

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.24—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 24 部分：慢性经口毒性试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 24: Chronic 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 24 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、郑玉新、李斌、史晓祎。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 24 部分:慢性经口毒性试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物慢性经口毒性试验的目的、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

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

通过经口途径,反复给予实验动物不同剂量的受试化学品,观察实验动物的慢性毒性效应、严重程度、靶器官和损害的可逆性,确定 NOAEL,为拟定人类接触该化学品的工作场所职业接触限值提供依据。

5 试验概述

在实验动物的大部分生命期间将受试样品经口途径染毒,通常动物连续染毒 1 年以上,观察动物的中毒表现,并进行生化指标、血液学指标、病理组织学等检查,以阐明此化学品的慢性毒性。

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) 受试样品的物理、化学性质(可包括:外观、沸点、熔点、折射率、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、光化学性质、电离度、粒度、密度等)。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 接受受试样品的日期应登记

开始试验前应有适当数量的受试样品,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 实验动物的年龄、数量和性别

啮齿类动物断奶后作短期适应环境之后要尽快开始试验,尽早使动物在生长的快速期接触受试样品。每组动物不少于 50 只(非啮齿类动物每组至少 8 只),雌雄各半,同性别体重差异不超过平均体重的 10%。如试验期间计划提前剖杀一些动物,或在染毒结束时留一部分动物观察,试验开始时要相应增加动物数量。试验结束时各剂量组每种性别的动物要能满足统计学要求(每组每性别动物应不少于 10 只)。

6.2.2 饲养环境和条件

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。

每一房间只能饲养一种动物;每一房间只供一种受试样品试验用(除非有证据表明不同受试样品对动物无影响),也应考虑受试样品对对照组动物的影响。笼具等物品应便于消毒和清洁,应避免使用消毒剂 and 农药等,特别是与动物有密切接触的部位更应注意,因为这类活性物质对试验结果可能产生影响。

饲料应满足动物营养需要,应定期分析饲料成分(包括营养成分和杂质等),不应含对试验有影响的杂质,分析结果应在鉴定报告列出。

如果受试样品掺在饲料或饮水中染毒,应测定受试样品在饲料或饮水中的稳定性和均匀性。在试验开始前应制定定期制备受试样品饲料或饮水的时间表。

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。

应评估饲料消毒对营养成分的影响,并对损失的营养成分作适当补充。对化学消毒剂(如环氧乙烷)的消毒效果应进行生物检测。必要时对饮水的水质也应监测。

食盒内饲料应定期更换,约每周一次。动物自由饮水。

6.3 试验设计

6.3.1 剂量设计

至少要设三个剂量组及一个相应的对照组。剂量选择可根据急性毒性、亚急性毒性、亚慢性毒性、

蓄积毒性和代谢研究等资料确定。高剂量组可以出现某些较轻或较明显的毒性反应,个别动物可能死亡;低剂量不应引起任何毒性反应;中剂量介于高剂量和低剂量之间,动物可能产生轻微的毒性效应。通常每天染毒一次,但根据染毒途径而有不同。受试样品加入饲料或饮水中进行经口试验时可连续染毒。染毒频率可根据毒物代谢学资料而调整。

此外,可另设一追踪观察组,即选用 20 只动物(雌雄各半),给予高剂量受试样品,染毒 2 年,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;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。

6.3.2 对照组

应设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其他介质,其他条件均与染毒组相同。若染毒必须加入溶剂或赋性剂,同时还应设相应的对照组。

6.4 染毒途径和周期

可将受试样品混入饲料或饮水,或采用灌胃法或药囊法染毒。受试样品混在饲料或饮水中应每周 7 d 染毒,如灌胃或用药囊法,考虑到实际工作方便,也可每周染毒 5 d,但染毒停顿可使动物得到一定程度恢复,或会影响结果及最后的评价。

动物连续染毒 1 年以上,小鼠通常为一年半,大鼠通常为 2 年。

6.5 临床观察

6.5.1 试验期内每天至少详细观察一次,还应增加必要的观察次数并采取适当的措施尽量减少动物损失,如对死亡动物进行解剖,对质弱或濒死动物隔离、处死并剖检,仔细记录毒性作用的开始时间及其进展情况,减少因疾病、自溶或被同类所食造成的动物损失。

