

ICS 13.100
C 52

GBZ

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.20—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 20: Subchronic inhalation 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》现拟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/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 20 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、李霜。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 20 部分:亚慢性吸入毒性试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了啮齿类动物亚慢性吸入毒性试验的目的、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吸入毒性。

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 化学品毒理学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

实验动物出现由受试样品引起的明显毒性作用的任何器官。

4 试验目的

确定一定时期内经呼吸道反复接触受试化学品引起的毒性作用,了解毒作用靶器官、损害程度和无作用浓度水平,为确定慢性呼吸道毒性试验的浓度提供依据。

5 试验概述

各组实验动物每日经呼吸道吸入不同浓度的受试样品,连续染毒 3 个月(90 d),有时候可根据需要染毒 6 个月(180 d)。如使用溶剂或其他介质,需设溶剂(介质)对照组。试验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、剖验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 资料收集

在开始本试验之前,应尽量搜集受试样品现有的各种资料:

- 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) 试样品的物理、化学性质(可包括:外观、沸点、熔点、密度、折射率、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、稳定性、ppm 和 mg/m^3 换算系数、光化学性质、电离度、粒度等)；
- 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、种类与含量；
- f) 储存方法:要有长期储存受试样品(包括在介质或饲料中)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。气态受试样品可直接染毒。若受试样品为液体,可直接雾化后染毒,如果较黏稠难以雾化,可加入介质作适当稀释。若受试样品为固体,应将其粉碎后以粉尘染毒,至少应保证相当部分为可吸入性粉尘(粒径 $\leq 5\ \mu\text{m}$);也可将固体受试样品溶解至适当的溶剂(介质)中雾化后染毒。水是首选的介质,若采用其他介质,应考虑其毒性和刺激性等,并按要求设介质对照。

6.2 实验动物和饲养环境

6.2.1 动物的选择和观察

常用啮齿类动物,首选大鼠,一般选用 6 周~8 周龄的大鼠。也可使用其他种属如豚鼠等进行试验。动物体重的变动范围按性别不应超出平均体重的 20%。试验前动物要在试验环境中至少适应 3 d~5 d,并在这段时间内观察实验动物的状态。若本试验为其他长期试验的预备试验,则本试验所选用的动物应与以后选用的动物相同。

6.2.2 动物的性别和数量

每一剂量组实验动物至少应有 20 只,雌雄各半。若在试验过程中处死动物,则应增加计划处死的动物数。

6.2.3 实验动物和动物试验的环境设施

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定。选用常规饲料,饮水不限制。动物可分性别群饲或单只饲养,群饲时应能清楚观察笼内每只动物的情况。

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,其他处理均与染毒组相同。高浓度组应使动物产生较明显的毒性效应,但不引起过多动物死亡。低浓度组应不出现任何毒性作用。若掌握人群接触水平,则低染毒浓度应高于人群的实际接触水平。如剂量设计得当,中浓度组可引起较轻的毒性效应,若设多个中浓度组时,应产生不同程度的毒性效应。此外,可另设一追踪观察的附加组,选用 20 只动物(雌雄各半),与高浓度组一同染毒,在全程染毒结束后继续观察一段时间(一般不少于 28 d),以了解毒性作用的持续性、可逆性或迟发毒作用。但应注意,高浓度组与附加组一起染毒,动物数的增加不应明显影响该组试验条件与其他各组条件的一致,否则,在试验设计时每组均增加一定的动物数。试验结束时每组剖杀部分动物(数量以满足统计分析为原则),部分动物继续观察。

6.4 染毒时间

按职业接触方式为每天 6 h,在必要时,也可延长或缩短染毒时间,但应说明理由及依据。每周 5 d。按环境污染物接触方式为每天 23 h;留下 1 h 给动物喂食和清理染毒柜,每周 7 d。受试样品浓度以 mg/m^3 计。

6.5 染毒方式

应采用动式染毒。可采用整体染毒法、头面式或口鼻式方法进行。整体染毒时,动物可舔食皮毛和笼具上吸附的受试样品,且少量受试样品可能经皮吸收,但所需设备较为简便,且与实际接触气体化学品的模式较一致;头面式或口鼻式动式吸入染毒时,动物仅头面部或口鼻部暴露在含受试样品空气中,可避免全身染毒法的缺点。染毒期间动物不进食但可饮水(头面式或口鼻式除外)。

6.6 染毒设施、试验环境和受试样品浓度监测

应保证笼内动物不太拥挤,使动物能最大限度接触受试样品;动物所占体积不超过染毒柜体积的 5%;应保证实验动物的正常需气量;染毒柜换气次数 12 次/h~15 次/h;柜内氧含量 $\geq 19\%$;定期记录染毒柜中温度和相对湿度;在试验进行过程中连续监测气流量;在动物呼吸带采样测定受试样品浓度,在试验开始时每小时一次,以后(如一周后)若浓度稳定,可适当减少采样测定的次数,有条件时最好能连续监测受试样品的浓度。染毒柜应保持一定的负压,以防受试样品意外漏出。

6.7 临床观察

试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、肢体运动和行为活动等改变。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

在动物染毒前和染毒后,最好对所有实验动物,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 血常规检查和其他血液指标检查

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。如设立附加组,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。测定指标至少应包括红细胞压积、血红蛋白浓度、红细胞数、血小板数、白细胞总数和分类,必要时测定网织红细胞数、凝血功能等指标。

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

一般须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,备病理组织学检查。

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 \times 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

肺和气管病理检查为必检指标。至少应包括心、肝、脾、肾、胃、大脑、肺、气管、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、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、皮肤、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

亚慢性吸入毒性试验结果应结合前期试验结果,并考虑到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之间的关系。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(或)饮水量资料;
- g) 动物暴露资料包括所用染毒装置情况(何种设计、类型、尺寸、气源、排出气的处理、染毒时动物的安置情况等)、空气温湿度、计算浓度、实测浓度,如有可能,提供粒子的分散度等;
- h) 眼科检查结果;
- i) 血液学检查结果;
- j) 临床生化检查结果;
- k) 大体解剖所见;
- l) 病理组织学检查所见的详细描述;
- m) 对结果进行处理的统计学方法;
- n) 确定 NOAEL;
- o) 结论。

9 结果解释

亚慢性吸入毒性试验能够提供受试样品在反复吸入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 和容许接触水平提供有价值的信息。
