

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.12—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 12 部分:体内哺乳动物骨髓细胞染色体 畸变试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 12: In vivo mammalian bone marrow chromosome aberration 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 12 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:湖南省劳动卫生职业病防治所、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:陆丹、孙金秀、常兵、林铮。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 12 部分:体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验的目的、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对骨髓细胞的遗传毒性。

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

染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色单体断裂或染色单体断裂重组的结构损伤。

3.2

染色体型畸变 chromosome-type aberration

为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组改变的结构损伤。

3.3

核内复制 endoreduplication

在 DNA 复制的 S 期之后,细胞核未进行有丝分裂就开始了另一个 S 期的过程。其结果是染色体有 4,8,16,……倍的染色质。

3.4

裂隙 gap

染色体或染色单体损伤的长度小于一个染色单体的宽度,为染色单体的最小的错误排列。

3.5

染色体数目畸变 chromosomal numerical aberration

染色体数目发生改变,不同于正常核型。

3.6

多倍体 polyploidy

哺乳动物染色体数目正常是二倍体,在化学诱变剂的作用下,染色体数目成倍地增加成三倍体、四

倍体等。

3.7

染色体结构的畸变 chromosomal structure aberration

通过显微镜可以直接观察到的发生在细胞有丝分裂中期的染色体的结构变化。如染色体中间缺失和断片,染色体互换和内交换等。

4 试验目的

本试验是一项致突变试验,用来检测整体动物骨髓细胞染色体畸变,以评价受试样品致突变的可能性。

5 试验概述

动物通过适当的途径接触受试样品,一定时间后处死动物。动物处死前,用细胞分裂中期阻断剂处理,处死后取出骨髓,经低渗、固定后制备骨髓细胞染色体标本,经染色,在显微镜下观察中期分裂相细胞,分析细胞染色体畸变。

6 试验方法

6.1 试剂

- 6.1.1 0.1% 秋水仙素:置于棕色瓶中,冰箱保存。
- 6.1.2 0.9% 氯化钠溶液。
- 6.1.3 0.075 mol/L 氯化钾溶液。
- 6.1.4 固定液:甲醇与冰醋酸以 3:1 混合,临用时现配。
- 6.1.5 姬姆萨(Giemsa)染液:

Giemsa 染料	3.8 g
甲醇	375 mL
甘油	125 mL

配制:将 Giemsa 染料和少量甲醇于乳钵里仔细研磨,再加入甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加入 125 mL 甘油,混合均匀。置 37℃ 恒温箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,促使染料的充分溶解。取出过滤,两周后使用。

6.1.6 磷酸缓盐冲液(pH 7.4):

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液:磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.47 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液:磷酸二氢钾(KH_2PO_4)49.07 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 80 mL 与 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液 20 mL 混合。

6.1.7 Giemsa 应用液:

取 1 份 Giemsa 染液与 9 份 1/15 mol/L 磷酸缓盐冲液混合而成。临用时配制。

全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

6.2 受试样品处理

受试样品一般应新鲜配制。如果有资料证明以溶液贮存稳定,可以不必新鲜配制。固体受试样品应溶于或悬于适当的溶剂或载体中,并进行稀释。液体受试样品可直接使用或稀释后使用。根据受试

样品的理化性质(水溶性/脂溶性)确定受试样品所用的溶剂或载体。但所用溶剂或载体在使用剂量水平对实验动物应不产生毒作用,且不与受试样品发生任何化学反应。通常用蒸馏水、等渗盐水、植物油、食用淀粉、羧甲基纤维素钠等。如非常用的溶剂或载体,应有参考资料说明其成分及选做溶剂的原因。

6.3 对照

6.3.1 每次试验每一性别都应设置相应的阳性和阴性对照(溶剂/载体),除不使用受试样品外,其他处理与受试样品组一致。

6.3.2 阳性对照组动物体内应能形成可被检测的高于背景骨髓细胞染色体结构畸变。阳性对照组剂量设置应使致染色体畸变效应明显,但以不能使看片者一看即知编码玻片底细。可只取一个采样点来证明阳性对照。最好使用与受试样品化学分类相关的阳性对照化合物。常用的阳性对照物有:

- 甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, CAS号 62-50-0);
- 乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea, CAS号 759-73-9);
- 丝裂霉素C(mitomycin C, CAS号 50-07-7);
- 环磷酰胺(cyclophosphamide, CAS号 50-18-0);
- 单水环磷酰胺(cyclophosphamide monohydrate, CAS号 6055-19-2);
- 三亚乙基胺(triethylenemelamine, CAS号 51-18-3)。

