

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.27—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 27 部分：致癌试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 27: Carcinogenicity 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 27 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、郑玉新、李斌、孙金秀、李霜。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 27 部分:致癌试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物致癌试验的目的、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致癌性。

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、GBZ/T 224 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验目的

观察化学品对实验动物的致癌作用。当某种化学物质经短期筛选试验证明具有潜在致癌性,或其化学结构与某种已知致癌物十分相近时,而此化学物质有一定实际应用价值时,就需用致癌性试验进一步验证。动物致癌性试验可为人体长期接触该物质是否引起肿瘤提供资料。

5 试验概述

在实验动物的大部分生命期间将受试化学物质以一定方式染毒,进行病理组织学等检查,观察动物的大部分或整个生命期间及死后,检查肿瘤出现的数量、类型、发生部位及发生时间,与对照动物相比以阐明此化学物质有无致癌性。

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各种资料。

- a) 受试样品的商品名和其他名称(包括 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、密度、折射率、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、ppm 和 mg/m^3 换算系数、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的稳定性);
- d) 受试样品的成分、主要杂质;
- e) 受试样品的生产方法、合成路线;
- 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) 人类可能接触的途径和水平。

6.1.2 登记接受样品的日期

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,应分别测定每一批受试样品的纯度和杂质。

6.2 实验动物和饲养环境

6.2.1 动物种系的选择

对活性不明的受试样品需用两种动物进行致癌性评价,一般选用大鼠和小鼠,这两种动物生命周期较短、饲养成本较低、常用于药理学和毒理学研究、对致癌物较敏感等,而且有相当多的生理学和病理学资料。

在选择合适的动物种类和品系时,应注意该物种对某些肿瘤的易感性,如小鼠对肝肿瘤易感性大于大鼠,相反,大鼠对皮下肿瘤的易感性又大于小鼠。

非啮齿类动物,尤其是狗或灵长类动物过去极少使用。这类动物使用数量受限、观察期长,而且无证据显示其肿瘤发生情况与人接近。如果采用这类动物进行试验,可参照啮齿类动物试验的方法。

有时也采用豚鼠和兔,其敏感性与啮齿类动物相差无几,但生命期长、饲养相对困难。

应有动物自发肿瘤的资料。

6.2.2 动物性别和年龄

应使用两种性别的动物。应使用刚断乳的动物进行致癌试验,尽量使动物有更长的时间接触受试样品。

6.2.3 实验动物数

为了最大限度保证试验结果的可靠性和满足统计学处理,动物应随机分成试验组和对照组,而且每组都应有相当多的动物数,保证试验结束时有足够的动物进行详细的生物学和统计学分析。

每一个剂量组和对照组至少应有 50 只雄性和 50 只雌性的动物。如果提前剖杀部分动物,应适当增加数量。如设附加组,高剂量组还应增加雌雄动物各 20 只,对照组增加雌雄动物各 10 只。

6.2.4 动物的管理、饲料和饮水

6.2.4.1 实验动物和动物试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、饲料的杂质、空气、饮水、垫料、疾病、药物治疗等都对试验结果产生影响。购入动物需经检疫方能用于试验。

6.2.4.2 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,还应避免受试样品对对照组动物的影响。

6.2.4.3 笼具等物品应便于消毒和清洁,应避免使用消毒剂和农药等,特别是与动物有密切接触的部

位更应注意,因为这类物质对试验结果可能产生影响。

6.2.4.4 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),应不含对试验有影响的杂质或含有的杂质成分不超过相关标准,目前已明确某些具有抑癌作用的物质(如抗氧化剂、不饱和脂肪酸、硒等)对致癌试验有影响,而有些致癌物质如农药、氯烃、多环芳烃、雌激素、重金属等也可影响致癌试验。应在评价报告列出饲料成分分析结果。

6.2.4.5 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。

6.2.4.6 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的浓度不应超过5%,否则会对动物正常营养产生影响。必要时应监测饮水中的污染物。应定期更换食盒内饲料,约每周一次。动物自由饮水。

