物染毒的方式应完全相同。

6.6 限量试验

在试验中,如果剂量预期达每天 1 000 mg/kg 体重或以上除人类接触水平的资料表明需用高剂量进行试验外时仍未产生可观测到的毒性效应,而且根据相关结构化合物可以预测受试样品毒性时,可不必设三个剂量水平进行试验。

6.7 临床观察

验期内每天至少观察一次,必要时增加观察次数。对附加组还要增加至少 28 d。

观察期间对动物的任何毒性表现均应记录,记录内容包括发生时间、程度和持续时间。观察应至少包括如下内容:皮肤和被毛、眼和黏膜、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行为习惯等改变。对死亡动物应进行解剖,对质弱或濒死动物应隔离或人道处死和解剖。记录每周摄食量,经饮水染毒时还应记录每天饮水量,记录每周体重变化。试验结束时处死动物作相关检查。

6.8 临床检查

6.8.1 眼科检查

在动物染毒前后,至少应对高剂量组和对照组动物,使用眼科镜或其他有关设备进行眼科检查。若发现动物有眼科变化则应对所有动物进行检查。

6.8.2 血液学检查

试验结束时测定血红蛋白浓度、红细胞数、白细胞总数和分类计数、红细胞压积等,必要时测定凝血功能如凝血时间、凝血酶原时间、凝血激酶时间或血小板等指标。

血液标本应在专用实验室采取,并在适当条件下储存。

6.8.3 血液生化检查

至少应在染毒结束时进行,必要时应在染毒中期也进行检查。染毒结束时如有异常的指标,附加组追踪观察结束时应进行检查。检查指标包括肝功能、肾功能、电解质平衡、碳水化合物代谢等。测定指标至少应包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)等,还应根据受试样品可能的毒作用表现补充如下指标:如鸟氨酸脱羧酶、 γ -谷氨酰转肽酶、总胆固醇、甘油三酯、高铁血红蛋白、胆碱酯酶、钙、磷、氯、钠、钾、血糖等。此外,还可根据所观察到的毒性作用进行其他更大范围的临床生化检查,以便进行全面的毒性评价。

6.8.4 尿液检查

一般应进行尿液的常规检查,包括外观、pH 值、尿蛋白、尿糖和血细胞。如尿样分析可作为预期或观察得到的毒性指标,则可增加有关的尿液检查项目。

6.9 病理检查

6.9.1 大体解剖

所有动物皆应进行大体检查,内容应包括:体表,各开口处,颅、胸、腹腔及其内容物。解剖分离后的肝、肺、肾、肾上腺、睾丸(卵巢)、附睾、脾、脑、心脏等应尽快称重,以防水分丢失,并应立即保存在固定液中,供病理组织学检查。

心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸(卵巢)等的绝对质量和脏器系数(脏器系数=脏器质量/体重×100%)为必测指标,必要时加测其他脏器绝对质量和脏器系数。

6.9.2 病理组织学检查

通常至少应包括心、肝、脾、肾、胃、大脑、肺、睾丸(卵巢)、附睾、肾上腺等。根据需要,还可包括脑桥、小脑和大脑皮层、脑垂体、主动脉、气管、胰、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、前列腺、子宫、乳腺、皮肤、肌肉、胸骨(包括骨髓)、淋巴结、眼球等。

如果毒性作用提示或作为被研究的靶器官时还可选择检查唾液腺、生殖附属器官、眼、股骨(包括关节面)、脊髓(包括颈部、胸部、腰部)、泪腺、雌性乳腺、大腿肌肉等。

要先对高剂量组和对照组动物及系统解剖时发现的异常组织作详尽的病理组织学检查,其他剂量组一般仅在高剂量组有异常发现时才进行检查。在附加组,应对那些在染毒组呈现毒性作用的组织和器官进行检查。

中、低剂量组动物也需做肺的病理组织学检查,肺部感染情况可判断动物的健康状况。必要时可对肝、肾做同样检查。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

可通过表格形式总结试验结果,显示动物体重和摄食量/饮水量、试验开始时各组动物数、出现毒性反应的动物数、毒性反应的类型和动物出现毒性反应的百分比。对所有数据应采用适当的统计学方法进行评价。

7.2 结果评价

亚慢性经口毒性试验结果应结合前期试验结果,综合考虑毒性效应指标和解剖及病理组织学检查结果进行综合评价。毒性评价应包括受试样品染毒剂量是否出现毒性反应、毒性反应的发生率及其程度间的关系。这些反应包括行为或临床异常、肉眼可见的损伤、靶器官、体重变化情况、死亡效应以及其他一般或特殊的毒性作用。成功的亚慢性试验应能够提出统计学上有意义的 NOAEL。

8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下内容:

- a) 试验方法;
- b) 按性别和剂量的毒性反应数据;
- c) 试验期内动物死亡的数量和时间;
- d) 毒性作用或其他作用;
- e) 每种异常症状出现的时间及其转归情况;

- f) 动物体重资料、摄食量和饮水量资料；
- g) 眼科检查结果；
- h) 血液学检查结果；
- i) 临床生化检查结果；
- j) 大体解剖所见；
- k) 病理组织学检查所见的详细描述；
- l) 对结果进行处理的统计学方法；
- m) 确定 NOAEL；
- n) 结论。

9 结果解释

亚慢性经口毒性试验能够提供受试样品在经口反复接触时的毒性作用资料。虽然其试验结果仅能有限地外推到人,但它可为确定人群接触的 NOAEL 和允许接触水平提供有价值的信息。