6.3.3 阴性对照由溶剂或载体组成。是否在每个采样时间点均设置阴性对照,可依据动物间的变异和历史对照资料中的细胞染色体畸变频率判断。如果采用一个采样时间点作阴性对照,最适采样时间点是第一采样时间点。另外,如果没有历史对照资料证明所用溶剂或载体无诱导缺失或突变效应,还应设空白对照。

6.4 实验动物和饲养环境

6.4.1 实验动物:大鼠、小鼠和中国仓鼠是骨髓细胞染色体畸变试验常规使用动物,其他合适的哺乳动物也可选用。应使用健康年轻的成熟动物,如使用小鼠,周龄7周~12周为最好。试验初始,动物体重变化应尽量小,即不能超过雌雄动物平均体重的20%。动物应随机分组,每个处理组和对照组每性别都应有至少5只能用于分析的动物。如试验设有几个采样时间点,则要求每组每性别每个采样时间点都有5只能用于分析的动物。如果有资料证明两性别间毒性作用无差别,则可只用一种性别的动物做试验。对人群暴露有性别差异的化学物质,如某些药剂,则要用相应性别的动物做试验。动物购回后应适应实验室新环境至少3d~5d。

6.4.2 实验动物和动物实验的环境设施应符合国家相应规定,应有合理的动物管理措施并严格控制环境条件,尽量减少人员流动。饲养条件、疾病、药物治疗、饲料的杂质、空气、饮水、垫料等都可能对试验结果产生巨大影响。

6.5 剂量水平

6.5.1 应进行预试验以选择高剂量,为避免出现假阴性结果应适当增大剂量范围。如果受试样品具有毒性,应在第一个采样时间点在最大毒性至最小毒性或无毒性的范围内设三个剂量。第二次采样时间点仅需设置高剂量。高剂量是能使动物出现严重中毒反应的剂量。而有特异生物学活性的物质,在低或无毒剂量(如激素和丝裂源)可采用其他剂量设置标准。高剂量也可为能在骨髓中产生明显毒性的剂量(如抑制骨髓细胞有丝分裂指数达50%以上)。按等比级数2向下设置中、低剂量组。

6.5.2 如剂量水平大于或等于2000 mg/kg体重,24 h内进行一次或两次染毒,不产生可观察到的毒性效应,并且根据结构相关物质的资料不能推断受试样品有遗传毒性,则不必设三个剂量。如染毒14 d则高剂量选用每天2000 mg/kg,染毒14 d以上高剂量选用每天1000 mg/kg。如欲外推人群接触的阈剂量,可能需要采用更高的剂量水平。

6.6 试验步骤

6.6.1 实验动物的处理和采样时间点

6.6.1.1 根据试验目的或受试样品的性质选择染毒途径,宜采用经口灌胃或腹腔注射方式。

6.6.1.2 受试样品一次给予的最大容量不应超过 20 mL/kg。

6.6.1.3 一般情况下染毒一次,或者为便于大容量给药,也可分散剂量染毒,即同一日染毒两次,其间隔时间不超过几小时。若采用其他染毒方式应予以说明。

6.6.1.4 高剂量组动物分为 A、B 两个亚组,分两次采集样品,啮齿类动物采样时间一般为 1.5 个正常细胞周期的间隔期,即 A 组于末次染毒后 12 h~18 h 采集样品。B 组于末次染毒后 36 h~42 h 采集样品;中、低剂量组均于末次染毒后 12 h~18 h 采集样品。如果采用多次染毒方式,只需在最后一次染毒后 12 h~18 h 采一次样。

6.6.1.5 于处死动物采集样品前 3 h~5 h 腹腔注射秋水仙素(4 mg/kg)。

6.6.2 制片

6.6.2.1 骨髓细胞悬液的制备:用颈椎脱臼法处死动物,迅速取出股骨,剔去肌肉,擦净血污,剪去两端的骨骺,用注射器吸取生理盐水,插入骨髓腔内,将骨髓冲洗入离心管,然后用吸管吹打骨髓团块使其均匀,以 1 000 r/min 速度离心 10 min,用滴管吸去上清液。

6.6.2.2 低渗:加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 9 mL,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37 °C 水浴中低渗 20 min。