6.3 试验分组

为了评价受试样品的致癌性,至少要设三个剂量组及一个对照组。高剂量组可以出现某些较轻的毒性反应,如血清酶水平改变或体重减轻(减少程度不多于10%)等,但不能明显缩短动物寿命(肿瘤引起的除外)。低剂量不能引起任何毒性反应,不应影响动物的正常生长、发育和寿命。中剂量应介于高剂量和低剂量之间,动物可能产生轻微的毒性反应。以上剂量的选择应根据现有资料制定,最好能根据亚慢性毒性试验资料,如有代谢动力学资料更好。

通常每天均应染毒,但根据染毒途径可有不同。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。

对照组动物除不接触受试样品及其他介质外,其他处理均与染毒组相同。若需对溶剂或添加剂对照组染毒,应加入溶剂或添加剂,这些溶剂或添加剂不应影响受试样品的吸收或引起毒性作用,同时还应设相应的助剂对照组。

6.4 染毒途径

6.4.1 经口

如果受试样品可通过胃肠道吸收,最好选用经口途径。可将受试样品混入饲料或饮水中喂饲,每周染毒7d;也可采用灌胃,最好是每周染毒7d,但考虑到实际工作方便,可每周灌胃5d。

6.4.2 经皮

皮肤接触方式可能是人类接触化学品的一个主要途径,可作为诱发皮肤病变的试验模型。最好每周染毒7d,也可每周染毒5d,具体染毒方法参照GBZ/T 240.25(慢性经皮毒性试验)。

6.4.3 经呼吸道吸入

6.4.3.1 染毒时间

间歇暴露方式的染毒时间为每天6h,每周5d;连续暴露方式的染毒时间为每天23h,每周7d。染毒时间从染毒柜达到预定浓度开始计算。无论哪种暴露方式,浓度都要求恒定。动物在这两种暴露方式中的主要不同是间歇暴露的动物每天有17h~18h恢复,而且在周末恢复时间更长。

6.4.3.2 染毒方式

采用哪一种染毒方式取决于试验设计和人类的主要接触方式。虽然连续暴露方式模仿环境暴露条件,但对设备的要求更高,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(最好能提供饮水)。

6.4.3.3 染毒柜

染毒柜的设计应保证换气次数达到12次/h~15次/h;柜内氧含量19%左右;柜内受试样品浓度均匀;对照组与剂量组动物的染毒柜的设计应完全一致;应保证笼内动物不拥挤,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%;染毒柜应保持一定的负压,以防受试样品意外漏出。

6.4.3.4 物理参数监测

6.4.3.4.1 应连续监测,保证管道通畅以及各个染毒柜条件相同;

6.4.3.4.2 连续监测空气流量;

6.4.3.4.3 尽量保持恒定柜内受试样品浓度;

6.4.3.4.4 应连续监测柜内温湿度,温度 $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度30%~70%(水性受试样品染毒时除外)。

6.4.3.4.5 粒径大小:粒子应是可吸入大小,在动物呼吸带采样检测。在气溶胶发生装置调试时应多次进行检测,稳定后可定期检测。

6.5 染毒周期

小鼠和仓鼠通常染毒18个月,大鼠通常为24个月。如果低剂量或对照组动物存活率只有25%时,可以结束试验。如两性别有明显差异,应将雌雄性动物的试验视为两个试验,其结束的时间也可以不同。个别情况下因受试样品毒性作用造成高剂量组动物过早死亡,此时不应结束试验。

任何一组的动物损失都不能高于10%;小鼠和仓鼠在18个月,大鼠在24个月时,各组动物存活率不小于50%。

6.6 临床观察

6.6.1 试验期内每天应至少详细观察一次。必要时还应增加观察次数,并采取适当措施减少动物损失,如对死亡动物进行解剖,对质弱或濒死动物隔离、处死、冷藏并剖验,并仔细记录毒性作用的开始时间及其进展情况。

6.6.2 应记录所有动物临床表现和死亡情况,特别应注意肿瘤的发生和发展,如肿瘤出现的时间、部位、大小、外观和进展情况。

6.6.3 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。

6.6.4 建议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。

6.7 临床检查

6.7.1 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),此后约每隔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。

本试验一般不要求进行尿常规和临床生化等检验。

6.7.2 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。在吸入试验,整个呼吸系统的组织器官包括鼻、咽喉等均应检查。脑、肝、脾、肾、肾上腺、性腺需称重。