6.5.2 观察期间对动物的任何毒性表现均应记录,包括神经系统、眼睛变化、肿瘤和死亡等,记录其开始时间及进展情况。

6.5.3 逐个记录体重变化,前 13 周每周记录一次,此后每 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则至少一个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水量,以便计算受试样品摄入量。

6.6 临床检查

6.6.1 血常规检查和其他血液指标检查

检查指标可包括血红蛋白浓度、红细胞压积、红细胞数、血小板数、白细胞计数与分类、凝血功能等指标。在染毒开始后第 3 个月和第 6 个月各检查一次(如果没有该种动物品系的历史资料时,可在试验开始时做正常值),此后每隔约 6 个月检查一次,试验结束时检查一次。大鼠每组每性别可检查 10 只,非啮齿类动物应全部检查。每次检查的动物最好相同。

在试验过程中如有动物健康状况恶化,对该动物作白细胞分类计数。白细胞分类计数通常先在高剂量组和对照组进行,如高剂量组有问题才依次再检查较低剂量组动物。

6.6.2 尿液检查

收集各组动物尿样进行分析,大鼠每组每性别可检查 10 只,非啮齿类动物应全部检查,每次检查的动物最好相同,检查时间间隔与血常规检查一致。

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。

6.6.3 临床生化检查

在染毒开始后第3个月和第6个月各检查一次(如果没有该种动物品系的历史资料时,可在试验开始时做正常值),此后每隔约6个月检查一次,试验结束时检查一次。大鼠每组每性别可检查10只,非啮齿类动物应全部检查。每次检查的动物最好相同。

检查指标主要包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、白蛋白(Alb)、总蛋白(TP)。如有必要还应做电解质平衡、钙(Ca)、磷(P)、氯(Cl)、钠(Na)、钾(K)、空腹血糖(Glu)(禁食时间要适当)、碱性磷酸酶(ALP)与总胆红素。在某些情况下,还应检测与肝或其他器官有关的酶和胆酸,以及脂类化合物、激素、高铁血红蛋白、胆碱酯酶(ChE)活性等分析。如出现肉眼可见的脏器改变,可增加与之相应的血液生化指标。还可增加其他脏器以进一步对观察到的毒性反应进行研究。

6.6.4 大体解剖

所有动物,包括在试验过程中死亡或濒死而被处死的动物均应进行大体解剖。如果处死动物,处死前应收集其血样进行白细胞分类计数。保存所有肉眼可见病变、肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析大体解剖与病理组织学检查结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存。一般包括下列器官和组织:脑、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、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、生殖附属器官、雌性乳腺、皮肤、肌肉、外周神经、脊髓(颈,胸,腰段)、胸骨或股骨(包括关节)和眼睛。肺和膀胱用固定剂填充能保存更好。

啮齿类动物的脑、肝、脾、肾、肾上腺、性腺组织器官应称重,非啮齿类动物还包括甲状腺及甲状旁腺,每组每性别称10只。

6.6.5 病理组织学检查

对所有肉眼可见的肿瘤和异常的组织器官应进行病理组织学检查。

对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的组织器官进行病理组织学检查并详细描述。

试验结果证明某一剂量组的动物正常寿命发生明显改变或诱发了影响毒性反应的效应,则下一个剂量组也应做病理组织学检查。

如果怀疑某种病变是由受试样品引起的,则应对所有剂量组动物的相应器官和组织进行病理组织学检查。

某一剂量组病理组织学检查有问题时,下一剂量组需作病理组织学检查。

如高剂量组与对照组病理组织学检查存在明显差别,则其他剂量组的相应器官和组织也应进行病理组织学检查。

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,统计学方法应在试验设计时确定。

7.2 结果评价

慢性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与是否出现毒性反应、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。成功的慢性试验应能够提出安全性评价中有意义 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) 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;
- o) 进行该试验的实验室的名称和地址、试验日期、试验和报告负责人;
- p) 评价报告还应包括所有必要的信息,对试验过程和结果评价提供全面而准确的描述。应包括摘要、资料分析和结论等,摘要应对试验资料以及任何与对照组比较有异常的数据进行概括。

9 结果解释

慢性经口毒性试验能够提供受试样品在长期接触该受试样品时的毒性作用资料,为拟定人类接触该化学品的职业接触限值提供依据。但由于本试验并不主要研究受试样品致癌性,确定受试样品致癌性仍有限。