6.6.2.3 预固定:立即加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)1 mL,混匀,以 1 000 r/min 速度离心 10 min,用滴管吸去上清液。

6.6.2.4 固定:加入 7 mL 固定液,混匀,固定 10 min~20 min,以 1 000 r/min 速度离心 10 min,用滴管吸去上清液。用同法再固定 2 次。

6.6.2.5 加入 0.1 mL~0.5 mL 新鲜固定液,用细口滴管充分混匀。

6.6.2.6 在洁净的冷冻玻片上滴 3 滴~4 滴细胞悬液,轻吹细胞悬液扩散平铺于玻片上,将玻片在酒精灯上微热烘烤,空气中自然干燥。每个标本制片 2 张~3 张。

6.6.2.7 染色:将制备好的标本片放入 Giemsa 应用液中染色 15 min~20 min,用蒸馏水冲洗、晾干。

6.6.3 阅片

6.6.3.1 所有玻片,包括阳性对照和阴性对照,在镜检前要分别编号。

6.6.3.2 在低倍镜下检查制片质量,制片应全部染色体较集中,而各个染色体分散、互不重叠、长短收缩适中、两单体分开、清晰地显示出着丝点位置、染色体呈红紫色。用油镜进行细胞中期染色体分析。

6.6.3.3 确定有丝分裂指数;包括所有处理组、阴性对照组和阳性对照组(每只动物计数 1 000 个细胞)。

6.6.3.4 计数畸变细胞:用双盲法阅片。每只动物至少分析 100 个分散良好的中期分裂相细胞,每只动物至少分析 1 000 个细胞,测定有丝分裂释放以确定细胞毒性。在阅片时应记录每一观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录显微镜视野的坐标位置及畸变类型。

6.6.3.5 观察项目:

a) 染色体数目的改变:非整倍体(亚二倍体或超二倍体),多倍体,核内复制。

b) 染色体结构的改变:断裂、微小体、有着丝点环、无着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙和非特定性型变化(如粉碎化、着丝点细长化、粘着等)。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

每一实验动物作为一个观察单位,每组动物按性别分别计算染色体结构畸变细胞百分率。若雌、雄动物之间无明显的性别差异时可合并计算结果。一般用卡方检验方法进行统计学分析。裂隙应分别记录和报告,但一般不计入总的畸变率。

7.2 结果评价

评价时应从生物学意义和统计学意义两个方面进行分析。受试样品组细胞染色体畸变率与阴性对照组相比,细胞染色体结构畸变数增加或异常中期分裂相增加,统计学意义上有显著性差异,并呈剂量-反应关系或在一个受试样品组出现染色体畸变细胞数明显增高时,并经重复试验证实,即可认为染色体畸变试验阳性。若统计学上差异有显著性,但无剂量-反应关系,则须进行重复试验,结果能重复者可确定为染色体畸变试验阳性。

多倍体的增加提示受试样品具有潜在的诱导染色体数目畸变的作用。核内复制的增加提示受试样品具有潜在的抑制细胞发育的作用。

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) 受试样品稳定性、配制方法、所用溶剂或载体及其选择的理由、受试样品在溶剂中的溶解度和饱和度;
- b) 实验动物种属/品系、数量、年龄、性别、试验开始时各动物的体重(包括体重范围、每组动物体重平均值和标准差)、来源(注明合格证号和动物级别);
- c) 实验动物饲养环境,包括饲料来源(注明合格证号)、饮水质量、室温、相对湿度、动物实验室合格证号;
- d) 剂量分组及选择剂量的基本原则,阳性和阴性对照资料(包括当前和历史的资料)、染毒途径和方式,采样时点;
- e) 细胞分裂中期阻断剂名称、使用浓度及处理间隔时间;
- f) 试验方法:简述操作步骤,所用统计学方法,结果判定标准;
- g) 结果:中毒症状、有丝分裂指数、每只动物细胞染色体畸变类型和畸变数、每组动物细胞畸变总数及均数和标准差、每组畸变细胞数及均值和标准差、多倍体、剂量-反应关系、阴性对照的参考资料、历史资料及范围、均值和标准差、阳性对照的参考资料等。以列表方式报告受试样品组、溶剂对照组和阳性对照组动物骨髓细胞染色体畸变类型和数量及畸变率;
- h) 结论。

9 结果解释

阳性结果表明在本试验条件下受试样品具有引起受试动物骨髓细胞染色体畸变的能力。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起受试动物骨髓细胞染色体畸变。