如有必要还可进行其他方面的检查,其结果常可向病理组织学检查提供重要提示。

6.7.3 病理组织学检查

理论上应对所有脏器进行全面的检查,但也可简化为以下顺序:

- a) 应对所有肉眼可见的肿瘤和怀疑肿瘤组织器官进行病理组织学检查;
- b) 应对试验过程中死亡或处死的动物、所有高剂量组和对照组动物的器官和组织进行病理组织学检查,详细描述其病变情况,特别是增生、癌前病变和癌变情况;
- c) 如果试验结果显示高剂量组动物某些组织器官增生、癌前病变和癌变与对照组比较有显著增加,应检查所有组别动物相应的组织器官(但如果高剂量组动物生存率很低,则应检查下一剂量组,然后再作比较);
- d) 如果试验结果显示高剂量组动物的生存期明显缩短,肿瘤的发生可能因而受到影响时,应再检查下一剂量组;
- e) 参考受试动物自发肿瘤或可疑癌变方面的资料(如相同试验条件下的历史资料),以便评估染毒组动物病变的变化情况。

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,显示试验各时段各组动物数、出现肿瘤及可疑肿瘤组织的动物数、肿瘤类型等。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。

试验组与对照组动物的平均寿命应基本相同,如果差别较大将会影响试验结果的可靠性。因肿瘤发生率和动物寿命关系极大,所以,统计分析试验结果时,一定要列出各组动物的平均寿命。

7.2 肿瘤统计指标及分析注意事项

7.2.1 肿瘤发生率 肿瘤发生率是整个试验结束时患肿瘤动物数在有效动物总数中所占的百分率。有效动物总数指最早出现肿瘤时的存活动物总数。

$$\text{肿瘤发生率} = \frac{\text{试验结束时患瘤动物总数}}{\text{有效动物总数}} \times 100\%$$

7.2.2 在分析受试样品致癌性时应注意:

- a) 不常见的肿瘤类型;
- b) 在多个部位发生肿瘤;
- c) 不同染毒途径均诱发肿瘤;
- d) 在不同种系动物或两性别动物均诱发肿瘤;

- e) 从癌前病变到癌变的进展情况；
- f) 癌前病变的潜伏期缩短；
- g) 转移；
- h) 肿瘤异常增大或增多；
- i) 恶性肿瘤的比例；
- j) 剂量-效应关系显著。

7.3 结果评价

7.3.1 致癌试验阳性的判断标准

试验组与对照组之间的数据经统计学处理后,以下任何一项有显著性差异即可认为受试样品的致癌作用为阳性:

- 肿瘤只发生在剂量组动物中,对照组无该类型肿瘤;
- 剂量组与对照组动物均发生肿瘤,但剂量组发生率明显增高;
- 剂量组动物中多发性肿瘤明显,对照组中无多发性肿瘤或只少数动物有多发性肿瘤;
- 剂量组与对照组动物肿瘤的发生率无显著性差异,但剂量组中肿瘤发生的时间较早。

应指出,染毒组和对照组肿瘤发生率差别不明显,但癌前病变差别显著时,不能轻易否定受试样品的致癌性。

另外,自发性肿瘤一般只出现于生命较晚和好发于内分泌腺或与内分泌功能有密切联系的组织,如垂体、肾上腺、睾丸及乳腺等。

7.3.2 致癌试验阴性结果的判断

假如动物试验的规模为两种动物、两个性别,至少3个剂量水平(其中一个接近最大耐受剂量),每组动物数至少50只,试验组肿瘤发生率与对照组无差异,才可判为阴性结果。

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) 血液学检查结果;
- b) 眼科检查结果;
- c) 肿瘤发生的时间及其发展情况;
- d) 按性别和剂量的大体解剖和组织病理学检查,说明肉眼可见和镜检病变的性质;
- e) 病理组织学检查所见的详细描述;
- f) 对结果进行处理的统计学方法;
- g) 数据处理和结果评价,包括肿瘤发生率、致癌性试验阳性的判断标准,对结果进行处理的统计学方法。

9 结果解释

致癌试验能够提供受试样品在长期反复接触时的致癌作用资料。一种动物显示受试样品有致癌性或可疑致癌性时,应怀疑该受试样品对人也有潜在的致癌性,如果多种(至少为两种)动物致癌性为阴性时,可认为该化学品对人具致癌性。